

R-27.815 1054698

S 7D M/236

CS 110
16 FEB. 1998

TD
M/236

STD 616-008
MAR

El Jefe del Departamento de Teoría

Gracia Márquez

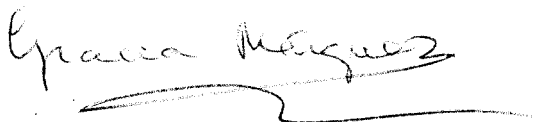
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

**TRANSDUCCION DE SEÑALES EN LINFOCITOS. IMPLICACION DE LA
CALCINEURINA Y ACTIVACION A TRAVES DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE
(CD69)**

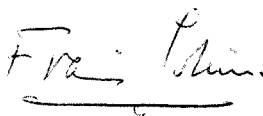
Tesis presentada para optar
al grado de Doctor en Farmacia por
Gracia Márquez Villegas
Director: Prof. F. Sobrino Beneyto

**TRANSDUCCION DE SEÑALES EN LINFOCITOS. IMPLICACION DE LA
CALCINEURINA Y ACTIVACION A TRAVES DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE
(CD96)**

Gracia Márquez Villegas

A handwritten signature in cursive script that reads "Gracia Márquez". The signature is written in black ink and is underlined with a single horizontal stroke.

Director de tesis.

A handwritten signature in cursive script that reads "F. Sobrino Beneyto". The signature is written in black ink and is underlined with a single horizontal stroke.

F. Sobrino Beneyto
Prof. Titular de Bioquímica
Médica y Biología Molecular.
Universidad de Sevilla.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

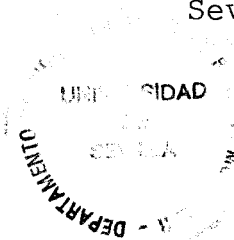
AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 SEVILLA

DÑA. CARMEN OSUNA FERNANDEZ, Profesora titular y Directora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

que el trabajo titulado "Transducción de señales en linfocitos. Implicación de la calcineurina y activación a través de antígenos de superficie (CD69), ha sido realizado en este Departamento por Dña. Gracia Márquez Villegas, bajo la dirección del Dr. D. Francisco Sobrino Beneyto y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, Febrero de 1998


C. Osuna

Fdo.: Dra. Carmen Osuna Fernández

ABREVIATURAS.

PBS	buffer fosfato salino
KRB	Krebs Ringer Bicarbonato Hepes
Hepes	ácido-(2-hidroxietil)-1-Piperacina etanosulfónido
PMFS	fenilmetilsulfonilfluoride
AMPc	adenosina 5`-monofosfato cíclico
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
DTT	ditiotreitól
BSA	albúmina de suero bovino
ATP	adenosina 5`-trifosfato
EDTA	ácido etilen-diaminotetraacético
PNPP	p-nitrofenilfosfato
SDS	dodecil sulfato de sodio
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
EDC	1-etil-3-dimetilaminopropilcarbodiámidá
CaM	calmodulina
TNF	factor de necrosis tumoral
PKC	proteína quinasa C
CsA	ciclosporina A
PHA	fitohemaglutinina
IL-2	interleucina 2
Pi	fosfato inorgánico
CAT	cloroanfenicol acetil transferasa
AcM	anticuerpo monoclonal
PMA	12-o-tetradecanoilforbol 13-acetato
NK	células asesinas
aa	aminoácido

PTK proteína tirosina cinasa
PTP proteína tirosina fosfatasa
PhAsO óxido de fenil arsinio

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

El conocimiento de la respuesta inmune como sistema de defensa frente a la invasión de organismos extraños ha alcanzado en los últimos años un alto nivel. El sistema inmune además de significar un elemento esencial en el sistema de defensa también ha sido tomado por gran numero de investigadores como un modelo experimental para el estudio de multitud de procesos, tales como los mecanismos de proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Descubrimientos de los últimos diez años han revelado que en las células del sistema inmune convergen, además de las clásicas rutas bioquímicas estudiadas en otras células somáticas, unos nuevos mecanismos tales como la síntesis y autorregulación por linfocinas altamente específicas. Hoy en día existen unas áreas de intensa investigación que se dirigen al descubrimiento de estas nuevas hormonas autocrinas, así como los mecanismos intracelulares que ellas ponen en marcha. Otros estudios se dirigen hacia el análisis de los mecanismos nucleares que, regulados por factores de transcripción, son puestos en marcha por acción de estas citoquinas. Así pues, se puede hoy en día dibujar un esquema altamente complejo en el cual las citoquinas y otros factores hormonales clásicos inciden sobre las células del sistema inmune y conducen a su destrucción, a su proliferación o a la síntesis de nuevos factores que van a interaccionar con las células vecinas. Todos estos procesos conllevan a cambios en lo que se conoce hoy en día como transducción de señales. En un sentido amplio podríamos definirla como el conjunto de modificaciones en

proteínas, derivados de ácidos grasos, y otros segundos mensajeros, que finalmente pueden converger en el núcleo a través de señales (tales como factores de transcripción), induciendo o reprimiendo la transcripción de genes específicos.

En nuestra investigación, objeto de esta tesis doctoral, hemos intentado analizar de forma muy específica algunas de estas señales. En primer lugar nos referiremos a estudios centrados en el papel de la calcineurina en del p53 y del NFKB cuando se une al promotor HVI-1 LTR. Hay que resaltar que la calcineurina, un enzima descubierto a principios de los años setenta como una fosfatasa dependiente del calcio y la calmodulina, se considera hoy en día como una etapa central en la regulación de la actividad de muchos factores de transcripción. Esta función fue descubierta gracias a estudios realizados con la ciclosporina. A esta molécula, actuando como inmunosupresor no citotóxica, es capaz de enlazar con su receptor citoplasmático, una proteína llamada ciclofilina; y el complejo activo de ambos inhibe la actividad calcineurina. Este enzima fosfatasa (serina/treonina fosfatasa) no inhibible por acción del ácido okadaico, participa en la activación del NFAT defosforilándolo y permitiendo su traslocación al núcleo. Allí en conjunción con los factores c-Fos y C-Jun se une a la región promotora de genes muy específicos (IL-2) induciendo su transducción. Descubrimientos recientes han puesto de manifiesto que la calcineurina se encuentra también en el núcleo en donde defosforila a factores específicos en contraposición a otras cinasas que utilizan como substratos a estos factores.

Otra línea de investigación que hemos seguido trataba de

analizar la función de la calmodulina en estos procesos. Por problemas metodológicos centrados en la unión débil de la calmodulina a las membranas usadas para la transferencia, estos estudios han quedado relegados a la espera de unas soluciones técnicas. Presentamos como trabajo tanto la producción y purificación de anticuerpos policlonales anti CaM, así como una metodología tendente a la mejora técnica del inmunoblotting con anti CaM. También presentamos un método alternativo al inmunoblot para la detección de la CaM usando técnicas de marcaje de proteínas con I^{125} . Estos problemas han sido parcialmente resueltos gracias a la donación de anticuerpos monoclonales anti CaM, los cuales detectan la CaM con más sensibilidad que lo hacía nuestro anticuerpo policlonal.

Por último, presentamos como materia de esta tesis doctoral un trabajo realizado en colaboración con el departamento de Inmunología del hospital de la Princesa de Madrid en el cual se investigan las señales de transducción implicadas en la capacidad mitogénica de un anticuerpo dirigido contra una proteína de la superficie de los linfocitos denominada CD69. Aunque no se conoce el ligando fisiológico de este receptor, la estimulación con mAb contra esta proteína induce la activación de linfocitos T. Hemos estudiado la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$, así como la modulación de su actividad. Es nuestro objetivo continuar este tipo de análisis incluyendo la participación de la calcineurina, ya que como se describe en el trabajo la CsA inhibe tanto la fosforilación en tirosina como la disociación del $p56^{lck}$ en una forma más lenta ($p60^{lck}$).

En resumen también además de los trabajos referidos, se

describen una serie de técnicas que hemos utilizado a lo largo del período de este período de formación y que incluye tanto la purificación de proteínas, producción de anticuerpos, técnicas de electroforesis y medida de actividades enzimáticas.

II. MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. LINFOCITOS Y CELULAS JURKAT.

OBTENCION Y CULTIVO.

Los linfocitos humanos se aislaron de sangre de donadores sanos por centrifugación en Ficoll de la sangre diluida 1:2 con 0.9% de ClNa, y posterior lavado con PBS (ClNa 0.14 M, ClK 2.7 mM, PO_4HNa_2 8.1 mM, PO_4KH_2 1.5 mM, pH 7.2-7.4), según el método que se describe en (1).

Las células Jurkat (células linfoides), después de ser descongeladas, se cultivaron una semana en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U Penicilina y 100 μg Estreptomicina, a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 y 95% de O_2 , antes de su uso.

TRATAMIENTO.

Las incubaciones de las células con los diferentes estímulos se realizaron en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U de Penicilina y 100 μg de Estreptomicina a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de O_2 . En algunos experimentos que fue necesario modificar la composición del medio se utilizó medio Krebs Ringer bicarbonato (KRB) tamponado con Hapes (Hapes 10 mM pH 7.4, ClNa 118 mM, ClK 4.75 mM, Cl_2Ca 1.25 mM, PO_4KH_2 1.18 mM, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18 mM, CO_3HNa 25 mM y 10 mM de glucosa).

Después del tratamiento las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron en un buffer de lisis con inhibidores de fosfatasas (ortovanadato sódico 2 mM, FNa 10 mM y $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_2$ 10 mM) y de proteasas (2 mM PMFS, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina). Se sonicaron 3 veces 5 segundos en frío y

secentrifugaron 1 minuto a 12.000 rpm, recogién dose el sobrenadante.

2. ANALISIS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

A. CALCINEURINA (FOSFATASA 2B).

A.1. METODO RADIOACTIVO.

A.1.1. Marcaje del péptido.

Un péptido sintético (Asp-Leu-Asp-Val-Pro--Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu) correspondiente al sitio de fosforilación de la subunidad RII de la proteína cinasa dependiente del AMPc, se marcó con ATP-P³² según se describe en (2). Para ello se usó proteína cinasa A (PKA) (subunidad catalítica de la proteína dependiente del AMPc).

El péptido una vez marcado se separa en alicuotas que se congelan a -80°C hasta el momento de su uso.

A.1.2. Medida de la actividad calcineurina.

6×10^6 de células se incubaron con los diferentes estímulos a 37°C durante los tiempos que se indican. La incubación se paró por centrifugación suave y posterior lavado de las células con PBS frío (2 veces). A continuación se lisaron por la adición de 50 µl del buffer de lisis hipotónico (Tris-ClH 50 mM pH 7.5, EGTA 0.1 mM, EDTA 1mM, DTT 0.5 mM, PMFS 2 mM, 5 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml de aprotinina). Se sonicaron 5 segundos y se centrifugaron a 12000 rpm 5 minutos a 4°C. El lisado se usó para medir actividad calcineurina.

La medida de la actividad calcineurina fue realizada por el método descrito por (3), usando como sustrato de la reacción un péptido sintético marcado con ATP-P³² como se describe en el apartado anterior. Para separar el fosfato inorgánico liberado

del péptido marcado, se pasó la mezcla por una columna de Dowex AG 50W-X8. El P^{32} liberado se midió con un contador β .

A.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

A.2.1. P-nitrofenilfosfato.

Los linfocitos se homogenizaron en buffer de incubación (Hepes 25 mM pH 7.5, Cl_2Mg 5 mM, Tritón X-100 0.05%, Cl_2Ca 1 mM y EDTA 100 μ M) y se sonicaron tres veces 5 segundos en frío. Después se centrifugaron 10 minutos a 15000 rpm, y se recogió el sobrenadante, al cual le medimos la concentración de proteínas por el método de Lowry (4).

A continuación se mezcló 0.5 mM de Cl_2Ni , 1 mM de Cl_2Mn , 0.5 μ M de calmodulina, 20 nM de calcineurina o un volumen de lisado de células equivalente a 40 μ g de proteínas, y buffer de incubación hasta un volumen final de 1 ml. La reacción se lanzó al añadir p-nitrofenilfosfato (PNPP) a una concentración final 3 mM. Después se incubó a 37°C y se midió la absorbancia a 420 nm a diferentes tiempos.

A.2.2. Malachita Green (MG).

Este método se basa en que el fósforo inorgánico forma un complejo estable con el reactivo Malachita Green a pH ácido, con un alto $\epsilon=112.000$. Este complejo es estabilizado con Tween 20.

Para preparar el reactivo color (MG-molibdato-Tween 20) se mezcló una solución acuosa de Malachita Green (MG) al 0.045% y molibdato amónico en la siguiente proporción: 3 volúmenes de MG más 1 volumen de molibdato amónico al 4.2% en CLH 4N. Se agitó 30 minutos y se filtró por papel Whatman. A continuación, para preparar el reactivo color, se mezcló 2 ml de la solución anteriormente preparada con 10 μ l de 2% de Tween 20

(concentración final 0.01%). Este reactivo color es estable una semana a 40C.

A continuación se realizó la curva patrón. Para ello se prepararon una serie de soluciones diluidas a partir de una solución stock 1 mM de KH_2PO_4 en SO_4H_2 0.01N (previamente el KH_2PO_4 se debe secar 4 horas a 800C), de forma que 5 μl de la solución diluida fuera equivalente a 1000, 500, 250 y 50 pmoles de KH_2PO_4 .

Para hacer la curva patrón se mezcló 5 μl de la solución diluida de KH_2PO_4 (equivalentes a 1000, 500, 250 o 50 pmoles) más 95 μl de SO_4H_2 0.01N y 150 μl de reactivo color. Se incubó 10 minutos con agitación a temperatura ambiente, y se midió en el lector de placas (MIOS-MERCK) a 630 nm. Para el blanco se mezcló 100 μl de SO_4H_2 0.01N más 150 μl de reactivo color.

Todos los ensayos se hacen por duplicado.

B. ACTIVIDAD CINASA (TIROSINA CINASA).

El ensayo se realizó según Chan y col. (5). Inmunocomplejos obtenidos de inmunoprecipitar con AcM anti-CD69 fueron lavados secuencialmente en 0.2% de NP40 en PBS una vez, dos veces con LiCl 0.5 M/ Tris-ClH 50 mM pH 7.4 y una vez con agua destilada. A continuación se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en 30 μl de buffer cinasa (Cl_2Mg 10 mM, Cl_2Mn 10 mM, Tris-Cl 20 mM pH 7.4) conteniendo 10 nM de ATP y 16 μCi de $\text{ATP}[\gamma\text{-P}^{32}]$ (6000Ci/nmol, Dupont) para la fosforilación del p56^{lck} . Después los inmunocomplejos fueron lavados tres veces con 1 ml de agua destilada, resuspendidos en 30 μl de buffer cinasa y 10 μl de sample buffer reductor (x4), calentados 5 minutos a 950 C y centrifugados. A continuación se realizó SDS-PAGE, y el gel se tiñó con azul de Coomassie.

Después se secó el gel y las muestras se analizaron por autoradiografía.

3. INMUNOPRECIPITACION.

Las células (7×10^6), linfocitos o células Jurkat, se lisaron en un buffer de lisis compuesto por Tris-ClH 20 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, ClNa 150 mM, Nonidet P40 1% y glicerol 10%, suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina 10 μ g/ml, PMFS 2 mM y leupeptina 10 μ g/ml). Se sonicaron y se centrifugaron 2 minutos a 12.000 rpm. Un volumen de lisado equivalente a 500 μ g de proteínas (la cuantificación de las proteínas se realizó por Bradford) se inmunoprecipitó durante una noche a 40 C con AcM anti-CD69 (1:10), AcM anti-CD45 (1:10) ó anticuerpo anti p56^{lck} (1:50). Para aislar los precipitados se añadió Pansorbin (50 μ l) y se incubó 2 horas a 40C. A continuación se centrifugó 2 minutos a 12.000 rpm y el precipitado se lavó 3 veces con PBS.

4. ELECTROFORESIS EN GEL (SDS-PAGE).

REACTIVOS.

- Running gel a diferentes concentraciones de acrilamida como se indica:

	<u>7.5%</u>	<u>10%</u>	<u>12.5%</u>
Acrilamida:bis (30:0.8%)	2.5 ml	3.3 ml	4.16 ml
Agua desionizada	4.4 ml	3.5 ml	2.7 ml
Tris-ClH 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Amonio persulfato 10%	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l

- Stacking gel.

Acrilamida:bis (30:0.8%)	430µl
Agua desionizada	830µl
Tris-ClH 0.5 M pH 6.8	33µl
SDS al 10%	1.88ml
Amonio persulfato al 10%	16µl
TEMED	3.3µl

- Running buffer pH 8.3 (x5).

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1 %

No se le debe ajustar el pH. Diluir en el momento de su uso.

- Sample buffer (x4).

NO REDUCTOR	NO REDUCTOR
Tris-ClH 500 mM pH 6.8	Tris-ClH 500 mM pH 6.8
8% SDS	8% SDS
20% glicerol	20% glicerol
0.012% azul de bromofenol	0.012% azul de bromofenol
4% de β-mercaptoetanol	4% de β-mercaptoetanol

PREPARACION DEL GEL, PATRON Y MUESTRAS.

Para la preparación del gel se usó un sistema de electroforesis en minigel (Bio-Rad). Una vez montado el sistema se añadió el running gel (gel donde corren las proteínas) . A continuación se adiciona agua lentamente evitando que se mezcle con el running gel. Una vez el gel ha polimerizado (de 20 a 45 minutos) se elimina el agua, se añade el stacking gel (gel donde se empaquetan las proteínas) y se coloca el peine que

forma los pocillos donde se añaden las muestras.

El patrón se preparó mezclando 10 µl de sample buffer no reductor (x4), 5 µl del estándar (estándar de bajo peso molecular de Pharmacia) y 15 µl de Tris-ClH 0.5 M pH 6.8, de forma que el volumen final de la mezcla sea 40 µl. Y las muestras se prepararon mezclando 10 µl de sample buffer reductor (x4), la muestra y Tris-ClH 0.5 M pH 6.8 hasta un volumen final de 40 µl. Se calentaron 5 minutos a 95 °C y se centrifugaron 1 minuto a 12000 rpm. El sobrenadante se usa para la electroforesis.

PROCEDIMIENTO.

La electroforesis se realizó según Laemmli (6). Se lavaron los pocillos con abundante agua para eliminar restos de acrilamida no polimerizada. Se secaron y se añadió las muestras. A continuación se colocó el gel en una cubeta con buffer running gel (x1) y se conecta a la fuente de alimentación. La electroforesis se realizó a 150 voltios constantes durante aproximadamente 1 hora.

5. TINCION DEL GEL.

B. NITRATO DE PLATA.

1. Las proteínas se fijaron en el gel con una solución formada de 50% (v/v) de metanol, 10% ácido acético y 40% de agua, de 30 minutos a toda la noche.

2. Se Lavaron con una solución de 10% de metanol, 5% de ácido acético y 85% de agua.

3. Se remoja el gel en una solución de 34 mM de dicromato potásico más 3.2 mM de ácido nítrico, durante 3 o 5 minutos.

4. Se lavaron con agua hasta quitar el color amarillo del

gel.

5. El gel se sumergió en una solución de 12 mM de nitrato de plata durante 20 minutos exactos.

6. Revelado: se hizo mediante varios lavados con una solución de 0.28 M de carbonato sódico y 0.5 ml de formaldehído al 37% por litro, hasta que aparezcan las bandas.

7. El revelado se paró con ácido acético al 5%.

A. AZUL DE COOMASSIE.

Se añade al gel una solución de tinción compuesta de 0.1% (p/v) de azul de Coomassie, 25% de metanol y 7% de ácido acético y se incubaba de 45 minutos a 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se eliminó la solución de tinción, y se le dieron varios lavados con una solución de destañir que contiene 25% de metanol y 7% de ácido acético, hasta que el fondo del gel es transparente.

6. TRANSFERENCIA A MEMBRANAS.

A. HUMEDA.

Se humedecen, durante 10-15 minutos, la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA), el gel y dos papeles Whatman en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0.1%). Después se forma un sandwich en el que la membrana se coloca hacia el cátodo y el gel hacia el ánodo, colocando un papel Whatman al principio y otro al final del sandwich. Antes de colocarlo en la cubeta (Bio-Rad) para hacer la transferencia, es importante asegurarse de que no existan burbujas entre las diferentes capas del sandwich, que podrían hacer que la transferencia no fuera homogénea. La transferencia se realizó a un amperaje constante de 350 mA durante 3-4 horas

a 40C.

B. SEMISECA.

Se humedece la membrana, el gel y dos trozos de papeles Whatman en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) durante 10 minutos. A continuación se forma un sandwich poniendo primero un papel Whatman, después la membrana, a continuación el gel y por último el otro papel Whatman, eliminando las posibles burbujas de aire que se hayan formado entre las diferentes capas. El sandwich se coloca en un sistema de transferencia semiseca (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 6 voltios durante 5 o 16 minutos.

7. TINCION DE MEMBRANAS CON NEGRO AMIDO.

La membrana se tiñe durante 1 minuto con una solución 0.1% (p/v) de Negro Amido en 25% (v/v) isopropanol-10% (v/v) de ácido acético en agua. A continuación se lava, aproximadamente 30 minutos, con una solución de 25% de isopropanol-10% de ácido acético hasta que el fondo de la membrana es blanco (aproximadamente 30 minutos).

8. MARCAJE CON ANTICUERPOS ("INMUNOBLOTTING") Y DETECCION DE LA PEROXIDASA (HRP).

A. INMUNOBLOTTING.

Una vez realizada la transferencia las membranas se incubaron durante 1 hora y media con un buffer de bloqueo que contenía 3% (p/v) de BSA en TBST (ClNa 150 mM, Tris-ClH 50 mM pH 7.5, Tween 20 0.1%). A continuación se lavaron 2 veces con TBS (ClNa 150 mM, Tris-ClH 50 mM pH 7.5) e se incubaron con AcM anti PY (1:2000), anti-p56^{lck} (1:2000) o anti-CaM (1:100) de 1

hora a toda la noche. Después se lavaron dos veces con TBS, y se incubaron durante 1 hora y media con anti-Ig G conjugado con peroxidasa (1:5000 en TBST).

B. DETECCION DE PEROXIDASA (HRP).

B.1. POR QUIMIOLUMINISCENCIA.

Reactivos.

- Luminol: []final = 2.25 mM.

Se pesa 1 mg de luminol y se disuelve en 50 μ l de NaOH 1M. Se añade 5 ml de Tris-ClH 10 mM pH 8.3, y se mezcla muy bien.

- 4-Iodofenol (4-IP): []final = 0.45 mM.

Se pesa 1 mg de (4-IP) y se disuelve en 5 ml de Tris-ClH 10 mM pH 8.3. Para disolverlo se debe agitar de 15 a 30 minutos.

- H₂O₂: []final = 0.015%. Se toman 5 μ l de una solución stock al 30%.

Procedimiento.

El reactivo se prepara básicamente como en (7). 10 ml del reactivo compuesto de Tris-ClH 10 mM pH 8.3, luminol 2.25 mM, 0.015 % (v/v) H₂O₂ y 450 μ M de 4-iodofenol, que actúa potenciando la reacción de quimioluminiscencia (8,9), se añaden sobre la membrana y se incuba durante un minuto a temperatura ambiente. Después la membrana se coloca sobre un papel de filtro, y se cubre con un plástico fino. A continuación se expone a un film de rayos X en la oscuridad de 1-5 minutos.

B.2. POR COLORIMETRIA.

Reactivos.

- Solución A.

Disolver 20 mg de 4-cloro-1-naftol en 100 μ l de agua. Y 15 mg de DEPDA (N,N-dietilfenilenediamina) en 100 μ l de

acetonitrilo más 100 µl de agua.

Mezclar ambas soluciones y añadir 700 µl de acetonitrilo.

- Solución B.

Solución de citrato sódico 100 mM pH 6.0.

Procedimiento.

Se realizó según el método descrito en (10). Se añade sobre la membrana una mezcla formada por 200 µl de solución A, 10 ml de solución B y 25 µl de H₂O₂ del 30% y se incubaba 20 minutos a temperatura ambiente.

9. SEPARACION DE ANTICUERPOS ASOCIADOS A PROTEINAS UNIDAS MEMBRANAS: "STRIPPING".

La membrana se incubaba 30 minutos a 50 °C con una solución que contiene 1% SDS, Tris-ClH 30 mM pH 8.0 y 50 mM de β-mercaptoetanol. A continuación se dan tres lavados de 10 minutos con TBST.

10. DOT-BLOT.

Diferentes cantidades de CaM purificada fueron pipeteadas sobre una membrana de nitrocelulosa. Después de ser secadas, las membranas se lavaron o no, por los tiempos indicados, con TBST. En algunos experimentos antes de los lavados la CaM fue fijada a la membrana con 1 M de KOH o 0.2% de glutaraldehído. A continuación algunas membranas fueron teñidas con Negro Amido, y en otras se añadió directamente sobre la CaM 3 µl de anti-CaM (1:30) seguido de 3 µl de anti-IgG conjugado con peroxidasa, a continuación se lavaron 30 segundos con TBS para eliminar los anticuerpos no unidos a las proteínas. En este último caso la detección se realizó por quimioluminiscencia o

con 4-cloro-1-naftol.

En las membranas de PVDF, previamente humedecidas en metanol y equilibradas en TBS, no fue posible pipetear directamente la CaM, por lo que 3 μ l de CaM purificada fueron diluidas en 50 μ l de PBS y añadidas a la membrana usando un aparato de filtración para dot-blot (Bio-Rad) conectado a una bomba de vacío a baja presión. Después de lavar con TBS, usando el mismo sistema, los blots fueron teñidos con Negro Amido.

11. PURIFICACION DE CALMODULINA.

La purificación de la calmodulina de cerebro de cerdo se realizó como previamente ha sido descrita (11).

1. Homogenización.

Se descongeló 610 g de sesos de cerdo con NaCl al 0.9% a temperatura ambiente. Una vez descongelados, se homogenizaron en un litro de buffer A (Tris-ClH 50 mM pH 7.4, EGTA 2.5 mM y PMFS 0.5 mM).

El homogenado se centrifugó 30 minutos a 12000 rpm en el rotor GSA (Sorvall). Recogimos el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en el mismo tampón y se volvió a homogenizar durante 1 o 2 minutos, se centrifugó en las mismas condiciones y se recogió el sobrenadante. Este segundo sobrenadante se mezcló con el primero.

2. Cromatografía en DEAE-Celulosa.

Todo el sobrenadante se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se colocó en un vaso de precipitada con DEAE celulosa previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 50 mM. Antes de añadir el sobrenadante la resina fue filtrada para eliminar el tampón.

La mezcla se agitó suavemente durante 30 minutos. Se filtró en un kitasato y la resina se lavó varias veces con Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, ClNa 50 mM hasta que la solución queda transparente.

La resina (que contiene retenida la CaM) se lavó varias veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, ClNa 150 mM. La CaM se extrajo de la resina con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, ClNa 600mM.

3. Precipitación con sulfato amónico.

Al filtrado se le añadieron 351 g/l de sulfato amónico y se dejó agitando una hora a 4°C. Se centrifugó 30 minutos a 12500 rpm con el rotor GSA (Sorvall) y, se recogió el sobrenadante al cual se le añadieron de nuevo 315 g/l de sulfato amónico y se dejó agitando 2 horas más a 4°C. Después se centrifugó durante 30 minutos a 12500 rpm con el rotor GSA (Sorvall) y se recogió el sedimento (contiene la CaM). A continuación el sedimento se resuspendió en bicarbonato amónico 10 mM, ClCa₂ 50 µM (aproximadamente 40 ml).

4. Diálisis.

Los 40 ml de muestra obtenida se dialisaron en saco de diálisis de 3500 MW, en 1 L de imidazol 10 mM pH 6.1, Cl₂Ca 50µM durante toda la noche. Al día siguiente se cambió el tampón de diálisis por uno que contenía únicamente de imidazol 10 mM pH 6.1 y se dejó dialisando durante 4 horas más.

A la muestra dialisada se añadió Cl₂Ca para tener una concentración final de 0.1 mM y β-mercaptoetanol hasta una concentración final de 1 mM. A continuación ajustamos el pH a 7.1.

5. Cromatografía de Fenil-Sefarosa.

A continuación se cargó la muestra sobre una columna de fenil-sefarosa previamente equilibrada con tampón HEPES 50 mM pH 7.1, Cl_2Ca 0.1 mM y 1 mM de β -mercaptoetanol. Luego lavamos la columna con tampón HEPES 50 mM pH 7.1, Cl_2Ca 0.1 mM y 1 mM de β -mercaptoetanol. Al cabo de poco tiempo se observó la salida de un pico de proteínas. Una vez se acabó el pico de proteínas eluidas, se cambió el tampón por uno igual pero que contenía ClNa 500 mM, y se recogieron fracciones de 10 ml de este tampón. A continuación se pasó un tampón que contenía HEPES 50 mM pH 7.1, 1 mM EGTA y 1 mM de β -mercaptoetanol con el cual se eluye la CaM. Se recogieron fracciones de 5 ml en tubos de 10 ml que contenían 5 μl de una solución 50 mM de CaCl_2 , para estabilizar la CaM, hasta que se observó que después de un pico de proteínas, la absorbancia a 280 nm disminuyó hasta cero.

Las fracciones con valores de absorbancia más altos se juntaron, y las proteínas se cuantificaron según (4).

A continuación comprobamos la pureza de la muestra mediante una electroforesis en gel de acrilamida y posterior tinción del gel con nitrato de plata.

12. OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

A. OBTENCION.

1. INMUNIZACION DEL CONEJO.

Por el método descrito previamente por Kamps (12).

Preparación del carrier (KLH).

Disolvimos 50 mg de KLH (Keyhole limpet homogenin) en 1ml de glicerol al 50% e hicimos alicuotas de 100 μl que se

congelaron -200 C hasta el momento de su uso.

Preparación del antígeno e inmunización.

Se mezclaron 50 µl (200 µg) de calmodulina purificada de cerebro de cerdo con 5 ml de PBS. La CaM fue unida covalentemente a KLH usando 50 mg/ml de EDC (12), para ello, después de ajustar el pH a 7.0, la mezcla se dejó agitando a 40C durante 4 horas. A continuación se dializó la mezcla contra PBS durante 48 horas, con varios cambios del buffer. La muestra dialisada se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freud completo, quedando una suspensión blanca lechosa. Se agitó y se inyectó intradermicamente (10 ml) en la espalda del conejo en 8 o 10 puntos diferentes.

2. DOSIS DE RECUERDO.

Para la preparación de las dosis de recuerdo se sigue el mismo método que para la preparación del antígeno. Una vez dialisada la muestra, se mezcló con igual volumen de adyuvante de Freud incompleto (eliminado la pared de E. coli por centrifugación).

Las dosis de recuerdo se dieron a las 3 y 8 semanas de la primera inyección. El suero del conejo se extrajo a los 14 días de la última dosis de recuerdo (cuando hay máxima cantidad de anticuerpos en sangre).

B. PURIFICACION.

B.1. POR CROMATOGRAFIA EN HIDROXIAPATITO.

La purificación del anticuerpo se realizó según se describe en (13) a partir del suero obtenido de la sangre extraída de la oreja del conejo.

1. Precipitación con $SO_4(NH_4)_2$.

Se realizaron dos precipitaciones con sulfato amónico. La

primera se realizó con 23% de sulfato amónico agitando a 40C durante 4 horas. A continuación centrifugamos a 18000 rpm 30 min, y cogemos el sobrenadante al cual añadimos 50% de sulfato amónico y se dejó agitando a 40C toda la noche. Después centrifugamos 20 minutos a 18000 rpm y recogimos el precipitado el cual resuspendimos en PBS.

2. Diálisis.

Después dialisamos la muestra contra PBS para eliminar el sulfato amónico.

3. Cromatografía en Hidroxiapatito.

A continuación centrifugamos la muestra dialisada 15 min a 6000 rpm y recogemos el sobrenadante. Después añadimos el sobrenadante a la columna y lavamos con 100 ml de buffer fosfato 10 mM pH 6.8. A continuación fuimos eluyendo las proteínas mediante un gradiente de concentración que va de 100 a 600 mM de buffer fosfato pH 6.8 (100 mM, 150 mM, 200 mM, 300mM y 600 mM) recogiendo fracciones de 5 ml. Medimos la absorbancia a 280 nm de cada fracción, obteniendo dos picos uno a 100 mM y otro a 150 mM.

Después, con aquellas fracciones que dieron valores de absorbancia más altos hicimos SDS-PAGE al 7.5% de acrilamida. El gel se tiñó con Azul de Coomassie, para ver la pureza del anticuerpo.

B.2. POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD: PROTEINA A-SEFAROSA.

Usamos 1.5 ml de Proteína A-Sefarosa para 1 ml de suero, al cual le ajustamos previamente el pH a 8.0 con un Tris ClH 1 M pH 8.0. La columna se equilibró con buffer fosfato disódico 0.1 M pH 8.0.

Después de añadir la muestra a la columna, lavamos con

PO_4HNa_2 pH 8.0 recogiendo fracciones de 2 ml. A continuación se añadieron citrato sódico 0.1 M pH 6.0 y citrato sódico 0.1 M pH 3.5 que se recogieron en fracciones de 1 ml en tubos que contenían una cantidad de Tris-ClH 1 M pH 8.0 suficiente para que el pH final de cada fracción fuera de 8.0. Las fracciones que dieron los valores más altos de absorbancia a 280 nm se juntaron, y se dialisaron contra PBS durante 15-18 horas a 40C.

Para ver la pureza de la muestra realizamos SDS-PAGE al 7.5% de acrilamida. A continuación teñimos el gel con Azul de Coomassie.

Para comprobar la especificidad de nuestro anticuerpo marcamos con I^{125} CaM purificada e inmunoprecipitamos con el anticuerpo obtenido. Con el inmunoprecipitado se hizo SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida, y posteriormente hicimos una autoradiografía.

13. MARCAJE DE PROTEINAS CON I^{125} .

A. CON IODOGEN.

Materiales.

- Iodogen: En un tubo de Pyrex se pesaron 1,33 mg de Iodogen que se diluyeron en 1 ml de diclorometano. En cada vial de vidrio que utilizamos pusimos 120 μl de la solución de iodogen agitando hasta que se evaporó el diclorometano (el Iodogen queda adherido al vidrio). Los viales se guardaron hasta el momento de su uso aislados de la luz.

- Sefadex G-25 (Fina): El sefadex se hinchó en agua y se forman columnas de 1 ml. A continuación se añadió 1 ml de BSA 0.1 % (w/v) en agua a cada columna para evitar que las proteínas se queden adheridas a las paredes. Después

centrifugamos 10 minutos a 3000 rpm, y eliminamos el líquido obtenido.

Procedimiento.

Se hizo según el método descrito en (14).

1. Se lavan con PBS los viales con el Iodogen.

2. A los viales con Iodogen se le añaden la CaM purificada (30 o 45 μg) ó 300 μl de homogenado de tejidos (higado o de eritrocitos) aproximadamente 1.6 μg de proteína/ μl . A continuación adicionamos a cada vial NaI^{125} (100-200 μCi) y agitamos suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró por la adición de tirosina a una concentración final de 1% (p/v) y se agitó durante un minuto.

3. Para separar el I^{125} que no se ha unido a las proteínas, la muestra se pasó por una columna de Sephadex G-25 (Fina) quedando I^{125} libre retenido en la columna.

4. A continuación realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CaM. Después lavamos el inmunocomplejo con PBS y le añadimos buffer Laemmli reductor (6) suplementado con 5 mM de EGTA. Posteriormente realizamos SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida y teñimos el gel con Azul de Coomassie. Después se hace autoradiografía.

B. CON CLORAMINA T.

Reactivos.

- Cloramina T. Se disuelven 2.5 mg de cloramina T en 1 ml de buffer fosfato 50 mM pH 7.2.

- Ioduro potásico. Se disuelven 1 mg de ioduro potásico en 1 ml de PBS con 0.1 % (w/v) de BSA.

- Sephadex G-50 (Fina). Se preparan columnas de 1 ml.

Procedimiento.

Se realizó según el método descrito por (15).

1. Añadimos 200 μ Ci en tubos de plásticos más 10 μ l de 250mM de buffer fosfato 50 mM pH 7.2. A continuación añadimos 30 o 45 μ g de CaM purificada, 200 μ g de homogenado de hígado o eritrocitos (aproximadamente 200 μ l).

2. Después añadimos 20 μ l de cloramina T, mezclamos e incubamos 1 minuto a temperatura ambiente.

3. Para separar el I^{125} libre pasamos la muestra por una columna de Sefadex (125 μ l de muestra por columna) y centrifugamos 10 min a 3000 rpm recogiendo el sobrenadante (aproximadamente 100 μ l/columna).

4. A continuación se inmunoprecipitan las muestras con anticuerpo policlonal anti-CaM. Con los inmunocomplejos se hace SDS-PAGE al 12.5 % de acrilamida y la CaM marcada se detecta por autoradiografía.

14. METODOS GENERALES: VIABILIDAD CELULAR Y CONCENTRACION DE PROTEINAS.

A. VIABILIDAD CELULAR.

A.1. EXCLUSION CON AZUL DE TRIPAN Y CONTAJE.

Este método se basa en la observación de que las células viables son impenetrables a ciertos colorantes mientras que las células no viables permiten que entre el colorante y tiñe su contenido (16).

La solución de azul Tripán se preparaba el día de su uso, mezclando 4 partes de una solución de azul de Tripán al 0.2% (p/v) en ClNa 0.9% con una parte de una solución de ClNa 4.25%. Para el conteo celular, se tomaba una alícuota de la

suspensión celular, se diluía 10 veces en PBS y se añadía un 5% de la preparación fresca de azul de Tripán. Se colocaban unos 5 µl de esta preparación en una cámara de Neubauer y se contaba el número de células no teñidas (viables) y teñidas (muertas).

A.2. MEDIDA DEL ENZIMA LACTICO DESHIDROGENASA.

La enzima fue medida usando un ensayo espectrofotométrico (Boehringer Mann). La medida se realizó el medio de cultivo libre de células una vez han sido tratadas.

B. CONCENTRACION DE PROTEINAS.

B.1. BRADFORD.

Este método se basa en la observación de un colorante, el azul brillante de Coomasie, que puede presentar dos colores: rojo con un máximo de absorbancia a 465 nm, pasa a azul con un máximo de absorbancia a 595 nm, al unirse a proteínas.

El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción por lo que la técnica puede detectar µg de proteínas. La unión del colorante a la proteína se realiza en un período corto de tiempo (2 min), y el color es estable durante 1 hora aproximadamente.

El ensayo se llevó a cabo según Bradford (17). La solución de azul de Coomasie se preparó disolviendo 100 mg de Azul de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95 %. Después se le añade 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se lleva el volumen hasta un litro con agua. Después se pasa a través de papel de filtro y se almacena a 40 C.

En cada caso se realizó una curva patrón con albúmina sérica.

B.2. LOWRY.

Se realizó por el método de Lowry modificado (4), realizando en cada ocasión una curva patrón empleando albúmina sérica.

Reactivos.

- Solución A: 2% CO_2Na_2 , 0.4% NaOH, 0.16% tartrato-Na y 1% SDS.

- Solución B: 4% $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

- Folin-Ciocalteu diluido 1:2 con agua destilada.

- Solución patrón de BSA (1mg/ml).

Procedimiento.

Se mezclan 0.750 ml de reactivo 1 (10 vol de A más 0.1 vol de B), BSA o muestra y agua destilada hasta un volumen final de 0.8 ml. A continuación se añaden 0.075 ml de Folin-Ciocalteu y se incuba a temperatura ambiente 30 minutos. Después se mide la absorbancia a 660 nm.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

**III.A. EFECTO DEL BENZOTIOFENO SOBRE LA ACTIVIDAD
CALCINEURINA EN LINFOCITOS**

INTRODUCCION

INTRODUCCION

DERIVADOS DEL BENZOTIOFENO (PD144795) COMO ANTI-HVI: INHIBICION DE LA CALCINEURINA.

La activación transcripcional de la expresión de los genes del HVI-1 (human immunodeficiency virus type 1) es controlada, en parte, por la interacción de secuencias específicas de factores de transcripción con la región LTR (long terminal repeat) (18,19). Dos de estos factores son NF- κ B y Sp1. El NF- κ B es un factor de transcripción inducible que se une a dos elementos descritos del ADN en el HVI-1 LTR. Por otra parte, el Sp1 es una proteína de aproximadamente 100 KDa que está ubicuamente expresada en células de mamíferos, y que se une a tres sitios sobre la región LTR, los cuales se encuentran corriente abajo de los sitios de NF- κ B (18-20).

Aunque se ha demostrado que algunas citoquinas modulan la expresión del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HVI-1), solo el TNF activa la replicación viral en las células T y fagocitos mononucleares (21). Esta citoquina es un potente activador de factores de transcripción que regulan la expresión del HIV mediada por el LTR (22,23). Además, el TNF induce una interacción física entre Sp1 y p53, esta interacción es importante para el reconocimiento de la secuencia del ADN por el p53 y la transactivación del HVI-1 LTR (24). El p53 es un producto de un gen supresor de tumores, es una proteína que se une a una secuencia específica de ADN, actuando como un activador o represor de la transcripción de genes (25-33). La aparición frecuente de tumores en ratones nulos para el p53, sugiere que el p53 funciona como un agente represor de tumores

(34). Sin embargo, experimentos con oligonucleótidos antisentido del p53 (35), microinyección de anticuerpos anti-p53 (36), y ensayos transcripcionales utilizando células transformadas con formas mutantes del p53 (21,31,32,37), indican que p53 presenta funciones adicionales que son independientes de la supresión del crecimiento. Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de p53 mutado en células que carecen completamente de p53 endógeno, nos llevaba a un dramático incremento en la replicación del HVI-1 in vivo (38). Además se ha demostrado que el mutante del p53 y la forma silvestre transactivan y reprimen, respectivamente la actividad transcripcional dirigida por el LTR del HIV-1 (23,37). También, se ha identificado una forma inducible del p53 en células T Jurkat, que directamente interacciona con una secuencia inmediatamente a la secuencia de unión más 5' del Sp1 (23).

Derivados de benzotiofenos además de tener propiedades antiinflamatorios presentan efectos anti-HIV. Recientemente se ha demostrado que derivados de benzotiofeno bloquean la transcripción del HVI-1 en promielocitos activados por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (39). Pero no bloqueaban la activación del NF-K β en respuesta al tratamiento con esta citoquina. Además, estos compuestos bloqueaban la transcripción constitutiva del HVI-1 en células crónicamente infectadas e inducían un estado de latencia en células activadas con citoquinas.

Es bien conocido que la replicación del virus HIV-1 en linfocitos se relaciona con los estados de activación/proliferación de la célula infectada (40,41). El tratamiento de las células Jurkat infectadas, con activadores

de PKC o de los receptores de células T (TCR) inducen la replicación del HIV (42,43). Estudios previos demuestran que ligandos del TCR activaban la transcripción dependiente del TCR, a través de un mecanismo sensible a CsA (44-46). La CsA, a través de su interacción con la ciclofilina (revisado en 47) actúa como un fuerte inhibidor de la calcineurina (48,49), la cual juega un crítico papel en la regulación de los caminos de señales dependientes de calcio necesarios para la activación de las células T (48,50,51). La definitiva prueba de el papel de este enzima en la activación de células T ha sido demostrado por la sobreexpresión de su subunidad catalítica (48,50). Por otra parte, los inhibidores de este enzima disminuyen la replicación viral del HIV e inhiben la transcripción mediada por el LTR del HIV-1 (44,52), un mecanismo sugerido para esta acción es la inhibición de la unión del NF- κ B a la región LTR del provirus HIV-1 (46,53). Interesantemente, el relativo gran número de genes cuya expresión es modulada por inhibidores de la calcineurina en células T (54,55) sugiere que, además del NFAT y el NF- κ B, otros factores de transcripción pueden ser afectado por estas drogas.

Además en estudios recientes (56) se ha demostrado que la CsA y el benzotiofeno bloquean la inducción, por un camino dependiente de TCR de la unión de NF κ B y p53 a la región LTR del HVI-1, e inhiben la inducción por PHA de la actividad transcripcional de un fragmento del promotor de HVI-1 LTR conteniendo sitios de unión para p53 y NF- κ B.

ACCION ANTIINFLAMATORIA DE DERIVADOS DEL BENZOTIOFENO (PD144795).

La inflamación es la reacción del organismo al ser agredido, como ocurre, por ejemplo, cuando es invadido por un agente infeccioso. Una etapa esencial en la patogénesis de esta respuesta es la adherencia de leucocitos al endotelio (57). Este proceso de adhesión precede a la migración de estas células desde los capilares hacia el tejido de alrededor, y una vez allí mediante quimiotaxis, se dirigen hacia el lugar de la infección. Esta adhesión está mediada por la expresión de una serie de moléculas específica sobre el endotelio (58-61). Tres moléculas mayoritarias, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) y E-selectinas pueden ser inducidas sobre las células endoteliales por citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-1 (62). La transactivación de estas moléculas implica la activación de factores de transcripción relacionados con el NF- κ B, que reconoce la secuencia reguladora κ B encontrada en muchos genes, incluyendo VCAM-1, ICAM-1 y E-selectinas (63-65).

El PD144795 se ha descrito que inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio (66,67). Se ha estudiado el efecto del PD144795 sobre la expresión inducida de VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales de la aorta humana. Los niveles de proteínas y de ARNm de ambas moléculas fueron disminuidas por este compuesto. Además, a diferencia del antioxidante PDTC (pirrolidina ditiocarbamato) (68), el cual inhibe la activación del NF- κ B, el PD144795 no bloquea la activación de este factor de transcripción, por lo que el mecanismo de acción parece ser

distinto al del PDTC (69). Este compuesto es oralmente activo en muchos modelos de inflamación. Su actividad tanto in vitro como in vivo reside predominantemente en el enantiómero S (70).

DERIVADOS DEL BENZOTIOFENO (PD144795), POTENCIAL AGENTE ANTIALERGICO.

En la patogénesis del asma y otras enfermedades alérgicas han sido implicadas una serie de sustancias mediadoras (71-73) que incluyen histaminas, leucotrienos, factor activador de plaquetas y prostaglandinas. Las células (74-76) que juegan un papel más importante en estos procesos alérgicos son mastocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos T.

Como una medida de la inhibición de liberación de mediadores, se han estudiado una serie de compuestos por su capacidad para bloquear la liberación de histamina de basófilos humanos estimulados con anti-IgE. Este modelo de ensayo, desarrollado por Lichtenstein y otros (77,78), ha sido empleado en la evaluación de potenciales compuestos antialérgicos.

El PD144795 es un potencial agente antialérgico por su capacidad de inhibir la liberación de histamina de basófilos de donadores alérgicos estimulados con anti-IgE. Además, este compuesto también inhibe el estallido respiratorio en neutrófilos humanos, y la liberación de mediadores en cortes de tejido pulmonar humano estimulados con anti-IgE (79).

CALCINEURINA.

El nombre de calcineurina fue introducido en vista de las propiedades de unión al calcio y su predominante distribución

en tejido nervioso (80). Es la más abundante proteína soluble que se une a la calmodulina. Es una serina/treonina fosfatasa estimulada por calmodulina en presencia de calcio y calmodulina (81). La calcineurina al ser una fosfatasa es inhibida por inhibidores de fosfatasas clásicos, como son fluoruro de sodio, fosfato inorgánico y pirofosfato, todos actúan en un rango milimolar (82,83). Reactivos sulfidrilos como son Zn^{+2} , N-Metilmaleimida, o organomercuriales, son también potentes inhibidores (82-85). Sin embargo, inhibidores específicos de la fosfatasas 1 no tienen efecto sobre la calcineurina, en esto se basan Ingebritsen y Cohen (86,87) para clasificar la calcineurina como una fosfatasa tipo 2. Por otra parte, la estimulación de la calcineurina por calmodulina y análogos es inhibida por fenotiazina, trifluoperazina (88-91), y otros antagonistas de la calmodulina como calmidazolium, W-5 y W-7 (92,93).

Este enzima es un heterodímero complejo formado por una subunidad catalítica de 60 KDa (Calcineurina A), y una subunidad reguladora de 19 KDa (Calcineurina B), que tiene dos dominios globulares de alta afinidad para el calcio flanqueada por una larga cadena C-terminal. Cada dominio contiene dos secuencias en forma de EF hand que unen calcio, por tanto es capaz de unir 4 moles de calcio por molécula de proteína con alta afinidad. Las dos subunidades se unen una a una, y esta interacción no depende de la presencia de cationes divalentes (80).

El sustrato in vitro de esta proteína es un miembro de la familia de factores de transcripción NFAT, el NFAT1 (nuclear factor of activated T cells 1) previamente llamado NFAT_p (94-

96), que juegan un importante papel en la transcripción de genes de citoquinas (IL-2) y otros genes durante la respuesta inmune. Este factor de transcripción se encuentra en el citoplasma en las células T, y es activado en respuesta a la estimulación con ionomicina, antígenos o anti-CD3. Esta activación se traduce en su defosforilación por la calcineurina, que promueve su traslocación del citoplasma al núcleo produciéndose un aumento de su capacidad para unirse al ADN, y de la transcripción de genes de activación de la célula T (IL-2) (97). Estos cambios son dependientes de la movilización del calcio, ya que son bloqueados por EGTA (quelante del calcio), y al depender de la calcineurina son bloqueados por inmunosupresores como CsA y FK506 (98). El NFAT_p forma un complejo con las proteínas Fos y Jun en el núcleo de las células T activadas (99,94). Este complejo presenta la misma especificidad en su unión al ADN que el NFAT1 solo (95). Recientemente se ha visto que el NFAT1 puede ser activado, y niveles significativos de IL-2 pueden ser producidos por un camino de señales resistente a la CsA, por el CD28 (100).

En el caso de la activación del NFAT, por la estimulación del TCR después de muchas horas, la mayoría del NFAT en la célula vuelve a su forma original fosforilada y reaparece en el citoplasma, proceso que se correlaciona con la disminución de los niveles de calcio intracelular, debido a un mecanismo feedback disparado por el TCR (96). La desactivación del NFAT_p es facilitada por PMA e inhibidores de la entrada de calcio.

Otros sustratos de la calcineurina como son: DARPP-32 que es una fosfoproteína regulada por AMPc (101), sinapsina-1 (102) y la proteína cinasa II estimulada por CaM, estos dos últimos

son defosforilados más lentamente. Otros sustratos son las cadenas ligeras de miosina del músculo liso y esquelético, α -subunidad de la fosforilasa cinasa del músculo esquelético (103) y la subunidad reguladora tipo II de la proteína cinasa dependiente de AMPc tipo II de cerebro. También puede defosforilar la β -subunidad de la fosforilasa cinasa y histonas, pero los niveles son 100 y 10 veces más bajos que con la subunidad alfa de la fosforilasa cinasa (103). También puede defosforilar sustratos no proteicos como son: el p-nitrofenilfosfato (104) y enoles fosfatos (105-107).

OBJETIVOS

Puesto que el benzotiofeno presenta similares propiedades que la CsA y la calcineurina es la actividad enzimática diana para la CsA, el objetivo de este trabajo era investigar el efecto del benzotiofeno sobre la actividad calcineurina.

El abordaje experimental se ha centrado en:

- 1.- Efecto del benzotiofeno sobre la actividad calcineurina en células Jurkat intactas. Dependencia del tiempo y la concentración del benzotiofeno.
- 2.- Efecto del benzotiofeno y la CsA sobre la actividad calcineurina en extracto de linfocitos.
- 3.- Efecto del benzotiofeno sobre la calcineurina pura.
- 4.- Efecto del benzotiofeno sobre la actividad fosfata alcalina en enzima purificado.

RESULTADOS

RESULTADOS

Puesto que el compromiso del TCR activa la transcripción del HIV mediada por LTR a través de un camino dependiente de calcineurina (44-46) y ya que el benzotiofeno presenta similares propiedades a la CsA, nosotros estudiamos el efecto del benzotiofeno sobre la actividad de la calcineurina, la actividad enzimática diana para la CsA (48,49).

1. Inhibición de la actividad calcineurina por el benzotiofeno en células Jurkat.

En la figura 1 se ilustra un experimento en que células Jurkat fueron incubadas durante 2h a 37°C con las concentraciones indicadas de benzotiofeno. Después se lisaron en un buffer de lisis hipotónico. Para medir la actividad fosfatasa de la calcineurina se utilizó como sustrato, un péptido sintético correspondiente al sitio de fosforilación sobre la subunidad RII de la proteína cinasa dependiente del AMPc. Este péptido fue fosforilado como se indica en Material y Métodos, con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc y ATP- γ P³². A continuación se incubó durante 15 minutos a 30°C, el péptido fosforilado junto con el lisado de las células como fuente de calcineurina, en presencia de 500nM de ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasas tipo 1 y 2A. El fosfato liberado fue aislado usando una columna de Dowex AG 50W-x8, y luego cuantificado en un contador β eta. En la figura 1 se muestra el efecto inhibitor del benzotiofeno sobre la actividad fosfatasa de la calcineurina en células Jurkat. Esta inhibición es más pronunciada a concentraciones entre 0

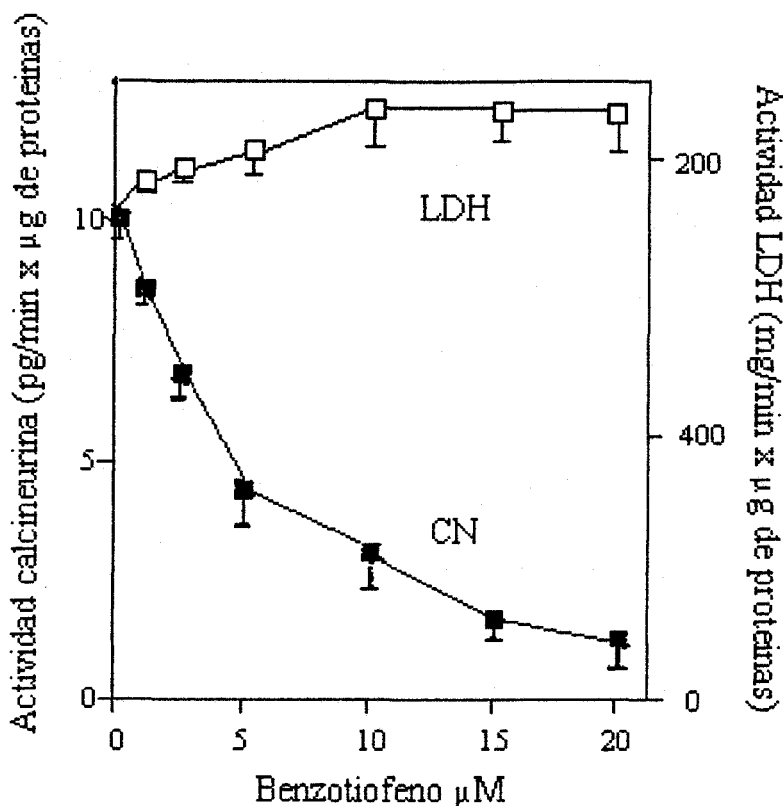


Fig 1. Curva dosis-efecto del benztiofeno sobre la actividad calcineurina en células Jurkat. Células Jurkat (6×10^6) fueron incubadas 2 horas a 37 °C con las concentraciones indicadas de benztiofeno. En el medio de incubación libre de células se mide la actividad lactato deshidrogenasa. Las células se lisan y en el lisado se mide la actividad calcineurina usando como sustrato un péptido sintético marcado con ATP- P^{32} , como se indica en Material y Métodos.

a 5 μM , llegando a ser casi total a una concentración de benzotiofeno de 20 μM . Por tanto, la incubación de células Jurkat con benzotiofeno produce una inhibición dosis dependiente de la actividad fosfatasa de la calcineurina.

Para analizar la viabilidad de las células Jurkat tras la incubación durante 2 horas con diferentes concentraciones de benzotiofeno, se midieron los valores de actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante libre de células. En la figura 1 se muestra que el benzotiofeno no disminuía la actividad del enzima LDH, por tanto este compuesto no era tóxico para las células.

A continuación se analizó la cinética de la inhibición por el benzotiofeno de la actividad fosfatasa de la calcineurina en células Jurkat. La figura 2 presenta un experimento en que células Jurkat fueron incubadas con una concentración 10 μM de benzotiofeno por los tiempos indicados. Después de lisar las células con buffer de lisis hipotónico, la medida de la actividad fosfatasa de la calcineurina se realizó siguiendo la técnica descrita en la figura 1, usando como sustrato un péptido marcado con ATP-P^{32} . La figura 2 muestra que la inhibición de la actividad fosfatasa aumenta cuando se incrementan los tiempos de incubación de las células con el benzotiofeno. Estos datos indican que la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina por el benzotiofeno depende del tiempo de incubación.

2. El benzotiofeno inhibe la actividad calcineurina, al igual que la CsA, en extractos de células.

La CsA, un metabolito biológico de un hongo, se ha usado

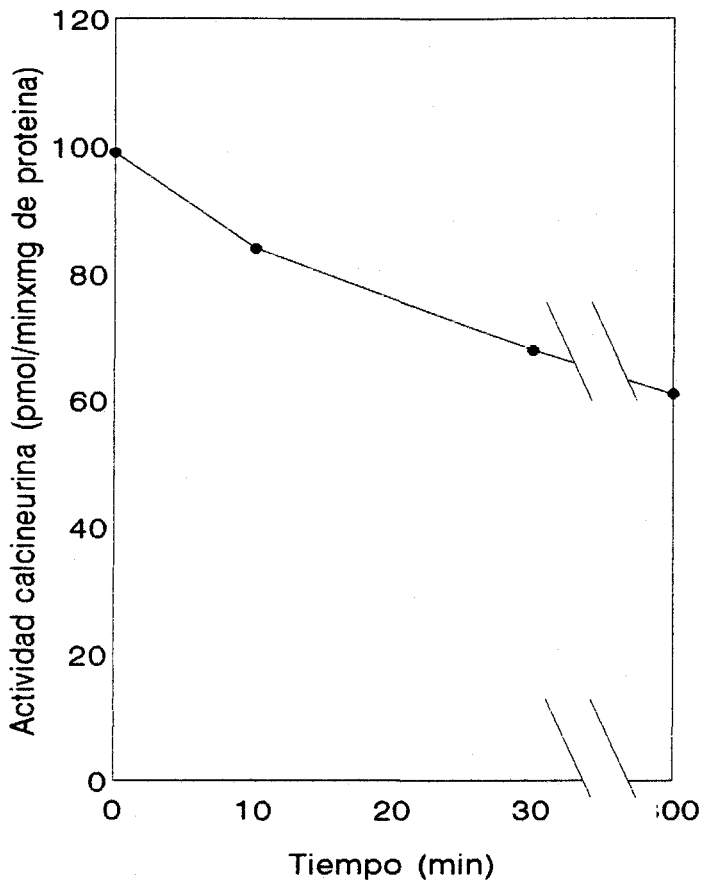


Fig 2. Cinética de la inhibición por el benzotiofeno de la actividad calcineurina en células Jurkat. Células Jurkat (6×10^6) fueron incubadas con $10 \mu\text{M}$ de benzotiofeno por los tiempos indicados. Después se lisan y en el extracto obtenido se mide la actividad calcineurina usando como sustrato un péptido marcado con ATP-P^{32} , como se indica en Material y Métodos

ampliamente para prevenir el rechazo en los trasplantes de órganos, es corrientemente el tratamiento de elección para estas condiciones clínicas. Este efecto inmunosupresor es apoyado por las observaciones de Borel y col. (108) de que esta sustancia no es tóxica para las células a concentraciones que bloquean completamente la activación de las células T, y que no bloquea la proliferación de otros tipos de células. Esta sustancia actúa como una prodroga, ya que para que sea activa debe unirse a una proteína intracelular llamada ciclofilina (109). El complejo ciclosporina-ciclofolina es ya activo, y su blanco principal es el enzima calcineurina en los linfocitos inhibiendo a este enzima.

En los siguientes experimentos se muestra como al igual que la CsA, el benzotiofeno también inhibe a la actividad fosfatasa de la calcineurina en extractos de células. Los extractos se obtuvieron por lisado de células Jurkat en un buffer de lisis hipotónico. Antes de medir la actividad fosfatasa de la calcineurina, los extractos fueron incubados durante 15 minutos con las concentraciones indicadas de benzotiofeno y CsA. El ensayo se realizó siguiendo la misma técnica utilizada en los experimentos anteriores, usando como sustrato un péptido sintético marcado con ATP-P³². En la figura 3 se muestra que tanto el benzotiofeno como la CsA inhiben la actividad calcineurina en un extracto de linfocitos, y este efecto es mayor cuanto más alta es la concentración de la CsA o el benzotiofeno, por tanto es un efecto dosis dependiente. Por otra parte, la CsA a igual concentración de benzotiofeno tiene un efecto inhibitor mayor sobre la actividad calcineurina, esto sugiere que la capacidad de la CsA para

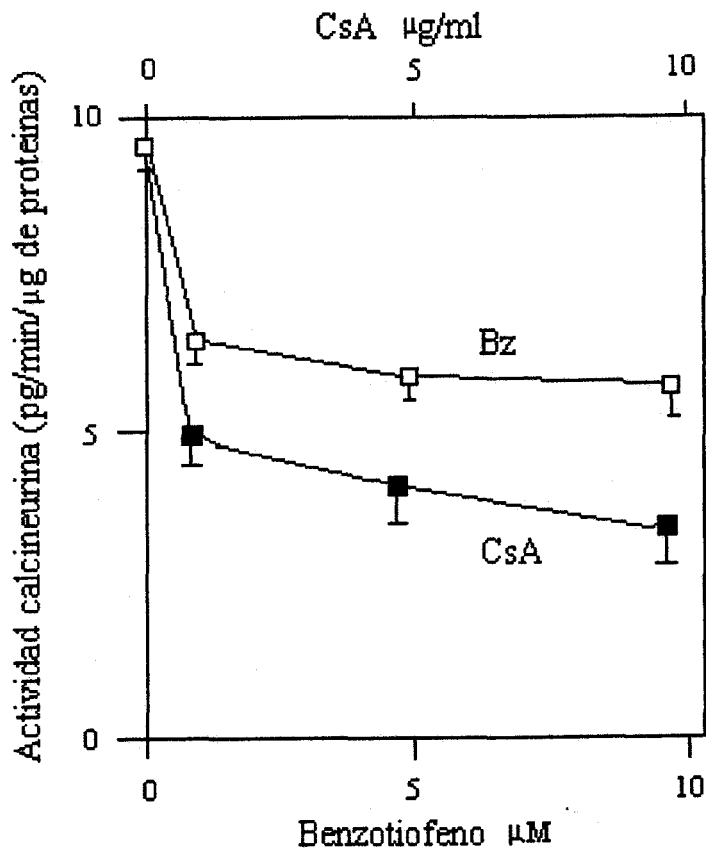


Fig 3. Efecto del benzotiofeno y la CsA sobre la actividad calcineurina en extracto de linfocitos. Linfocitos humanos fueron lisados en un buffer de lisis hipotónico. Los extractos obtenidos fueron incubados durante 15 minutos con las concentraciones indicadas de CsA y benzotiofeno. A continuación en el lisado se mide la actividad calcineurina usando como sustrato un péptido marcado con ATP-P³², como se indica en Material y Métodos

inhibir la actividad fosfatasa de la calcineurina es mayor que la del benzotiofeno.

3. Efecto del benzotiofeno sobre la calcineurina pura.

Antes de realizar los ensayos descritos anteriormente con células, se hicieron una serie de experimentos para ver el efecto del benzotiofeno sobre la actividad fosfatasa de la calcineurina en enzima purificado. Para realizar estos ensayos se utilizó una técnica espectrofotométrica, que es más rápida y sencilla pero menos sensible que la radioactiva. Esta técnica utiliza como sustrato un compuesto fosforilado de naturaleza no proteica, el paranitrofenilfosfato (PNPP), que al defosforilarse da una sustancia de color amarillo que se lee a una longitud de onda de 420 nm. La figura 4 ilustra un experimento en que 20 nM de calcineurina se incubaron a 37°C con 0.5 μ M de calmodulina y cantidades crecientes de benzotiofeno: 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 3 μ M, usando como sustrato de la reacción el PNPP. Los resultados que se muestran en la figura 4 se corresponden al incremento de absorvancia a los 45 minutos. Estos datos indican que el benzotiofeno inhibe la actividad calcineurina in vitro, siendo esta disminución más acusada entre 0.5 y 1 μ M. Los resultados obtenidos en estos experimentos nos sirvieron como base para realizar los experimentos anteriormente descritos con un péptido marcado con ATP-P³².

4. Efecto del benzotiofeno sobre la actividad fosfatasa alcalina.

Con el objeto de analizar si la inhibición por el

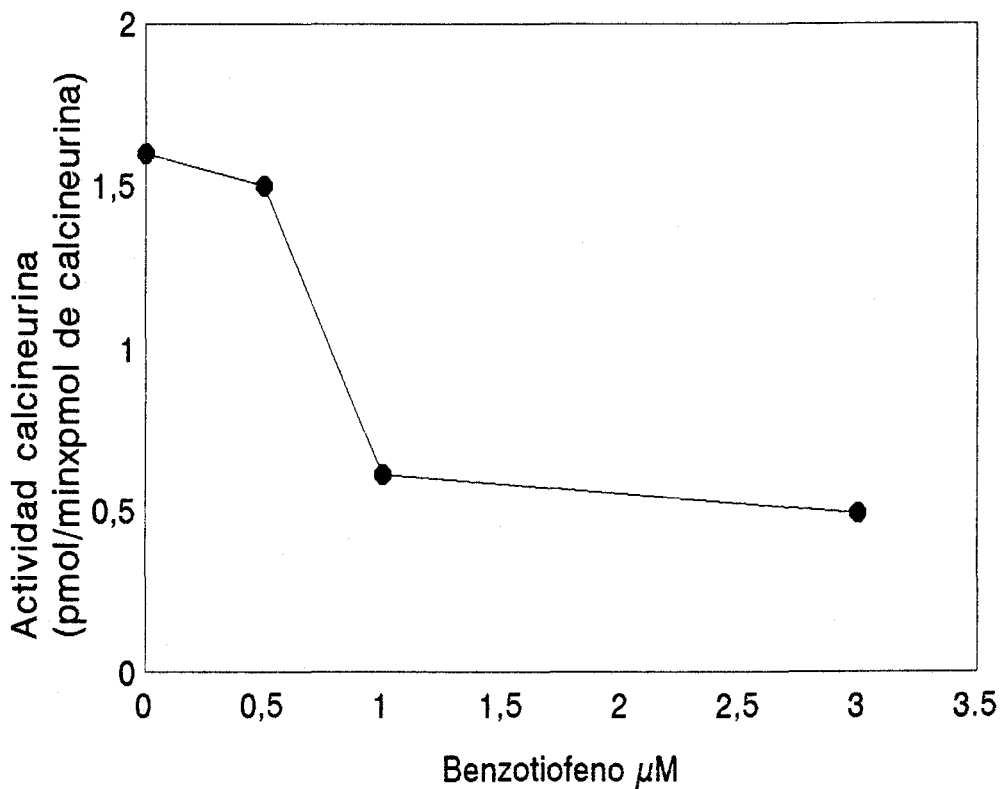


Fig 4. Efecto del benzotiofeno sobre la calcineurina pura. 20nM de calcineurina fue incubada a 37 °C con 0.5 μM de calmodulina en la presencia de diferentes concentraciones de benzotiofeno. La reacción se realizó usando como sustrato el PNPP, y la absorbancia se mide a 420 nm. Los valores se corresponden al incremento obtenido a los 45 minutos.

benzotiofeno era especifica de la calcineurina, se estudió el efecto de este compuesto sobre la actividad fosfatasa alcalina in vitro. La medida de la actividad fosfatasa alcalina se realizó por el método espectrofotométrico que usa el PNPP como sustrato. En la figura 5 se ilustra un experimento en el cual 120 μ U de fosfatasa alcalina fueron incubados a 37°C en presencia o ausencia de 1 μ M de benzotiofeno, junto con el sustrato PNPP. La medida de absorbancia se realizó a los tiempos indicados. La figura 5 muestra como los valores obtenidos en presencia o ausencia del benzotiofeno son similares. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitor del benzotiofeno es especifico de la calcineurina.

5. Medida de la actividad fosfatasa de la calcineurina con Malachita Green.

Antes de usar el método radioactivo para medir la actividad fosfatasa de la calcineurina ensayamos un método espectrofotométrico más sensible que el del PNPP (detecta 50-4 pmol de fosfato). Este método se basa en que el Pi forma un complejo estable con el molibdato (fosfomolibdato) y el reactivo Malachita Green a pH ácido. En la figura 6 se muestra un ensayo en el cual linfocitos humanos fueron incubados durante dos horas a 37°C con 4 μ g/ml de CsA, y diferentes concentraciones de benzotiofeno (2.5, 5 y 10 μ M). Después de lavar las células dos veces con PBS se lisaron en buffer de lisis hipotónico, y se centrifugaron 1 minuto a 12000 rpm, el sobrenadante obtenido se pasa por una columna de Sephadex G-25 para eliminar el fosfato libre. A continuación, el extracto se incubó 15 minutos junto con un péptido sintético fosforilado,

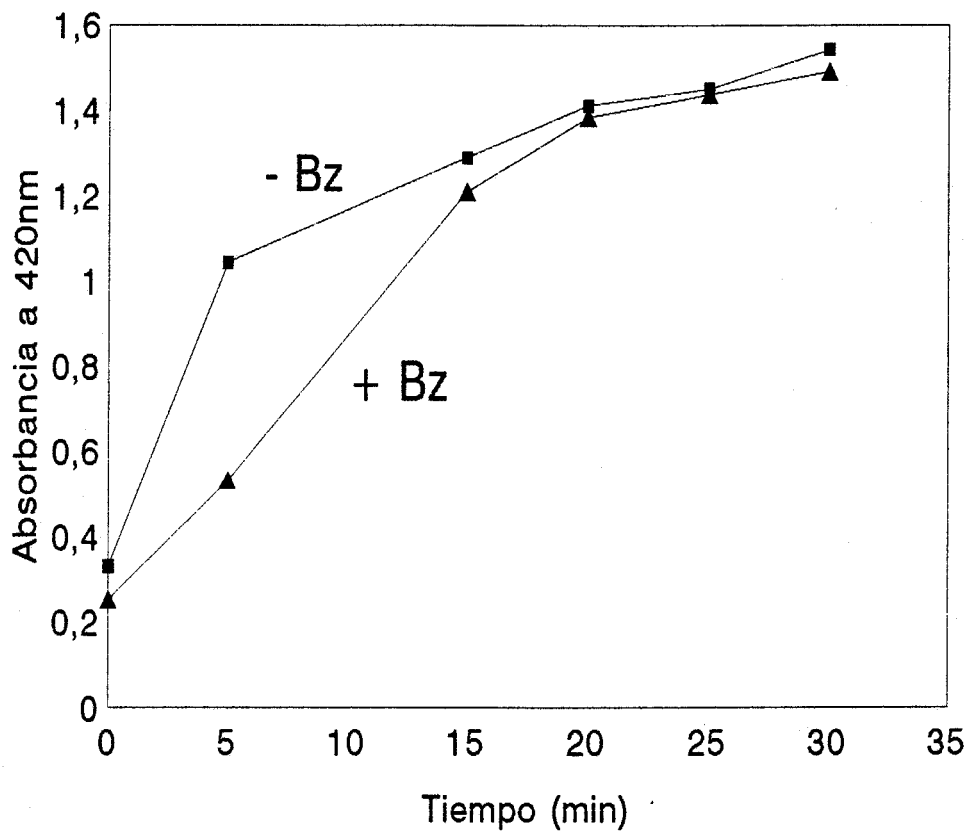


Fig 5. Efecto del benzotiofeno sobre la actividad fosfatasa alcalina en enzima purificado. 120 μ U de fosfatasa alcalina fueron incubadas en presencia de PNPP, como sustrato de la reacción, con o sin 1 μ M de benzotiofeno a 37 $^{\circ}$ C. La absorbancia fue medida a los tiempos que se indican.

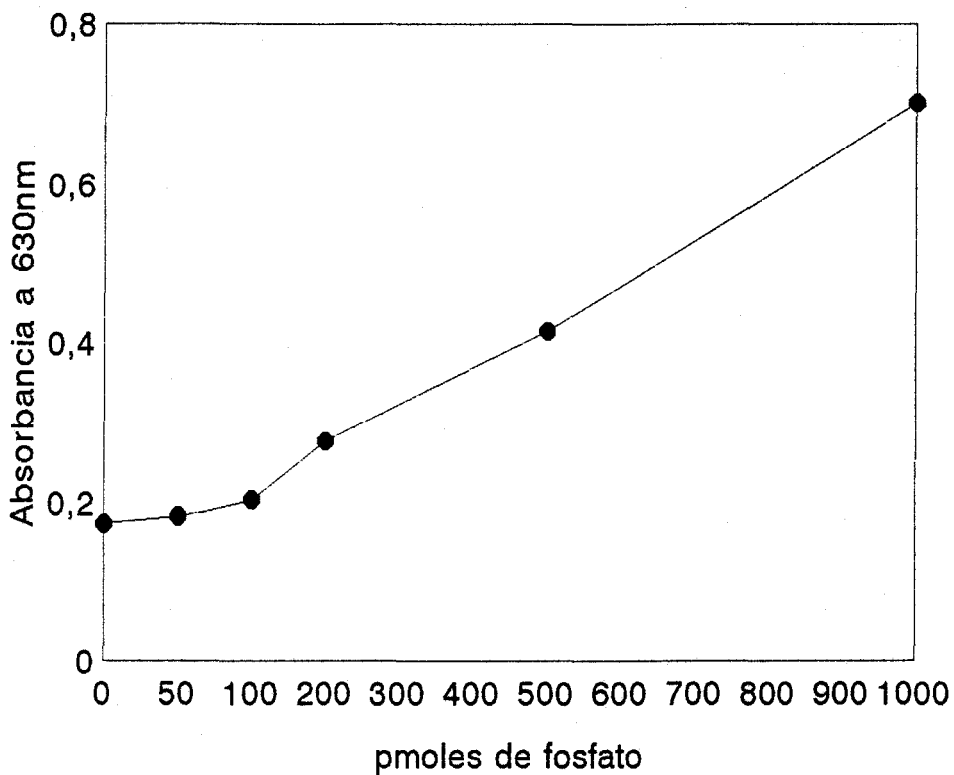


Fig 6. Medida de fosfato inorgánico con Malachita Green: curva patrón. Se mezcla 5 μ l de una solución diluida de KH_2PO_4 equivalentes a 50, 100, 200, 500 y 1000 pmoles de P_i , con 95 μ l de SO_4H_2 0.01 N y 150 μ l de reactivo color Malachita Green. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia en un lector de placas (MIOS-MERCK) a 630 nm.

como sustrato, y 1 μM de ácido okadaico. Luego se añadió el reactivo color Malachita Green y se incubó 15 minutos. La absorbancia se leyó a 630 nm en un lector de placas. Los valores obtenidos con los linfocitos estaban fuera del rango de linealidad de la curva patrón (datos no mostrados) por tanto este método no es lo suficientemente sensible para medir el efecto de estas sustancias sobre los linfocitos, a las concentraciones ensayadas.

DISCUSSION

DISCUSION

Estudios previos han indicado que los benzotiofenos presentan una gran cantidad de propiedades antiinflamatorias (70) e inhiben la replicación del virus tipo 1 de la inmunodeficiencia humana. Se ha demostrado que el agente inmunosupresor CsA y el benzotiofeno-2-carboxamide,5-metoxi-3-(1 metiletoxi)-,1-oxide (benzotiofeno) bloquean la unión del p53 y NFk β a la región LTR del HIV-1 inducida por PHA, un activador del receptor de las células T. Además, ambos agentes también inhiben la inducción por PHA de la transcripción mediada por un fragmento de la región LTR del HVI-1 que contiene los sitios p53 y NFK β (56). Por tanto, como el benzotiofeno presenta similares propiedades que la CsA y como la actividad enzimática diana de esta sustancia es la calcineurina, nosotros estudiamos el efecto del benzotiofeno sobre este enzima.

La incubación de células Jurkat con benzotiofeno resulta en una inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina dosis-dependiente (fig.1). Además, este efecto depende del tiempo (fig.2). por otra parte, el benzotiofeno no disminuye la actividad del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) indicando que este compuesto no es tóxico para las células (fig.1). El benzotiofeno y la CsA también inhiben la actividad fosfatasa de la calcineurina en extractos de células (Fig.3) y del enzima purificado (fig.4). Sin embargo, el benzotiofeno no afecta la actividad fosfatasa alcalina (Fig.5) indicando que el efecto de este compuesto es específico sobre la calcineurina.

Por lo tanto, los resultados presentados en este estudio

demuestran que el blanco de la acción del benzotiofeno es la misma actividad enzimática que para la CsA, sugiriendo que la inhibición de la calcineurina es un mecanismo de acción común para ambas drogas, que explica su similar efecto sobre la actividad transcripcional de p53 y NF κ B. Por otra parte, el benzotiofeno tiene efectos adicionales sobre los primeros hechos que ocurren cuando se activa el TCR. Por ejemplo, bajas concentraciones de benzotiofeno inducen un lento y continuo aumento de los niveles de calcio intracelular en linfocitos T, e inhiben la elevación del calcio intracelular inducido por PHA en estas células (observaciones no publicadas).

El efecto del benzotiofeno sobre la actividad calcineurina ha sido también investigado por experimentos de sobreexpresión de este enzima in vivo. Ha sido demostrado que la sobreexpresión de calcineurina en células Jurkat le confiere más resistencia a los efectos de CsA y FK506 y aumentan la transcripción de NFAT y NFIL2A (50,51). Cotransfectando 121,+232 HIV-1 LTR CAT con pSR α - Δ CAM, un vector de expresión pSR α que contiene una forma constitutivamente activa de la calcineurina, en células Jurkat y fibroblastos humanos normales, se ha visto que la calcineurina induce la actividad transcripcional de este fragmento LTR del HIV en ambos tipos de células. La incubación de estas células con benzotiofeno inhibe este efecto de la calcineurina de una forma dosis dependiente.

Por otra parte, como el benzotiofeno inhibe la actividad transcripcional mediada por NF κ B y p53 se ha investigado si la calcineurina está involucrada en la regulación de la actividad transcripcional del NF κ B y p53. Ha sido demostrado que la mutación de los sitios del NF κ B y p53 anulan completamente la

inducción de la actividad de la región LTR del HIV por calcineurina, indicando que la actividad transcripcional del NF κ B y p53 pueden ser moduladas de una manera calcineurina dependiente. Previamente, ha sido demostrado que inhibidores de la calcineurina modulan la actividad transcripcional del NF κ B (110-113). Por otra parte, la activación del p53 nos lleva a la parada del crecimiento celular en la fase G1/S (114,115) o la inducción de apoptósis (116,117), de ese modo previene la proliferación de células dañadas genéticamente (118). La pérdida de la función supresora del p53 a través de mutaciones es un común suceso en el desarrollo de una amplia variedad de cánceres humanos (119) y puede contribuir a un incremento en el número de anormalidades genéticas (120,121). Por tanto, la regulación de la actividad transcripcional del p53 por la calcineurina puede tener importantes implicaciones para las funciones de regulación del crecimiento de las células por esta proteína (122-124).

El mecanismo como la calcineurina puede regular la actividad transcripcional del NF κ B y p53 es desconocido. Una clara relación entre calcineurina y la actividad transcripcional solo ha sido demostrada para el NFAT. La calcineurina directamente defosforila el NFAT y regula la actividad transcripcional de este factor (125,126). Ha sido demostrado que la calcineurina puede regular la interacción del NF κ B con su inhibidor I κ B. Se ha demostrado que la calcineurina estimula al NF κ B al incrementar la inactivación del I κ B/MAD3, un inhibidor del NF κ B, de ese modo se incrementa la capacidad de unión del NF κ B al ADN (110). Recientemente ha sido publicado que TNF α y mitógenos inducen una familia de cinasas llamada

SAPKs (stress activated protein kinases, revisada en 127). Estas cinasas regulan la capacidad de muchos factores de transcripción, incluyendo c-jun y ATF2 (128), para transactivar su ADN diana. Un miembro de esta familia de cinasas, la SAPK1 fosforila al p53 (129). Por otra parte, la actividad de esta cinasa SAPK1 (130) es inhibida por la CsA, sugiriendo que la actividad SAPK puede ser regulada por calcineurina. Por lo que una hipótesis, es la existencia de un complejo camino de señales en que la activación de calcineurina y las cinasas SAPKs pueden dar lugar a la fosforilación del p53 y la transactivación de sus dianas genéticas que activan la proliferación.

**III.B. LAS SEÑALES DE TRANSDUCCION A TRAVES DEL ANTIGENO
CD69 INVOLUCRA LA ACTIVACION DE LA PROTEINA CINASA P56^{lck}**

INTRODUCCION

INTRODUCCION

EL CD69.

El antígeno CD69 se identificó inicialmente, en estudios con AcM anti-linfocito activado, como un antígeno de aparición muy temprana tras la activación de células T con ésteres de forbol, por lo que fue denominado EA1 ("early activation antigen 1")(131). CD69 fue posteriormente identificado mediante el AcM MLR3, y fue relacionado funcionalmente con la inhibición de la proliferación de linfocitos T, inducida con AcM anti-CD3 inmovilizados e interleucina 1, o células accesorias (132). De nuevo, mediante el uso de un AcM, Leu-23, se demostró la expresión del antígeno CD69 en células NK tras la activación con IL-2 y paralelamente a la adquisición de la actividad lítica (133). La importancia funcional de esta molécula fue reconocida en otro de los estudios iniciales con AcM anti-CD69, donde la respuesta proliferativa de las células T estaba muy aumentada al incluir los AcM anti-CD69, junto con activadores policlonales como PMA, PHA, y AcM anti-CD3 (134). Con posterioridad, otros grupos describieron similares efectos funcionales con otros AcM anti-CD69 (135-137). Paralelamente, se describió en ratón una molécula de características homólogas al CD69 humano, y a través de la cual también se estimulaba la proliferación de células T murinas en presencia de PMA (138).

El CD69 es una glicoproteína compuesta de dos cadenas polipeptídicas de 33 y 27 KDa (en condiciones no reductoras aparece como una sola cadena de 60 Kd) unidas por puentes disulfuros intercatenarios, las cuales están constitutivamente fosforiladas. Estas cadenas se forman tras una glicosilación

diferencial de un esqueleto polipeptídico de 24 Kd mediante la adición de oligosacáridos unidos en N- de tipo complejo, esta glicosilación no es necesaria para su transporte ni expresión en la membrana (139).

La molécula CD69 no se detecta sobre la superficie de las células en linfocitos T en reposo. Sin embargo, tras la activación con PMA se induce rápidamente su expresión, pudiendo ser detectada a los 30 min, y que después de 1 h se expresa en un 85-90% de la superficie de las células (131). La expresión de CD69 en PBL puede inducirse a través de varios estímulos como ésteres de forbol, lectinas mitogénicas, o ACM anti-CD3, pero no por el ionóforo de Ca^{2+} A23187 (134). Además también se induce por anticuerpo CD28 y choque térmico (140). La expresión de este antígeno precede a la de otras moléculas de activación temprana como 4F2 o la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) (134). La expresión de esta molécula requiere de la síntesis activa de mRNA y proteínas (131,141,142) y depende de la activación de la PKC, como lo demuestra su inducción con dioctanoilglicerol, un análogo sintético del diacilglicerol, el activador fisiológico de la PKC, o su bloqueo con H7, un inhibidor de PKC (141,143). Además de expresarse en células T activadas se expresa constitutivamente en una subpoblación de timocitos (CD3_{bright}) y en plaquetas (144,145), y su expresión es inducible en células B, neutrófilos y eosinófilos (136,146,147).

La molécula CD69 funciona como un receptor que transmite señales de activación en distintos tipos de células. Una vez que CD69 es expresado en la superficie de los PBL tras la estimulación con dosis submitogénicas de PMA, la unión de los

AcM anti-CD69 induce la síntesis de IL-2, la expresión del receptor de IL-2, y una fuerte respuesta proliferativa (134). La expresión del complejo CD3/TCR en superficie, y la activación simultánea de la PKC son necesarias para la inducción de la respuesta proliferativa por los AcM anti-CD69 (141,148). La estimulación de la expresión de los genes de la IL-2, del IFN-gamma, del TNF-alfa y del proto-oncogén c-fos también es inducida a través de CD69 (137,149,150). El entrecruzamiento de la molécula CD69 induce una elevación prolongada en la concentración de Ca^{2+} , que podría ser la señal implicada en la activación celular (135,142). Además se ha descrito la asociación de CD69 con una proteína que une GTP (140). Asimismo, CD69 también actúa como una molécula transductora de señales en células NK y en plaquetas, induciendo la lisis redirigida de células diana por parte de células NK activadas con IL-2, y la agregación plaquetaria, acompañada de entrada de Ca^{2+} , e hidrólisis de ácido araquidónico mediada por la fosfolipasa A_2 en plaquetas (145,151,152).

La función de CD69 sigue todavía sin determinar, pero tras el clonaje del cDNA que codifica la molécula, se han abierto nuevas expectativas de que CD69 sea un receptor celular, y se ha iniciado la búsqueda del supuesto ligando. En este sentido, la comparación de la secuencia de aa de CD69 con otras secuencias conocidas, indica que CD69 muestra homología con proteínas de una superfamilia que se caracteriza por presentar un dominio de lectina animal dependiente de Ca^{2+} (tipo C), y que también poseen una orientación en la membrana de tipo II (153). Esta superfamilia incluye la familia de genes que codifican los antígenos NKG2 humano, NKR-P1 de rata y ratón, y Ly49 de ratón,

que se expresan de forma preferente en células NK y en algunos clones de células T (154,155). Los antígenos de las familias NKR-P1 y Ly49 también forman homodímeros unidos por puentes disulfuro, y están implicados en la función de las células NK. Se cree que estos antígenos pueden mediar el reconocimiento de la célula NK (155).

El antígeno CD69 comparte características funcionales con estos receptores NK específicos (133,151), aunque se expresa de forma inducible en una gran variedad de células hematopoyéticas. Los efectos agonistas de los AcM anti-CD69 humano y de ratón en la estimulación de la lisis celular redirigida de células NK activadas con IL-2 es similar a lo descrito para los AcM anti-NKR-P1 de rata y de ratón (156,157). Por otra parte, el gen que codifica el antígeno CD69 humano ha sido mapeado en la región distal del brazo corto del cromosoma 12, en las bandas p13-p12 (158,159). Los genes que codifican los antígenos NKG2 también han sido localizados en este cromosoma (160). En el ratón, los genes que codifican Ly49 y NKR-P1 están genéticamente unidos en la porción distal del brazo corto del cromosoma 6 de ratón, que es homólogo al cromosoma 12 humano (155). La existencia de un complejo genético que codifica una familia de receptores con dominios de lectina tipo C que se expresan en linfocitos T activados y en células NK abre nuevas expectativas en términos de su función y regulación en el sistema immune.

Se postula que la función de los miembros de la familia de lectinas de tipo C es la de receptores celulares, que en principio participarían en el reconocimiento de carbohidratos. Los ligandos de la mayoría son todavía desconocidos, aunque en

algunos de los casos en los que se conoce el ligando como CD23 y CD72 no se trata de carbohidratos. CD23 es el receptor de baja afinidad de Fcε, y recientemente se ha descrito su interacción con CD21 (161). CD69 tiene un patrón de expresión parecido a CD23, que se expresa en células B, y es inducible en monocitos, macrófagos y células T, y también induce la proliferación de células linfoides. CD72/Lyb-2 es una proteína que se expresa en células B y que también induce su proliferación (162). Estudios recientes muestran que CD72 es el ligando de CD5 que se expresa en todas las células T maduras y media señales de co-estimulación. Otro miembro de esta familia del que se conoce el ligando es el receptor hepático de asialoglicoproteínas, que participa en el aclaramiento plasmático de glicoproteínas (163).

p56^{lck}, PRODUCTO DEL PROTOONCOGEN LCK.

El p56^{lck} es una proteína con actividad tirosina cinasa de la familia src que más abundantemente se expresa en los linfocitos T (164,165). Es codificada por el protooncogen lck. Esta proteína fue detectada por primera vez en la línea de células T de linfoma LTSRA (166-168), el cual sobreexpresa el gen lck debido a la inserción de secuencias del promotor viral. Primeramente el gen lck fue clonado y secuenciado de LSTRA y murine timocitos (169), y más tarde de linfocitos T humanos (170,171).

El p56^{lck} no posee dominios extracelulares o transmembranales, de ese modo no puede interaccionar con factores externos. Sin embargo, al igual que los demás miembros de la familia de proteínas cinasas src, el p56^{lck} está asociado

a la membrana por su extremo N terminal, el cual se encuentra unido covalentemente a un ácido mirístico que está anclado en la membrana (166,172,173), donde se piensa que el p56^{lck} potencialmente modifica y/o amplifica las señales de traducción como respuesta a estímulos de proliferación y diferenciación (173).

PAPEL DEL P56^{LCK} EN LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.

El estímulo crítico para iniciar el proceso de activación de las células T a través del receptor específico del antígeno, es el contacto del antígeno con su receptor específico en la superficie de la célula T. Para que este contacto sea efectivo el antígeno debe ser procesado por una célula presentadora de antígeno (CPA), que lo presenta a la célula T en forma de pequeños fragmentos peptídicos unidos a las moléculas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (174). El receptor para el antígeno de la célula T (TCR) es un complejo compuesto de una serie de subunidades proteicas que se asocian durante la maduración de la células T y durante el reconocimiento del antígeno para transmitir una señal óptima de activación. Así, el complejo CD3 se asocia al heterodímero $\alpha\beta$ del TCR, conformando el módulo responsable de la traducción de la señal. Otro componente asociado funcionalmente al TCR $\alpha\beta$ son las moléculas coreceptoras, CD4 ó CD8, de la célula T, que actúan como ligandos para las moléculas del MHC de clase II ó I, respectivamente. Finalmente, la molécula CD45, que es una fosfatasa específica de tirosina, parece que se asocia también al TCR en determinadas situaciones, como las células T de

memoria, podría modular la traducción de la señal de activación (175).

Esta activación de linfocitos T por antígenos o anticuerpos al receptor de antígeno (antigen receptor) induce una multitud de cambios bioquímicos en las células estimuladas (176). En primer lugar se produce un incremento de la fosforilación en tirosina de proteínas (177-181). Una de estas proteínas es la fosfolipasa C, y esta modificación podría ser responsable del aumento de su actividad (182). La activación de la fosfolipasa C causa la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), dando lugar a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. Estos segundos mensajeros son responsables de los aumentos en la concentración de Ca^{2+} y en la actividad de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. Estas señales bioquímicas tempranas (activación de PTKs y PKC, y aumentos en el Ca^{2+} intracelular) son traducidas al núcleo a través de una serie de intermediarios. Finalmente, estas señales actúan de forma sinérgica induciendo la activación de los factores transactivadores que se necesitan para la transcripción del gen de la IL-2, que de forma autocrina, a través de su receptor homólogo, induce la proliferación clonal de la célula T (183). Como hemos dicho todos estos cambios son disparados por el aumento de fosforilación de proteínas en tirosina, por tanto, como ninguna de las subunidades del receptor del antígeno de las células T poseen actividad tirosina cinasa intrínseca (184) necesitan la interacción con proteínas tirosinas cinasas de citoplasma. Hay estudios que implican a 4 tirosinas cinasas citoplasmáticas en la activación de las células T: la lck y fyn

cinastas, las cuales son miembros de la familia de tirosinas cinasa src, y Syk y ZAP-70 de la familia de tirosinas cinastas syk.

La activación de las células T depende de la presencia de lck. Esto ha sido puesto de manifiesto por la introducción de lck en una variante de células Jurkat humanas no sensibles (180) y la línea de células T murina CTLL-2 (181) las cuales habían perdido la expresión de lck endógeno. Por la transferencia del lck se restaura la capacidad de estas células para responder a señales a través del antígeno y exhibir actividad citosólica, respectivamente.

Aunque es probable que las proteínas p56^{lck} participen en la activación de células T, fosforilando sustratos polipeptídicos (185), hay un ejemplo de una línea de células que se hace sensible a la estimulación a través del receptor del antígeno por un fragmento no catalítico del p56^{lck} (186).

CONEXION DEL P56^{LCK} CON OTRAS MOLECULAS, CD4/CD8.

Las moléculas CD4 y CD8 son glicoproteínas transmembranales expresadas por funcionalmente distintos subtipos de las células T maduras y por una gran parte de timocitos inmaduros. Ambas moléculas, que se asocian físicamente al TCR cuando las células T se activan por el antígeno (187), son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, difiriendo considerablemente en su primera secuencia (188,189). Mientras CD4 es aparentemente un monómero, CD8 puede existir como un $\alpha\alpha$ homodímeros o $\alpha\beta$ heterodímeros. Tanto una como otra se unen a regiones monomórficas de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC),

clase II en el caso del CD4 y clase I el CD8 (190,191).

Estás dos glicoproteínas tienen funciones similares en la activación de las células T. Sirven como moléculas de adhesión debido a su afinidad específica por las moléculas del MHC (190,191) como hemos dicho antes, estabilizando la unión entre la célula T con la célula presentadora del antígeno (APC) (192-194). Además, pueden transducir señales o facilitar la transducción de la señal mediada por el complejo TCR al unirse a las moléculas del MHC, promoviendo por lo tanto las respuestas funcionales posteriores de las células T. Por otra parte, tanto el CD4 como el CD8 juegan un importante papel en la selección del repertorio de receptores en las células T en el timo (195-197). También se conoce que el p56^{lck} está asociado físicamente con el dominio citoplasmático de las moléculas CD4 y CD8 en las células T (198,199). Por lo tanto, esta proteína podría jugar un importante papel en estos procesos específicos de los linfocitos T (200). Este hecho se apoya en estudios de transfección que utilizan formas mutantes de la molécula CD4 con colas citoplasmáticas alterada indicando que la unión de lck al CD4 puede ser necesario para una activación completa de la célula T (201,202).

PAPEL REGULADOR DEL CD45 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL P56^{LCK}.

El p56^{lck} como los demás miembros de la familia de proteínas cinasas src, está formada por un único dominio NH₂, un conservado dominio de unión SH2/SH3 y un dominio catalítico carboxilo terminal, con una tirosina autofosforilada y una tirosina reguladora, Tyr- 394 y 505, respectivamente (203). Cuando el residuo de tirosina Tyr-505 se encuentra fosforilado

la actividad cinasa está inhibida (204). Ha sido demostrado que el p56^{lck} está asociado físicamente con la molécula CD45 (también llamada T200) ó antígeno común leucocitario (205), que es la más abundante tirosina fosfatasa encontrada en todas las células hematopoyéticas nucleadas (206,207). De forma que el CD45 al defosforilar el residuo de tirosina Tyr-505 de la proteína p56^{lck} la activa (208), participando en la transducción de señales mediadas por el TCR. Exactamente como interviene el p56^{lck} en los caminos de señales mediados por el TCR no está claro, como recientes datos indican que esta defosforilación no necesariamente nos lleva a un incremento en la actividad cinasa (209). La defosforilación de estas cinasas puede también resultar en la liberación de la tirosina carboxi terminal del dominio SH2 intramolecular, lo cual permitiría la unión al dominio SH2 desocupado de otras proteínas fosforiladas en tirosina. Por lo tanto el CD45 puede regular las interacciones con el dominio SH2 del p56^{lck} que pudieran ser cruciales en la mediación de las señales inducidas por el TCR. De acuerdo con este modelo es la demostración que el dominio SH2 del p56^{lck} también juega un importante papel en la activación de las células T (210).

OBJETIVOS.

Las señales de transducción implicadas en la activación celular a través del antígeno CD69 son mal conocidas. Debido al papel central del $p56^{lck}$ en la activación de las células T, el objetivo de este trabajo era investigar si la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$ participa en la cascada de señales que se desencadenan al estimular el receptor CD69 con un AcM anti-CD69.

El abordaje experimental se ha centrado en:

- 1.- Dependencia del tiempo y la concentración de AcM anti-CD69 de la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$ inducida por el AcM anti-CD69.
- 2.- Requerimiento de calcio para dicha fosforilación.
- 3.- Influencia de la CsA sobre la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$ inducida por el AcM anti-CD69.
- 4.- Efecto de inhibidores de tirosina fosfatasa/cinasas sobre la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$: PhAsO y genisteína.
- 5.- Intervención del AMPc en la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$.
- 6.- Determinar la asociación del CD69 con la proteína $p56^{lck}$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Fosforilación de la proteína p56^{lck} inducida por el AcM anti-CD69.

Como antes se ha indicado el p56^{lck} desempeña un papel crucial en el proceso de activación de los linfocitos T (180,181). Esta proteína está regulada de forma negativa por una tirosina fosfatasa, el CD45, la cual al desfosforilar el residuo Tyr-505 del p56^{lck} lleva a la activación de esta proteína (208). La fosforilación en tirosina, que se produce en el residuo de tirosina Tyr-394 (211,212) de la proteína p56^{lck} es una etapa previa en la activación y fosforilación consiguiente de otras proteínas situadas downstream (corriente abajo) en la vía de las señales de transducción (112,113).

Así mismo, también se ha señalado que el activador fisiológico de la proteína de membrana conocida como CD69 aún no está identificado. Así pues, si enfrentamos a unas células con anticuerpos específicos para una proteína determinada de su superficie podemos simular, una situación en la cual a las células "se les engaña", y pone en marcha unos mecanismos similares a lo que haría la molécula fisiológica (214,215). Nuestro interés fue investigar las señales de transducción implicadas en el proceso de activación a través del CD69.

En la figura 1A (líneas 1-4), se ilustra un experimento en el cual células Jurkat (linfomas de células T) se incubaron con AcM anti-CD69 a diferentes concentraciones. Después de lisar las células y realizar SDS-PAGE, el inmunoblot se hizo con AcM anti-PY. En la figura 1A (líneas 1-4) se muestra que en ausencia o a bajas concentraciones de AcM anti-CD69 no

existe señal de fosforilación en tirosina del p56^{lck}. Sin embargo, a dosis mayores (20 y 60 µg por ml) se detecta una clara señal de fosforilación en tirosina.

Ocasionalmente, se ha observado en algunas preparaciones celulares una fosforilación del p56^{lck} en ausencia del AcM anti-CD69. La adición posterior del anticuerpo produjo un ligero incremento en la fosforilación en tirosina. No tenemos explicación para interpretar esta activación inespecífica en células teóricamente en reposo. Este hecho ha sido previamente observado por otros investigadores (216).

Es de señalar que la expresión constitutiva de CD69 en células en reposo es del orden del 10% (217). Este pequeño valor parece ser suficiente para inducir una fosforilación en tirosina del p56^{lck}. En experimentos previos observamos que cuando las células se activan con PHA durante 24 horas y se incuban posteriormente con AcM anti-CD69, no se detectó ningún incremento debido a que células sin AcM anti-CD69 tenían ya un p56^{lck} altamente fosforilado.

En este sentido se incubaron células con 100 nM de PMA 2 horas con el fin de analizar si la activación de la proteína cinasa C actúa de forma sinérgica con el AcM anti-CD69. En la figura 1A se demuestra que no se observaban diferencias entre las células preincubadas con PMA y las que no se preincubaron.

La figura 1B ilustra la presencia del p56^{lck} en nuestras preparaciones. Tanto en ausencia como en presencia de altas concentraciones de AcM anti-CD69, cantidades similares de p56^{lck} estaban presentes. Es interesante señalar un fenómeno previamente ya descrito (211) del desdoblamiento del p56^{lck} en dos bandas cuando las células se estimulan con PMA. En algunas

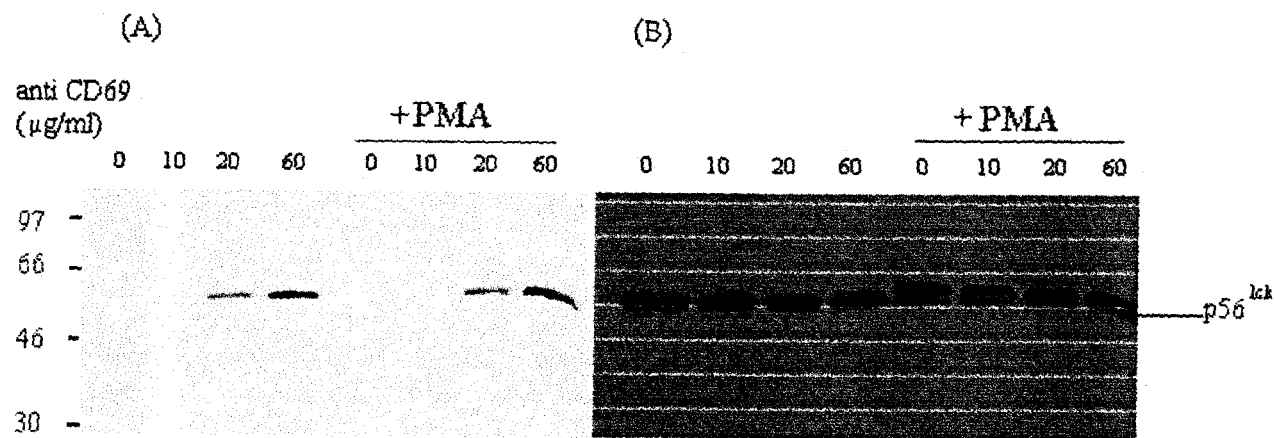


Fig 1. Fosforilación de la proteína p56^{lck} inducida por el AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) fueron preincubadas solas o con 100 nM de PMA durante 2 horas a 37 °C. Después las células fueron incubadas con las dosis indicadas de AcM anti CD69 durante un minuto a 37 °C. Entonces fueron lisadas y la fosforilación en tirosina del p56^{lck} (A) y la expresión del p56^{lck}, fueron analizadas por inmunoblot con AcM anti PY o anticuerpo anti p56^{lck}, respectivamente.

preparaciones celulares se observó un similar desdoblamiento del p56^{lck} en dos bandas.

En los siguientes experimentos se analizó la cinética de fosforilación en tirosina del p56^{lck} tras la incubación con una sola concentración de AcM anti-CD69 (60 µg/ml). La figura 2A muestra un inmunoblot con AcM anti-PY de células Jurkat en el que se observa un incremento de la fosforilación en tirosina del p56^{lck} con respecto al tiempo, siendo máxima a los 15 minutos.

Posteriormente la membrana fue sometida a un proceso de "stripping" para eliminar el AcM anti-PY unido a las proteínas, y se realizó el inmunoblot con el anti p56^{lck} (Fig. 2B) donde se muestra que los cambios en la fosforilación del p56^{lck} no se deben a modificaciones en la cantidad de esta proteína a través del tiempo.

Con el fin de analizar la especificidad celular de la fosforilación en tirosina del p56^{lck} estudiamos la cinética de la fosforilación de esta proteína en PBL obtenidos de sangre de donadores sanos (Fig. 2C). Para ello las células se incubaron con una sola cantidad de AcM anti-CD69 (60 µg/ml) durante los tiempos que se indican. Se observó un aumento de la fosforilación en tirosina del p56^{lck} que es máxima a los 15-30 minutos, para empezar a decrecer con 1 hora de incubación hasta ser prácticamente nula a las 20 horas de incubación.

Después de eliminar los AcM anti-PY unidos a las proteínas, se hizo el inmunoblot con anti p56^{lck} comprobando nuevamente que los cambios en la fosforilación en tirosina del p56^{lck} no se debían a diferencias en la cantidad del p56^{lck} a través del tiempo (Fig. 2D).

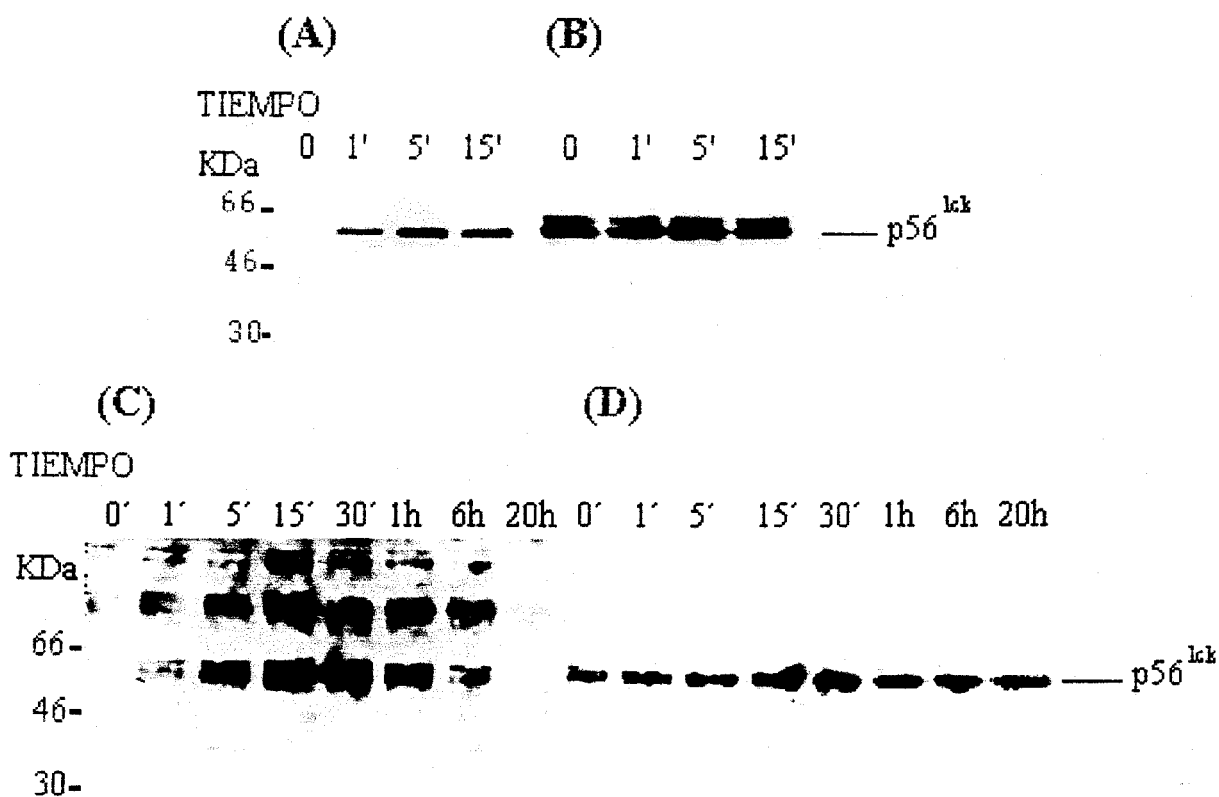


Fig 2. Cinética de la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) (A,B) o linfocitos humanos (C,D) fueron incubados con 60 $\mu\text{g/ml}$ de AcM anti CD69, por los tiempos indicados. Entonces las células fueron lisadas y analizadas por inmunoblot con AcM anti PY (A,C) o anticuerpo anti p56^{lck} (B,D).

Previamente se ha demostrado que el anti-CD69 (134) por sí mismo cuando se une a linfocitos humanos no tiene capacidad proliferativa, ya que requiere la presencia simultanea de PMA. Ello sugiere que la señal inducida por el anti-CD69 sobre la fosforilación del p56^{lck} es un requerimiento necesario pero no suficiente para inducir la proliferación de los linfocitos T.

2. Requerimiento de calcio para la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por el AcM anti-CD69.

Ha sido demostrado que la presencia de AcM anti-CD69 promueve el incremento de calcio intracelular en linfocitos T (142). Posteriormente nuestro grupo ha estudiado el mismo efecto sobre timocitos para ver si respondían de igual manera que las células maduras, observándose un aumento del calcio intracelular al estimular con AcM anti-CD69 (218).

En la figura 3 se ilustra como el calcio afecta a la fosforilación en tirosina del p56^{lck}. Para ello se incubaron células Jurkat con diferentes concentraciones de AcM anti-CD69 durante 5 minutos. Previamente a la estimulación con anticuerpo, algunas fracciones celulares se incubaron 30 minutos a 37°C en medio KRB sin calcio y suplementado con EGTA 5 mM, con el objeto de deplecionar el calcio intracelular. Se observó que cuando al disminuir los niveles de calcio intracelular la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por el AcM anti-CD69 disminuye (Fig. 3). Esto sugiere que la fosforilación del p56^{lck} requiere la presencia de calcio.

Así mismo, el incremento observado previamente en los niveles de calcio intracelular podría tener una función bioquímica como un requerimiento para la fosforilación del

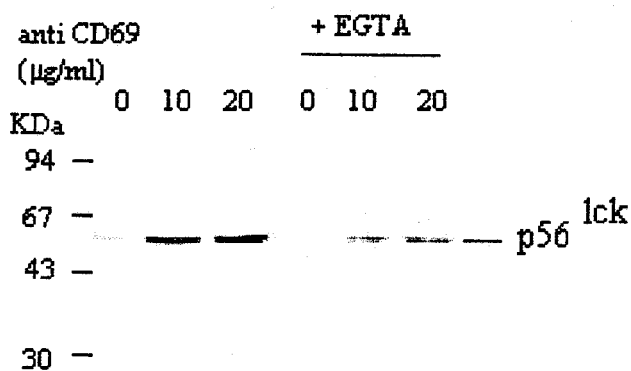


Fig 3. Requerimiento de calcio para la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) fueron preincubadas o no con 5 mM de EGTA 30 minutos a 37 °C. Después las células fueron incubadas con las dosis de AcM anti CD69 que se indican, durante 5 minutos a 37 °C. Entonces se lisaron y se analizaron por inmunoblot con AcM anti PY.

p56^{lck}.

3. Efecto de la CsA sobre la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por el AcM anti-CD69.

Se ha demostrado que la CsA inhibe la expresión del CD69 de una forma dependiente de su concentración, cuando PHA fue usada como estímulo, sin embargo no tiene efecto cuando las células fueron estimuladas con mezereina (219).

En la figura 4 se muestra el efecto de la CsA sobre la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por el AcM anti-CD69. En el experimento que se presenta células Jurkat fueron preincubadas con 3 µg/ml de CsA por 30 minutos a 37°C, antes de ser estimuladas con diferentes concentraciones de AcM anti-CD69 por 5 minutos. Después se lisaron las células y se realizó el inmunoblot con AcM anti-PY.

En la figura 4 se muestra que la CsA inhibía la fosforilación en tirosina del p56^{lck}. Esta disminución depende de la concentración de AcM anti-CD69 que hemos usado.

Es de señalar, que a la concentración más alta de AcM anti-CD69 usada, la CsA carecía de efecto. Esto sugiere que ambos agentes (CsA y AcM anti-CD69) actúan sobre una misma molécula(s) o mecanismos bioquímicos de una manera competitiva.

4. Efecto de inhibidores de fosfatasas/cinasas sobre la fosforilación del p56^{lck} inducida por AcM anti-CD69.

Por otra parte nosotros también hemos estudiado si la inhibición de PTP y PTK podían modificar la respuesta al CD69, usando fenil arsine oxide (PhAsO) como un inhibidor de tirosina cinasas. Un estricto control sobre los niveles de

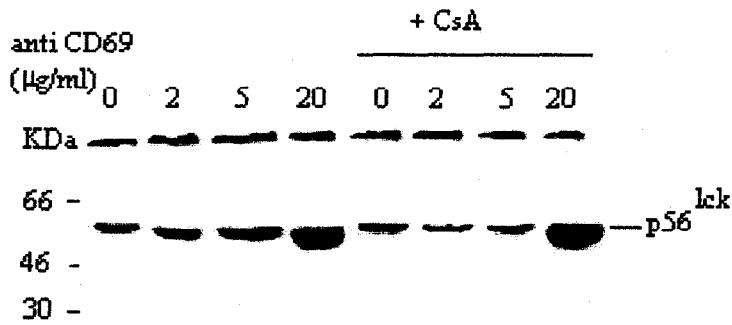


Fig 4. Inhibición por la CsA de la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) fueron preincubadas con 3 µg/ml de CsA 30 minutos a 37 °C, y luego fueron incubadas con diferentes dosis de AcM anti CD69 durante 5 minutos a 37 °C. Después las células se lisaron y se analizaron por inmunoblot con AcM anti PY.

fosforilación, particularmente de residuos de tirosina, parece ser necesario para el normal crecimiento de las células, puesto que la sobreexpresión o mutación de tirosinas cinasas endógenas a menudo nos conducen a una transformación de las células afectadas (220). El pretratamiento de células con PhAsO ha sido mostrado que aumenta la recuperación de fosfotirosinas (221) pero no tiene un efecto aparente sobre la actividad de dos PTKs, p56^{lck} y p59^{fyn}, en vitro (222). En la Fig.5 se ilustra los efectos del PhAsO sobre la fosforilación en tirosina inducida por el AcM anti CD69 en linfocitos. las células fueron pretratadas con 100 μ M de PhAsO por 10 minutos. Después fueron estimuladas con AcM anti CD69. Cuando las células se preincubaron con PhAsO (Fig 5 (A), líneas 2 y 4) un fuerte incremento en el conjunto de todas las fosfotirosinas fue detectado. Esto está de acuerdo con previos datos sobre linfocitos (221). Sin embargo, no se detectó un incremento adicional de fosforilación en tirosina del p56^{lck} cuando las células fueron estimuladas con ambos agentes (Fig 5 (A) línea 4), presumiblemente debido a la máxima fosforilación inducida solo por PhAsO.

El efecto de la genisteina es mostrado en la fig 5 (B). Es bien conocido que la genisteina inhibe la actividad cinasa del p56^{lck} purificado por inmunoafinidad de células T de sangre periférica humana (223). Células T de sangre periférica fueron preincubadas con 100 μ M de genisteina por 30 min. Después fueron estimuladas con AcM anti CD69. Nosotros observamos una clara disminución de la fosforilación del p56^{lck} cuando las células fueron pretratadas con genisteina. Estos datos sugieren que la fosforilación inducida por anti CD69 puede ser producida

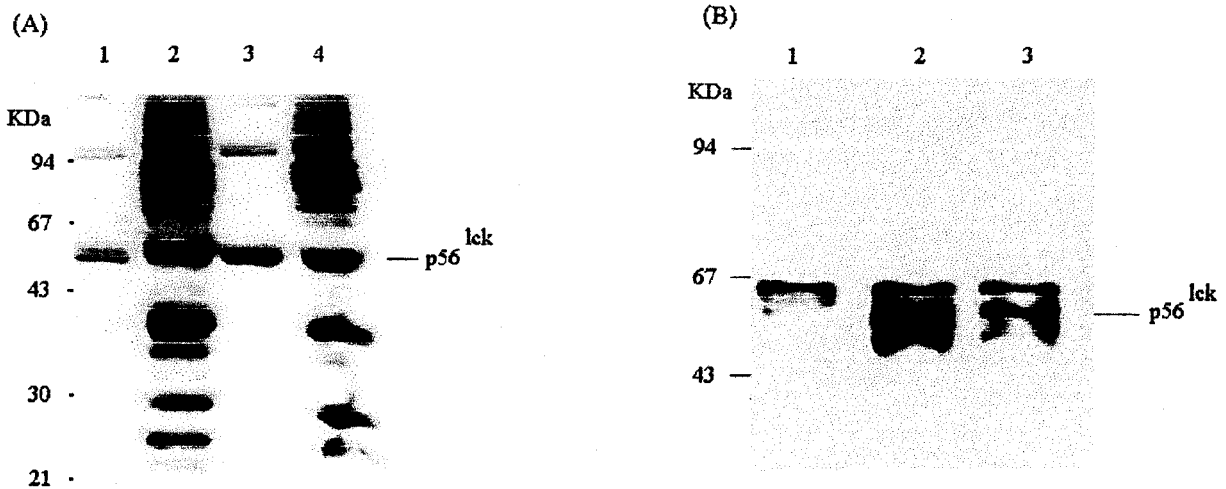


Fig 5. Efecto de inhibidores de fosfatasa/cinasas sobre la fosforilación del p56^{lck} inducida por el AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) fueron preincubadas con 100 μ M de PhAsO 10 minutos (A) o con 300 μ M de genisteina (B) 30 minutos a 37°C. Después fueron incubadas con 5 μ g/ml de anti CD69 5 minutos a 37 °C. Luego se lisaron y se analizaron por inmunoblot con anti PY. Panel A: línea 1, no tratadas; línea 2, PhAsO; línea 3, anti CD69; línea 4, PhAsO más anti CD69. Panel B: línea 1, no tratadas; línea 2, anti CD69; línea 3, genisteina más anti CD69.

por la autofosforilación del $p56^{lck}$, lo cual es fuertemente inhibida por genisteina. El mismo efecto ha sido descrito con la proteína $p56^{lck}$ purificada (223).

5. Requerimiento de AMPc para la fosforilación del $p56^{lck}$ inducida por el AcM anti-CD69.

Con el objeto de investigar los factores que intervienen en la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$, analizamos el efecto de un aumento del AMPc intracelular sobre esta fosforilación. En la figura 6 se muestra un experimento en el cual células Jurkat fueron incubadas con dibutiril AMPc, un compuesto que por sus propiedades lipofílicas penetra con facilidad en el interior de las células. Después fueron estimuladas 5 minutos con AcM anti-CD69. En la figura 6 se muestra un ligero aumento de fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$ cuando estimulamos las células con AcM anti-CD69 después de incubar con dibutiril AMPc (línea 3). Es de señalar que el AMPc por si solo produce un aumento de la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$ (línea 2). Estos datos indican que el AMPc al ser un efector alostérico de proteínas cinasas, podría estimular la actividad cinasa del $p56^{lck}$ o de otras proteínas, que podrían intervenir en la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$.

6. Asociación del CD69 con la proteína $p56^{lck}$.

Los datos mostrados en experimentos anteriores nos indican que un paso en la cascada de señales que se pone en marcha cuando las células se incuban con AcM anti-CD69, es la fosforilación en tirosina del $p56^{lck}$. Con el objeto de analizar la existencia de una asociación física entre el $p56^{lck}$ y el

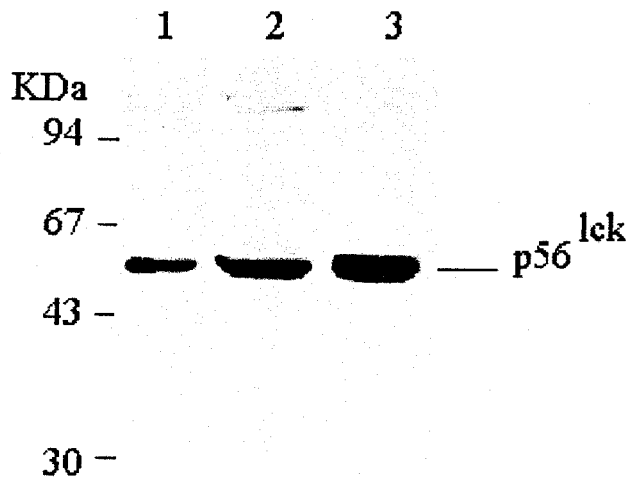


Fig 6. Requerimiento de AMPc para la fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por AcM anti CD69. Células Jurkat (4×10^6) fueron preincubadas con 2 mM de dibutiril AMPc 10 minutos a 37°C, y luego fueron incubadas con 5 μ g/ml de AcM anti CD69 durante 5 minutos a 37 °C. Después las células se lisaron y se analizaron por inmunoblot con AcM anti PY. Línea 1: control, línea 2: AMPc, y línea 3: AMPc más anti CD69.

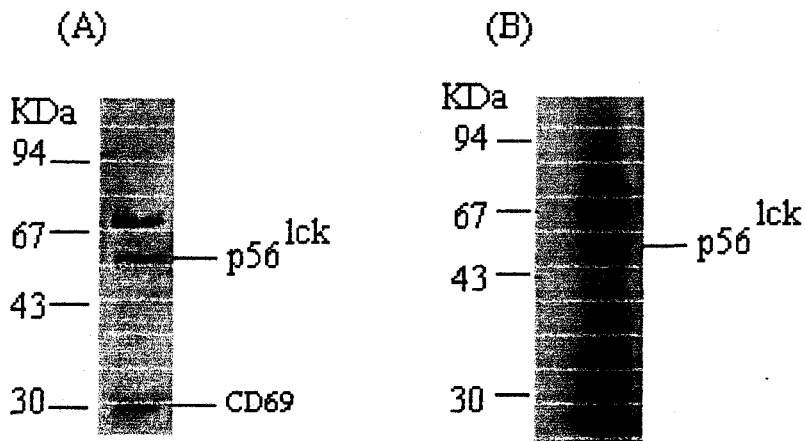


Fig 7. Asociación del CD69 con el p56^{lck}. Linfocitos humanos se lisaron con tampón 1 % Nonidet P40, y 72 µg del lisado celular fueron inmunoprecipitados con AcM anti CD69. La asociación de p56^{lck} con CD69 fue analizada por inmunoblot con anti p56^{lck}.

(B) Ensayo de actividad cinasa de inmunoprecipitados de células Jurkat. Tiempo de exposición 10 días.

antígeno CD69, hicimos dos ensayos, uno de coimmunoprecipitación, y otro de actividad cinasa basándonos en el hecho de que la proteína p56^{lck} es una tirosina cinasa (164,165).

En la figura 7 analizamos esta asociación. Lisados de linfocitos humanos en reposo con detergente, fueron incubados con AcM anti CD69, y los inmuno complejos fueron analizados por coprecipitación del p56^{lck} por immunoblotting con anti p56^{lck} y por un ensayo de proteína cinasa, puesto que el p56^{lck} es una proteína cinasa. Nosotros encontramos que que la proteína p56^{lck} coprecipita con el antígeno CD69, tanto en el ensayo de coimmunoprecipitación (Fig 7 (A)) como en el ensayo de proteína cinasa (Fig 7 (B)). Previamente nosotros verificamos que el AcM anti CD69 y el anti p56^{lck} usados precipitan de lisados con detergentes de linfocitos humanos la proteína p56^{lck} y el antígeno CD69, respectivamente.

DISCUSSION

DISCUSION

El tratamiento de linfocitos T con anticuerpos a proteínas de la superficie de los linfocitos T ha sido demostrado que imitan las interacciones de antígenos y células presentadoras de antígeno con estas proteínas de superficie (214,215). El compromiso del antígeno CD69 induce la proliferación de los linfocitos (134). En un intento para entender las señales de transducción lanzadas a través de la unión del CD69 con un anticuerpo monoclonal anti CD69, nosotros investigamos la posibilidad que el p56^{lck} pudiera estar implicado. En el presente trabajo nosotros mostramos evidencias de que la unión del CD69 con un AcM anti CD69 producía en PBL y células Jurkat una rápida y dosis dependiente fosforilación del p56^{lck}, acompañada por la aparición de una forma modificada de la proteína migrando aproximadamente a 60 KDa, designada como p60^{lck} o (211). Ha sido previamente descrito que la reducción en la movilidad electroforética de 56 KDa a una forma de 60 KDa, con la aparición de un doblete, es inducida por la unión del TCR con anticuerpos solubles, por tratamiento con IL-2 y con activadores de la PKC como el PMA. Por lo tanto, la capacidad del AcM anti CD69 para inducir la la aparición de un doblete del p56^{lck}, mostrado en el presente trabajo debe ser relacionado con la capacidad para actuar como una molécula de activación, análogamente como los agentes citados anteriormente, y también sugiere que la activación del p56^{lck} es una señal implicada en el proceso iniciado por la unión del antígeno CD69 con un AcM anti CD69. Otro parámetro usado anteriormente para identificar la activación del p56^{lck} fue la fosforilación en tirosina.

Nosotros mostramos evidencias que el tratamiento de linfocitos de la sangre o células Jurkat con anti CD69 resultan en un claro incremento en la fosforilación en tirosina del p56^{lck} (Fig 1 y 2). En la mayoría de nuestras preparaciones, ninguna señal de fosfotirosina en experimentos de inmunoblotting fue detectado. Similares resultados fueron anteriormente descritos para otros tipos de células en estado de reposo. Es interesante hacer notar que, como se ha indicado antes, Tyr-505 se fosforila más que la Tyr-394 en linfocitos de la sangre y células Jurkat no tratadas, sin embargo Tyr-505 no es detectada por anticuerpos específicos antifosfotirosina. Una similar ausencia de señal de fosfotirosina fue descrita en células CEM y RAMOS no tratadas. Sin embargo en otros casos, cuando el p56^{lck} ha sido inmunoprecipitado previamente a su detección por inmunoblotting, o en células LSTRA, las cuales sobreexpresan la proteína p56^{lck}, un cierto grado de fosforilación en tirosina fue detectado en inmunoblotting en células en reposo, aunque la fosforilación de la Tyr-394 permanece baja. Nosotros no tenemos una fácil explicación para esta aparente contradicción. Es posible que la Tyr-505 esté localizada en una posición inaccesible a anticuerpos antifosfotirosina, y solo después de diferentes tratamientos (ej: inmunoprecipitación) la estructura se abre.

El potencial requerimiento de Ca⁺² para inducir la fosforilación del p56^{lck} fue investigado en células Jurkat en el que se ha deplecionado los niveles de Ca⁺². En estas condiciones una reducción en la fosforilación del p56^{lck} fue detectada (Fig 3), apoyando la idea de que el Ca⁺² intracelular es requerido para activar algunas no bien caracterizadas cinasas

responsables de la fosforilación en tirosina del p56^{lck}. Está necesidad de la presencia de Ca⁺² intracelular para la fosforilación del p56^{lck} inducida por el AcM anti CD69 podría, además, estar relacionada al echo descrito anteriormente de que la unión del AcM anti CD69 al CD69, una vez que es expresado en la superficie de los linfocitos tras la estimulación con dosis submitogénicas de PMA, promueve el incremento de Ca⁺² intracelular en linfocitos T, así como la síntesis de IL-2, la expresión del receptor de IL-2 y una fuerte respuesta proliferativa (134).

Por otra parte hemos analizado el efecto de la CsA, un inhibidor de la fosfatasa serina/treonina fosfatasa calcineurina (109), sobre la fosforilación que hemos observado cuando estimulamos células Jurkat con AcM anti CD69, detectando una disminución de ésta. Esto puede sugerir que este enzima puede estar implicado en la fosforilación observada.

Teóricamente, la activación de la fosforilación en tirosina puede ser conseguida por estimulación de una tirosina cinasa o por inhibición de la actividad de una fosfotirosina fosfatasa. En este sentido investigamos el efecto del PhAsO, un inhibidor de tirosina fosfatasa (222), y de la genisteina, un inhibidor de proteínas tirosinas cinasas. En el primer caso (Fig 5 (A)) observamos un fuerte aumento de proteínas fosforiladas en tirosina, como ha sido descrito anteriormente (221), cuando se incuban las células con PhAsO. La falta de efecto sobre la fosforilación en tirosina del p56^{lck} cuando estimulamos con PhAsO y AcM anti CD69 puede ser debido a la máxima fosforilación inducida solo por el PhAsO. Por otra parte se ha descrito anteriormente (223) que la genisteina inhibe la

actividad cinasa del p56^{lck} purificado por inmunoafinidad de células T de sangre periférica humana y de la proteína p56^{lck} purificada, por lo que la fosforilación inducida por el anti CD69 pudiera ser producida por autofosforilación del p56^{lck}.

En la última parte de este estudio se ha investigado la posible unión física entre el antígeno CD69 y la proteína p56^{lck}, con ensayos de coprecipitación y de actividad cinasa. La unión observada podría ser similar a la descrita entre el CD4/CD8 y la proteína p56^{lck} (198,199). Por tanto en nuestro caso, al igual que en el descrito anteriormente, el p56^{lck} podría transducir las señales de fosforilación en tirosina disparadas por CD69 durante la estimulación del antígeno.

**III.C. LABILIDAD DE LA UNION DE LA CALMODULINA A MEMBRANAS:
EVIDENCIAS DE SU SEPARACION DE LA MEMBRANA DURANTE LOS
PROCESOS DE INMUNOBLOTTING**

INTRODUCCION

INTRODUCCION

CALMODULINA.

Kakiuchi y col. y Cheung (223 y 224) descubrieron independientemente una proteina termoestable de cerebro activadora de la fosfodiesterasa de nucleótidos ciclicos. Dos años más tarde Wolf y Siegel (225) purificaron una proteina que se unía al calcio de cerebro de bovino. Weisenberg (226) encontró que los microtúbulos eran estabilizados por concentraciones micromolares de calcio, y Bond y Clough (227) observaron que una fracción soluble de hemolisados estimulaban la actividad de Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-asas de las células rojas de la sangre. Pier y col. (228) descubrieron que una cadena ligera de una cinasa especifica de miosina de músculo esquelético era dependiente de calcio para su óptima actividad. Ahora se conoce que todos estos procesos están regulados por la misma proteina unida al calcio. Al ser una proteina que modula la actividad de enzimas por una manera calcio dependiente, esta proteina es conocida como Calmodulina. Anteriormente se han referido ha ella como proteina activadora, prteina moduladora y proteina reguladora dependiente de calcio (CDR).

La CaM es una proteina que se encuentra en casi todas las células eucariotas, la mayor parte en forma soluble. También ha sido encontrada en extractos de tejidos de invertebrados (229), en plantas (230-233) y un hongo (234). Es una proteina pequeña de 17.000 KDa, estable a ácidos y al calor. La secuencia de aminoácidos ha sido conservada, casi perfectamente, a través de la evolución. Debido al mayor número de residuos ácidos que básicos. La CaM posee un bajo punto

isoelectrico (235,236).

Teo & Wang (237) demostraron por primera vez la unión de la CaM al calcio. Estudios posteriores indican que la proteína une 4 calcio por molécula de calmodulina con una alta afinidad, en el rango μM . Con la unión de calcio la calmodulina sufre un gran cambio conformacional (238-241). Este cambio conformacional es requerido por la calmodulina para regular algunos de los sistemas de enzimas sobre los que actúa: regulador de degradación de nucleótidos cíclicos (243-244) por su acción sobre la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (245-249), y la adenilato ciclasa (250); regulación de la movilidad de las células, activando la cinasa miosina (251,252) y estimulando el desamblaje de los microtúbulos, que son unos componentes del citoesqueleto de las células (226); regulación de caminos metabólicos (253,254) y regulación de flujo de calcio a través de la bomba de Ca^{+2} de la membrana (255,256) y de la del retículo sarcoplásmico (257,258).

OBJETIVOS.

Puesto que han sido descritas dificultades en la detección de la calmodulina por inmunoblotting nosotros investigamos en este trabajo una serie de técnicas para mejorar su detección con el objeto de medir los niveles de CaM bajo diferentes patologías.

El abordaje experimental se ha centrado en:

1.- Análisis de la pérdida de calmodulina de la membrana en inmunoblotting por lavados.

2.- Detección de la calmodulina usando la técnica del Dot-blot. Análisis de diferentes técnicas para la fijación de la CaM a la membrana.

3.- Análisis de los niveles de calmodulina en tejidos mediante la inmunoprecipitación de la calmodulina marcada con I^{125} .

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Puesto que estamos interesados en investigar los niveles de CaM bajo diferentes patologías, nosotros hemos seguido la metodología clásica de blotting de extractos de células y CaM purificada sobre membranas sólidas, y la detección de la CaM con el uso de un anticuerpo policlonal anti-CaM y un anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa. Siguiendo este proceso, nosotros sin embargo, no fuimos capaces de detectar ninguna señal sobre las membranas, ni por quimioluminiscencia ni con técnicas colorimétricas. Dos posibilidades fueron consideradas: (i) la ausencia de señal fue debida a dificultades inherentes a la producción de anticuerpos contra CaM, como previamente ha sido señalado (259), resultando en la ausencia o en un bajo título de anticuerpo presente en el antisuero policlonal de conejo, y (ii) las propiedades hidrofóbicas de la CaM dificulta su unión a las membranas. Estos estudios fueron realizados para analizar estas dos posibilidades. Algunas dificultades para electrotransferir CaM a membranas han sido descritas previamente (260,261). Sin embargo, usando un sistema semi-seco para transferir la CaM no observamos tantos problemas.

1. Purificación de Calmodulina y de anticuerpo anti-CaM.

Las propiedades hidrofóbicas dependientes de Ca^{+2} de la calmodulina sirven como base para su purificación por cromatografía de fenil-Sefarosa (262). La calmodulina fue purificada de cerebro de cerdo. Después de hacer SDS-PAGE el gel fue teñido con nitrato de plata detectándose una sola banda. Esta proteína fue conjugada a KLH e inyectada a conejos,

el suero obtenido fue sujeto a precipitación con 50% (w/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado de proteínas obtenido fue disuelto en PBS, y se hizo una cromatografía sobre hidroxapatito. Las inmunoglobulinas fueron eluidas paso a paso con un gradiente de concentración de 50-600 mM de buffer fosfato pH 6.8. Las fracciones eluidas a una concentración 100 mM de buffer fosfato, las cuales dan la máxima absorbancia a 280 nm, se juntaron.

2. Pérdida de CaM de las membranas por lavado.

La figura 1 muestra la transferencia de CaM purificada a membranas de nitrocelulosa después de SDS-PAGE. Un gel (A) fue mantenido como control y dos geles (B y C) fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa por 5 y 16 min, respectivamente. CaM purificada corre como una banda simple en el gel (A), y después de 16 min de transferencia la CaM no fue visible en el gel después de su tinción con azul de Coomassie (C). Las membranas de nitrocelulosa, con la CaM transferida, fueron no tratadas (D), o bloqueadas e incubadas con anticuerpo policlonal anti-CaM y anti-IgG conjugado con peroxidasa (E y F). Mientras en (D) una señal de CaM fue encontrada después de su tinción con Negro Amido, ninguna señal fue detectada en (E) y (F) después del revelado del anticuerpo unido usando 4-cloro-1-naftol. Estos resultados evidencian la labilidad de la unión de la CaM a las membranas de nitrocelulosa. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se hizo el inmunoblot con membranas de PVDF, la proteína también se perdía durante los procesos de lavado e incubación. Otras condiciones para la transferencia fueron también

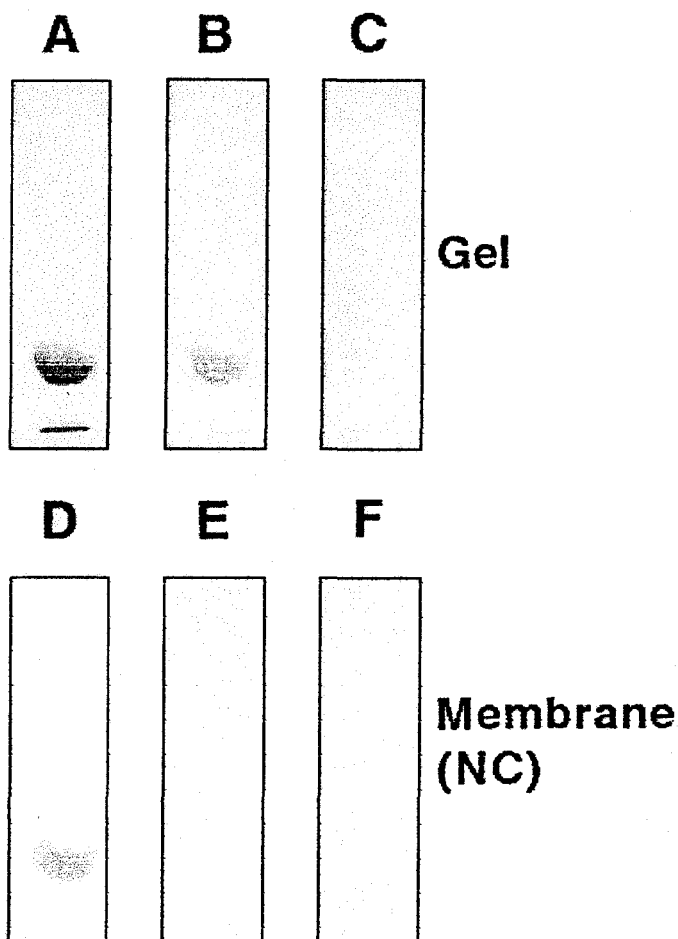


Fig. 1. Pérdida de la CaM transferida a nitrocelulosa después de bloqueo e incubación con anticuerpo policlonal anti-CaM. Después de la electroforesis de CaM purificada (40 μ g) el gel fue partido en tiras (A,B y C): (A) teñida con azul de Coomassie, sin transferir, transferidas a nitrocelulosa por 5 min (B) y 16 min (C), respectivamente. Membrana después de una transferencia de 16 min y teñida con Negro Amido (D), las membranas (E) y (F) que proceden de transferir los geles (B) y (C) respectivamente, fueron bloqueadas con 5% de BSA en TBST a pH 7.5 e incubadas con un anticuerpo policlonal anti-CaM, seguido por inmunobloting con anti-IgG-HRP, y teñidas con 4-cloro-1-naftol.

ensayadas. Así se encontró que el uso de condiciones ácidas (263) o la adición de 0.1 M ClNa al buffer de transferencia (264) tampoco favorece la retención de la CaM sobre las membranas.

3. Analisis de la CaM por Dot-Blot.

Diferentes cantidades de CaM purificada fueron espoteadas directamente sobre membranas de nitrocelulosa. Figura 2 muestra que cuando las membranas fueron teñidas con Negro Amido, sin haber lavado la CaM fue claramente visualizada (Fig.2a). Sin embargo, cuando las membranas fueron lavadas con TBST 5 min, antes de ser teñidas, la señal fue menos evidente que en la membrana no tratada (fig.2b). Este hecho está de acuerdo con las observaciones anteriores (fig.1, E y F) de una pérdida completa de la CaM de la membrana después de los procesos del inmunoblotting. Ha sido demostrado que la detectabilidad de péptidos después del inmunoblotting puede ser mejorada tratando a la membrana con KOH o con glutaraldehído (265). De acuerdo con estos datos, nosotros observamos que la fijación de CaM con KOH (Fig.2c) o con 0.2% (w/v) de glutaraldehído mejoraba la retención sobre la nitrocelulosa, aunque la señal fue menos intensa que en las membrana no tratada.

En los siguientes experimentos (fig.3) un anticuerpo policlonal anti-CaM fue añadido directamente sobre la CaM espotada, después de seca la membrana, se añadió un anti-IgG conjugado con peroxidasa sobre el mismo spot. Los procesos fueron seguidos por un rápido lavado (30 segundos) con TBS para eliminar los anticuerpos no unidos. Finalmente, las bandas de CaM fueron reveladas con 4-cloro-1-naftol (A) o por

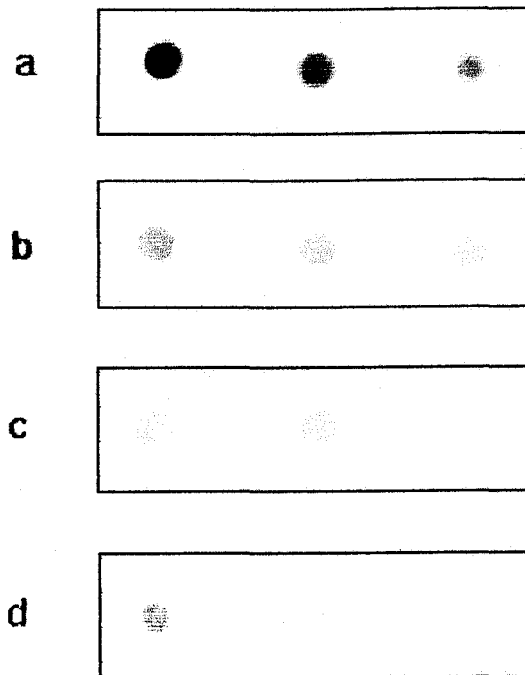


Fig. 2. Dot-blot de CaM purificada en membrana de nitrocelulosa y teñidas con Negro Amido. Una no fue lavada (a), y otras (b,c y d) fueron lavadas en TBST durante 5 min. Previamente al lavado las membranas fueron no tratadas (b) o tratadas con 1M de KOH (c) o 0.2% de glutaraldehido (d) por 15 min. Después de secadas las membranas se tiñeron con Negro Amido por 3 minutos.

quimioluminiscencia (B). Usando ambos métodos, una clara señal se observó en las membranas no lavadas (fig.3 A-a y B-a). Sin embargo, una débil señal o ninguna fue obtenida en las membranas que habían sido lavadas 1 min (A-b) o 5 min (A-c y B-b) después de añadir la CaM. En la membrana tratada con glutaraldehído la CaM no fue detectada por tinción (A-d y B-c), a pesar que la proteína fue parcialmente retenida en la membrana. Esto sugiere una baja afinidad de la CaM por el 4-cloro-1-naftol o alguna alteración de las propiedades antigénicas de la CaM después del tratamiento con glutaraldehído, o ambos (266).

Hay evidencias que el tratamiento de proteínas con SDS incrementa su capacidad de unión a las membranas de nitrocelulosa (267). Siguiendo el método sugerido por estos autores, la CaM fue tratada con diferentes concentraciones de SDS (de 2.5 a 50 µg/ml) y hervida 2-3 min, con este tratamiento no observamos un incremento de la retención de la CaM sobre la membrana (dato no mostrado). También se realizaron experimentos para analizar la unión de la CaM a membranas de PVDF por el método del dot-blot, después de la succión de la proteína sobre la membrana usando una bomba de vacío. Como se muestra en la figura 4A la CaM fue visible en las membranas de PVDF no lavadas después de la tinción con Negro Amido. Sin embargo, si la membrana se lavaba durante 30 min solamente se detectaba una débil señal, y únicamente a las cantidades más altas de CaM (fig. 4B). Esto indica que la CaM se perdía también de las membranas de PVDF después de los lavados, aunque menos que con membranas de nitrocelulosa. Dado que en experimentos de inmunoblotting los pasos de incubación y lavado duran algunas

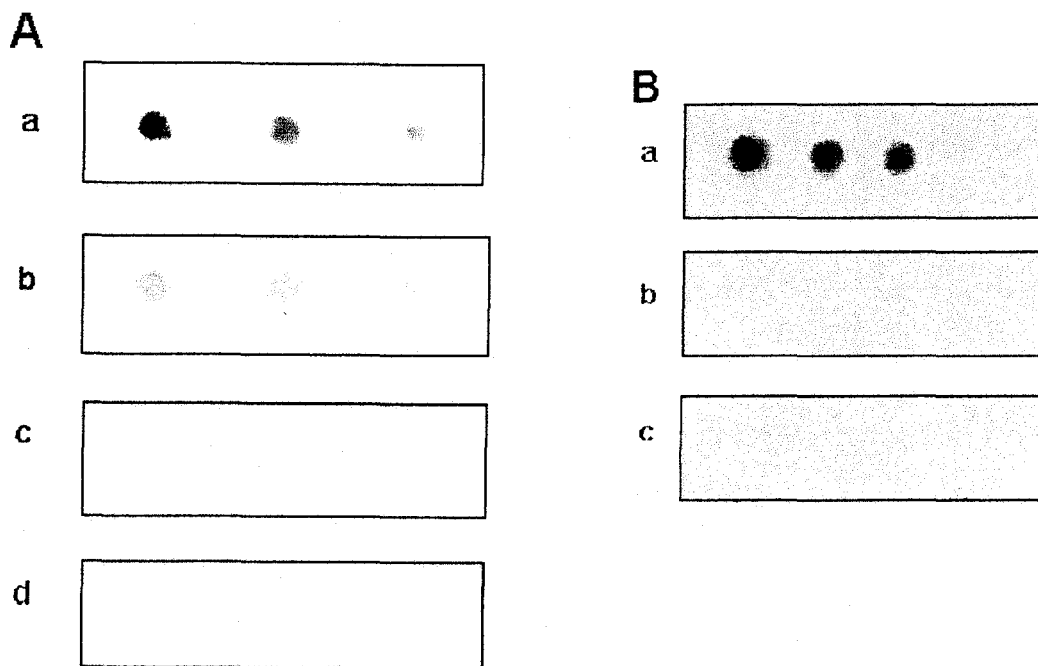


Fig. 3. Dot-blot de CaM purificada en membrana de nitrocelulosa: tratamiento con anticuerpo policlonal anti-CaM, y detección con 4-cloro-1-naftol (A) o quimioluminiscencia (B). CaM purificada (3 μ l conteniendo 9, 4.5 o 2.25 μ g de proteína) fueron espoteados sobre la membranas de nitrocelulosa. Panel A: (a) no lavada, (b) lavada con TBST 1 min, (c) lavada con TBST 5 min y (d) fijada con glutaraldehido y lavada después 5 min con TBST. Panel B: (a) no lavada, (b) lavada con TBST 5 min y (c) fijada con glutaraldehido y lavada después 5 min con TBST. A continuación de ser secadas, se añadió sobre la CaM espotada, primero 3 μ l de anticuerpo anti-CaM (diluido 1:30 en TBST) y a continuación 3 μ l de anti-IgG-HRP (diluido 1:5000 en TBST). Después de secarse se lavan durante 30 segundos con TBS para eliminar los anticuerpos no unidos. La detección se realizó por tinción con 4-cloro-1-naftol (Panel A) o por quimioluminiscencia (Panel B).

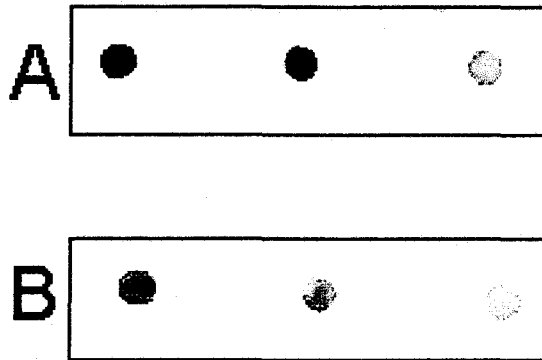


Fig. 4. Dot-blot de CaM purificada en membranas de PVDF y tinción con Negro Amido. CaM purificada (9, 4.5 y 2.25 μ g de proteínas disueltas en 50 μ l de PBS) fueron añadidas a la membrana de PVDF usando una bomba de vacío. (A) no lavada y (B) lavada en TBST 5 min. Después de secadas se tiñeron con Negro Amido.

horas, estos resultados pueden explicar nuestras primeras observaciones en que la CaM no fue detectada en ambos tipos de membranas al final del inmunobloting.

4. Niveles de calmodulina tisulares.

Eritrocitos frescos fueron aislados de sangre de donadores humanos sanos, y el hígado fue obtenido de ratas Sprague-Dawley. Los tejidos fueron homogeneizados en un buffer de lisis compuesto de ClNa 300 mM, Tris-ClH 50 mM pH 7.6, EDTA 5 mM, PMFS 2 mM, aprotinina 0.5 U/ml y 0.5 % (p/v) de octil- β -D-glucopiranosido. Después de centrifugar 10 minutos a 12000 rpm, los sobrenadantes fueron hervidos durante 5 minutos a 90°C. Las proteínas desnaturalizadas fueron eliminadas por centrifugación a 18000 rpm durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante.

A continuación, para analizar los niveles de CaM tisular inmunoprecipitamos los sobrenadantes con nuestro anticuerpo policlonal anti-CaM. La Figura 5 ilustra que este anticuerpo inmunoprecipita CaM purificada marcada con I^{125} , usando iodogen (línea A, 45 μ g y línea B, 30 μ g de CaM). Este fue también el caso de CaM inmunoprecipitada de sobrenadantes de hígado y eritrocitos, marcados con I^{125} usando cloramina T, (líneas C y D, respectivamente). En otros experimentos observamos que ambos métodos de marcaje (Iodogen o cloramina T) dan los mismos resultados (datos no mostrados).

La alta señal residual encontrada en extractos de tejidos cuando se usa un dot-blot, nos impidió usar este método para analizar los niveles de CaM en tejidos. Cuando la CaM fue mezclada con 1M de KOH o 0.02% de glutaraldehído, se incrementó la retención de la proteína sobre la membrana de nitrocelulosa.

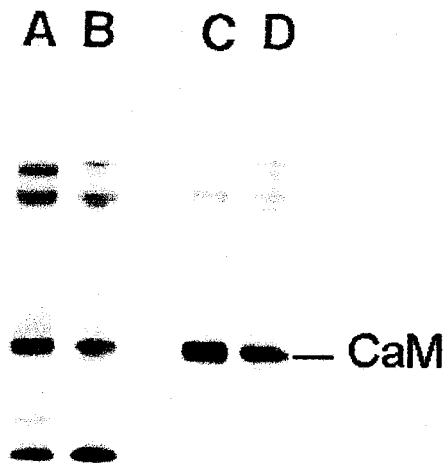


Fig. 5. Immunoprecipitación de CaM de homogenados de tejidos marcados con I^{125} . CaM purificada (A) 45 μ g y (B) 30 μ g, y extractos de hígado (C) o de eritrocitos (D) fueron marcados con I^{125} con Iodogen (A,B) o con cloramina T (C,D). a continuación se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal anti-CaM. Después del SDS-PAGE el gel se secó y las proteínas fueron detectadas por autoradiografía.

En previos reportajes (265,268) ha sido descrito que la fijación con glutaraldehído incrementa la sensibilidad del inmunoblotting para proteínas de bajo peso molecular. Los presentes datos muestran que esto no es un proceso aplicable en cualquier momento, ya que en nuestro caso el tratamiento con glutaraldehído parece destrozar las propiedades antigénicas de la CaM. Los datos presentados están de acuerdo con previas observaciones sobre la pérdida de la CaM y otras pequeñas proteínas de las membranas después de lavados (269). También ha sido afirmado (261) que la adición de 2 mM Ca^{+2} al buffer de transferencia aumenta la detección de la CaM transferida a membranas de nitrocelulosa. En nuestro caso la presencia de calcio no aumenta la retención de CaM sobre las membranas (dato no mostrado). A pesar que la CaM es una ubicua y abundante proteína en la célula, es a menudo descrita como una proteína que da un señal débil, cuando sus niveles tisulares son analizados por inmunoblotting (236). Las observaciones presentadas sugieren una explicación a la pérdida de la CaM de la membrana durante los procesos asociados al inmunoblotting. Además, los resultados presentados indican que la dificultad para detectar CaM, usando inmunoblotting es probablemente debido a la pérdida de CaM de la membrana dado la labilidad de su unión, hay autores que no encuentran estos problemas (270). En suma, los datos presentados sugieren que la inmunoprecipitación puede ser el método de elección para estudiar los niveles tisulares de CaM.

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La incubación de células Jurkat con benzotiofeno resulta en una inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina. Además este efecto inhibitor depende de la dosis de benzotiofeno y del tiempo de incubación.
2. El benzotiofeno no disminuye la actividad lactato deshidrogenasa, indicando que este compuesto no es tóxico para las células.
3. El benzotiofeno, al igual que la CsA, inhibe la actividad calcineurina en extractos de células, así como del enzima purificado.
4. El benzotiofeno no afecta la actividad fosfatasa alcalina por lo que el efecto de este compuesto es específico sobre la actividad de la calcineurina.
5. El anti CD69 induce la fosforilación de la proteína p56^{lck}, tanto en células Jurkat como en linfocitos T humanos, así como la aparición de una forma más lenta de esta proteína (p60^{lck}).
6. La fosforilación en tirosina del p56^{lck} inducida por el anti CD69 es dependiente de la concentración del anticuerpo usado y del tiempo de incubación.
7. Esta fosforilación en tirosina requiere calcio, y además es inhibida por la CsA, un agente inhibitor de la calcineurina. Lo que hace suponer que la fosforilación del p56^{lck} inducida por el AcM anti CD69 puede estar regulada por la calcineurina.
8. La fosforilación del p56^{lck} inducida por el AcM anti CD69 es fuertemente inhibida por la genisteína, un inhibitor de proteínas tirosinas cinasas, por lo que la fosforilación del p56^{lck} puede ser producida por la autofosforilación de esta

proteína.

9. Existe una unión física entre el antígeno CD69 y la proteína p56^{lck}.

10. La ausencia de señal en el inmunoblot de CaM purificada con anticuerpo policlonal anti CaM, se debe a la pérdida de la proteína de la membrana durante los lavados. Un método alternativo al inmunoblot puede ser el del marcaje de proteínas con I¹²⁵.

IV. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Boyum, A. (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supple. 97), 77-81.
2. Hubbard, M.J., & Klee, C.B. (1991) Kinases and phosphatases as probes of intracellular modulation. In Molecular Neurobiology. H. Wheal and J. Chad, eds. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, p.135.
3. Fruman, D.A., Klee, C.B., Bierer, B.E., & Burakoff, S.J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 3686.
4. Markwell, A.K., Haas, S.M., Bierer, L.L., & Tolbert, N.E. (1978) Anal. Biochem. 87, 206-210.
5. Cham, A.C., Irving, B.A., Fraser, J.D., & Weiss, A. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9166-9170.
6. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
7. Leong, M.M.L., & Fox, G.R. (1988) Anal. Biochem. 172, 145-150.
8. Hodgson, M., & Jones, P. (1989) J. Biolum. Chemilum. 3, 21.
9. Thorpe, G.H., & Kricka, L.J. (1986) Methods Enzymol. 133, 331.
10. Conyers, S.M., & Kidwell, D.A. (1991) Anal. Biochem. 192, 207-211.
11. Gopolakrishna, R., & Anderson, W.G. (1982) Biochem. Biophys. Res. Comun. 104, 830-836.
12. M. Kamps. (1991) Methods. Enzymol. 201, 10-110.
13. Harlow, E., & Lane, D. (1988) Antibodies a Laboratory manual. pp 298-307.
14. Fraker, P.J., & Speck, J.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857.

15. Johnstone, a., & Thorpe, R. (1987) *Immunochemistry in Practice*. Second Edition. pp 118-119.
16. Hathway, W.E., Newby, L.A., & Githens, J.H. (1964) *Blood* 23, 517.
17. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
18. Jones, K.A., & Peterlin, B.M. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 717-743.
19. Garcia, J., & Gaynor, R. (1994) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 49, 157-196.
20. Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A., & Tjian, R. (1986) *Science* 232, 755-759.
21. Biswas, P.B., Poli, G., Kinter, A.L., Justement, J.S., Stanley, S.K., Maury, W.J., Bessler, P., Orenstein, J.M., & Fauci, A.S. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 739-750.
22. Perkins, N.D., Lawrence, N.E., Duckett, C.S., Agranoff, A.B., Schmid, R.M., & Nabel, G.J. (1993) *EMBO J.* 12, 3551-3558.
23. Gualberto, A., Hixon, M.L., Finco, T.S., Perkins, N.D., Nabel, G.L., & Baldwin, A.S., Jr. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 3450-3459.
24. Gualberto, A., & Baldwin, A.S., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19680-19683.
25. Weintraub, H., Hauschka, S., & Tapscott, S.J. (1991) *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.* 88, 4570-4571.
26. Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., & Fornace, A.J., Jr. (1992) *Cell* 71, 587-597.
27. Zambetti, G.P., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C., & Levine, A.J. (1992) *Genes & Dev.* 6, 1143-1152.
28. Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I., & Wu, B. (1993) *Science*

259, 84-87.

29. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., & Oren, M. (1993) *EMBO J.* 12, 461-468.

30. Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., & Levine, A.J. (1993) *Genes & Dev.* 7, 1126-1132.

31. Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., & Gottesman, M.M. (1992) *Science* 255, 459-462.

32. Deb, S., Jackson, C.T., Subler, M.A., & Martin, D.W. (1992) *J. Virol.* 66, 6164-6170.

33. Deffie, A., Wu, H., Reinke, V., & Lozano, G. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 3, 3415-3423.

34. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., & Bradley, A. (1992) *Nature* 356, 215-221.

35. Mercer, W.E., & Baserga, R. (1985) *Exp. Cell Res.* 160, 31-

36. Mercer, W.E., Avignolo, C., & Baserga, R. (1984) *J. Virol.* 68, 276-281.

37. Subler, M.A., Martin, D.W., & Deb, S. (1994) *J. Virol.* 68, 103-110.

38. Duan, L., Ozaki, I., Oakes, J.W., Taylor, J.P., Khalili, K., & Pomerantz, R.J. (1994) *J. Virol.* 68, 4302-4314.

39. Butera, S.T., Roberts, B.D., Critchfield, J.W., Fang, G., McQuade, T., Gradeck, S.J., & Folks, T.M. (1995) *Mol. Medicine* 1, 758-767.

40. McDougal, J.S., Mawle, A., Cort, S.P., Nicholson, J.K., Cross, G.D., Scheppler-Campbell, J.A., Hicks, D., & Sligh, J. (1985) *J. Immunol.* 135, 3151-3162.

41. Folks, T., Kelly, J., Benn, S., Kinter, A., Justement, J., Gold, J., Redfield, R., Sell, K.W., & Fauci, A.S. (1986) *J.*

Immunol. 136, 4049-4053.

42. Zagury, D., Bernard, J., Leonard, R., Cheyner, R., Feldman, M., Sarin, P.S., & Gallo, R.C. (1986) *Science* 231, 850-853.

43. Harada, S., Koyanagi, Y., Nakashima, H., Kobayashi, N., & Yamamoto., N. (1986) *Virology* 154, 249-258.

44. Tong-Starckesen, S.E., Luciw, P.A., & Peterlin, B.M. (1989) *J. Immunol.* 142, 702-707.

45. Siekevitz, M.S., Josephs, S.F., Dukovich, M., Peffer, N., Wong-Staal, F., & Greene, W.C. (1987) *Science* 238, 1575-1578.

46. Schmidt, A., Hennighausen, L., & Siebenlist, U. (1990) *J. Virol.* 64, 4037-4041.

47. Fruman, D.A., Burakoff, S.J., & Bierer, B.E. (1994) 8, 391-400.

48. Liu, J., Farmer Jr, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S.L. (1991) *Cell* 66, 807-815.

49. Friedman, J., & Weissman, I. (1991) *Cell* 66, 799-806.

50. O'Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., & O'Neil, E.A. (1992) *Nature* 357, 692-694.

51. Clipstone, N.A., & Crabtree, G.R. (1992) *Nature* 357, 695-697.

52. Karpas, A., Lowdell, M., Jacobson, S.K., & Hill, F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8351-8355.

53. Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacy, E., & Crabtree, G.R. (1989) *Science* 246, 1617-1620.

54. Gunter, K.C., Irving, S.G., Zipfel, P.F., Siebenlist, U. & Kelly, K. (1989) *J. Immunol.* 142, 3286-3291.

55. Zipfel, P.F., Irving, S.G., Kelly, K., & Siebenlist, U. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 1041-1048.

56. Gualberto, A., Márquez, G., Youngblood, G.L., Carballo, M.

- Hunt, S.T., Baldwin, S., & Sobrino, F. (J. Biol. Chem. en prensa).
57. Springer, T.A. (1990) *Nature*, 346, 425-234.
58. Cybulsky, M.I., & Gimbrone, M.A.Jr. (1991) *Science* 251, 788-791.
59. Gimbrone, M.A., Jr. Bevilacqua, M.P., & Cybulsky, M.I. (1990) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 598, 77-85.
60. Faruqi, R.M., & DiCorleto, P.E. (1993) *Br. Heart J.* 69, S19-29.
61. Harlan, J.M. (1985) *Blood* 65, 513-525.
62. Pober, J.S., & Cotran, R.S. (1990) *Physiol. Rev.* 70, 427-451.
63. Read, M.A., Whitley, M.Z., Williams, A.J., & Collins, T. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 503-512.
64. Collins, T. (1993) *Lab. Invest.* 68, 499-508.
65. Neish, A.S., Williams, A.J., Palmer, H.J., Whitley, M.Z., & Collins, T. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 1583-1593.
66. Schrier, D.J., Lesh, M.E., Okonkwo, G.C., Finkel, M.P. & Imre, K. (1994) *J. Cell Biochemsup* 18A, E517 (Abstract).
67. Boschelli, D.H., Kramer, J.B., Connor, D.T., Lesh, M.E., Schrier, D.J., Ferin, M.A., & Wright, C.D. (1994) *J. Med. Chem.* 37, 717-718.
68. Offermann, M.K. & Medford, R.M. (1994) *Heart Dis. Stroke* 3, 52-57.
69. Wölle, J., Ferguson, E., Keshava, C., Devall, L.J., Boschelli, D.H., Newton, R.S. & Saxena, U. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 6-10.
70. Boschelli, D.H., Kramer, J.B., Khatana, S.S., Sorenson, R.J., Connor, D.T., Ferin, M.A., Wright, C.D., Lesh, M.E.,

- Imre, K., & Okonkwo, G.C. (1995) *J. Med. Chem.* 38, 4597-4614.
71. Chung, K.F. (1990) Inflammatory Mediators in Asthma. in *Asthma as an Inflammatory Disease*, O'Byrne, P.M., Ed; Marcel Dekker: New York, pp 159-183.
72. Johnston, S.L., & Holgate, S.T. (1990) *Curr. Opin. Immunol* 2, 513-524.
73. Pretolani, M., Ferren-Lopéz, P., & Vargaftig, B.B. (1989) 38, 1373-1384.
74. Kay, A.B. Inflammatory Cells in Allergic Disease. In *Mast Cells, Mediators and Disease*; Holgate, S.T., Ed.; Kluwer Academic Publisher: Lancaster, U.K. (1988); pp 227-239.
75. Kay, A.B. *Immunol. Invest.* (1988) 17, 679-705.
76. Frew, A.J., & Kay, A.B. (1990) *J. Allergy Clin. Immunol.* 85, 533-539.
77. Lichtenstein, L.M., & Osler, A.G. (1964) *J. Exp. Med.* 120, 507-530.
78. Siraganian, R.P. & Brodsky, K.J. (1976) *J. Allergy Clin. Immunol.* 57, 525-540.
79. Connor, D.T., Cetenko, W.A., Mullican, M.D., Sorenson, R.J., Unangst, P.C., Weikert, R.J., Adolphson, R.L., Kennedy, J.A., Thueson, D.O., Wright, C.D. & Conroy, M.C. (1992) *J. Exp. Chem.* 35, 958-965.
80. Klee, C.B., Crouch, T.H., & Krinks, M.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6270.
81. Wallace, R.W., Tallant, E.A., & Cheung, W.Y. (1980) *Biochemistry* 19, 1831.
82. King, M.M., & Huang, C.Y. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8847.
83. Tallant, E.A. & Cheung, W.Y. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 269.

84. Gupta, R.C., Khandelwal, R.L., & Sulakhe, P.V. (1984) FEBS Lett. 169, 251 (1984).
85. Tallant, E.A. & Wallace, R.W. (1985) J. Biol. Chem. 260, 7744.
86. Ingebritsen, T.S., & Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 255.
87. Ingebritsen, T.S., & Cohen, P. (1983) Science, 221, 331.
88. Stewart, A.A., Ingebritsen, T.S., & Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 289.
89. Tallant, E.A., & Cheung, W.Y. (1983) Biochemistry 22, 3630.
90. Newton, D.L., & Klee, C.B. (1984) FEBS Lett. 165, 269.
91. Burnham, D.B. (1985) Biochem. J. 231, 335.
92. Wolff, D.J., & Sved, D.W. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4195.
93. Geyer, S.J., Kincaid, R.L., & Vaughan, M. (1984) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 43, 1897a.
94. McCaffrey, P.G., Perrino, B.A., Soderling, T.R., & Rao, A. (1993) J. Biol. Chem. 268, 3747-3752.
95. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., & Rao, A. (1993) Nature (London) 365, 352-355.
96. McCaffrey, P.G., Luo, C., Kerppola, T.K., Jain, J., Badalian, T.M., Ho, A.M., Burgeon, E., Lane, W.S., Lambert, J.L., Curran, T., Verdine, G.L., Rao, A., & Hogan, P.G. (1993) Science 262, 750-754.
97. Flanagan, S.D., & Yost, B. (1984) Anal. Biochem. 140, 510.
98. Shaw, K.T., Ho, A.M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Sharma, S., Rao, A., & Hogan, P.G. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. A.S.U. 92, 11205-11209.
99. Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Archer, V.E., & Rao, A.

- (1992) *Nature*, 365, 801-804.
100. Ghosh, P., Sica, A., Cippitelli, M.M Subleski, J., Lahesmaa, R., Young, H.A., & Rice, N.R. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7700-7704.
101. Hemmings, H.C., Greengard, P., Lim Tung, N.Y., & Cohen, P. (1984) *Nature (London)* 310, 503-508.
102. King, M.M., Huang, C.Y., Chock, P.B., Nairn, A.C., Hemmings, H.C., Chan, K.F.J., & Greengard, P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8080.
103. Ingebritsen, T.S., Stewart, A.A., & Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 297.
104. Pallen, C.J., & Wang, J.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8550.
105. Li, H.C. (1984) *J. Biol. Chem.* (1984) 259, 8801.
106. Pallen, C.J., & Wang, J.H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6134.
107. Pallen, C.J., Brown, M.L., Matsui, H., Mitchell, K.J., & Wang, J.H. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131, 1256.
108. Borel, B.F., Feurer, C., Magnee, C., & Stahelin, H. (1977) *Immunology* 32, 1017.
109. Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S.L. (1991) *Cell* 66, 807-815.
110. Brini, A.T., Harel-Bellan, A., & Farra, W.L. (1990) *Eur. Cytokine Net.* 1, 131-139.
111. Granelli-Piperno, A., Nolan, P., Inaba, K., & Steinman, R.M. (1990) *J. Exp. Med.* 172, 1869-1872.
112. Frantz, B., Nordby, E.C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C.V., Kincaid, R.L., Tocci, M.L., O'Keefe, S.J., & O'Neill, E.A. (1994) *Embo J.* 13, 861-870.

113. McCaffrey, P.G., Kim, P.K., Valge-Archer, V.E., sen, R., & Rao, A. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22, 2134-2142.
114. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R.W. (1991) *Cancer Res.* 51, 6304-6311.
115. Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., & Kastan, M.B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7491-7495.
116. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. & Jacks, T. (1993) *Nature* 362, 847-849.
117. Clarke, A.R., Purdie, C.A. Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., & Wyllie, A.H. (1993) *Nature* 362, 849-852.
118. Lane, D.P. (1992) *Nature* 358, 15-16.
119. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C.C. (1991) *Science* 253, 49-53.
120. Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., & Tlsty, T.D. (1992) *Cell* 70, 923-935.
121. Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., & Wahl, G.M. (1992) *Cell* 70, 937-948.
122. Zhang, W., Hu, G., Estey, E., Hester, J., & Deisseroth, A. (1992) *Oncogen* 7, 1645-1647.
123. Ullrich, S.J., Anderson, C.W., Mercer, W.E., & Appella, E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15259-15262.
124. Milner, J. (1994) *Sem. Cancer Biol.* 5, 211-219.
125. Park, J., Yaseen, N.R., Hogan, P.G., Rao, A., & Sharma, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 29653-20659.
126. Ruff, V.A., & Leach, K.L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22602-22607.
127. Cano, E., & Mahadevan, L.C. (1995) *TIBS* 20, 117-122.
128. Livingstone, C., Patel, G., & Jones, N. (1995) *EMBO J.* 14,

1785-1797.

129. Milne, D.M., Campbell, L.E., Campbell, D.G., & Meek, D.W. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5511-5518.
130. Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., y Ben-Neriah, Y. (1994) *Cell* 77, 727-736.
131. Hara, T., Jung, L.K.L., Bjorndahl, J.M., & Fu, S.M. (1986) *J. Exp. Med.* 164, 1988-2005.
132. Cosulich, M.E., Rubartelli, A., Risso, A., Cozzolino, F., & Bargellesi, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 4205-4209.
133. Lanier, L.L., Buck, D.W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., & Phillips, J.H. (1988) *J. Exp. Med.* 167, 1572-1585.
134. Cebrián, M., Yagüe, E., Rincón, M., López-Botet, M., O. de Landazuri, M., & Sánchez-Madrid, F. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 1621-1637.
135. Nakamura, S., Sung, S.J., Bjorndahl, J.M., & Fu, S.M. (1989) *J. Exp. Med.* 169, 677.
136. Risso, A., Cosulich, M.E., Rubartelli, A., Mazza, M.R., & Bargellesi, A. (1989) *Eur. J. Immunol* 19, 323.
137. Testi, R., Phillips, J.H., & Lanier, L.L. (1989) *J. Immunol.* 143, 1123-1128.
138. Yokoyama, W.M., Koning, F., Kehu, P.J., Pereira, G.M.B., Stingl, G., Coligan, J.E., & Shevach, E.M. (1988) *J. Immunol.* 141, 369-376.
139. Sánchez-Mateos, P., & Sánchez-Madrid, F. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 2317-2325.
140. Risso, A., Smilovich, D., Capra, M.C., Baldisarro, I., Yang, G., Bargellesi, A., & Cosulich, M.E. (1991) *J. Immunol.*

146, 4105-4114.

141. Cebrián, M., Redondo, J.M., López-Rivas, A., Rodríguez-Tarduchy, G., O. de Landazuri, M., & Sánchez-Madrid, F. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 809.

142. Testi, R., Phillips, J.H., & Lanier, L.L. (1989) *J. Immunol.* 142, 1854-1860.

143. Bjorndahl, J.M., Naakmura, S., Hara, T., Jung, L.K.L., & Fu, S.M. (1988) *J. Immunol.* 141, 4094.

144. Jung, L.K.L., Haynes, B.F., Nakamura, S., Pahwa, S., & Fu, S.M. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81, 466.

145. Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., & Santoni, A. (1990) *J. Exp. Med.* 172, 701-707.

146. Gavioli, R., Risso, A., Smilovich, D., Baldisarro, I., Capra, M.C., Bargellesi, A., & Cosulich, M.E. (1992) *Cell. Immunol.* 142, 186.

147. Hamada, K., Saito, S., & Narita, N. (1992) *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 169.

148. Rincón, M., Cebrián, M., Sánchez-Madrid, F., & López-Botet, M. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 959.

149. Santis, A.G., Campanero, M.R., Alonso, J.L., Tugores, A., Alonso, M.A., Yagüe, E., Pivel, J.P., & Sánchez-Madrid, F. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 1253-1259.

150. Tugores, A., Alonso, M.A., Sánchez-Madrid, F., & O. de Landázuri, M. (1992) *J. Immunol.* 148, 2300.

151. Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A.M., Pella, N., Augugliaro, R., Bottino, C., Ciccone, E., & Moretta, L. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 1393-1398.

152. Testi, R., Pulcinelli, F.M., Cifone, M.G., Botti, D., Del Grosso, E., Riondino, S., Frati, L., Gazzaniga, P.P., &

- Santoni, A. (1992) *J. Immunol.* 148, 2867.
153. Drickamer, K. (1993) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3, 393.
154. Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., & Bach, F.H. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 1017.
155. Yokoyama, W.M., & Seaman, W.E. (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11, 613.
156. Chambers, W.H., Vujanovic, N.L., Deleo, A.B., Olszowy, M.W., Herberman, R.B., & Hiserodt, C. (1989) *J. Exp. Med.* 169, 1373.
157. Karlhofer, F.M., & Yokoyama, W.M. (1991) *J. Immunol.* 146, 3662.
158. López-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P., & Sánchez-Madrid, F. (1993) *J. Exp. Med.* 178, 537-547.
159. Schnittger, S., Hamann, J., Dannenberg, C., Fiebig, H., Strauss, M., & Fonatsch, C. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 2711.
160. Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H., Fish, P., Schall, R.P., Sondel, P.M., & Houchins, J.P. (1993) *Immunogenetics* 37, 455.
161. Aubry, J.P., Pocho, S., Graber, P., Jansen, K.V., & Bonnefoy, J.Y. (1992) *Nature* 358, 505.
162. Kamal, M., Katira, A., & Gordon, J. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1419.
163. Spiess, M., Schwartz, A.L., & Lodish, H.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1979.
164. Marth, J.D., Lewis, D.B., Wilson, C.B., Gearn, M.E., Krebs, E.G., & Perlmutter, R.M. (1987) *EMBO J.* 9, 2727-2734.
165. Veillette, A., Horak, I.D., & Bolen, J.B. (1988) *Oncogene Res.* 2, 385-401.

166. Voronova, A.F., Buss, J.E., Patschinsky, T., Hunter, T., & Sefton, B.M. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 2705-2713.
167. Casnellie, J.E., Harrison, M.L., Pike, L.J., Hellstrom, K.E., & Krebs, E.G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 282-286.
168. Gacon, G., Gisselbrecht, S., Piau, J.P., Boissel, J.P., Tolle, J. & Fischer, S. (1982) *EMBO J.* 1, 1579-1582.
169. Marth, J.D., Peet, R., Krebs, E.G., & Perlmutter, R.M. (1985) *Cell* 43, 393-404.
170. Trevillyan, J.M., Lin, Y., Chen, S.J., Phillips, C.A., Canna, C., & Linna, T.J. (1986) *Biochem. Biophys. Acta* 888, 286-295.
171. Koga, Y., Caccia, N., Toyonaga, B., Spolski, R., Yanagi, Y., Yoshikai, Y., & Mak, T.W. (1986) *Eur. J. Immunol.* 16, 1643-1646.
172. Buss, J.E., Kamps, M.P., & Sefton, B.M. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 2697-2704.
173. Marchildon, G.A., Casnellie, J.E., Walsh, K.A., & Krebs, E.G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7679-7682.
174. Germain, R.N., & Margulies, D.H. (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11, 403.
175. Alexander, D., Shiroo, M., Robinson, A., Biffen, M., & Shivnan, E. (1992) *Immunol. Today* 13, 477.
176. DeFranco, A.L. (1991) *Nature* 351, 364-371.
177. Mustelin, T., Coggeshall, K.M., Isakov, N., & Altman, A. (1990) *Science* 247, 1584-1587.
178. June, C.H., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Siegel, J.N., Phillips, A.F., & Samelson, L.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7722-7726.

179. Pingel, J.T., & Thomas, M.L. (1989) *Cell* 70, 1055-1065.
180. Straus, D.B., & Weiss, A. (1992) *Cell* 70, 585-593.
181. Karnitz, L., Sutor, S.L., Torigoe, T., Reed, J.C., Bell, M.P., Mckean, D.J., Leibson, P.J., & Abraham, T.R. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 4521-4530.
182. Nishibe, S., Wahl, M.I., Hernandez-Sotomayor, S.M.T., Tonks, N.K., Rhee, S.G., & Carpenter, G. (1990) *Science* 250, 1253.
183. Crabtree, G.R. (1989) *Science* 243, 355.
184. Samelson, L.E., Phillips, A.F., Luong, E.T., & Klausner, R.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4358-4362.
185. Abraham, N., Miceli, M.C., Parnes, J.R., & Veillette, A. (1991) *Cell* 64, 511-520.
186. Xu, J., & Littman, D.R. (1993) *Cell* 74, 633-643.
187. Janeway, C.A. (1992) *Ann. Rev. Immunol.* 10, 645.
188. Littman, D.R. (1987) *Ann. Rev. Immunol.* 5, 561-584.
189. Parnes, J.R. (1989) *Adv. Immunol.* 44, 265-311.
190. Doyle, C., & Strominger, J.L. (1987) *Nature* 330, 256-259.
191. Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H., & Littman, D.R. (1988) *Nature* 336, 79-81.
192. Emrich, F. (1988) *Immunol. Today* 9, 296-300.
193. Fleischer, B., & Schrezenmeier, H. (1988) *Immunol. Today* 9, 132-134.
194. Gay, D., Maddon, P., Sekaly, R., Talle, M.A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, L., Axel, R., Kappler, J. & Marrack, P. (1987) *Nature (London)* 328, 626-629.
195. Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H., & Loh, D.Y. (1988) *Nature (London)* 336, 73-76.
196. Janeway, C.A., Jr. (1988) *Nature (London)* 335, 208-210.

197. McCarthy, S.A., Kruisbeek, A.M., Uppenkamp, I.K., Sharrow, S.O., & Singer, A. (1988) *Nature (London)* 336, 76-79.
198. Rudd, C.E., Trevillyan, J.M., Dasgupta, J.D., Wong, L.L., & Schollossman, S.F. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5190-5194.
199. Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., & Bolen, J.B. (1988) *Cell* 55, 301-308.
200. Mustelin, I., & Altman, A. (1989) *Immunol. Today* 10, 189-192.
201. Sleckman, B.P., Peterson, A., Foran, J.A., Gorga, J.C., Kara, C.J., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., & Greenstein, J.L. (1988) *J. Immunol.* 141, 49-54.
202. Zamoyska, R., Derham, P., Gorman, S.D., Von Hoegen, P., Bolen, J.B., Veillette, A., & Parnes, J.R. (1989) *Nature (London)* 342, 278-281.
203. Hanks, S.K., Quinn, A.M., & Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42.
204. Caron, L., Abraham, N., Pawson, T., & Veillette, A. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 2720-2729.
205. Schraven, B., Kirchgessner, H., Gaber, B., Samstag, Y., & Meuer, S. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 2449-2477.
206. Manger, B., Weiss, A., Imboden, J., Laing, T., & Stobo, J.D. (1987) *J. Immunol.* 139, 2755-2760.
207. Thomas, M. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7, 339-370.
208. Mustelin, T. & Altman, A. (1990) *Oncogene* 5, 809-813.
209. Burns, C.M., Sakaguchi, K., Apella, E., & Ashell, J.D. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13594-13600.
210. Xu, H., & Littman, D.R. (1993) *Cell* 74, 633-643.
211. Veillette, A., Horak, I.D., Horak, E.M., Bookman, M.A.,

- & Bolen, J.B. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 4353-4361.
212. Tinker, D.A., Overell, R.W., Krebs, E.G., & Perlmutter, R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 540-550.
213. Casnellie, J.E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9859-9864.
214. Rozengurt, E., Rodriguez-Peña, A., Coombs, M., Sinnett-Smith, J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5748.
215. Schreiber, A.B., Lax, I., Yarden, Y., Esshhar, Z., & Schlessinger, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7535.
216. Conde, M., Montaña, R., Moreno-Auriolles, V.R., Ramirez, R., Sánchez-Mateo, P., Sánchez-Madrid, F., & Sobrino, F. (1986) *J. Leukoc. Biol.* 60, 278-284.
217. Monteseirín, J., Palma, J.L., Delgado, J., Llamas, E., Conde, J., & Sobrino, F. (1994) *J. Clin. Lab. Immunol* (1994) 43, 117-126.
218. Cautley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., & Soltoff, S. (1991) *Cell* 64, 281-301.
219. Bernier, N., Laird, D.M., & Lane, N.D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1844-1848.
220. Garcia-Morales, P., Minami, Y., Luong, E., & Klausner, R.D. (1990) *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9255-9259.
221. Trevillyan, J.M., Lu, Y., Atluru, D., Phillips, C.A., & Bjorndahl, J.M. (1990) *J. Immunol.* 145, 3223-3230.
222. Hannestad, U., & Sorbo, B. (1980) *J. Chromatogr.* 200, 171-177.
223. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., & Nakajima, H., (1970) *Proc. Jpn. Acad.* 46, 587-592.
224. Cheung, W.Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533-538.

225. Wolff, D.J., & Siegel, F.L. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4180-4185.
226. Nishida, E., Kumagai, H., Ohtsuki, I., & Sakai, H. (1979) *J. Biochem. Tokyo* 85, 1257-1266.
227. Bond, G.H., & Clough, D.L. (1973) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 83, 1373-1379.
228. Pires, E., Perry, S.V., & Thomas, M.A.W. (1974) *FEBS Lett.* 41, 292-296.
229. Waisman, D., Stevens, F.C., & Wang, J.H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 675-982.
230. Head, J.F., Mader, S., & Kaminer, B. (1979) *J. Cell. Biol.* 80, 211-218.
231. Jones, H.P., Matthews, J.C., & Cornier, M.J. (1979) *Biochemistry* 18, 55-60.
232. Kuznicki, J., Kuznicki, L., & Drabikowski, W. (1979) *Cell. Biol. Int. Rep.* 3, 17-23.
233. Anderson, J.M., & Cornier, M.J. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 595-602.
234. Gomes, S.L., Mennucci, L., & Maia, J.C. (1979) *FEBS Lett.* 99, 39-42.
235. Persechim, A., Moncrief, N.D., & Kretzinger, R.H. (1989) *Trends Neurosci.* 12, 462-467.
236. Pochet, R., Rampelbergh, J.V., Bastianelly, E., & Van Eldik, L.J. (1994) *Biochem. Biophys. Acta*, 1223, 318-324.
237. Teo, T.S., & Wang, J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5950-5955.
238. Klee, C.B. (1977) *Biochemistry* 16, 1017-1024.
239. Dedman, J.R., Potter, J.D., Jackson, R.L., Johnson, J.D., & Means, A.R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8415-8422.

240. Wolff, D.J., Poirier, P.G., Brostrom, C.O., & Brostrom, M.A. (1977) *J. Biol. chem.* 252, 4108-4117.
241. Liu, Y.P., & Cheung, W.Y. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4193-4198.
242. Wells, J.N., & Hardman, J.G. (1977) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 8, 119-143.
243. Wolff, D.J., & Brostrom, C.O. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 11, 27-88.
244. Wang, J.H., & Waisman, D.M. (1979) *Curr. Top. Cell. Regul.* 15, 47-107.
245. Kakiuchi, S., & Yamazaki, R. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1104-1110.
246. Thompson, W.J., & Appleman, M.M. (1971) *Biochemistry* 10, 311-316.
247. Uzunov, P., Shein, H.M., & Weiss, B. (1974) *Neuropharmacology* 13, 377-391.
248. Ho, H.C., Teo, T.S., Desai, R., & Wang, J.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429, 461-473.
249. Russell, T.R., & Pastan, I.H. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7764-7769.
250. Brostrom, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B.M., & Wolff, D.J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 64-68.
251. Dabrowska, R., Sherry, J.M.F., Aromatorio, D.K., & Hartshorne, D.J. (1978) *Biochemistry* 17, 253-258.
252. Yasawa, M., & Yagi, K. (1978) *J. Biochem. Tokyo* 84, 1259-1265.
253. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C., & Nairn, A.C. (1978) *FEBS Lett.* 92, 287-293.
254. Shenolikar, S., Cohen, P.T.W., Cohen, P., Nairn, A.C., &

- Perry, S.V. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 329-337.
255. Vincenzi, F.F. (1979) *Proc. West Pharmacol. Soc.* 22, 289-294.
256. Larsen, F.L., & Vincenzi, F.F. (1979) *Science* 204, 306-309.
257. Katz, S., & Remtulla, M.A. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1373-1379.
258. LePeuch, C.J., Haiech, J., & Demaille, J.G. (1979) *Biochemistry* 18, 5150-5157.
259. Van Eldik, L.J., & Watterson, D.M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4205-4210.
260. Van Eldik, L.J., & Wolchik, S.R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 752-759.
261. McKeon, T.A., & Lyman, M.L. (1991) *Anal. Biochem.* 193, 125-130.
262. Dedman, J.R., & Kaetzel, M.A. (1983) in *Methods in Enzymology* (Means, A.R. and O'Malley, B.W., Eds.), Vol. 102, pp. 1-8, Academic Press, San Diego.
263. Laurière, M. (1993) *Anal. Biochem.* 212, 206-211.
264. Rochette-Egly, C., & Daviaud, D. (1985) *Electrophoresis*, 6, 235-238.
265. Li, K. W., Geraerts, W. P. M., Van Elk, R., & Joosse, J. (1988) *Anal. Biochem.* 174, 97-100.
266. Van Oss, C.J., Good R.J., & Chaudhury, M.K. (1987) *J. Chromatogr.* 391, 53-65.
267. Smith, C.E., Musich, P.R., & Johnson, D.A. (1989) *Anal. Biochem.* 177, 212-219.
268. Ikegaki, N., & Kennett, N.H. (1989) *J. Immunol. Methods* 124, 205-210.

269. Schleicher, M., & Watterson, M. (1983) *Anal. Biochem.* 131, 312-317.

270. Sacks, D.B., Porter, S.E., Ladenson, J.H., & McDonald, J.M. (1991) *Anal. Biochem.* 194, 369-377.

Gracia Márquez Villegas
Transducción de señales en linfocitos.
Implicación de la calineurina y activación
a través de antígenos de superficie (CD49)
Apto Cum Laude

12

mayo

93

Susilubari

[Signature]

E. Piñedo

El Estudiante.

[Signature]

[Signature]

[Signature]