



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Regulación de moléculas de la inmunidad innata por
Glucocorticoides: papel de la Fosfoinositol 3-Quinasa
en la vía de señalización del receptor tipo Toll 2 (TLR2)**

Sergio Andrés Arancibia Zunino

Memoria de título para optar al grado de Bioquímico

**Directora de Tesis:
Dra. Marcela Hermoso Ramello
Programa Disciplinario de
Inmunología
Laboratorio de Inmunidad Innata
Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

**Profesor Patrocinante:
Dr. Dante Miranda Wilson
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile**

Santiago-Chile

2006

Esta tesis va dedicada con especial afecto a mi nona "la mimi"

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora guía, la Dra. Marcela Hermoso Ramello por el cariño y la amistad.

A mi familia por todo el amor y el apoyo que me han dado.

Al todos los lillos del laboratorio de Inmunidad Innata, por la ayuda y los gratos momentos compartidos.

Al Programa de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Al Dr. John Cidlowski por su valiosa colaboración.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistema Inmune Innato y Adquirido	1
1.2 Receptores de Reconocimiento de Patógenos	2
1.3 Tipos de TLRs	2
1.4 Vía de Señalización de los TLRs	4
1.4.1 Ruta de señalización dependiente de MyD88	4
1.4.2 Ruta de señalización intracelular independiente de MyD88	6
1.5 Participación de la PI3K en la ruta de señalización del TLR	6
1.6 Participación de los Glucocorticoides en el sistema inmune	8

1.7 Regulación de la expresión del TLR por moléculas pro- y anti-inflamatorias	10
2. HIPÓTESIS	11
2.1 Objetivo General	11
2.2 Objetivos Específicos	12
2.3 Diseño Experimental	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Reactivos y Anticuerpos	15
3.2 Células	15
3.3 Transfección Transitoria y Plasmidios	16
3.4 Determinación de Actividad Transcripcional con Gen Reportero Luciferasa	17
3.5 Inmunoblots	18
3.6 Co-Inmunoprecipitación	19
3.7 Citometría de Flujo	20
3.8 Estadística	20

4. RESULTADOS	21
4.1 Efecto de <i>Pam</i>₃<i>Cys-Ser-Lys</i>₄ y Dexametasona en la expresión de TNFα	21
4.2 Efecto de <i>Pam</i>₃<i>Cys-Ser-Lys</i>₄ y Dexametasona sobre la actividad transcripcional de NFκB	23
4.3 Determinación de la efectividad biológica de la Dexametasona	24
4.4 Efecto de <i>Pam</i>₃<i>Cys-Ser-Lys</i>₄ y Dexametasona sobre la fosforilación de Akt	26
4.5 Participación de la PI3K en la expresión de TNFα inducida por <i>Pam</i>₃<i>Cys-Ser-Lys</i>₄	28
4.6 PI3K participa en la regulación de la actividad transcripcional de NFκB	29
4.7 Papel de AP-1 en la vía de señalización del TLR2	32
4.8 Regulación de la actividad transcripcional del TLR2 por PI3K	34
4.9 Determinación de la interacción entre PI3K-TLR2 y PI3K-GR en células A549	36

5. DISCUSIÓN	39
5.1 Efecto de la Dexametasona y PI3K en la expresión de TNFα y en la activación del receptor TLR2	40
5.2 Efectos de la PI3K y los Glucocorticoides en la activación de Akt	41
5.3 Interacciones Proteína-Proteína	42
5.4 Factores de Transcripción Involucrados	43
5.5 Modelo de la vía alternativa del TLR2 en células A549	44
6. CONCLUSIONES	46
6.1 Anexo	47
7. REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vía de señalización de los receptores de tipo Toll (TLRs) dependiente de MyD88.	15
Figura 2. <i>Pam₃Cys-Ser-Lys₄</i> y Dexametasona aumentan la expresión de TNF α en células epiteliales humanas.	22
Figura 3. Efecto de <i>Pam₃Cys-Ser-Lys₄</i> y Dexametasona sobre la actividad de NF κ B.	24
Figura 4. Actividad de Dexametasona en células A549.	25
Figura 5. Efecto de <i>Pam₃Cys-Ser-Lys₄</i> y Dexametasona sobre la fosforilación de Akt.	27
Figura 6. PI3K regula la producción de TNF α inducida por efecto de <i>Pam₃Cys-Ser-Lys₄</i> y Dexametasona.	29
Figura 7. Dexametasona regula la actividad transcripcional de NF κ B mediada por <i>Pam₃Cys-Ser-Lys₄</i> .	31
Figura 8. AP-1 participa en la vía de señalización del TLR2 en células A549.	33
Figura 9. Regulación de la actividad transcripcional del TLR2 por PI3K.	35
Figura 10. Estudio de la Interacción entre p85/GR y p85/TLR2.	38
Figura 11. Esquema de la vía alternativa del TLR2 en células A549.	45

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropina
Akt: serina/treonina quinasa
AP-1: Factor de transcripción Proteína activadora 1
BAD: Proteína Bcl-2 antagonista de la muerte celular
CMV: Citomegalovirus
COX2: Ciclooxygenasa 2
DI: Dominio Intermedio
DD: Dominio de muerte
DMEM: Medio de cultivo celular
dsRNA: RNA de doble hebra
ECL: Sustrato quimio-luminiscente de peroxidasa
EDTA: ácido dietilendiaminotetraacético
FRET: Transferencia de energía resonante fluorescente
IFN: Interferón
I κ B: Inhibidor de NF κ B
IKKs: Quinasa de I κ B
IL-x: Interleuquinas
IRAK: Quinasa asociada al receptor de IL-1
IRF: Factores reguladores de interferón tipo I
F12: Medio de cultivo
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GATA-3: Factor de transcripción
GCs: Glucocorticoides
GFP: Proteína fluorescente verde
GR: Receptor de glucocorticoides
GREs: Elementos de respuesta a glucocorticoides
GSK-3: Quinasa sintetizadora de glicógeno
HPA: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Glándula adrenal
hsp: Proteínas de shock térmico

HSV: Herpes virus simple

LDB: Tampón de baja concentración de detergente

MAPKs: Quinasas activadas por mitógenos

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MyD88: Proteína 88 de diferenciación mieloide

NFκB: Factor nuclear κB

NOS: Oxido nítrico sintetasa

p85: Subunidad regulatoria de PI3K

p85-DN: Dominante negativo de PI3K

Pam₃Cys-Ser-Lys₄: Lipopéptido sintético, análogo a la porción amino terminal de lipoproteínas de bacterias gram positivas

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PDKs: Quinasas dependientes de fosfoinositoles

PH: Dominios de pleckstrina

PI3K: Fosfoinositol 3-Quinasa

PIPs: Fosfoinositoles fosforilados

PKC: Proteína quinasa C

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

RU486: Mifepristone, Antagonista de GR

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

ssRNA: RNA de hebra simple

TCR: Receptor de las células T

Th: Linfocito T helper

TIR: Dominio intracelular homólogo al receptor de IL1 y de TLR

TLRs: Receptores de tipo Toll

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF alfa

TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF

TRIF: Molécula adaptadora que contiene un dominio TIR y que induce IFN-β

RESUMEN

Los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas de transmembrana que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El TLR2 reconoce PAMPs de bacterias gram positivas, los cuales activan una vía de señalización clásica que involucra el reclutamiento de la proteína MyD88 y una alternativa donde participa la Fosfoinositol 3-Quinasa (PI3K). A su vez, los glucocorticoides (GCs) son moléculas que suprimen la inflamación y la inmunidad adaptativa, que recientemente han sido reportadas como potenciadoras de la expresión de ciertas moléculas de la inmunidad innata, tales como el TLR2. La importancia de PI3K y los GC en la regulación de la vía alternativa del TLR2 no ha sido estudiada aún.

El objetivo general fue determinar la participación de PI3K en la producción de TNF α inducida por agonistas del TLR2 y GCs. Los objetivos específicos fueron: 1) Analizar el efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* un lipopéptido sintético análogo a la porción NH₂-terminal de lipoproteínas de bacterias gram positivas, y Dexametasona, sobre la secreción de TNF α y la activación transcripcional de NF κ B, en células A549. 2) Estudiar la participación de PI3K-Akt en la ruta de señalización del TLR2 inducida por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona. 3) Determinar la interacción entre TLR2-PI3K y GR-PI3K.

Los resultados obtenidos muestran que la activación del TLR2 por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* provocó un aumento en la expresión de TNF α y la activación transcripcional del TLR2, sin embargo el co-tratamiento con Dexametasona no alteró el efecto del agonista del TLR2. Al mismo tiempo, PI3K aumenta la expresión de TNF α e inhibe la transcripción del TLR2, al usar un dominante negativo para PI3K (p85-DN). PI3K activa la transcripción de genes que responden a la movilización de NF κ B y AP-1, ya que células expuestas a *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y que expresan el constructo p85-DN, presentan una disminución significativa de la activación transcripcional de NF κ B y AP-1. Los resultados indicaron que *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* aumentó significativamente la fosforilación de Akt, como un indicador indirecto de la actividad de PI3K, y Dexametasona la revirtió.

Por otra parte, se determinó la interacción entre p85 con el GR o el TLR2, siendo la primera modulada exclusivamente por Dexametasona.

Estos resultados demuestran que PI3K presenta diversos mecanismos de regulación en la vía de señalización del TLR2 y además proponen mecanismos por los que los GCs intervienen en la ruta transduccional.

ABSTRACT

“Regulation of innate immune molecules by Glucocorticoids: Rol of Phosphoinositol 3-Kinase in Toll-like receptor signaling pathway”

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). TLR2 identify PAMPs from gram positive bacteria, which activate a classical signaling pathway involving MyD88 recruitment to the receptor intracellular domain, and an alternative signaling pathway, which comprises the activation of the phosphoinositol 3-kinase (PI3K). Moreover, glucocorticoids (GCs) suppress the inflammation and adaptive immune responses, and have been recently reported to enhance the TNF α -induced expression of TLR2. The relevance of GCs in the regulation of the alternative pathway has not yet been described.

The general aim of this thesis was to determine PI3K participation on TNF α production induced by TLR2 agonists in the presence or absence of GCs. The specific aims were: 1) To analyze the effect of *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, a specific synthetic ligand analogue to the NH₂-terminal portion of gram positive bacterial lipoproteins, and Dexamethasone, a synthetic GC, on TNF α expression and NF κ B transcriptional activation, in A549 cells. 2) To study the role of PI3K-Akt in the TLR2 signaling pathway induced by *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* in the presence or absence of Dexamethasone. 3) To determine the interaction between TLR2-PI3K and GR-PI3K.

The results show that TLR2 activation by *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* promotes TNF α expression and TLR2 transcriptional activity, however co-treatment of cells with *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* and Dexamethasone did not revert TNF α increase. In relation to this pathway, we investigated if PI3K was involved in TNF α expression and TLR2 transcription activity regulation. *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* significantly increased Akt phosphorylation, as an indicator of PI3K activity, and Dexamethasone reverted to it.

Moreover, by using a PI3K regulatory subunit dominant negative mutant cDNA (p85-DN) transiently expressed in cells, a remarkably decrease in NF κ B and AP-1 transcriptional activation was observed.

On the other hand, we determined p85 regulatory PI3K subunit interaction with GR or TLR2, and we were able to identify interaction between p85-GR in the presence of Dexamethasone. These results demonstrate that PI3K shows different mechanism of regulation in the TLR2 signaling and propose pathways in which GCs may be participating

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema Inmune Innato y Adquirido

El sistema inmune comprende una red celular y molecular integrada, en la cual sus componentes orquestan respuestas complejas y rápidas frente a la invasión por microorganismos patógenos. El mecanismo de defensa inicial a esta agresión está dado por el sistema inmune innato, que responde coordinadamente mediante la expresión de ciertas proteínas receptoras y la secreción de moléculas solubles (1). La primera línea de defensa esta representada por macrófagos y células dendríticas como también por las barreras físicas, tales como la piel y las mucosas (2). Los microorganismos que logran atravesar estas barreras inducen un daño en los tejidos activando la quimiotaxis de macrófagos y células dendríticas ubicados en la proximidad para eliminar inmediatamente al patógeno (3). Otro mecanismo esta representado por el sistema del complemento, que promueve la fagocitosis y la lisis del agresor, mediante moléculas precursoras presentes en la sangre (4). Al ser superadas estas barreras se induce una respuesta inflamatoria (5), caracterizada por la secreción de proteínas de la fase aguda inespecíficas al antígeno y que no generan memoria. Si el proceso inflamatorio inicial no logra eliminar al patógeno, se activa el sistema inmune adaptativo. El evento inicial de la inmunidad adaptativa es la presentación antigénica, que comienza con una célula dendrítica que internaliza al patógeno, y que posteriormente procesa y presenta a los linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (6). El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T induce la expresión de moléculas de adhesión, la secreción de citoquinas, tales como IL-12, y la proliferación de subclones de linfocitos T. Las citoquinas liberadas pueden direccionar la respuesta hacia un fenotipo inmune celular, mediante la secreción de Interferón- γ (IFN- γ), o uno humoral, a través de la producción de interleuquinas 4, 5 y 10 (IL-4, IL-5 e IL-10).

La respuesta inmune celular está representada por los linfocitos T citotóxicos CD8+, que se encargan de la lisis de células infectadas por virus y/o bacterias, los macrófagos, que secretan citoquinas inductoras de la proliferación de linfocitos B y T. En cambio, la respuesta inmune humoral está constituida por los linfocitos B y anticuerpos, cuyo principal blanco de acción son los patógenos extracelulares (6).

1.2 Receptores de reconocimiento de Patógenos

El sistema inmune innato reconoce motivos moleculares conservados asociados a patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Una de las principales familias de PRRs corresponde a la de los receptores de tipo Toll (TLRs, homólogos a los Toll de *Drosophila*). A inicios de la década de los 90 los primeros receptores Toll de *Drosophila* fueron asociados con el desarrollo dorso-ventral (7), los que también cumplen un papel determinante en la respuesta inmune innata contra infecciones fúngicas, según se ha demostrado por la presencia de mutaciones en alguna de las proteínas de la ruta de señalización intracelular del mismo (8).

Los TLRs son proteínas de transmembrana que poseen un dominio intracelular TIR homólogo al del receptor de IL-1 (Toll/IL-1R), crucial en la activación de la vía de señalización del receptor. Además, el TLR posee un dominio extracelular que contiene repeticiones ricas en Leucina (Leucine Rich Repeats, LRR) involucradas en el reconocimiento de los ligandos (9).

1.3 Tipos de TLRs

Hasta el momento, 11 TLRs han sido identificados en mamíferos, agrupados en dos categorías, una que reconoce PAMPs de tipo bacteriano (TLR2, 4 y 5), localizados principalmente en la superficie celular (10), y otra compuesta por los TLR3, 7/8 y 9, que reconocen virus (10) y requieren su internalización a compartimientos endosomales (11).

TLR2, reconoce PAMPs de bacterias gram positivas, tales como peptidoglicano, lipoproteínas, lipopéptidos y ácido lipoteicoico; también puede responder a PAMPs de diversos orígenes, tales como lipoarabinomano de *Micobacteria*, zimosan de Hongos y glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi* (12).

TLR 1/6, no responden a ningún PAMPs conocido *per se*, sin embargo ambos forman heterodímeros con el TLR2, lo que aumenta la diversidad en el reconocimiento de PAMPs (13-15).

TLR3, reconoce RNA de doble hebra viral (dsRNA) y a la forma de doble hebra de replicación.

TLR4, responde a lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas. La resistencia al shock endotóxico que poseen los ratones C3H/HeJ y C57BL/10ScCr es consecuencia de una mutación natural en el gen *Tlr4*, que disminuye la respuesta a LPS (16). El TLR4 puede reconocer PAMPs de otras especies, tales como el Taxol de *Taxus brevifolia* (un potente anticancerígeno humano) (17), ligandos endógenos y algunas proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial (18).

TLR5, reconoce Flagelina, una proteína que compone al flagelo bacteriano y que está ausente en eucariontes (19). El flagelo es una de las estructuras más complejas encontradas en bacterias y está involucrado en el movimiento hacia un medioambiente óptimo para su crecimiento y supervivencia.

TLR7/8, reconocen RNA de hebra simple (ssRNA). Ambos se encuentran en el endosoma celular, exponiendo el dominio de reconocimiento de ligando en el interior del organelo y el TIR en el citoplasma (20-22).

TLR9, reconoce DNA bacteriano y/o viral, principalmente, como motivo CpG, siendo el Citomegalovirus (MCMV) (23) y el Herpes Simple 1 y 2 (HSV 1/2) ejemplos de virus que activan este receptor (24, 25).

1.4 Vía de señalización de los TLRs

La activación de casi todos los TLRs, con excepción del TLR3, estimula una vía de señalización que involucra el reclutamiento inicial de la proteína adaptadora MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88). Existen vías alternativas de transducción de señales exclusivas de cada TLR, las cuales regulan la ruta de señalización clásica y son, en general, independientes de la participación de MyD88. El estudio riguroso de los mecanismos blanco de una de estas vías, que involucra a la PI3K, es parte central de esta tesis.

1.4.1 Ruta de señalización dependiente de MyD88

El dominio TIR de los TLRs inicia la vía de señalización mediante el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88 y posteriormente de proteínas quinasas. MyD88 es una proteína de 35 kDa que presenta tres dominios funcionales: un TIR en el carboxilo terminal, por el cual se asocia al TLR (26, 27); uno de muerte (DD) en el amino terminal, que media la interacción con DD presentes en otras proteínas (28); y uno intermedio (DI), el cual activa, río abajo, a proteínas quinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAKs).

La familia de las IRAKs esta compuesta por cuatro integrantes: IRAK-1, -2, -4 y -M, las cuales poseen un DD en el amino terminal y un dominio con actividad quinasa en su región central. No obstante, solo IRAK-1 y -4 presentan actividad quinásica, ya que IRAK-2 y -M inhiben la ruta de señalización de IL-1/TLR. La forma fosforilada de IRAK-4 media la fosforilación de IRAK-1, lo que permite que IRAK-1 se escinda del complejo TIR/MyD88/IRAK-4/-1, y así interaccionar, subsecuentemente, con TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (29).

TRAF6 es una molécula adaptadora que se encuentra en el citoplasma y que se activa posterior a IRAK en la cascada de señalización de los TLRs (Figura 1).

TRAF6 también activa a las quinasas (IKKs) del inhibidor del factor nuclear- κ B ($I\kappa$ B) y a las activadas por mitógeno (MAPKs) (30, 31, 32).

Las IKKs activadas fosforilan a IκB, el cual se escinde del complejo que forma con las subunidades que conforman el factor nuclear-κB (NFκB), para ser ubiquitinizado y posteriormente degradado por el proteosoma. Cuando NFκB se disocia del complejo se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes pro-inflamatorios y de moléculas de adhesión (Figura 1).

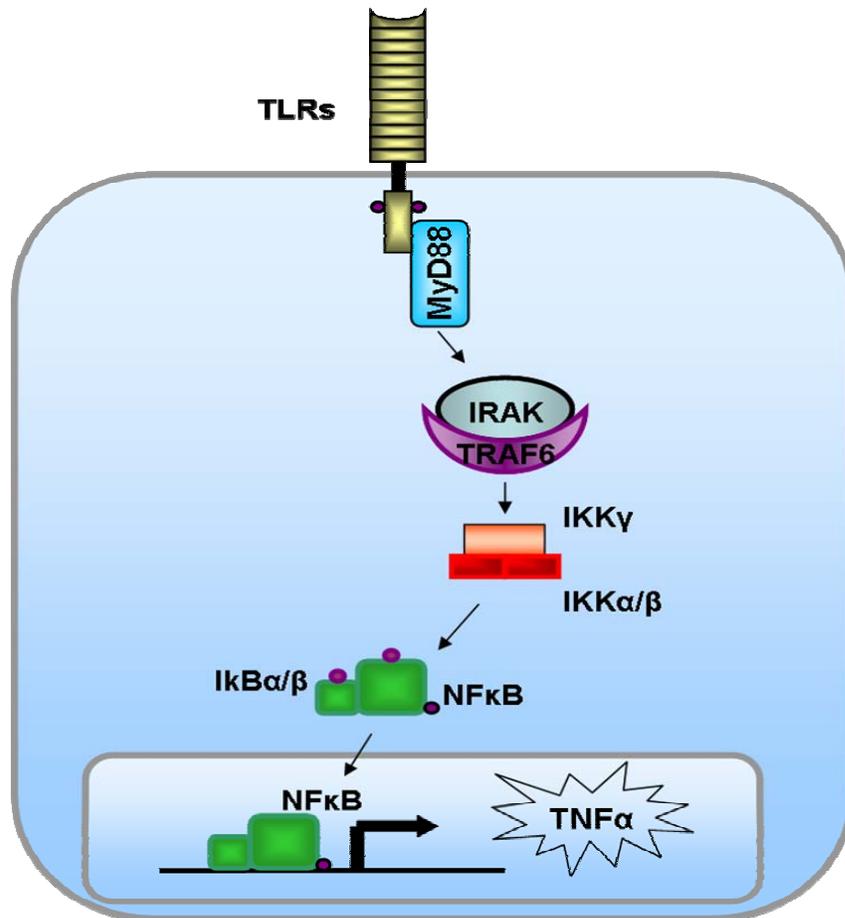


Figura 1. Vía de señalización de los receptores de tipo Toll (TLRs) dependiente de MyD88. La activación de los TLRs induce una ruta de señalización transduccional, mediada principalmente por MyD88 y NFκB, activando la transcripción de genes pro-inflamatorios y moléculas de adhesión (Adaptado de (113)).

1.4.2 Ruta de señalización intracelular independiente de MyD88

Algunos de los integrantes de la familia de los TLRs no requieren de la participación de MyD88 para activar respuestas inmunes innatas. La activación de TLR3 y TLR4 involucra una vía de señalización alternativa, que cuenta con la intervención de la proteína adaptadora TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) y TRAM (TRIF-related adaptor molecule), además de los factores reguladores de interferon 3 y 7 (IRF-3/7) que inducen la expresión de IFN tipo I y moléculas co-estimuladoras (25, 33).

1.5 Participación de la fosfoinositol 3-quinasa en la ruta de señalización del TLR

Otras vías de señalización intracelular producto de la activación de algunos TLRs, involucran la participación de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). El dominio TIR de TLR2, TLR1, TLR6 y TLR3 posee motivos *YXXM* susceptibles a fosforilación por tirosina quinasa, los que son reconocidos por los dominios SH2 de la enzima PI3K. Cuando PI3K se une a las tirosinas fosforiladas del dominio TIR, activa la fosforilación de fosfoinositoles (o sus derivados en el hidroxilo en la posición 3) localizados en la membrana plasmática, los que son reconocidos por los dominios de Pleckstrina (PH domain) presentes en la serina/treonina quinasa Akt (PKB) y en proteínas dependientes de fosfoinositoles (PDK1/2), promoviendo rápidamente la fosforilación de Akt y la expresión de genes anti- o pro-inflamatorios, mediante NF κ B, IRF-3 y AP-1, dependiendo del TLR, del estímulo y del tipo celular (34, 35). En este sentido, el estado de fosforilación de Akt es un indicador de la actividad de la ruta de PI3K.

Los fosfoinositoles blanco de la PI3K se ubican en la cara citoplasmática de la membrana celular, regulando el tráfico vesicular, la organización del citoesqueleto, la transducción de señales, la fagocitosis, la proliferación celular, la supervivencia celular y la respuesta inmune (36-39), como también el reclutamiento de proteínas específicas a nivel de la membrana plasmática (40, 41).

Hasta el momento, se han identificado *in vivo* cuatro fosfoinositoles fosforilados siendo los principales, en la respuesta inducida por los TLRs, el fosfoinositol (3,4)-bifosfato (PIP2) y el fosfoinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), los cuales se producen en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas, etc (39).

PI3K fue inicialmente purificada y clonada como un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110 α) y una reguladora de 85 kDa (p85 α). Existen 8 tipos de PI3Ks en mamíferos y se clasifican en I, II y III, de acuerdo a la estructura de sus subunidades, la selectividad por el sustrato y el tipo celular en el que se expresan (41).

La clase I comprende dos subclases, Ia y Ib, los cuales generan el PIP3, uno de los segundos mensajeros lipídicos más relevantes en el sistema inmune. La subclase Ia está compuesta por tres subunidades catalíticas, p110 α , p110 β y p110 δ , y cinco regulatorias p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , y p50 α . La preferencia en la expresión de cada subunidad regulatoria y catalítica está dada por el tipo celular (42). La subunidad p85 α posee dominios SH2 por lo que interacciona con proteínas fosforiladas en tirosina, especialmente con el TLR1, TLR6, TLR2 y TLR3, y una región inter-SH2 a través de la que dimeriza con p110 (43). El subgrupo Ib está compuesto solo por un integrante catalítico (p110 γ) expresado inicialmente en leucocitos y uno regulatorio (p101) activado por asociación con proteínas G.

Las PI3K de clase II han sido poco estudiadas, y su mecanismo de acción estaría relacionado con la producción de fosfoinositol 3-monofosfato (P3P) y PIP2 (44). La clase III, que solo genera P3P se localiza en vesículas endocíticas y principalmente regularía la fagocitosis (38).

El PIP3 recluta distintas proteínas quinasa, tales como la dependiente de fosfoinositol (PDK-1), Akt y la proteína quinasa C ζ (PKC ζ), quienes median la transcripción de genes, la supervivencia y el crecimiento celular (45-48).

Akt es el homólogo celular del oncogen transformante del retrovirus AKT8 (87-89). Hasta el momento tres familias de Akt han sido descritas en mamíferos (89-92).

La familia de proteínas Akt poseen un motivo central con actividad quinasa y en el amino terminal un dominio PH, el cual media las interacciones lípido-proteína y/o proteína-proteína (93-95). Además, Akt regula la fosforilación de múltiples sustratos, tales como la proteína Bcl-2 antagonista de la muerte celular (BAD), involucrada en apoptosis, las quinasas IKKs, involucradas en apoptosis, vías de sobrevivencia celular y respuesta inmune, el apoptosoma, y la quinasa sintetizadora de glicógeno 3 (GSK-3), entre otros (96, 97).

PI3K regula el desarrollo de los linfocitos B (50) y el reconocimiento antigénico de los linfocitos T por asociación al dominio citoplasmático de su receptor (T Cell Receptor; TCR) (51).

Otras funciones de la vía de PI3K vinculadas con el sistema inmune innato, han sido la quimiotaxis de fagocitos (52) y la regulación de la actividad de células NK en el rechazo a trasplantes, tumores y virus (53-55).

1.6 Participación de los Glucocorticoides en el sistema inmune

Las hormonas esteroidales han sido reconocidas como moduladores esenciales de diversos procesos celulares, tales como transducción de señales, comunicación intercelular y metabolismo intermedio, entre otros (56). Los glucocorticoides (GCs) son sintetizados en la zona fasciculada/reticulada de la corteza adrenal y liberados a la circulación en respuesta a estímulos relacionados con el estrés.

La secreción de los GCs es orquestada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Glándula Adrenal (HPA), mediante la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de corticotropina, que activa la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH), la cual finalmente, activa receptores específicos en la glándula adrenal.

Los GCs circulan en el plasma asociados a moléculas transportadoras, tales como la globulina y la albúmina, que une ligandos endógenos y/o sintéticos, respectivamente (57). Estas moléculas participan en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, regulando la glicemia, y el procesamiento de estos en aminoácidos y ácidos grasos libres, respectivamente. Los tejidos blanco de los GCs son el sistema nervioso central, el cardiovascular, regulando la tensión vascular, y en el sistema inmune, disminuyendo la expresión de moléculas de la inmunidad adaptativa (58).

Estas moléculas lipofílicas atraviesan la bicapa lipídica de la célula mediante difusión simple, sin embargo el efecto de los GCs en algunos tipos celulares estaría vinculada con la unión a receptores de membrana (56, 59). El mecanismo de acción conocido de los GCs involucra su unión a un receptor citoplasmático (GR), el cual activa la expresión de genes, tales como $I\kappa B\alpha$, e inhibe la actividad transcripcional de $NF\kappa B$ y AP-1, mediante interacción proteína-proteína (5, 60). En ausencia de GCs, GR se encuentra inactivo en el citoplasma asociado a proteínas de shock térmico 56, 70 y 90 (hsp56, hsp70 y hsp90) (61, 62), y presenta una gran afinidad por el ligando.

Los GCs sintéticos son utilizados para el tratamiento de enfermedades, tales como Lupus Eritematoso Sistémico, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Psoriasis, Asma y Artritis Reumatoidea (63, 64). El aspecto más relevante de la asociación de GCs con el sistema inmune corresponde al potente efecto supresor de la inflamación y la respuesta inmune adaptativa. El mecanismo inmunosupresor de los GCs se vincula con la inducción de la apoptosis, la disminución de la proliferación linfocitaria, la supresión de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la disminución de la secreción de anticuerpos por los linfocitos B (5, 65, 66).

1.7 Regulación de la expresión del TLR por moléculas pro- y anti-inflamatorias

La expresión de los TLRs puede ser modulada por diversos factores involucrados en vías pro- o anti-inflamatorias, tales como citoquinas y GCs, respectivamente (1).

Las moléculas que forman parte de la vía de señalización del TLR2 son blancos posibles del GR, por lo cual es pertinente estudiar la participación de PI3K en estos mecanismos de señalización intracelular. Estudios recientes indican que el GC sintético Dexametasona, en combinación con $TNF\alpha$, aumenta sinérgicamente la expresión del receptor TLR2 en células A549 (1), y la inhibición de la apoptosis (67). Por otra parte, Dexametasona reduce la fosforilación de Akt en mastocitos (70). Estos resultados proponen nuevas perspectivas de los GCs en la respuesta inmune innata, que clásicamente han sido vinculados con la inhibición de la expresión de moléculas de la inmunidad adaptativa. Por estas razones, en esta tesis, se estudia el efecto de los GCs sobre la vía de transducción de los TLRs.

2. HIPÓTESIS

La activación del TLR2 por lipopéptidos bacterianos sintéticos activa una vía clásica de señalización que es mediada por MyD88. Sin embargo, estudios recientes indican que la activación del TLR2 también involucra una vía alternativa mediada por PI3K/Akt (35, 68). Estudios preliminares indican que el tratamiento de células A549 con un agonista sintético del TLR2, análogo a la porción amino terminal de lipoproteínas bacterianas (*Pam₃Cys-Ser-Lys₄*), aumenta la actividad transcripcional del TLR2. Una interrogante en estos procesos ha sido el efecto de los GCs sobre estas vías. GR activado por Dexametasona puede interaccionar y regular la actividad de PI3K en queratinocitos, mastocitos y neutrófilos (69, 70).

Basándome en estos antecedentes, la hipótesis de esta tesis para optar al grado de Bioquímico es:

“La fosfoinositol 3-quinasa regula negativamente la producción de TNF α inducida por agentes de bacterias gram positivas, en presencia o ausencia de glucocorticoides”

2.1 Objetivo General

Determinar la participación de PI3K en la producción de TNF α inducida por productos de bacterias gram positivas, en presencia o ausencia de glucocorticoides, y las vías involucradas en estos procesos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analizar el efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona, sobre la expresión de TNF α y la activación transcripcional de NF κ B, en células A549.

2. Estudiar la participación de PI3K-Akt en la ruta de señalización del TLR2 inducida por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona.
 - 2.1) Para ello se evaluó el estado funcional de Akt, determinado por su estado de fosforilación.

Se determinó el efecto de la intervención de la enzima, en condiciones de activación del TLR2 y GR, sobre:
 - 2.2) La producción de TNF α
 - 2.3) La actividad transcripcional mediada por NF κ B
 - 2.4) La actividad transcripcional mediada por AP-1
 - 2.5) La activación transcripcional del promotor del TLR2

3. Determinar la interacción entre TLR2-PI3K y GR-PI3K.
 - 3.1) Analizar la presencia de sitios putativos de reclutamiento de dominios SH2 de p85, con el programa DS Gene.
 - 3.2) Estudiar la interacción de estas proteínas sobre-expresadas *in vitro* mediante co-inmunoprecipitación.

2.3 Diseño Experimental

Para desarrollar el objetivo específico 1: “*Analizar el efecto de Pam₃Cys-Ser-Lys₄ y Dexametasona, sobre la expresión de TNF α y la activación transcripcional de NF κ B en células A549*”.

- a) Se determinó la expresión intracelular de TNF α en células expuestas al agonista del TLR2 en un rango de dosis (0,1 a 20 μ g/ml), por citometría de flujo.
- b) Se estudió la actividad transcripcional de NF κ B utilizando un constructo que contiene el gen reportero luciferasa (3xMHC-Luc). Este vector se expresó transitoriamente en células A549 que se estimularon posteriormente con Pam₃Cys-Ser-Lys₄ en presencia o ausencia de Dexametasona. La actividad transcripcional de NF κ B fue proporcional a la actividad de la luciferasa.

Para Evaluar el Objetivo específico 2, “*Estudiar la participación de PI3K-Akt en la ruta de señalización del TLR2 inducida por Pam₃Cys-Ser-Lys₄ en presencia o ausencia de Dexametasona*”.

- a) Se determinó la fosforilación de Akt mediante inmunoblots de extractos proteicos totales de células A549 expuestas a Pam₃Cys-Ser-Lys₄ en presencia o ausencia de Dexametasona.

En todos estos estudios se intervino la actividad de la PI3K con un mutante de la subunidad reguladora p85 (p85-DN, ver en materiales y métodos)

- b) La actividad transcripcional mediada por NF κ B.
- c) La actividad transcripcional mediada por AP-1.
- d) La activación transcripcional del promotor del TLR2:

Para determinar la actividad transcripcional de NF κ B, AP-1 y TLR2, las células se co-transfectaron transitoriamente con los constructos 3xMHC-Luc, AP-1-Luc y TLR2-1486-Luc (ver detalles en sección de materiales y métodos). Las células A549 se estimularon posteriormente con distintas dosis de Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (0,1, 1 y 20 μ g/ml) y Dexametasona 100 nM, y se determinó la actividad de la luciferasa.

e) Para determinar la expresión intracelular de TNF α en células A549 expuestas a *Pam*₃Cys-Ser-Lys₄ en presencia o ausencia de Dexametasona, se realizó la tinción intracelular con anticuerpos conjugados específicos y se cuantificó el contenido por citometría de flujo.

Para evaluar el Objetivo específico 3: “*Determinar la interacción entre TLR2-PI3K y GR-PI3K*”, se realizaron co-inmunoprecipitaciones de las fracciones proteicas de células A549 que expresan transitoriamente los vectores que contienen el cDNA de las proteínas cuya interacción será evaluada (p85, GR y/o TLR2-Flag). Previo a la obtención de las fracciones proteicas, las células A549 se estimularon con *Pam*₃Cys-Ser-Lys₄ en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM. Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación, se utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra cada una de las proteínas en estudio y se resolvieron posteriormente por inmunoblots.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y Anticuerpos

El ligando específico para el TLR2 es el Palmitoyl-Cys((RS)-2,3-(dipalmitoyloxy)-propyl)-OH, *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, se obtuvo de Bachem Bioscience (King of Prusia, PA, USA), el GC sintético Dexametasona de Steraloids (Wilton, NH, USA). Mifepristone (RU-486) un inhibidor del receptor de GCs fue donado por Roussel UCLAF (Francia). El anticuerpo anti-FlagM2 fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), el anticuerpo para el GR humano Ab57, donado por J. Cidlowski (NIEHS, National Institute of Environmental Health and Sciences) (71) y un anticuerpo anti-p85 α de BD Bioscience (San José, CA, USA). El anticuerpo anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³) fue obtenido de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) y el anti-Akt de BD Bioscience (San José, CA, USA). El anticuerpo conjugado anti-TNF α -FITC fue obtenido de eBioscience (San Diego, CA, USA). Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el reactivo quimio-luminiscente ECL, pertenecientes a Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA).

3.2 Células

El modelo utilizado fue la línea celular A549 derivada de un adenocarcinoma de epitelio pulmonar que expresa el TLR2 y también GR (1). Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5%/95% CO₂ en el medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (1:1 v/v) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 100 IU/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomycin, y subcultivadas cada 3 ó 4 días.

3.3 Transfección Transitoria y Plasmidios

En esta tesis todas las transfecciones fueron realizadas con el reactivo Fugene® (Roche, Indianapolis, IN, USA). El protocolo de transfección fue el sugerido por el fabricante y consistió en subcultivar células A549 hasta obtener un 70% de confluencia. Al segundo día, se cambia el medio de mantención DMEN/F12, 5%SFB, Pen/Str por el medio de transfección OPTIMEM (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, FL, USA). Luego, se prepara una mezcla formada por 100 µl de Optimem/ml de medio, 1 µg de DNA y 3 µl de Fugene®/1 µg de DNA, que se incuba por 40 minutos a temperatura ambiente y se aplica en los pocillos por goteo suave, manteniéndose a 37°C por 24 horas. Al tercer día, se repone el medio de cultivo DMEN/F12, 5%SFB, Pen/Str y se realizan los tratamientos de los cultivos celulares.

Para los experimentos de actividad transcripcional con gen reportero se usaron los siguientes plasmidios: el vector 3xMHC-Luc (que posee tres sitios de unión a NFκB, correspondiente al promotor del complejo mayor de histocompatibilidad humano y que codifica para la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*) para determinar la actividad transcripcional de NFκB; el constructo 7xAP-1-Luc (Stratagene, La Jolla, CA, el cual posee siete elementos de respuesta para AP-1 y que codifica para la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*) en conjunto con plasmidios que expresan c-fos y c-jun donados por los Drs. Bikini y Yaniv (Instituto Pasteur de Paris, Francia) (72) para determinar la actividad transcripcional del factor de transcripción AP-1; y el vector TLR2-1486-Luc (promotor completo del TLR2 que codifica para la enzima luciferasa) (1) para determinar la actividad transcripcional del TLR2. Como control de transfección se utilizó el vector pGL3-hRL (73), que codifica para la enzima luciferasa de *Renilla reniformes* (renilla reporter vectors; Promega Corp., Madison, WI).

Para intervenir la actividad de PI3K en los ensayos de citometría de flujo y de gen reportero se usó un constructo dominante negativo de PI3K (p85-DN), que carece del dominio de unión a la subunidad catalítica p110 (Δ478-511), y que fue donado por el Dr. L.C. Cantley (74).

Para los experimentos de co-inmunoprecipitación se utilizaron constructos que contienen el cDNA de: GR (GR-wt), donado por el Dr. J. Cidlowski; p85 α (p85-wt), donado por el Dr. J. Downward (75); y el TLR2 fusionado a un Flag donado por el Dr. Mantovani (1, 112).

Para el ensayo de actividad transcripcional reportero de la proteína fluorescente verde (green fluorescent protein, GFP), se usó el vector pd2GREd2EGFP (el cual posee dos elementos de respuestas a GR) donado por el Dr. J. Cidlowski (NIEHS, National Institute of Environmental Health and Sciences) (76). La emisión de fluorescencia se determinó en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón).

3.4 Determinación de Actividad Transcripcional con Gen Reportero Luciferasa

Para obtener resultados exitosos con los ensayos de luciferasa es recomendable utilizar un número de 1×10^5 células por ml. En estas condiciones, los constructos para determinar actividad transcripcional: 3xMHC-Luc, 7xAP-1-Luc o TLR2-1486-Luc, fueron transfectados en células A549 de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección las células fueron estimuladas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, en presencia o ausencia de Dexametasona por 18 horas. Posteriormente, se removió el medio, se lavaron los cultivos con PBS 1% y luego las células se lisaron utilizando un tampón de lisis (Passive Lysis Buffer - Promega Corp., Madison, WI, USA) durante 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Los lisados celulares fueron centrifugados a 4°C, a 15000 rpm por 5 minutos, para determinar la actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* y de *Renilla reniformes*, esta última se usa como control de transfección, usando el Kit "Dual luciferase reporter assay system" (Promega, Madison, WI, USA). La actividad de luciferasa fue determinada en un luminómetro MLX de placa con un microinyector automatizado (Dynex Tech, VA). La actividad luciferasa fue normalizada a la actividad de renilla y al control. Los ensayos de gen reportero realizados en este estudio representan tres experimentos en duplicado e independientes.

3.5 Inmunoblots

Para los inmunoblots se utilizaron una cantidad de 1×10^6 células por ml, las que fueron tratadas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, en presencia o ausencia de Dexametasona. Posteriormente se removió el medio, las células se lavaron con PBS 1% y se lisaron en un tampón LDB (LDB: low detergent buffer cuya composición en mM es: 20 Tris-Cl, pH 7.5, 2 EDTA, 150 NaCl, y 0.5% Triton X-100, tabletas de inhibidores de proteasas (Roche®) e inhibidores de fosfatasas (100 nM de Ortovanadato de Sodio, Pirofosfato de Sodio y NaF)), para luego ser homogenizadas con un sonicador de vástago (Microson) a 14 Watts por 5 segundos.

La cantidad total de proteínas fue determinada con el método de Bradford utilizando el reactivo de Bio-Rad, siguiendo las especificaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

A una cantidad equivalente de proteínas se le agregó SDS sample buffer y β -mercaptoetanol (77), para luego ser denaturadas por calor (5 minutos a 100°C). Se cargaron y corrieron 30 μ g de proteína en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 10%, utilizando la solución de tampones para la porción concentradora y separadora del gel descrita por Laemmli (77). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y, luego, teñidas con una solución de rojo Ponceau S al 1%. La membrana se lavó con una solución de TBS-Tween-20 0,1% (5M NaCl, 1M Tris/HCl pH 7,5 y 0,1% Tween-20) y fue bloqueada toda la noche con leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 al 0,1%. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios y secundarios diluidos en TBS-Tween-20 al 0,1% por 2 y 1 hora, respectivamente, lavándose la membrana con TBS-Tween-20 0,1% por 30 minutos entre y después de la incubación con los anticuerpos. Finalmente, se reveló la membrana con el reactivo quimio-luminiscente ECL de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas fue realizado con el software Gel Pro Analyzer 4.0 de MediaCybernetics, Inc.

3.6 Co-inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación, el número de células utilizadas fue de 1×10^6 por ml, las que fueron transfectadas, de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente, con los constructos GR-wt, p85-wt y TLR2-Flag, dependiendo del ensayo de co-inmunoprecipitación.

Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron tratadas con distintas dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona y por un periodo de tiempo determinado. Luego, se removió el medio de las células, estas se lavaron con PBS 1%, se lisaron con el tampón LDB y se homogenizaron en un vortex. La cantidad total de proteínas fue medida usando el método de Bradford con el reactivo ensayo de proteínas Bio-Rad, de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, una cantidad equivalente de proteínas fue usada para la inmunoprecipitación.

El lisado celular se incubó con sueros normales de ratón y/o conejo, para reducir la inespecificidad, por 15 minutos a 4°C con rotación. Las células posteriormente se incubaron con proteínas A/G agarosa por 1 hora, para reducir la inespecificidad, y se centrifugaron a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos. El sobrenadante fue incubado toda la noche con el anticuerpo específico, y el complejo antígeno-anticuerpo fue incubado con una solución proteínas A/G agarosa y centrifugado a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos. Luego la columna de agarosa fue lavada 4 veces con LDB conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas. Para eluir las proteínas inmunoprecipitadas de la columna de agarosa, esta se incubó con SDS Sample buffer conteniendo β -mercaptoetanol, para ser denaturadas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, las proteínas eluidas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida más SDS al 8% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, siguiendo el protocolo descrito en la sección de inmunoblots.

3.7 Citometría de Flujo

Los ensayos para determinar el contenido intracelular de TNF α por citometría de flujo se realizaron con un número de 1×10^5 células por ml, las cuales, dependiendo de las condiciones, se transfectaron con un constructo dominante negativo de p85. Las células fueron posteriormente tratadas con distintas dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona por 4 horas, y suplementadas con Brefeldina A 10 μ M posterior a los 30 minutos de iniciado el tratamiento, para inhibir la ruta exocítica celular. Cumplido el período de tratamiento, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1% y fijadas en p-formaldehído 2% por 15 minutos a 4°C. Después del periodo de fijación las células fueron lavadas con PBS 1% y centrifugadas a 2000 rpm por 1 minuto a 4°C.

Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-TNF α -FITC diluido 1:50 en una solución de Saponina 0,05%/PBS1%/BSA1% e incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad para detectar el contenido intracelular de TNF α . Luego, las células se lavaron 2 veces con la misma solución de preparación de los anticuerpos y fijadas nuevamente con p-formaldehído 2%, para ser guardadas a 4°C por toda la noche. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSort de Becton Dickinson y analizadas usando el programa CellQuest y/o WinMD.

3.8 Estadística

Todos los pares de grupos tratados con ambos ligandos y a su vez transfectados con los distintos constructos fueron comparados con one way ANOVA – Turkey test. Al menos tres experimentos independientes en duplicado fueron realizados y las muestras fueron significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc).

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la expresión de TNF α

Para determinar el efecto de la activación del TLR2 sobre los mecanismos que controlan la ruta pro-inflamatoria, se evaluó la expresión de TNF α . Además y debido a los antecedentes de la literatura que reflejan efectos controversiales de los GCs, de acuerdo al modelo de estudio y al agente inflamatorio utilizado, nos propusimos también estudiar el efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la expresión intracelular de TNF α en células A549.

Las células se trataron con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en un rango de dosis de 0 a 50 μ g/ml por 4 horas en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM y, a los primeros 30 minutos de iniciado el tratamiento se adicionó Brefeldina A al medio de cultivo para posteriormente procesar las células y visualizar la expresión de TNF α por citometría de flujo.

La expresión intracelular de TNF α aumentó de manera dependiente de la dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, alcanzando un máximo con 50 μ g/ml (Figura 2). Sin embargo, y contrario a lo esperado respecto a la acción de los GC, se observó que el co-tratamiento con Dexametasona no revierte el aumento en la expresión de TNF α inducido con las dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* utilizadas. Los resultados sugieren que los GCs no interfieren la expresión de moléculas de la inmunidad innata activadas por el TLR2 (68, 78).

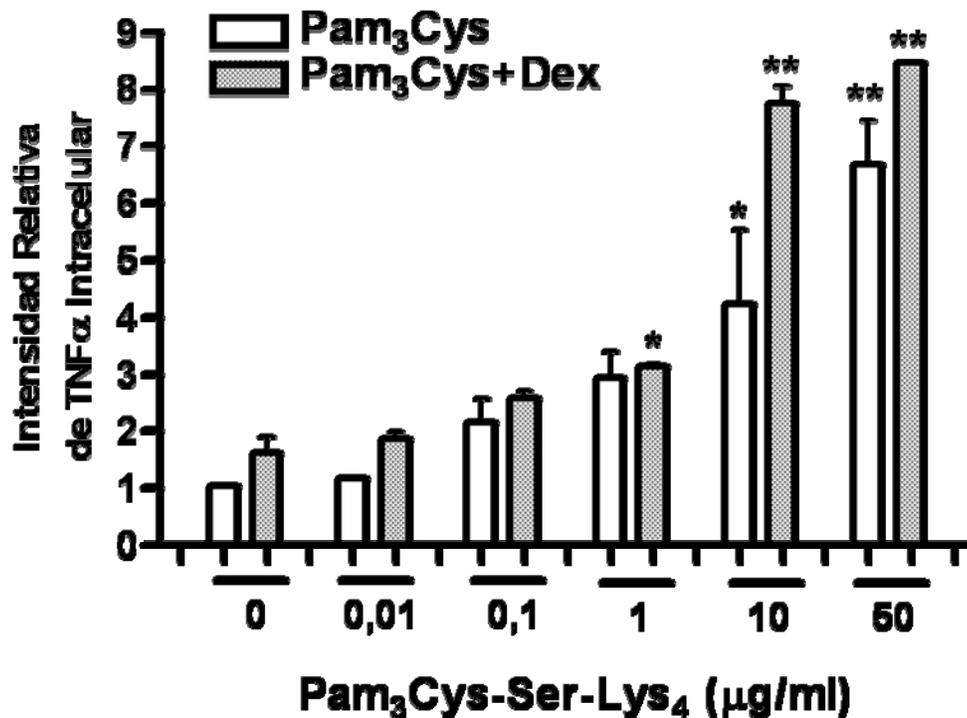


Figura 2. Pam₃Cys-Ser-Lys₄ y Dexametasona aumentan la expresión de TNFα en células epiteliales humanas.

Las células A549 tratadas con Pam₃Cys-Ser-Lys₄ durante 4 horas aumentan la expresión de TNFα en forma dependiente de la dosis. El co-tratamiento de las células con Dexametasona 100 nM no alteró la producción de TNFα inducido por el agonista del TLR2 en el rango de las dosis utilizadas. La producción de TNFα fue normalizada al control (n=3, los resultados significativos mostraron un * p<0,05 y **p<0,01 respecto al control sin tratamiento, ANOVA - Turkey test).

4.2 Efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la actividad transcripcional de NF κ B

El factor de transcripción NF κ B regula la transcripción de los genes de citoquinas involucradas en el desarrollo de la respuesta inmune innata (79) inducida por la ruta de transducción de señales del TLR2.

En esta tesis evaluamos el efecto de los GC sobre la activación de NF κ B en la vía de señalización del TLR2. Las células A549 se transfectaron con los constructos 3xMHC-Luc y pGL3-hRL para determinar la activación transcripcional de NF κ B a través de la expresión del gen reportero luciferasa (de acuerdo a las condiciones mencionadas en materiales y métodos).

En la Figura 3 se muestra un aumento en la actividad transcripcional de NF κ B dependiente de la dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, alcanzando un máximo con 1 μ g/ml del agonista del TLR2, la cual se mantiene con las dosis mayores. El co-tratamiento con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 ó 20 μ g/ml y Dexametasona no modificó la actividad transcripcional de NF κ B, siguiendo un patrón de respuesta similar a lo observado en la expresión intracelular de TNF α . Estos resultados son novedosos, ya que, es conocido que GR es un antagonista molecular de la activación transcripcional de NF κ B, sin embargo, en las células A549 dicho mecanismo no ocurrió. Para comprender un poco mejor estos efectos, profundizamos en la participación de otros integrantes de la vía transduccional.

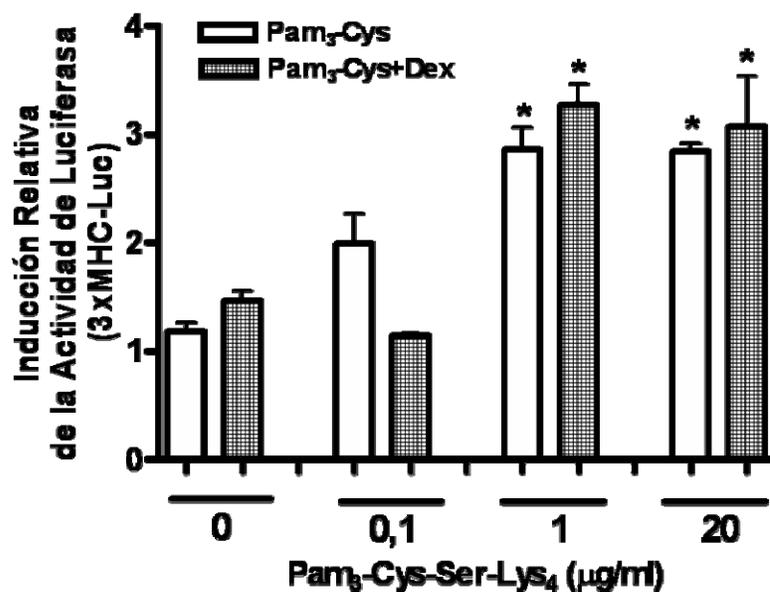


Figura 3. Efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la actividad de NFκB. Las células A549 fueron co-transfectadas con el constructo 3xMHC-Luc y con el plasmidio control de transfección Renilla (pGL3-hRL). Las células fueron estimuladas durante 18 horas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM, y luego se determinó la activación transcripcional de NFκB mediante la expresión del gen reportero luciferasa. Los resultados muestran la inducción o represión de la actividad transcripcional de NFκB expresada como el porcentaje de la razón de la actividad del gen reportero luciferasa y la del gen reportero renilla. (n=3, Análisis ANOVA - Turkey test, * p < 0,01 respecto al control).

4.3 Determinación de la efectividad biológica de Dexametasona

Los GCs ejercen su acción a través de GR, el cual inhibe la respuesta inmune adaptativa interaccionando con factores de transcripción involucrados en vías pro-inflamatorias y regulando la expresión de genes que poseen en su región promotora elementos de respuesta a GCs (GREs) (5, 79, 80).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la Dexametasona no disminuyó la expresión de moléculas pro-inflamatorias inducidas por la activación del TLR2, tales como $TNF\alpha$, a pesar que clásicamente los GCs ejercen un efecto supresor sobre moléculas del sistema inmune adaptativo. Debido a lo anterior, quisimos determinar si la Dexametasona despliega su efecto a través de la unión de GR a los GREs. Para esto, usamos un constructo que codifica para la proteína fluorescente verde (Green fluorescent protein, GFP) y que en su porción promotora posee dos GREs (pd2GRE α 2EGFP). Las células fueron transfectadas con pd2GRE α 2EGFP y posteriormente tratadas con Dexametasona 100 nM por 6 horas. Los resultados indican que las células expuestas a Dexametasona expresaron GFP a diferencia de las células no tratadas (Figura 4b y c). Estos resultados indican que la Dexametasona puede regular, en este sistema celular, la expresión de genes que tienen en su promotor GREs.

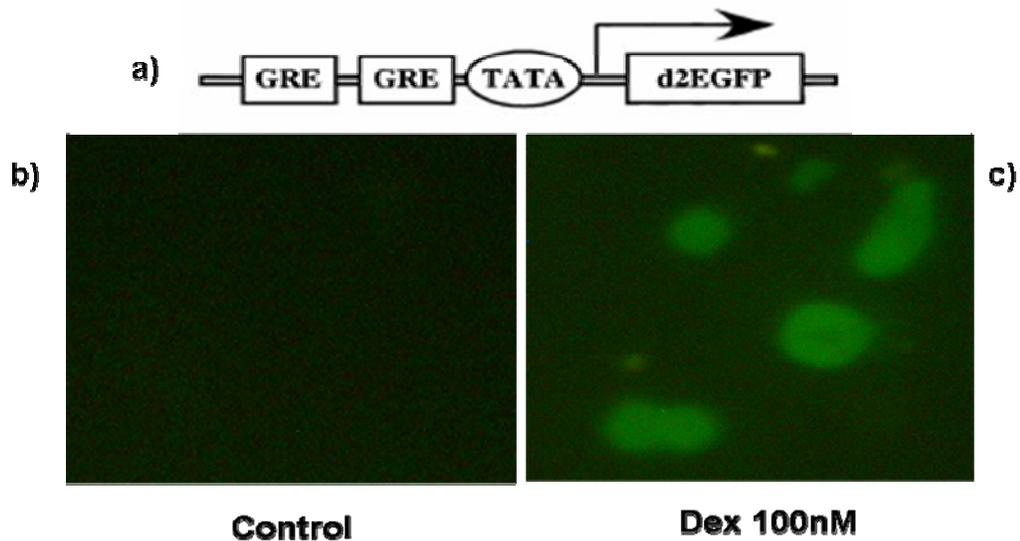


Figura 4. Actividad de la Dexametasona en células A549.

a) Esquema del constructo pd2GRE α 2EGFP utilizado para evaluar la activación de los GREs inducidos por Dexametasona. b y c) Microscopía de fluorescencia de células que expresan transitoriamente el constructo pd2GRE α 2EGFP incubadas en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM por 6 horas.

4.4 Efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la fosforilación de Akt

En la mayoría de las líneas celulares PI3K y Akt regulan la supervivencia celular y previenen una excesiva respuesta inmune iniciada por la activación de los TLRs (81). Existen dos formas de determinar la actividad de PI3K: una directa, a través de la fosforilación de fosfoinosítoles, y otra indirecta, mediante la fosforilación de Akt, y esta última estrategia fue la que utilizamos en esta tesis. Esta maniobra experimental para evaluar la actividad de PI3K se vio reforzada por estudios que muestran que la estimulación de neutrófilos con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce un aumento en el estado de fosforilación de Akt (35).

En esta tesis se demostró que *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml incrementa la fosforilación de Akt después de 15 minutos de tratamiento. Sin embargo, este aumento en la fosforilación de Akt es transitorio, y disminuye drásticamente después de 30 min de exposición al agonista (Figura 5a). El próximo paso fue demostrar si existe una dependencia de la fosforilación de Akt con la dosis del agonista. La Figura 5b muestra que el aumento de la fosforilación de Akt es dependiente de la dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, siendo máxima con 1 µg/ml (casi 4 veces en relación al control).

Por otra parte, para determinar el efecto del co-tratamiento con Dexametasona sobre la fosforilación de Akt, las células A549 se trataron con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM, durante 15 minutos. Los resultados indican que la inducción de la fosforilación de Akt por activación del TLR2 es parcialmente restituida por Dexametasona. Este proceso requiere de la participación de GR, ya que al preincubar las células con un inhibidor específico de GR, RU486, se revierten los efectos de la Dexametasona sola o en combinación con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* sobre la fosforilación de Akt (Figura 5c). Estos resultados indican que *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce la fosforilación de Akt, y por lo tanto activa la vía alternativa de PI3K en células A549 la cual es inhibida por los GCs.

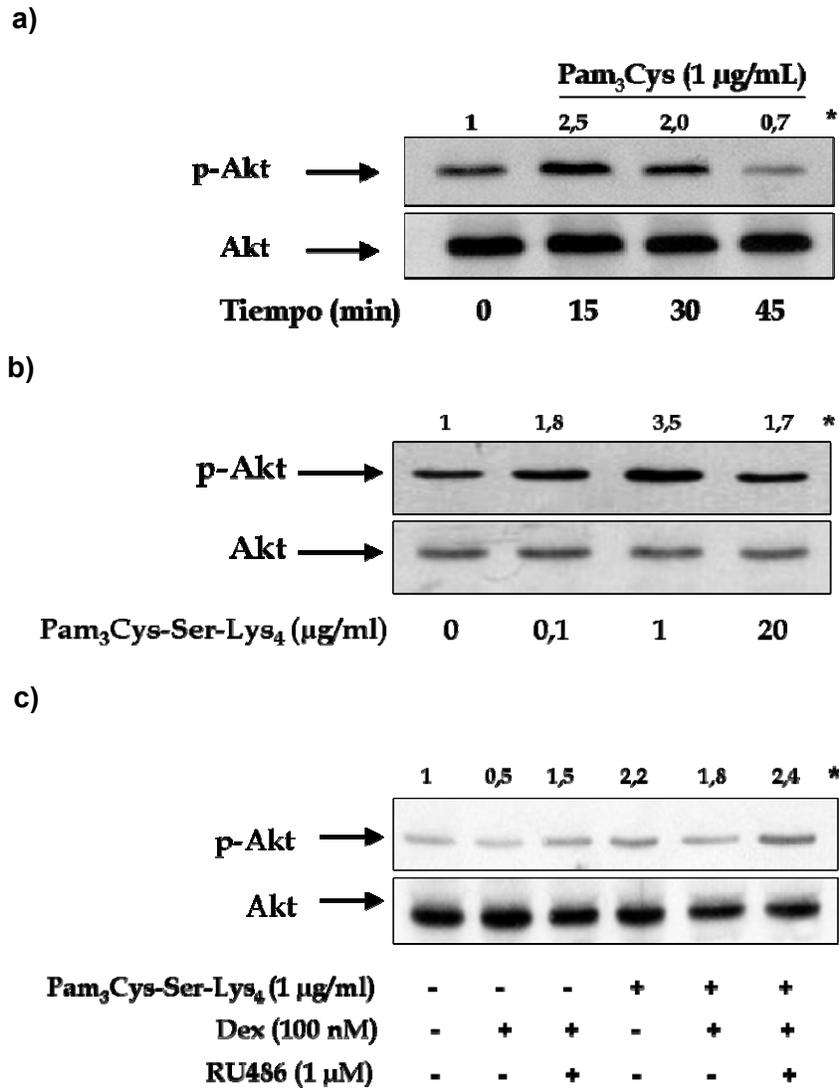


Figura 5. Efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona sobre la fosforilación de Akt. a) Las células A549 fueron estimuladas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml en los tiempos indicados y se determinó la fosforilación de Akt, mediante inmunoblots utilizando un anticuerpo anti-fosfoAkt (Ser⁴⁷³) y uno anti-Akt, observándose un máximo a los 15 minutos post-estímulo. b) Las células A549 fueron tratadas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* (0,1, 1 y 20 µg/ml) durante 15 minutos y se observó un aumento en la fosforilación de Akt con todas las dosis utilizadas. c) Las células fueron pre-tratadas con RU486 1 µM y posteriormente estimuladas con 1 µg/ml de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM por 15 minutos.

Los * representan los valores densitométricos de la razón p-Akt/Akt. Los geles que se muestran en las figuras son representativos de 3 experimentos independientes.

4.5 Participación de la PI3K en la expresión de TNF α inducida por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*

En macrófagos, la PI3K es activada en respuesta a *Staphylococcus aureus* (68), sin embargo, regula negativamente la cascada de señalización del TLR2 en células dendríticas de un ratón knock-out para p85 (PI3K^{-/-}), el cual presenta un aumento en la producción de IL-12 en relación a las células wild type (49).

La siguiente interrogante fue determinar la participación de PI3K en la ruta de señalización que conduce a la expresión de TNF α inducida por activación del TLR2. Las células A549 fueron transfectadas con el constructo p85-DN, para intervenir la actividad de PI3K, y se determinó la expresión intracelular de TNF α inducida por activación del TLR2.

Las células que transitoriamente expresaron el constructo p85-DN, aumentaron significativamente la expresión intracelular de TNF α en respuesta al estímulo con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, en relación a sus respectivos controles. Este aumento fue significativo con todas las dosis del agonista del TLR2 utilizadas, especialmente con 20 μ g/ml (Figura 6). Similar a lo demostrado en la Figura 2, el co-tratamiento de los cultivos celulares con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia de Dexametasona no provocó cambios significativos en la expresión de TNF α inducida por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*. Estos resultados indican que PI3K regula negativamente la expresión de TNF α inducida por el TLR2, y que se activa fuertemente frente a altas dosis del agonista del TLR2.

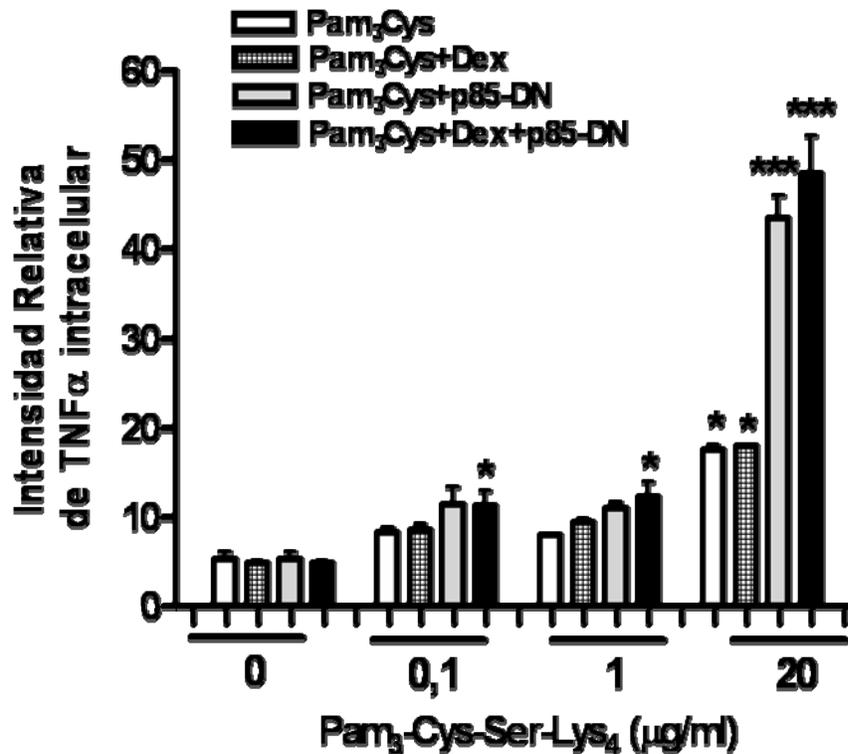


Figura 6. PI3K regula la producción de TNF α inducida por efecto de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y Dexametasona. Las células A549, que expresan transitoriamente el constructo p85-DN, fueron expuestas a *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* (0,1-20 μ g/ml) en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM. La expresión de TNF α fue normalizada al control, (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativos respecto al control, Análisis ANOVA - Turkey test).

4.6 PI3K participa en la regulación de la actividad transcripcional de NF κ B

Posterior a los hallazgos mencionados anteriormente, nos interesó estudiar la contribución de PI3K sobre la activación transcripcional de NF κ B inducida por el TLR2 en células que expresaron transitoriamente el constructo mutante p85-DN.

La actividad basal de NF κ B en células A549 que expresaron transitoriamente el mutante p85-DN fue menor respecto a las células que no expresaron el dominante negativo (Figura 7). El tratamiento de células, que expresaron p85-DN, con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce un aumento significativo y dependiente de la dosis, siguiendo un patrón de respuesta similar a aquellas que no lo expresaron. El co-tratamiento con Dexametasona 100 nM y *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 0,1 ó 1 μ g/ml no afecta la actividad transcripcional de NF κ B, inducida por el agonista solo. No obstante, las células que expresan el mutante p85-DN y que fueron tratadas con 20 μ g/ml del agonista del TLR2 responden con un aumento mayor en la actividad de NF κ B en comparación a las dosis menores, el cual fue revertido con Dexametasona (Figura 7). Estos resultados sugieren que PI3K es crucial en la ruta de transducción de señales activada por el TLR2 en células A549, ya que su inhibición disminuye casi en su totalidad la actividad transcripcional de NF κ B. Sin embargo, otros intermediarios de la ruta fueron también analizados.

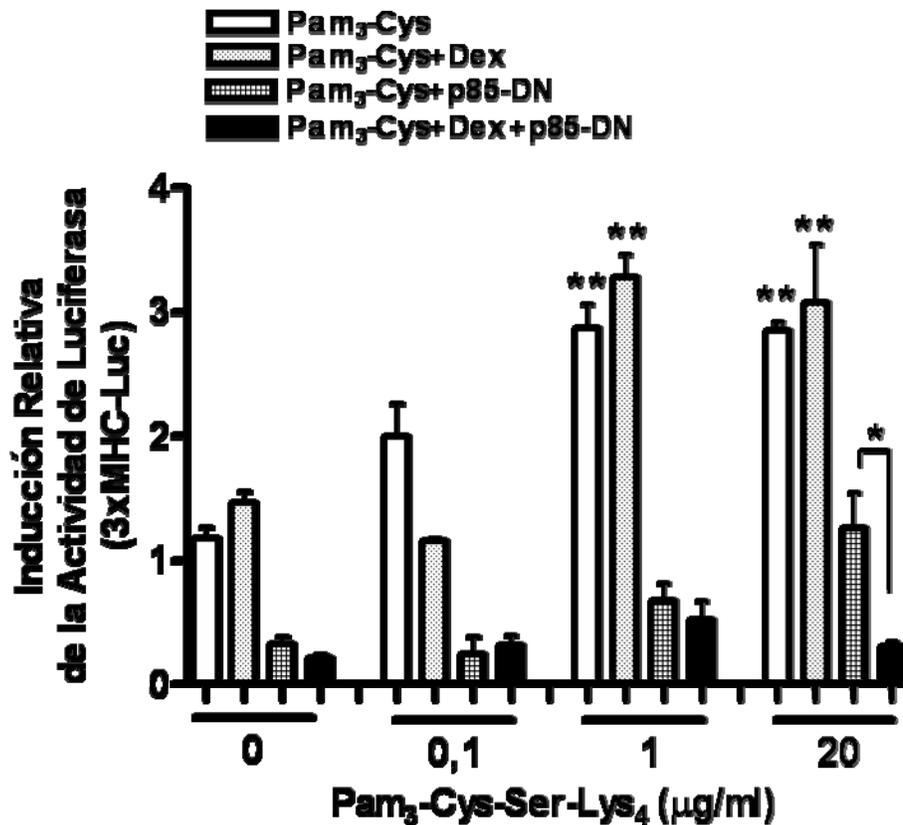


Figura 7. Dexametasona regula la actividad transcripcional de NFκB mediada por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*. Las células A549 fueron co-transfectadas con el constructo 3xMHC-Luc y con el constructo dominante negativo de PI3K (p85-DN). Las células fueron estimuladas por 18 horas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM, para luego analizar la activación transcripcional de NFκB mediante la expresión de la luciferasa. (n=3, Análisis ANOVA - Turkey test, * p < 0,05 y ** p < 0,01 respecto al control).

4.7 Papel de AP-1 en la vía de señalización del TLR2

En la búsqueda de los mediadores intracelulares que controlan la producción de TNF α inducido por la activación del TLR2, quisimos evaluar la participación de AP-1 en la vía de señalización del TLR2.

El factor de transcripción AP-1 es un heterodímero formado por c-fos y c-jun cuya actividad es requerida para la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y en el sistema inmune (82, 83).

Utilizamos células que expresaron transitoriamente el constructo AP-1-Luc y el mutante p85-DN, y que posteriormente fueron estimuladas con *Pam*₃*Cys-Ser-Lys*₄ (0,1 a 20 μ g/ml) en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM.

En la Figura 8, se observa un aumento significativo de la actividad de AP-1 dependiente de la dosis de *Pam*₃*Cys-Ser-Lys*₄, alcanzando un máximo con 0,1 μ g/ml y disminuyendo a los niveles basales con dosis mayores. El co-tratamiento de las células con Dexametasona 100 nM, revierte el aumento inducido por la activación del TLR2 sobre la actividad transcripcional de AP-1.

Las células que expresaron transitoriamente el constructo p85-DN, no presentaron activación de AP-1 en presencia o ausencia de los estímulos (*Pam*₃*Cys-Ser-Lys*₄ en presencia o ausencia de Dexametasona), revelando que PI3K es crítico para la inducción de AP-1 en células A549.

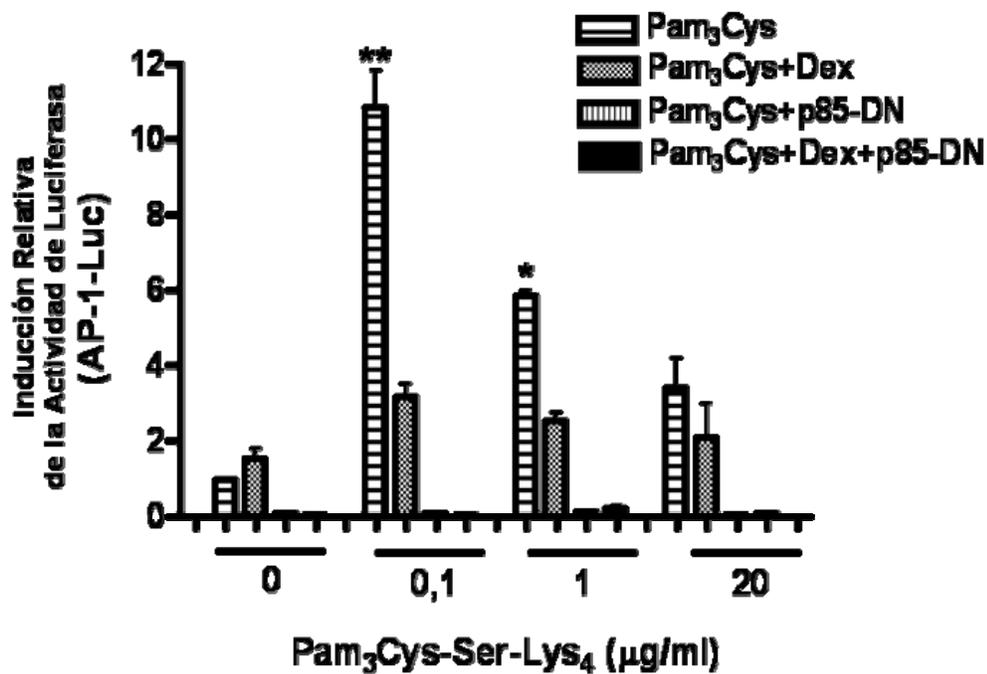


Figura 8. AP-1 participa en la vía de señalización del TLR2 en células A549.

Las células A549 fueron transfectadas transitoriamente con el constructo AP-1-Luc en combinación con los vectores que expresan c-fos y c-jun y con el mutante p85-DN, y posteriormente estimuladas por 18 horas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* (0,1 a 20 µg/ml) en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM. Se determinó la activación transcripcional de AP-1 mediante la expresión del gen reportero luciferasa. (n=3, Análisis ANOVA - Turkey * p < 0,05 y ** p < 0,01 respecto al control).

4.8 Regulación de la actividad transcripcional del TLR2 por PI3K

La siguiente incógnita de este trabajo fue determinar la participación de PI3K en la regulación de la actividad transcripcional del promotor del TLR2. Se evaluó la activación del TLR2, expresando transitoriamente el constructo TLR2-1486-Luc (forma completa del DNA del promotor del TLR2, en un vector pGL3 que contiene el gen reportero luciferasa) en combinación con el vector mutante p85-DN, en células A549 que fueron posteriormente estimuladas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* (0,1 a 20 µg/ml) en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM.

La Figura 9 muestra que la activación transcripcional del TLR2 aumentó con el tratamiento con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, alcanzando un máximo con 1 µg/ml. El co-tratamiento con Dexametasona induce un aumento cooperativo en la activación transcripcional del TLR2, específicamente con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 0,1 y 1 µg/ml. Este aumento en la activación transcripcional del TLR2, observado por el co-tratamiento con Dexametasona, requiere la unión de Dexametasona a GR, puesto que RU486, un antagonista específico del receptor, revirtió este efecto.

Estos resultados muestran que el agonista del TLR2 en conjunto con Dexametasona aumenta cooperativamente la activación transcripcional del TLR2, en comparación a *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* solo.

El estudio de la actividad transcripcional del promotor del TLR2 en células que transitoriamente expresaron el mutante p85-DN, y que posteriormente fueron tratadas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM mostró una disminución de la actividad transcripcional del promotor del TLR2. Estos resultados sugieren que PI3K regula positivamente la activación transcripcional del TLR2, a diferencia de lo que sucede con la expresión de TNF α , en donde PI3K regula negativamente su expresión, evidenciando que PI3K participaría en múltiples vías de activación de la respuesta inmune innata.

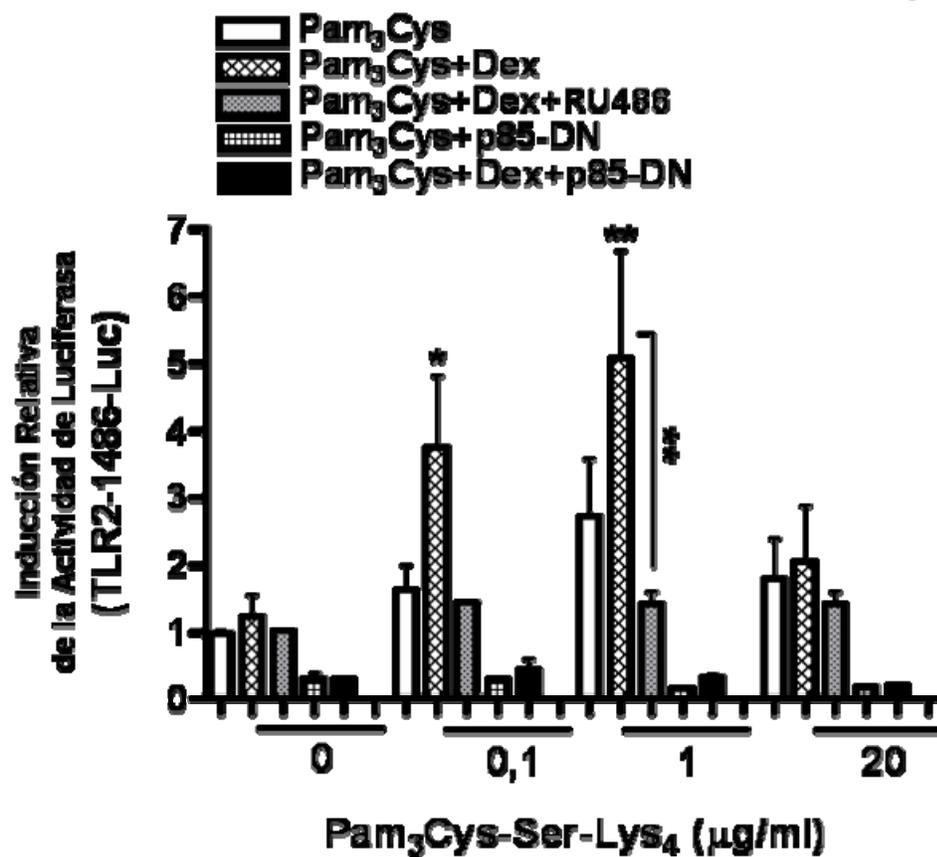


Figura 9. Regulación de la actividad transcripcional del TLR2 por PI3K.

Las células A549 fueron transitoriamente transfectadas con la forma completa del promotor del TLR2 y el mutante p85-DN, y que posteriormente fueron tratadas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM y/o RU486 1 µM. (n=3, * p < 0,05, ** p < 0,01 respecto al control, ANOVA - Turkey Test).

4.9 Determinación de la interacción entre PI3K-TLR2 y PI3K-GR en células A549

PI3K posee dominios SH2 que reconocen motivos de unión *YXXM* en diversas proteínas blanco, especialmente en receptores del sistema inmune.

Para comprender un poco más en detalle los posibles mecanismos involucrados en la regulación de PI3K, se analizó si el TLR2 y GR poseen estos motivos *YXXM* susceptibles a reclutar a la quinasa. La Figura 10a muestra la localización de los motivos *YXXM*, en la secuencia aminoacídica del TLR2 y del GR conservados en distintas especies de mamíferos, utilizando el programa DS Gene v1.5 de Accelrys Software, Inc. Estos resultados sugieren que potencialmente podría ocurrir una interacción entre p85/TLR2 y p85/GR.

El paso siguiente fue evaluar la interacción de p85 con el TLR2 o el GR por co-inmunoprecipitación, y así develar los mecanismos iniciales que suceden al estimular alguno de ellos. Las células A549 fueron co-transfectadas con los constructos que poseen los cDNAs de GR, p85 y el TLR2-Flag. Veinticuatro horas después las células fueron tratadas por 5 minutos con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml y Dexametasona 100 nM, para determinar la interacción entre p85/TLR2, y por 12 minutos para la interacción entre p85/GR. Los resultados evidencian que p85 co-inmunoprecipita con el TLR2, pero que ninguno de los tratamientos induce un aumento de la interacción entre p85 y el TLR2, en comparación con el control (Figura 10b).

Por otra parte, se demostró que p85 interactúa con GR en células A549, como también había sido descrito en queratinocitos (69). Los resultados indican que la interacción entre GR y p85 es inducida de manera significativa con respecto al control, cuando las células fueron estimuladas con Dexametasona 100 nM (Figura 10c). En cambio, el agonista del TLR2, no aumentó significativamente la interacción en comparación al control. Estos resultados indican que la interacción entre el TLR2 y p85 no fue modulada por ninguno de los agonistas utilizados, sin embargo, la unión entre p85 y GR fue aumentada significativamente en presencia de Dexametasona.

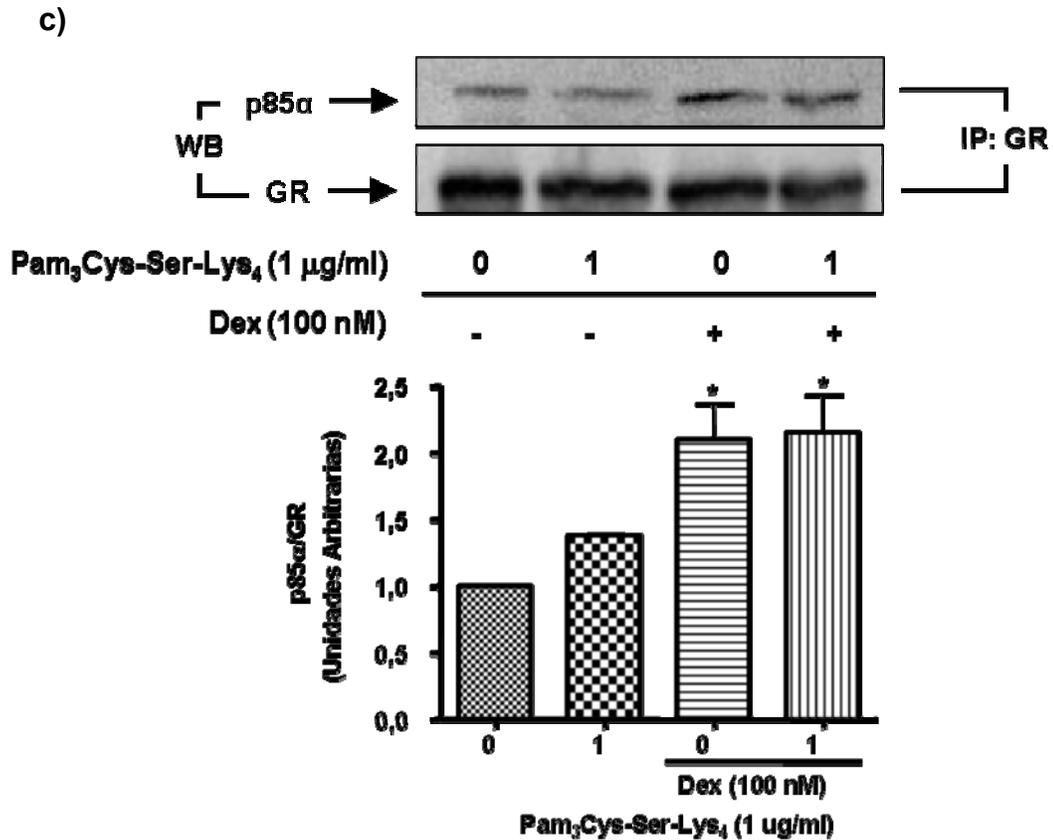


Figura 10. Estudio de la Interacción entre p85/GR y p85/TLR2.

a) Localización de los motivos YXXM en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del TLR2 y GR. b) Co-inmunoprecipitación de p85 y TLR2, se sobreexpresaron los constructos p85-wt y el TLR2-Flag en células A549 que fueron expuestas a *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM por 5 minutos. El panel inferior muestra la expresión relativa de la co-inmunoprecipitación de p85 respecto a la expresión de TLR2-Flag. c) Co-inmunoprecipitación de p85 y GR en células A549 transfectadas con los plasmidios GR-wt y p85-wt y posteriormente tratadas con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* 1 µg/ml en presencia o ausencia de Dexametasona 100 nM por 12 minutos. El panel inferior muestra la expresión relativa de la co-inmunoprecipitación de p85 respecto a la expresión de GR. (n=3, ANOVA – Turkey * p < 0.05 respecto al control).

5. DISCUSIÓN

En esta memoria se propuso determinar el papel de la PI3K y de los GCs como inmuno-moduladores de la vía de señalización del TLR2. Para ello se estudió la expresión de TNF α y la activación transcripcional del TLR2, además se investigó la fosforilación de la quinasa Akt, la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1, y las interacciones proteína-proteína entre PI3K con el TLR2 y GR.

La participación de PI3K en la vía de señalización del TLR2 es controversial, tal como se ha descrito en estudios realizados en neutrófilos y en células HEK293, en que la PI3K promueve la expresión de moléculas pro-inflamatorias (35, 68), sin embargo, en células dendríticas obtenidas de ratones deficientes de PI3K la enzima regularía negativamente la expresión de IL-12 (49).

El estudio de la vía de señalización alternativa del TLR2 nos entrega nuevas evidencias sobre el mecanismo de acción de PI3K en la respuesta inmune innata. Además, el establecimiento de un mecanismo regulatorio entre los TLRs y los GCs abre un campo totalmente nuevo en la función de los GCs sobre el sistema inmune, más aún con los resultados que se obtuvieron en esta memoria, los cuales muestran un mecanismo distinto de acción de los GCs.

5.1 Efecto de la Dexametasona y PI3K en la expresión de TNF α y en la activación del receptor TLR2

Debido al uso masivo de GCs en distintas patologías (Artritis Reumatoide, Alergias, Transplantes, Quimioterapia, Tuberculosis, enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa, Shock Séptico, etc) se utilizó Dexametasona para examinar su efecto sobre la vía de señalización del TLR2, en una dosis de 100 nM en conjunto con el agonista sintético del TLR2. Dexametasona en conjunto con TNF α aumenta cooperativamente la expresión del TLR2 en células A549 (1), lo que indica que el efecto de los GCs sobre moléculas de la inmunidad innata no han sido completamente entendido aún. Los GCs clásicamente están involucrados en la reducción de mecanismos pro-inflamatorios y la supresión de moléculas de la inmunidad adaptativa. En esta tesis, la Dexametasona en conjunto con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* no disminuyó la expresión de TNF α , ni tampoco la activación transcripcional del TLR2. Estos resultados exponen nuevos antecedentes de la función de los GCs sobre moléculas de la inmunidad innata.

En la búsqueda de moléculas que pudieran regular la vía pro-inflamatoria del TLR2, una buena candidata a estudiar era PI3K. Los resultados muestran que esta enzima participa en varios procesos que ocurren como consecuencia de la activación del TLR2: por un lado ejerce efectos pro-inflamatorios (induce la activación transcripcional del TLR2) y por otro anti-inflamatorios (regula negativamente la expresión de TNF α).

El efecto anti-inflamatorio de PI3K asociado a la expresión de TNF α , muestra resultados distintos a los que se habían reportado anteriormente en neutrófilos, en donde el tratamiento con un inhibidor farmacológico de PI3K (wortmanina) en combinación con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, disminuían significativamente la expresión de TNF α , en comparación al agonista del TLR2 *per se* (35). Sin embargo, en un modelo murino deficiente de PI3K, ésta induce efectos anti-inflamatorios, específicamente, disminuyendo la expresión de IL-12 en células dendríticas (49), la estabilidad del mRNA de la Ciclooxygenasa 2 (COX2) y la expresión de la Oxido Nítrico Sintetasa en macrófagos (NOS) (81, 84, 85).

Por lo tanto, los resultados presentados en esta memoria muestran que PI3K cumple un papel vital en la regulación de la vía de señalización del TLR2.

5.2 Efectos de la PI3K y los Glucocorticoides en la activación de Akt

La enzima PI3K genera fosfolípidos 3-fosforilados que pueden activar una serie de intermediarios celulares que incluyen tirosina quinasas, proteínas G pequeñas, serina/treonina quinasas, tales como isoformas atípicas de la PKC ζ (Proteína quinasa C ζ) y Akt (86).

Para entender el papel de PI3K en la inducción de TNF α mediada por el TLR2 se estudió el estado de fosforilación de Akt como un indicador indirecto de la activación de PI3K. Observamos que *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce un aumento transitorio en la fosforilación de Akt a los 15 minutos de tratamiento. Además, la inducción de la fosforilación de Akt es dependiente de la dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*, la cual fue significativa con 1 μ g/ml.

Por otra parte, el tratamiento con Dexametasona disminuyó la fosforilación de Akt en comparación al control. Este efecto fue similar a reportes de la literatura, en donde la Dexametasona también disminuyó la fosforilación de Akt (70), indicando que su efecto sobre la ruta de señalización de PI3K/Akt no es exclusivo de un solo tipo celular. La disminución en la fosforilación de Akt podría ser explicada en relación a una reducción en la generación de PIP3, ya que su producción esta directamente relacionada con el estado de fosforilación de Akt. El aumento de la interacción entre p85 y GR inducido por Dexametasona podría estar impidiendo la producción de PIP3 por algún mecanismo aún desconocido. Finalmente, se concluye que la activación de PI3K es regulada diferencialmente por el agonista del TLR2 y los GCs.

5.3 Interacciones Proteína-Proteína

La subunidad reguladora de PI3K, p85, es reclutada al dominio TIR del TLR2 en la línea celular THP-1 y en células HEK293 que expresan establemente el TLR2 y que fueron estimuladas con *Staphylococcus aureus* (68).

Los resultados obtenidos no fueron del todo esperados, ya que por una parte se observó una interacción basal entre p85 y el TLR2, sin embargo los tratamientos con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* y/o Dexametasona no modificaron la interacción en comparación con el control. Esto podría deberse a que la dosis del agonista no fue suficiente para aumentar el reclutamiento de p85 al TLR2, debido a esto se intentará a futuro estudiar la interacción de estas proteínas con mayores dosis de *Pam₃Cys-Ser-Lys₄*.

Los resultados evidenciaron que existe una unión entre GR y p85 en ausencia de estímulos, y que cuando las células se trataron con Dexametasona la unión aumentó significativamente. Este incremento era previsible, ya que la Dexametasona activa al GR y lo hace susceptible a interacciones con proteínas de su ruta de señalización. En este experimento, *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* no varió la asociación GR-p85 de manera significativa, indicando que ésta no es modulada por el agonista del TLR2, sino exclusivamente por GCs.

Finalmente, los ensayos de co-inmunoprecipitación no son del todo certeros al momento de confirmar que una proteína interaccione directamente con otra, ya que es posible que se formen complejos y que las proteínas que se buscan sean parte del complejo y no que realmente interaccionen entre sí.

Para ratificar este proceso molecular estamos generando constructos para cada una de estas proteínas y así demostrar la interacción directa por Transferencia de Energía Resonante Fluorescente (FRET) (99).

5.4 Factores de Transcripción Involucrados

Para determinar cuales son los factores de transcripción involucrados en la respuesta de la PI3K, se realizó una búsqueda de los principales factores relacionados con las respuestas anti y pro-inflamatorias en las vías de señalización de los TLRs (1).

NF κ B regula la expresión de moléculas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión vía TLRs (68, 78, 79, 100, 101). Por otra parte, AP-1 también está involucrado en las respuestas mediadas por TLRs, siendo descrito como un regulador de respuestas pro-y/o anti-inflamatorias, dependiendo del estímulo y el tipo celular (102-106). Los resultados indicaron que PI3K regula positivamente la actividad transcripcional de NF κ B, y se observó un perfil de respuesta comparable con la cinética de activación transcripcional del promotor del TLR2, indicando que este factor es vital para la activación transcripcional del receptor, según se había reportado previamente (1).

Pam₃Cys-Ser-Lys₄ activa una vía clásica de señalización que involucra a NF κ B y a las MAPKs, dentro de las cuales AP-1 es uno de los principales factores de transcripción. Los experimentos indicaron que AP-1 está implicado en mecanismos pro-inflamatorios inducidos por el TLR2 en las células A549, ya que cuando éstas expresaron transitoriamente el constructo p85-DN indujeron sutilmente la transcripción mediada por AP-1.

Como objetivos anexos de esta tesis queda pendiente averiguar cuales son las otras moléculas o factores de transcripción involucrados que mediarían el efecto anti-inflamatorio observado para PI3K, sobre la expresión de TNF α . No obstante, se analizaron los factores de transcripción que están involucrados en el funcionamiento del promotor de TNF α , y se observó que éste posee elementos de respuesta para GATA-3.

GATA-3 es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación de células T a linfocitos tipo Th2, los cuales participan en la inhibición de la expresión de citoquinas del tipo Th1, tales como TNF α (107, 108).

Además, ha sido reportado que células las A549 expresan el mRNA de GATA-3 con lo cual este factor podría tener un papel en la regulación de la expresión de TNF α (107).

5.5 Modelo de la vía alternativa del TLR2 en células

A549

En esta memoria se estudió la relevancia de la enzima PI3K y los GCs en la vía de señalización del TLR2. La estimulación del TLR2 por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce el reclutamiento de p85 (subunidad reguladora de PI3K) al dominio TIR del TLR2 (36, 68). Una vez unida al TLR2, PI3K fosforila fosfolípidos de membrana generando diversos mediadores lipídicos, dentro de los que destaca PIP3. Estos mensajeros lipídicos son reconocidos por las proteínas que poseen dominios PH (Akt y PDKs), las cuales inducen la activación de proteínas involucradas en diversas vías de señalización (46) (Figura 11).

Akt fosforilada regula la actividad transcripcional de NF κ B y AP-1, a través de la activación de IKKs, la fosforilación de p65 (subunidad de NF κ B) (109, 110) y de MAPKs (p38, ERK y JNK) (111). Una vez que NF κ B y AP-1 están activados, translocan al núcleo e inducen la transcripción de genes que participan en procesos pro-inflamatorios. Sin embargo, aún queda por esclarecer el mecanismo involucrado en la disminución observada en la expresión de TNF α .

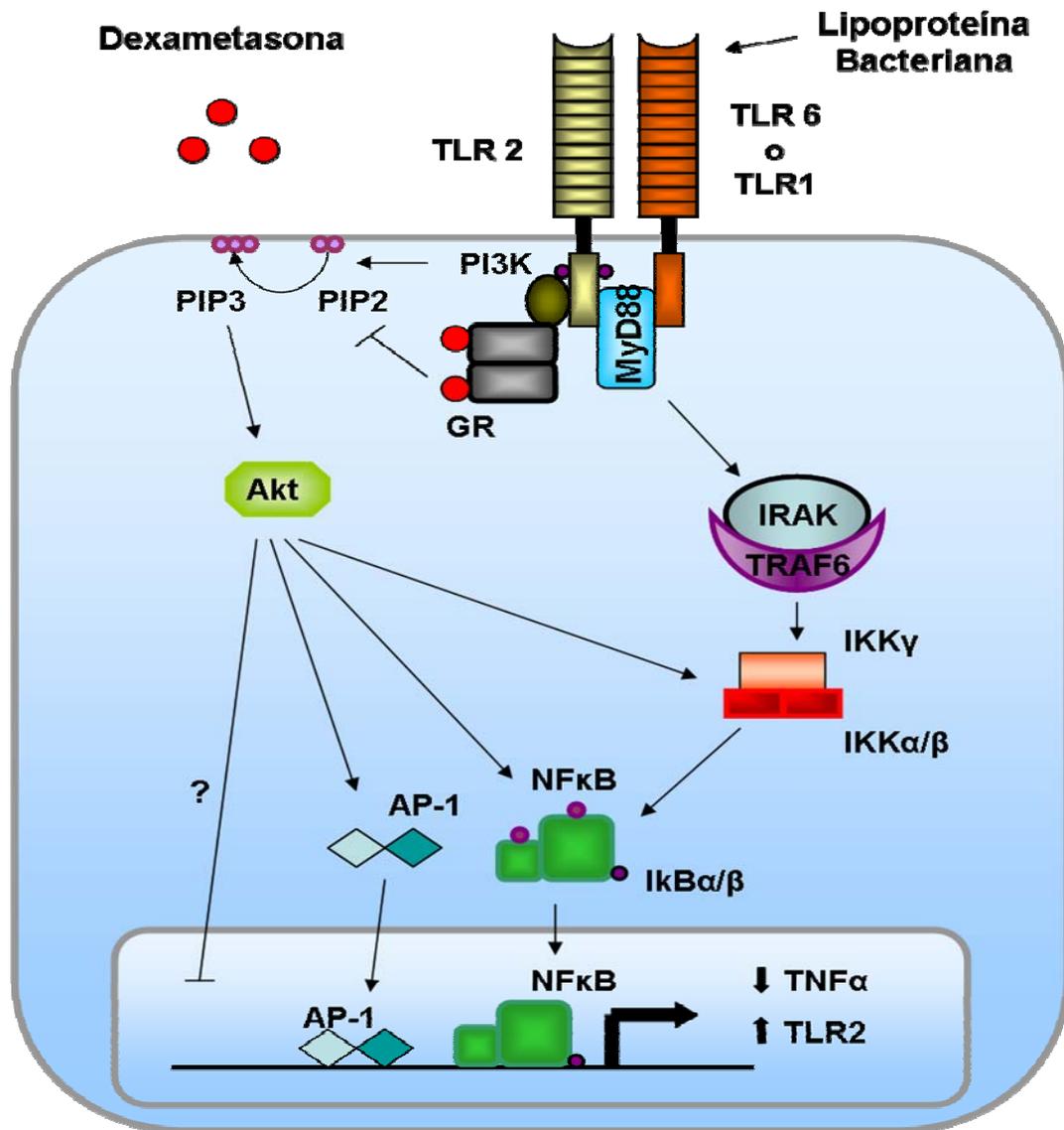


Figura 11. Esquema de la vía alternativa del TLR2 en células A549.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de esta memoria señalan que la estimulación del TLR2 por *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* induce la activación de la vía alternativa de PI3K. Asimismo, Dexametasona aumenta la interacción entre p85 y GR. Río abajo del receptor, *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* promueve la fosforilación de Akt, en cambio Dexametasona la disminuye. Los resultados también demuestran que PI3K actúa regulando negativa y positivamente la expresión de moléculas pro-inflamatorias como TNF α y el TLR2, respectivamente. Además, Dexametasona en conjunto con *Pam₃Cys-Ser-Lys₄* no redujo la expresión de TNF α , ni la activación transcripcional del TLR2, evidenciando un mecanismo regulatorio de los GCs que aún es desconocido.

Por otra parte, se analizaron los principales factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune mediada por el eje PI3K/TLR2, específicamente NF κ B y AP-1. La actividad de luciferasa demostró que ambos factores actúan promoviendo pro-inflamación. Estos resultados no logran explicar la vía de transducción de señales que lleva a PI3K regular negativamente la expresión de TNF α , pero si la que induce la activación transcripcional del promotor del TLR2.

Finalmente, los resultados obtenidos revelan un nuevo mecanismo de acción de los GCs y además demuestran que la PI3K puede actuar regulando diversos procesos inflamatorios en células A549.

6.1 Anexo

Como parte del trabajo realizado durante esta tesis se generaron los siguientes eventos y presentaciones:

- **Publicaciones**

S. Arancibia, C. Beltran, I. Aguirre, P. Silva, A. Peralta, F. Malinarich, M.A. Hermoso. **Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses** (2006). Aceptado en Biological Research

- **Trabajos presentados en congresos Internacionales**

Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) participation in the Toll-like receptor 2 and Glucocorticoid receptor signaling: An intracellular competitor for both pathways. (Presentacion Oral)

S. Arancibia, M. A. Hermoso. Laboratorio de Inmunidad Innata. Programa de Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

VII Latin American Congress of Immunology.

Córdoba, Argentina 2-6 octubre (2005)

TLR regulation by Glucocorticoids: Role of the negative regulator PI3K on TLR2 signaling. S. Arancibia¹, D. Benitez¹, P. Silva¹, I. M. Aguirre¹, C. Maass¹, C. J. Beltrán¹, J. A. Cidlowski² and M. A. Hermoso¹.

¹ Laboratorio de Inmunidad Innata. Programa de Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. ²Laboratory of Signal Transduction, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).

TOLL 2006: Recent Advances in Pattern Recognition.

Salvador, Brasil 4-7 marzo (2006)

- **Trabajos presentados en congresos nacionales**

Relevancia de los glucocorticoides en la regulación de la respuesta Inmune Innata mediada por los Toll-like Receptors (TLRs). Sergio Arancibia¹, Paulina Silva¹, Dixon Benitez¹, Caroll Beltrán^{1,2,3}, Rodrigo Valenzuela¹, Ramón Pérez¹ y Marcela A. Hermoso¹.

Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile¹, Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica², Gastroenterología³ Hospital Clínico Universidad de Chile.

Taller de Jóvenes Científicos INICIATIVA CIENTIFICA MILENIO

Pta. Tralca, 27-29 Septiembre (2006)

Fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) y el receptor de glucocorticoides modulan la respuesta inmune innata mediada por el TLR2. Sergio Arancibia, Paulina Silva, Rodrigo Valenzuela, Galia Ramírez y Marcela A. Hermoso.
Lab. Inmunidad Innata, Programa Inmunología, ICBM,
Fac. Medicina, U. Chile, Santiago, Chile.
Congreso Sociedad de Biología Celular
Pucón, Chile 8-12 octubre (2006)

7. REFERENCIAS

1. Hermoso, M. A., T. Matsuguchi, K. Smoak, and J. A. Cidlowski. 2004. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 24:4743-4756.
2. Kaiserlian, D., N. Cerf-Bensussan, and A. Hosmalin. 2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J Leukoc Biol* 78:311-318.
3. Jones, G. E. 2000. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 68:593-602.
4. Thurman, J. M., and V. M. Holers. 2006. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 176:1305-1310.
5. Hermoso, M. A., and J. A. Cidlowski. 2003. Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids. *IUBMB Life* 55:497-504.
6. Mowen, K. A., and L. H. Glimcher. 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* 202:203-222.
7. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
8. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
9. Gay, N. J., and F. J. Keith. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.
10. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
11. Wagner, H. 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25:381-386.
12. Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167:416-423.

13. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.
14. Takeuchi, O., T. Kawai, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Takeda, and S. Akira. 1999. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231:59-65.
15. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169:10-14.
16. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
17. Kawasaki, K., S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, and M. Nishijima. 2000. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 275:2251-2254.
18. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
19. Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson, and A. Aderem. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4:1247-1253.
20. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
21. Philbin, V. J., M. Iqbal, Y. Boyd, M. J. Goodchild, R. K. Beal, N. Bumstead, J. Young, and A. L. Smith. 2005. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 114:507-521.
22. Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5598-5603.
23. Tabet, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune

- defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3516-3521.
24. Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira, and M. Colonna. 2004. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103:1433-1437.
 25. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198:513-520.
 26. O'Neill, L. A., and C. A. Dinarello. 2000. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 21:206-209.
 27. Janssens, S., and R. Beyaert. 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 27:474-482.
 28. Boldin, M. P., I. L. Mett, E. E. Varfolomeev, I. Chumakov, Y. Shemer-Avni, J. H. Camonis, and D. Wallach. 1995. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270:387-391.
 29. Li, S., A. Strelow, E. J. Fontana, and H. Wesche. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5567-5572.
 30. Takaesu, G., J. Ninomiya-Tsuji, S. Kishida, X. Li, G. R. Stark, and K. Matsumoto. 2001. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21:2475-2484.
 31. Dadgostar, H., and G. Cheng. 1998. An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling. *J Biol Chem* 273:24775-24780.
 32. Bradley, J. R., and J. S. Pober. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20:6482-6491.
 33. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278:49751-49762.
 34. Sarkar, S. N., K. L. Peters, C. P. Elco, S. Sakamoto, S. Pal, and G. C. Sen. 2004. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* 11:1060-1067.

35. Strassheim, D., K. Asehnoune, J. S. Park, J. Y. Kim, Q. He, D. Richter, K. Kuhn, S. Mitra, and E. Abraham. 2004. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *J Immunol* 172:5727-5733.
36. Fruman, D. A., and L. C. Cantley. 2002. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin Immunol* 14:7-18.
37. Koyasu, S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4:313-319.
38. Stephens, L., C. Ellson, and P. Hawkins. 2002. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14:203-213.
39. Vivanco, I., and C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
40. Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535-602.
41. Fruman, D. A., R. E. Meyers, and L. C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67:481-507.
42. Inukai, K., M. Funaki, T. Ogihara, H. Katagiri, A. Kanda, M. Anai, Y. Fukushima, T. Hosaka, M. Suzuki, B. C. Shin, K. Takata, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano. 1997. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272:7873-7882.
43. Rodrigues, G. A., M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong, and J. Schlessinger. 2000. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 20:1448-1459.
44. Okkenhaug, K., and B. Vanhaesebroeck. 2003. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 3:317-330.
45. Stein, R. C., and M. D. Waterfield. 2000. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6:347-357.
46. Toker, A. 2000. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* 57:652-658.
47. Stokoe, D., L. R. Stephens, T. Copeland, P. R. Gaffney, C. B. Reese, G. F. Painter, A. B. Holmes, F. McCormick, and P. T. Hawkins. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277:567-570.

48. Duckworth, B. C., and L. C. Cantley. 1997. Conditional inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strength. *J Biol Chem* 272:27665-27670.
49. Fukao, T., M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, T. Kadowaki, T. Takeuchi, and S. Koyasu. 2002. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol* 3:875-881.
50. Clayton, E., G. Bardi, S. E. Bell, D. Chantry, C. P. Downes, A. Gray, L. A. Humphries, D. Rawlings, H. Reynolds, E. Vigorito, and M. Turner. 2002. A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* 196:753-763.
51. Kane, L. P., and A. Weiss. 2003. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev* 192:7-20.
52. Comer, F. I., and C. A. Parent. 2002. PI 3-kinases and PTEN: how opposites chemoattract. *Cell* 109:541-544.
53. Yokoyama, W. M., and B. F. Plougastel. 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3:304-316.
54. Wang, J. W., J. M. Howson, T. Ghansah, C. Desponts, J. M. Ninos, S. L. May, K. H. Nguyen, N. Toyama-Sorimachi, and W. G. Kerr. 2002. Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science* 295:2094-2097.
55. Long, E. O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17:875-904.
56. Brann, D. W., L. B. Hendry, and V. B. Mahesh. 1995. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:113-133.
57. Rang HP, D. M., Ritter J, Gardner P. 1995. *Pharmacology*. Churchill-Livingstone, New York.
58. Munck, A., P. M. Guyre, and N. J. Holbrook. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5:25-44.
59. Harrison, R. W., K. Balasubramanian, J. Yeakley, M. Fant, F. Svec, and S. Fairfield. 1979. Heterogeneity of AtT-20 cell glucocorticoid binding sites: evidence for a membrane receptor. *Adv Exp Med Biol* 117:423-440.
60. Ballard, P. L., J. D. Baxter, S. J. Higgins, G. G. Rousseau, and G. M. Tomkins. 1974. General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Endocrinology* 94:998-1002.

61. Smith, D. F., and D. O. Toft. 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11.
62. Pratt, W. B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:21455-21458.
63. Kirkham, B. W., M. M. Corkill, S. C. Davison, and G. S. Panayi. 1991. Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: in vitro cell mediated immune assay predicts in vivo responses. *J Rheumatol* 18:821-825.
64. Langhoff, E., J. Ladefoged, B. K. Jakobsen, P. Platz, L. P. Ryder, A. Svejgaard, and J. H. Thaysen. 1986. Recipient lymphocyte sensitivity to methylprednisolone affects cadaver kidney graft survival. *Lancet* 1:1296-1297.
65. Wilckens, T. 1995. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *Trends Pharmacol Sci* 16:193-197.
66. Wilckens, T., and R. De Rijk. 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today* 18:418-424.
67. Webster, J. C., R. M. Huber, R. L. Hanson, P. M. Collier, T. F. Haws, J. K. Mills, T. C. Burn, and E. A. Allegretto. 2002. Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* 143:3866-3874.
68. Arbibe, L., J. P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch, and U. G. Knaus. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 1:533-540.
69. Leis, H., A. Page, A. Ramirez, A. Bravo, C. Segrelles, J. Paramio, D. Baretino, J. L. Jorcano, and P. Perez. 2004. Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Endocrinol* 18:303-311.
70. Andrade, M. V., T. Hiragun, and M. A. Beaven. 2004. Dexamethasone suppresses antigen-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream responses in mast cells. *J Immunol* 172:7254-7262.
71. Cidlowski, J. A., D. L. Bellingham, F. E. Powell-Oliver, D. B. Lubahn, and M. Sar. 1990. Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmic and nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 4:1427-1437.
72. Delerive, P., F. Martin-Nizard, G. Chinetti, F. Trottein, J. C. Fruchart, J. Najib, P. Duriez, and B. Staels. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor

activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402.

73. Lu, N. Z., and J. A. Cidlowski. 2005. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18:331-342.
74. Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and L. C. Cantley. 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91:961-971.
75. Wennstrom, S., and J. Downward. 1999. Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 19:4279-4288.
76. Necela, B. M., and J. A. Cidlowski. 2003. Development of a flow cytometric assay to study glucocorticoid receptor-mediated gene activation in living cells. *Steroids* 68:341-350.
77. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
78. Aliprantis, A. O., D. S. Weiss, and A. Zychlinsky. 2001. Toll-like receptor-2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res* 7:287-291.
79. McKay, L. I., and J. A. Cidlowski. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459.
80. McKay, L. I., and J. A. Cidlowski. 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12:45-56.
81. Fukao, T., and S. Koyasu. 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 24:358-363.
82. Fujioka, S., J. Niu, C. Schmidt, G. M. Sclabas, B. Peng, T. Uwagawa, Z. Li, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, and P. J. Chiao. 2004. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24:7806-7819.
83. Chedid, M., B. K. Yoza, J. W. Brooks, and S. B. Mizel. 1991. Activation of AP-1 by IL-1 and phorbol esters in T cells. Role of protein kinase A and protein phosphatases. *J Immunol* 147:867-873.

84. Monick, M. M., P. K. Robeff, N. S. Butler, D. M. Flaherty, A. B. Carter, M. W. Peterson, and G. W. Hunninghake. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase activity negatively regulates stability of cyclooxygenase 2 mRNA. *J Biol Chem* 277:32992-33000.
85. Diaz-Guerra, M. J., A. Castrillo, P. Martin-Sanz, and L. Bosca. 1999. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J Immunol* 162:6184-6190.
86. Rameh, L. E., and L. C. Cantley. 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350.
87. Staal, S. P. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5034-5037.
88. Bellacosa, A., J. R. Testa, S. P. Staal, and P. N. Tsichlis. 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274-277.
89. Bellacosa, A., T. F. Franke, M. E. Gonzalez-Portal, K. Datta, T. Taguchi, J. Gardner, J. Q. Cheng, J. R. Testa, and P. N. Tsichlis. 1993. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 8:745-754.
90. Altomare, D. A., K. Guo, J. Q. Cheng, G. Sonoda, K. Walsh, and J. R. Testa. 1995. Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* 11:1055-1060.
91. Altomare, D. A., G. E. Lyons, Y. Mitsuuchi, J. Q. Cheng, and J. R. Testa. 1998. Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 16:2407-2411.
92. Brodbeck, D., P. Cron, and B. A. Hemmings. 1999. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 274:9133-9136.
93. Musacchio, A., T. Gibson, P. Rice, J. Thompson, and M. Saraste. 1993. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci* 18:343-348.
94. Datta, K., A. Bellacosa, T. O. Chan, and P. N. Tsichlis. 1996. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 271:30835-30839.
95. Mayer, B. J., R. Ren, K. L. Clark, and D. Baltimore. 1993. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73:629-630.

96. Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
97. Cross, D. A., P. W. Watt, M. Shaw, J. van der Kaay, C. P. Downes, J. C. Holder, and P. Cohen. 1997. Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett* 406:211-215.
98. Chrysis, D., F. Zaman, A. S. Chagin, M. Takigawa, and L. Savendahl. 2005. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway. *Endocrinology* 146:1391-1397.
99. Berney, C., and G. Danuser. 2003. FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J* 84:3992-4010.
100. Musikachoen, T., T. Matsuguchi, T. Kikuchi, and Y. Yoshikai. 2001. NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol* 166:4516-4524.
101. Faure, E., L. Thomas, H. Xu, A. Medvedev, O. Equils, and M. Arditi. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 166:2018-2024.
102. Verrecchia, F., C. Tacheau, E. F. Wagner, and A. Mauviel. 2003. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 278:1585-1593.
103. Wang, N., L. Verna, N. G. Chen, J. Chen, H. Li, B. M. Forman, and M. B. Stemerman. 2002. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277:34176-34181.
104. Zhong, S. P., W. Y. Ma, J. A. Quealy, Y. Zhang, and Z. Dong. 2001. Organ-specific distribution of AP-1 in AP-1 luciferase transgenic mice during the maturation process. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R376-381.
105. Furst, R., S. B. Blumenthal, A. K. Kierner, S. Zahler, and A. M. Vollmar. 2006. NF- κ B-independent anti-inflammatory action of salicylate in human endothelial cells: induction of heme oxygenase-1 by the JNK/AP-1 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*.
106. Kriehuber, E., W. Bauer, A. S. Charbonnier, D. Winter, S. Amatschek, D. Tamandl, N. Schweifer, G. Stingl, and D. Maurer. 2005. Balance between NF-

- kappaB and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 106:175-183.
107. Caramori, G., S. Lim, K. Ito, K. Tomita, T. Oates, E. Jazrawi, K. F. Chung, P. J. Barnes, and I. M. Adcock. 2001. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J* 18:466-473.
 108. Ray, A., and L. Cohn. 1999. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 104:985-993.
 109. Madrid, L. V., M. W. Mayo, J. Y. Reuther, and A. S. Baldwin, Jr. 2001. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 276:18934-18940.
 110. Yang, F., E. Tang, K. Guan, and C. Y. Wang. 2003. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* 170:5630-5635.
 111. Funakoshi-Tago, M., K. Tago, Y. Sonoda, S. Tominaga, and T. Kasahara. 2003. TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *Eur J Biochem* 270:1257-1268.
 112. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., P. Ruco L., Allavena P. and Mantovani A. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J Immunol* 164: 5998-6004.
 113. Arancibia, S., Beltrán, C., Aguirre, I., Silva, P., Peralta, A., Malinarich, F., Hermoso, M.A. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. Aceptado en Biological Research (Noviembre, 2006).