

Tesi Doctoral

Unitat d'Immunologia

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Universitat Pompeu Fabra

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MECANISMOS QUE REGULAN AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT5

Jordi Minguillón Pedreño

Barcelona, noviembre de 2007

Unitat d'Immunologia

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Universitat Pompeu Fabra

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MECANISMOS QUE REGULAN AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT5

Jordi Minguillón Pedreño

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universitat Pompeu Fabra. Este trabajo se ha realizado bajo la supervisión del Dr José Aramburu Beltrán y la Dra Cristina López Rodríguez en la Unidad de Inmunología, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra.

José Aramburu Cristina López-Rodríguez Jordi Minguillón

Barcelona, noviembre de 2007

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MECANISMOS
QUE REGULAN AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
NFAT5
(ACTIVACIÓN Y FUNCIÓN DEL NFAT5 EN
RESPUESTAS MEDIADAS POR LOS RECEPTORES
DE TIPO TOLL)**

Jordi Minguillón Pedreño

Barcelona, noviembre de 2007

Aquesta Tesi está dedicada a la meva mare,
al David, i a qui cap dels tres no podem veure ara,
si no és en somnis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

NOTA SOBRE EL USO DE ABREVIATURAS Y TERMINOLOGÍA EN

INGLÉS-----Página 1

ABREVIATURAS-----Página 2-3

RESUMEN-----Página 4-5

INTRODUCCIÓN-----Página 6-40

1. El NFAT5 y las proteínas Rel-----Página 7
2. Los NF- κ B-----Página 8-13
3. Los NFATc-----Página 14-19
4. El NFAT5-----Página 20-26
5. La inmunidad innata y adaptativa-----Página 27-28
6. Los receptores tipo *Toll* y la inmunidad innata-----Página 27-28
7. Los receptores intracelulares de reconocimiento de patógenos-----Página 29-33
8. Los genes regulados por los TLR-----Página 34-37

OBJETIVOS-----Página 41-42

MATERIALES Y MÉTODOS-----Página 43-54

RESULTADOS-----Página 55-131

- Problemática de la identificación de proteínas asociadas al NFAT5-----Página 56
1. Estrategia de purificación de proteínas asociadas al NFAT5-----Página 57-58
 2. Optimización de las condiciones de copurificación de proteínas asociadas al NFAT5 a pequeña escala-----Página 59-69
 3. Obtención y caracterización de líneas transfectantes estables que expresan el NFAT5-----Página 70-72
 4. Inmunoprecipitación de las líneas estables y métodos de elución-----Página 73-75
 5. Obtención de la columna de afinidad anti-HA-----Página 76
 6. Purificación a gran escala de complejos asociados al NFAT5 y análisis por espectrometría de masas-----Página 77-81
 7. El NFAT5 y la PKN1-----Página 82-85
 8. Los RNA interferentes y el NFAT5-----Página 86
 9. Los RNA de doble cadena y proteínas involucradas-----Página 87
 10. Activación del NFAT5 por la estimulación de los TLR-----Página 88-91
 11. Los TLR inducen la expresión del NFAT5-----Página 92-93

12. Expresión del NFAT5 en células primarias. Macrófagos derivados de médula ósea-----	Página 94-96
13. Papel del NFAT5 en la expresión de los genes regulados por los TLR. Línea RAW 264.7-----	Página 96-99
14. La ausencia del NFAT5 no inhibe la activación del NF- κ B por los TLR---	Página 100-101
15. Papel del NFAT5 en la estimulación por los TLR en células primarias----	Página 102
16. Los esplenocitos-----	Página 103-109
17. Los macrófagos peritoneales.-----	Página 110-111
18. Los macrófagos derivados de médula ósea-----	Página 112-114
19. Análisis de la expresión de genes proinflamatorios en los BMDM por PCR cuantitativa (RT-QPCR)-----	Página 115-117
20. Análisis de la producción de citoquinas por los BMDM-----	Página 118-123
21. Análisis de la expresión de la iNOS en los BMDM-----	Página 124
22. Análisis de otras rutas de señalización activadas por los TLR en los BMDM-----	Página 125-126
23. Inmunoprecipitación de cromatina-----	Página 127-129
24. Reducción de citoquinas en respuesta al choque séptico <i>in vivo</i> -----	Página 130
DISCUSIÓN -----	Página 131-141
CONCLUSIONES -----	Página 142-143
BIBLIOGRAFÍA -----	Página 144-157

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, José Aramburu y Cristina López por la oportunidad de haberme formado como investigador en la Universitat Pompeu Fabra y el poder trabajar en unas condiciones claramente ventajosas respecto a otros laboratorios, que en su momento exploré en Barcelona al finalizar mi licenciatura. Desde que empecé en el laboratorio, en noviembre de 2001, he aprendido muchas cosas y he evolucionado en mi forma de pensar, pero también he visto como mis jefes han evolucionado, y creo favorablemente, debido supongo al ser el primer becario que empezó y acaba la tesis en este grupo. Espero que todos sigamos aprendiendo y evolucionando en el futuro.

En segundo lugar quiero agradecer a mi familia el apoyo que he recibido todos estos años, sin la cual estoy seguro que la experiencia hubiera sido menos gratificante y llevadera. Gracias a mi hermano Enrique, su mujer Carmen y especialmente a sus dos pequeñas joyas, no tan pequeñas ahora, Carla y Erica, espero poder estar con vosotras durante muchos años. Gracias a mi hermano Joan y a su mujer Paqui por los breves aunque intensos y divertidos momentos que pasamos juntos 3-4 veces al año. Si ara us ficaveu amb mi per què era l'únic llicenciat de la família, que sapigueu que ara seré l'únic doctor... Gracias a mi madre y a David, mi verdadera familia e inspiración de lo que ahora soy y hago, con la que he estado desde que tengo memoria y con la cual seguiré estando, espero, durante muchos años.

De mis amigos quiero recordar a Roberto y a Blanco, que me han acompañado desde la licenciatura hasta estos días, y aunque cada vez menos, espero seguirlos viendo, pero veo ya difícil encontrarnos en Benicásim...

Gràcies al Toni i la Paula, al Joda, al Víctor, Jordis i a l'Albert, grup amb el que he viscut molts bons moments. Toni hem d'anar a córrer algun dia!

Gràcies al Jordi i la Noe pels bons moments viscuts durant i després de la carrera. Us desitjo el millor amb la nena que portareu al món!

Gràcies al Carles, Pablo, Nacho, Sergio, respectives parelles (Maribel i Özlem) y la resta del grup (Juanra, Pi, Marieta i Patricia). És llargament improbable i rústic que no m'ho hagi passat millor que amb vosaltres. Tot i que se us va una mica l'olla, mai no deixeu la part adolescentil i rústica que porteu a dins.

Gracias por los buenos momentos a Maria de Miguel, Pilar, pilarín, la chatina (y Víctor) i a l'Helena, en Joan i les seves bestioletes.

Gràcies al Joan Sayós i la Marga, hi ha pocs jefes com vosaltres! Després de dues victòries consecutives, no se si voldràs seguir jugant a l'Squash amb mi. Prometo baixar el nivell...

Dame una D! Dame una A! Dame una M! Dame una I! Que tenemos? DAMI! Tiaaaaaa, estás en Washington, te echamos de menos, es una pena que no haya podido acabar antes para que estés con nosotros cuando lea... Gracias por todo, por tu alegría, por tu locura, por tus cantos, por tu amistad, por tus momentos pesados cuando tenía seminario, por estar pintada, es más, repintada, por la seva ceba y la meva ameba. Un beso muy grande!

Gracias a Hugo, Andrés, Citla, Yaniré y Pere, Maria Isabel y Fabien, Vero y Vicky, Maite, Mireia i Pau, Yaqui y Sebastian, Ivan, que suerte haber conocido a tan buena gente urugasha, mejicana, argentina, chilena, alemana, india, madrileña, catalana y viguetana. Me siento afortunado! Por cierto, alguien sabe algo de Rai? Si algún día lees esto, gracias por los momentos que viviste con nosotros!

Lupe!! Ja quasi estic! Ufff, tia, m'ha costat molt, gràcies pels bons moments que hem viscut junts, per l'optimisme que sempre transmets, no canviïs mai! Espero que tot vagi molt bé a la tornada a Barna i et desitjo el millor amb el Rafa.

Grupo **IMIM/Micro/Inmuno/Rabenessen Lab**. Gràcies/gracias a la Txell (& Loris), la Vane, Luisa, Fabien y demás amiguitos con los que he vivido momentos muy divertidos. Sin vosotros la tesis hubiera sido muuuuy aburrida. A las que os vais a un mundo mejor (sig!), os echaremos de menos... Vane ens haurem de prendre un penúltim xupito abans que marxis! Luisa, estoy triste por que te vas, gracias por haber sido mi amiga, te deseo mucha suerte! Txell jo t'estimo molt, sort amb els yanquis! Gràcies també a la Judit Jané (ningú com tu sap pronunciar cafeteria i Matrix!).

Gràcies a la gent de micro, al Damià, Antonio i Charo, a l'Encarna, la Isabel, Leo, Eva y Ana. Que suerte haberos conocido a todos y que pena que algunos ya no estéis. Antonio, gracias por ser como eres, fuiste alguien especial en nuestro labo.

Gracias a los integrantes de nuestro grupo, Vero, Anaïs, las recientes Giulia y Maria, por vuestra compañía, ayuda y comentarios. Gracias también para Angelika, tú inspiraste el Rabenessen lab!

Gracias especiales a las veteranas del grupo (después de mi, claro...), Bea y Kathy. Habéis sido una parte importante para mí en estos seis años. Bea, gracias por tu compañía, por las fiestas, los congresos, tus opiniones (casi siempre en contra, pero se agradecen!), tu tolerancia al alcohol (me hundiste en París...), por compartir tus proyectos de futuro (espero que ya no sean la granja de cerdos... mejor la de ovejas!).

Espero seguir viéndote muchos años! Aló Kathy! Quiero darte las gracias por la simpatía, elegancia y sensatez que has aportado al laboratorio, aunque no haya aprendido mucho del hablado alternativo... Si todo va bien el 2008 será nuestro año, futuras doctoras Morancho y Drews!!!!

Gràcies també a la Rosa i la Mari, les bessones, heu omplert el laboratori d'aire fresc, el vostre companerisme, alegria (no sempre Mari!) i energia han animat el meu últim any de tesi. No canviem mai. Shawarma team forever! Petonets.

Ague, gracias por haberte conocido. Gracias por estar conmigo. Gracias por darme tantos buenos momentos y hacerme compañía en los malos, por escuchar todo lo que pasa por mi cabeza (ojalá fuera poco), a veces hasta altas horas de la noche, y encima interesarte! Gracias por reírte con las migas, por ayudarme cuando necesito ayuda, por dejarme ayudarte cuando tú la necesitas, por las berenjenas rellenas, por los papelitos, por el Shiatsu, por el buen camino, por Australia. Gracias por muchas cosas! Un beso.

Barcelona, noviembre de 2007

NOTA SOBRE EL USO DE ABREVIATURAS Y TERMINOLOGÍA **EN INGLÉS**

Para la redacción de esta tesis doctoral se han utilizado abreviaturas y acrónimos que provienen de la lengua inglesa, tales como DNA, RNA ó PCR. Asimismo se ha utilizado la palabra inglesa *knockout* en sustitución de la de “organismo en el que se ha eliminado un gen o porción del mismo mediante técnicas de genética molecular”, y *wild type* se refiere al mismo organismo no modificado. *Cross-linker / crosslinking*, agente entrecruzante / entrecruzamiento.

ABREVIATURAS

AED: dominio de exporte auxiliar.

BMDM: macrófagos derivados de médula ósea.

CHAPS: detergente (*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*)

ChIP: inmunoprecipitación de cromatina.

CpG: CpG DNA no metilado.

DBD: dominio de unión al DNA.

DBD5: dominio de unión al DNA del NFAT5.

DMP: dimetil-pimelimidato.

DNA: ácido desoxiribonucleico.

cDNA: DNA complementario.

DSP: Ditiobis-succinimidilpropionato.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético.

ELISA: ensayo de captura inmunológica ligado a enzima.

GDA: glutaraldehído.

GFP: proteína fluorescente verde.

HA: hemaglutinina.

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana.

IDD5: dominio de dimerización inhibitorio del NFAT5.

IP: inmunoprecipitación.

LC-MS-MS: espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida.

LDH: lactato deshidrogenasa.

Lox: Loxoribine.

LPS: lipopolisacárido.

MALDI-TOF: espectrómetro de masas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*.

NES: señal de exporte nuclear.

NFAT: *nuclear factor of activated T cells*.

NF- κ B: *nuclear factor kappa B*.

NHD: dominio de homología del NFAT.

NLR: receptores tipo NOD.

NLS: señal de localización nuclear.

NP-40: detergente Nonidet P-40.

PAMP: patrones moleculares asociados patógenos.

PBS: tampón fosfato salino.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
pIC: ácido poli-inosínico poli-citidílico.
PKN1: proteína quinasa N 1.
PKN1-KD: mutante inactivo de la PKN1.
PMF: Peptide Mass Fingerprint.
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PyrK: piruvato quinasa.
RHD: dominio de homología Rel.
RLR: receptores tipo RIG.
dsRNA: RNA de doble cadena.
ssRNA: RNA de cadena sencilla
mRNA: RNA mensajero.
shRNA: RNA de interferencia.
RT-QPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.
SD: desviación estándar.
SDS: dodecilo sulfato sódico.
SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida desnaturizante.
SEM: media del error estándar.
TcR: receptor de células T.
TX-100: tritón X-100.
TK-RENILLA: gen reportero bajo el promotor de la timidina quinasa.
TLR: receptor tipo *Toll*.
Zym: Zymosan A.

Terminología en inglés

Cross-linker: agente entrecruzante.

Cross-linking: entrecruzamiento.

Wild type: organismo no modificado genéticamente.

Knockout: organismo en el que se ha eliminado un gen o porción del mismo mediante técnicas de genética molecular.

RESUMEN

El NFAT5 es un factor de transcripción de la familia Rel la cual incluye a los NFATc y los NF- κ B. El NFAT5 presenta homología con los demás miembros de la familia en el dominio de unión al DNA o dominio Rel. Aunque su homología es mayor con los NFATc, el NFAT5 difiere de éstos en que no es capaz de unir los factores de transcripción Jun y Fos (AP1) ni presenta motivos de unión a la calcineurina. En cambio, une el DNA en forma dimérica y la estructura de su dominio de unión al DNA es similar a la de los NF- κ B.

El mRNA del NFAT5 se detecta en numerosos tejidos y su proteína está presente en el timo, cerebro, y linfocitos activados en ratones adultos y en la mayoría de los tejidos embrionarios. La localización subcelular de este factor varía en determinados tipos celulares, desde predominantemente citoplásmica a nuclear.

El NFAT5 es activado en respuesta a hipertonicidad, por la activación del receptor de linfocitos T y por ligandos de la integrina $\alpha_6\beta_4$. El NFAT5 regula genes osmoprotectores (SMIT, BGT1, AR y HSP70, entre otros) y citoquinas (TNF α y linfotóxina β) en respuesta a hipertonicidad. Por otro lado, el NFAT5 participa en procesos no relacionados con la respuesta a hipertonicidad, tales como la migración de células de carcinoma, la migración y diferenciación de células de músculo esquelético y la replicación del virus HIV.

Los objetivos iniciales de esta tesis fueron: 1) Identificar y caracterizar funcionalmente proteínas asociadas al NFAT5 y 2) Identificar y caracterizar otros tipos de estímulos activadores de este factor.

La búsqueda de proteínas asociadas al NFAT5 no dio los resultados esperados y sólo identificamos la HSP70. Sin embargo, la búsqueda de estímulos reguladores del NFAT5 llevó al hallazgo de que este factor de transcripción es activado por y regula la función de los receptores tipo *Toll* (TLR), una familia de receptores que responden a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), esenciales para la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

La vía de los TLR es capaz de activar al NFAT5 e inducir su expresión de forma dependiente de dosis en macrófagos murinos. Nuestros experimentos muestran que el NFAT5 es importante para la expresión de diversos genes inducidos por los TLR, como la iNOS, el TNF α , la IL6, la IL12 β , la COX2 y el RANTES. En este sentido, la producción de la iNOS y la IL6 fue deficiente en macrófagos NFAT5^{-/-} en respuesta tanto a concentraciones bajas como altas de ligandos de los TLR, mientras que la

producción del TNF α y la IL12 β en células deficientes para el NFAT5 fue inferior a la de macrófagos NFAT5^{+/+} sólo en respuesta a concentraciones bajas de ligandos de los TLR, pero relativamente normal en respuesta a altas dosis de estímulo.

Hemos caracterizado en detalle la regulación de uno de los genes más sensibles a la ausencia del NFAT5, la iNOS, y determinado que el NFAT5 regula la actividad de su promotor. Además, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina muestran que el NFAT5 es capaz de unirse directamente al promotor de la iNOS *in vivo* en macrófagos estimulados con ligandos de los TLR.

Finalmente, experimentos actualmente en curso muestran que los ratones deficientes para el NFAT5 presentan una producción exacerbada del TNF α durante el choque séptico inducido por altas dosis de LPS *in vivo*. Este resultado contrasta con la deficiencia en la inducción del TNF α observada *in vitro* en macrófagos NFAT5^{-/-} y estamos estudiando posibles causas que expliquen esta diferencia.

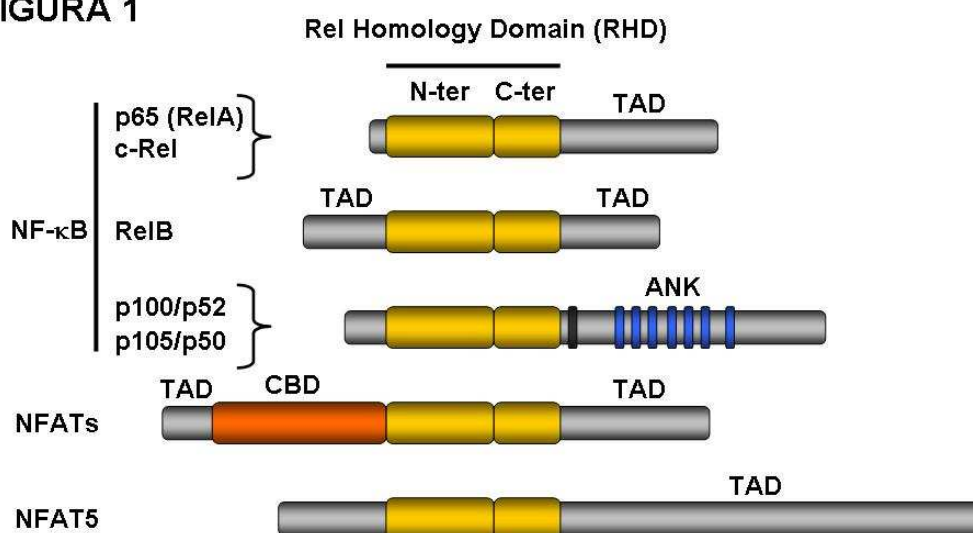
En este trabajo de tesis doctoral hemos identificado y caracterizado una nueva función del NFAT5, la regulación de genes activados por la vía de los TLR, importantes para la respuesta inmunitaria innata y adaptativa a una amplia variedad de patógenos. Nuestros resultados muestran que el NFAT5 es un regulador importante en la ruta de los TLR, jugando un papel en la actividad de varios miembros de esta familia de receptores, tal y como lo hacen los factores de transcripción NF- κ B e IRF5.

INTRODUCCIÓN

1. El NFAT5 y las proteínas Rel

El NFAT5 (*nuclear factor of activated T cells 5*), también denominado TonEBP (*tonicity enhancer binding protein*), NFATL1 (*NFAT-like 1*) y OREBP (*osmotic response element binding protein*) (1-4), es una proteína que pertenece a la familia Rel de factores de transcripción, la cual incluye a los NFATc y los NF- κ B. Fue descrito originalmente por ser el factor de transcripción que regulaba varios genes osmoprotectores en respuesta a hipertonicidad (1), y por su homología con los NFATc en el dominio de unión a DNA o dominio Rel (2). El NFAT5 es la última proteína descrita de la familia Rel y la de mayor tamaño, con más de 1400 aminoácidos (**figura 1**).

FIGURA 1



Modificada de Aramburu, J. et al (Biochem Pharmacol 2006)

Figura 1. Esquema de la familia de proteínas Rel, mostrando los NF- κ B, los NFATc y el NFAT5. TAD, dominio de transactivación. CBD, dominio de unión a calcineurina. ANK, repeticiones de anquirina. N-ter, amino-terminal. C-ter, carboxilo-terminal. En p100 y p105 aparece en negro la región de proteólisis necesaria para su activación.

2. Los NF- κ B

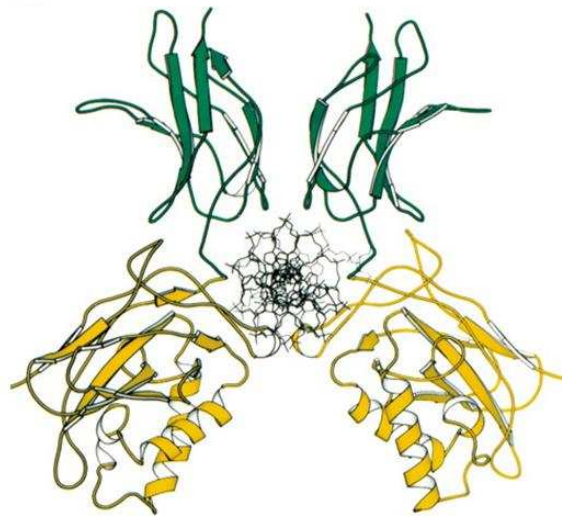
Estructura

La familia de los NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) presenta cinco miembros en vertebrados: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52) (**figura 1**). NF- κ B1 y NF- κ B2 se sintetizan como precursores, p105 y p100, que se procesan post-traduccionalmente para dar lugar a las subunidades p50 y p52 respectivamente, capaces de unirse al DNA. NF- κ B es regulado por un gran número de estímulos y participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos mediante el control de la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión o receptores inmunológicos. De entre ellos destacan la inmunidad, la inflamación y el desarrollo de diversos tejidos.

Los NF- κ B presentan en su estructura un dominio de unión a DNA o dominio Rel localizado en el extremo amino-terminal, excepto en RelB, que está en una posición más central (ver **figura 1**). RelA, RelB y c-Rel tienen en su extremo carboxilo-terminal un dominio de transactivación, mientras que p105 y p100 tienen varias repeticiones de anquirina. Asimismo, RelB presenta un dominio de transactivación adicional en el extremo amino-terminal.

Todos los miembros de NF- κ B se asocian formando homo o heterodímeros, excepto en el caso de RelB, el cual sólo puede formar heterodímeros (5). Esta diversidad en la combinación contribuye a la variedad de regulación de distintos conjuntos de genes. Esto es debido a que cada pareja de NF- κ B, sea homo o heterodimérica, presenta propiedades diferentes de unión al DNA y de interacción con otras proteínas presentes en la región promotora de los genes (6). Los homodímeros de p50 y p52 por ejemplo, actúan como represores, mientras que los dímeros que contienen RelA o c-Rel son activadores (7). La resolución de la estructura tridimensional del dominio de unión a DNA definió la base molecular que controla la dimerización y el contacto con el DNA por parte de las proteínas NF- κ B (**figura 2**) (8, 9).

FIGURA 2



5' - TGGGAATTCCC - 3'
3' - CCCTTAAGGGT - 5'

p50/κB

Hogan, P. et al (Genes Dev 2003)

Figura 2. Estructura cristalina del dominio de unión a DNA del dímero p50 unido a un elemento de unión κB.

Expresión de las proteínas NF-κB en células y tejidos.

Los miembros de NF-κB presentan diferencias de expresión en tejidos (10):

NF-κB1 (p105/p50): presenta una expresión ubicua y juega una función importante en la inmunidad innata y adaptativa.

NF-κB2 (p100/p52): su expresión es más elevada en tejidos hematopoyéticos, donde participa en el desarrollo de órganos linfoides secundarios y en la correcta función y maduración de linfocitos T y B.

c-Rel: sus mayores niveles de expresión se encuentran en linfocitos y células mielomonocíticas.

RelA (p65): su expresión es ubicua y se activa rápidamente en muchos tipos celulares en respuesta a mediadores inmunológicos e inflamatorios.

RelB: presenta niveles elevados de expresión en timo, ganglios linfáticos y placas de Peyer. De este modo, su función está restringida a la formación de órganos

linfoides secundarios y en la regulación de ciertos tipos celulares (como linfocitos T y B) con una función en la respuesta inmunitaria.

Regulación y función

La actividad de los NF- κ B está finamente regulada por la interacción con las proteínas inhibidoras llamadas I κ B (α , β , γ , ϵ y Bcl-3, principalmente) (5), excepto para los miembros p105 y p100. Cada uno de los I κ B presenta diferentes afinidades por los diversos miembros de NF- κ B, aumentando así la complejidad en su regulación. I κ B interacciona con el dominio Rel del NF- κ B por varios sitios, ocultando su señal de localización nuclear e interfiriendo con la secuencia involucrada en la unión al DNA. De esta forma, en estado de reposo el NF- κ B se encuentra como un complejo inactivo unido al I κ B y localizado en el citoplasma.

Hay dos rutas principales que llevan a la activación de NF- κ B, las llamadas vía canónica o clásica y la no canónica o alternativa (**figura 3**).

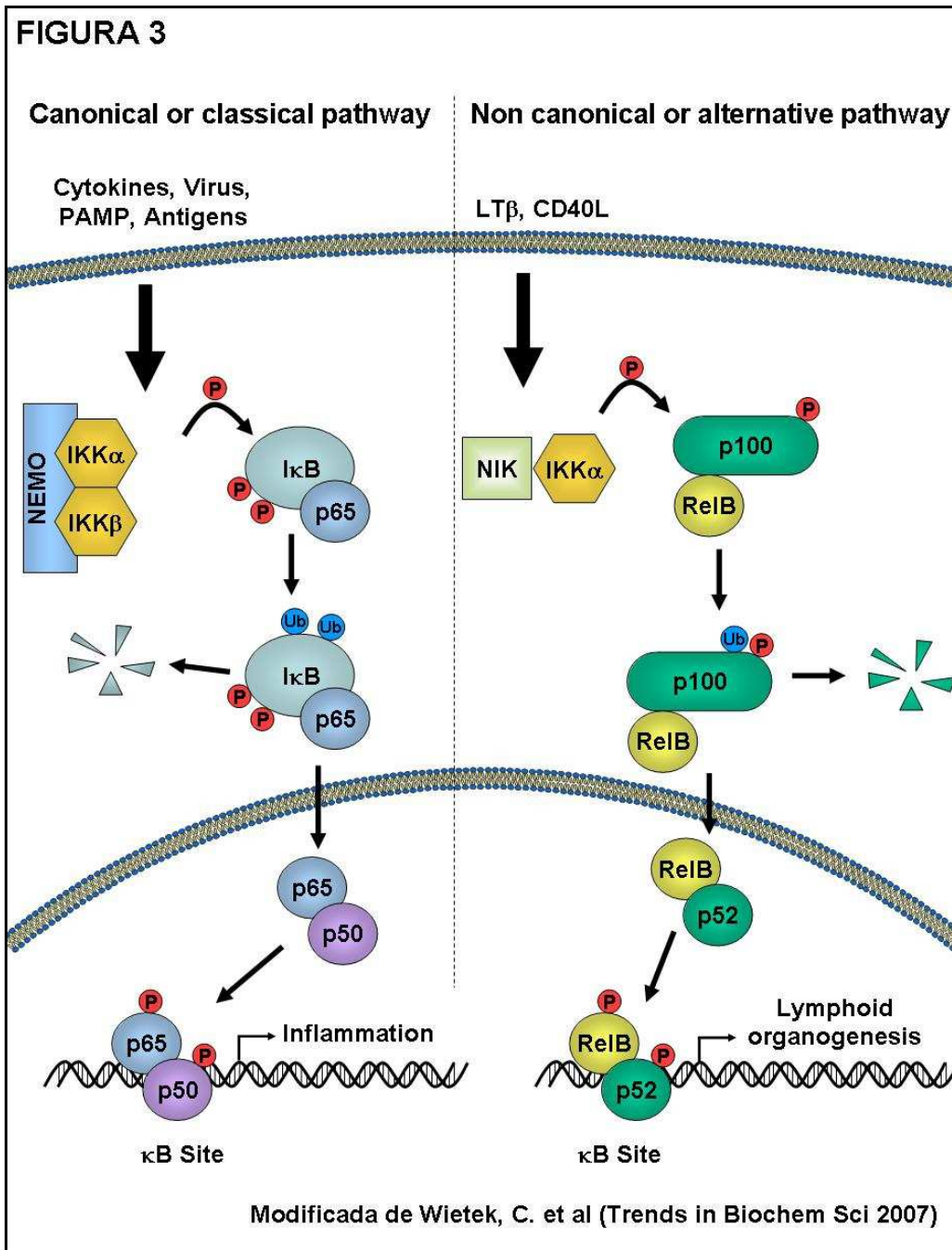


Figura 3. Esquema de la ruta de señalización clásica o alternativa de los NF- κ B. PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos.

La vía clásica es activada por todos los agentes fisiológicos inductores del NF- κ B, incluyendo citoquinas inflamatorias, moléculas asociadas a patógenos (también llamadas PAMP, por “pathogen associated molecular patterns”) y receptores de antígenos. En esta vía los I κ B son fosforilados por el complejo IKK α/β , que incluye a la proteína adaptadora NEMO (*NF- κ B essential modifier*, o IKK γ), induciéndose su poliubiquitinación y su posterior degradación por la vía del proteasoma (11). El NF- κ B quedará así libre y translocará al núcleo por interacción con importinas mediante su secuencia de localización nuclear (12). El equilibrio inicial se restablece rápidamente, debido a que uno de los genes que los NF- κ B regula son los propios I κ B (11, 13), que al ser sintetizados de nuevo, entrarán en el núcleo y secuestrarán los NF- κ B, llevándolos de nuevo al citoplasma mediante exportinas como Crm1 (14). En la vía clásica el NF- κ B es principalmente un heterodímero que contiene RelA y p50 (15).

La vía alternativa está activada por un número más limitado de estímulos, como diversas citoquinas de la familia del TNF (linfotóxina- β y CD40L, entre otros) (16) y en ella, la proteína p100 se degrada a p52 por el complejo formado por un homodímero del IKK α y la proteína NIK (*NF- κ B inducing kinase*). Los heterodímeros de p52, que suelen contener RelB, serán los encargados de translocar al núcleo y activar un patrón específico de genes (7).

La vía clásica está asociada a un incremento en la transcripción de citoquinas (IL6, IL12 β , IL-1 β , TNF α), quimiocinas (IL8, RANTES), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina), enzimas productores de mediadores inflamatorios (iNOS, COX2) e inhibidores de apoptosis (7, 17). Éstos son componentes importantes de la respuesta inmunitaria innata a la invasión por microorganismos y se requieren para la migración de las células inflamatorias y fagocíticas a los tejidos donde NF- κ B se ha activado por una infección o una herida. Al llegar a su destino, estas células matan, ingieren y degradan bacterias, virus y parásitos, y presentan antígenos de los patógenos en el proceso de migración hacia órganos linfoides secundarios (7).

La vía alternativa de activación de NF- κ B está relacionada con la maduración y supervivencia de los linfocitos B, participando así en la inmunidad adaptativa (18, 19), la osteoclastogénesis (20), el desarrollo de órganos linfoides (7) y la regulación del ciclo celular (21).

Se ha visto que las dos vías pueden ser solapantes, produciendo activaciones de genes más prolongadas. La vía clásica presenta una respuesta rápida a estímulos, mientras que la alternativa presenta una activación más retardada. De esta forma, estímulos como la linfotóxina- β , que puede activar las dos rutas, inducen de forma

sostenida genes que dependen del heterodímero RelB/p52, al presentar éste una cinética de activación más lenta (22).

Existen otros niveles adicionales en la regulación de NF- κ B:

1) Fosforilación. Las subunidades p105 y p100 necesitan ser fosforiladas por las quinasas IKK α y NIK para poder procesarse a p50 y p52, respectivamente (23, 24). p65, RelB y c-Rel también necesitan ser fosforiladas para ejercer su función transactivadora. Varias quinasas son capaces de fosforilar residuos específicos de las subunidades de NF- κ B cuando la vía clásica es activada, como PKA, MSK1, PKC ξ e incluso las propias IKK (25-28).

2) Para que NF- κ B ejerza su función se necesita el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como CBP (CREB-binding protein) y p300. La activación del dímero sólo no es suficiente para inducir la expresión génica (29).

3) NF- κ B puede actuar en conjunción con otros factores de transcripción. Se ha descrito que coopera con IRF3-7 y ATF-2/c-Jun en en la transcripción del interferón- β , formando un complejo llamado “enhanceosoma” (30). Un efecto similar ha sido observado con los STAT (31, 32). Además NF- κ B puede interactuar directamente con CREB (33), SP1 (34) y con E2F1, recientemente descrito (35).

4) Existen otras muchas modificaciones en los NF- κ B, IKK e I κ B, como acetilación, oxidación, monoubiquitinación o sumoilación, entre otras, que también afectan a la regulación de la vía (36).

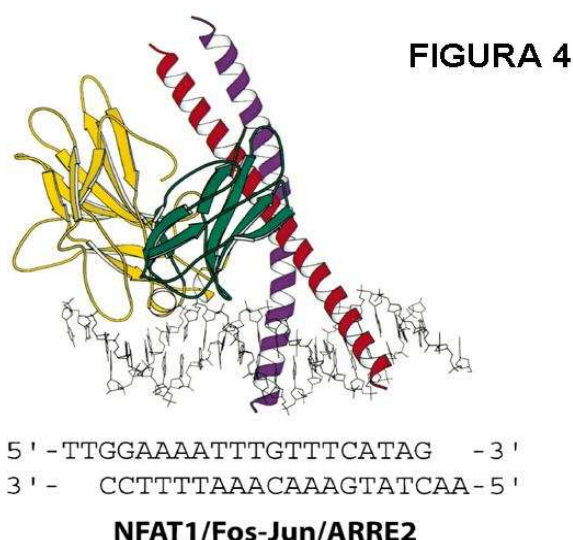
3. Los NFATc

Estructura

La familia de proteínas NFAT consta de cinco miembros, cuatro NFAT dependientes de calcineurina o NFATc y el NFAT5 (37). Los NFATc son: NFAT1 (NFATp o NFATc2), NFAT2 (NFATc o NFATc1), NFAT3 (NFATc4) y NFAT4 (NFATx o NFATc3). Varios de los NFATc presentan variantes generadas por procesamiento alternativo del mRNA, produciendo diversas isoformas, lo que aumenta la variabilidad de cada miembro de esta familia (8, 38).

Los NFATc tienen dos dominios bien conservados: el dominio regulador, conocido como dominio de homología NFAT (NHD), situado en el extremo amino-terminal, y el dominio de unión a DNA, conocido como dominio de homología Rel (RHD). El extremo amino-terminal y parte del carboxilo-terminal de la proteína presentan regiones de transactivación (**figura 1**).

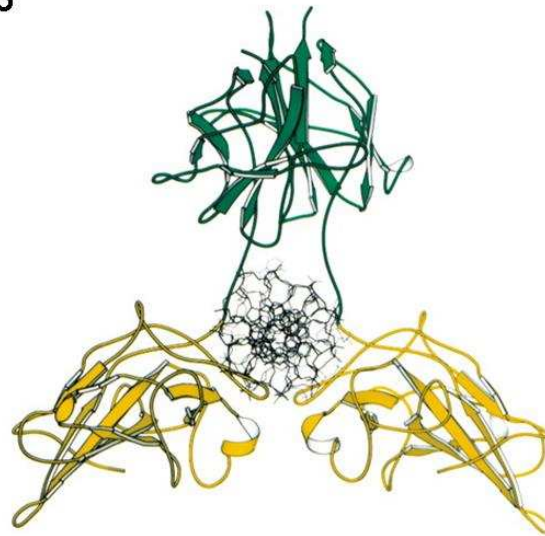
El análisis de los NFATc unidos al DNA indica la base molecular de la interacción con otros factores de transcripción tales como AP1 (Fos/Jun, **figura 4**) y las recientemente descritas proteínas FOXP (9, 39-41). De hecho, la habilidad de seleccionar como proteína asociada AP1 o FOXP3 resulta esencial para llevar a cabo un programa génico específico de células T efectoras o reguladoras, respectivamente (42, 43). Sin embargo, recientemente se ha descrito que en secuencias de DNA parecidas a elementos de unión a NF- κ B, los NFATc son capaces de unirse formando dímeros, adoptando una estructura tridimensional parecida a los NF- κ B (**figura 5**) (39, 44).



Hogan, P. et al (Genes Dev 2003)

Figura 4. Estructura cristalina del dominio de unión a DNA de NFAT1 unido junto a un dímero de Fos-Jun a la secuencia murina de DNA ARRE2 (promotor de la interleuquina 2).

FIGURA 5



5' - AATGGGGACTTTCCA - 3'
3' - ACCCCTGAAAGGTTT - 5'

NFAT1/HIV-LTR κB

Hogan, P. et al (Genes Dev 2003)

Figura 5. Estructura cristalina recientemente descrita del dominio de unión a DNA de NFAT1 homodimerizando sobre una secuencia κB del promotor LTR del HIV.

Expresión de los NFATc en células y tejidos.

Los diversos miembros de los NFATc pueden tener funciones redundantes en varios aspectos (38, 45). Presentan una amplia expresión en diversos tejidos, destacando órganos linfoides (excepto NFAT3), por la función que desarrollan:

NFAT1: se expresa en varios órganos linfoides, corazón, músculo y cerebro. Ratones deficientes presentan un desarrollo anormal del bazo y una mayor respuesta de los linfocitos T (sobre todo Th2) y B, con un aumento de la expresión de IL4 por estimulación del TcR (38). IL4 es importante para la activación de linfocitos B y para la diferenciación de células T a células cooperadoras de tipo 2 (Th2) (46).

NFAT2: se expresa en linfocitos T, bazo, timo, músculo y otros tejidos. Ratones deficientes para NFAT2 presentan una menor respuesta de los linfocitos T, una disminución del timo y órganos linfoides y una menor producción de IL4 y respuestas dependientes de linfocitos Th2 (38).

NFAT3: se expresa en pulmón y riñón principalmente. No se expresa en linfocitos. Es el único miembro de la familia que no regula la diferenciación o función de los linfocitos T y B. Ratones deficientes para NFAT3 y 4 presentan anomalías en el desarrollo cardíaco y vascular (47, 48).

NFAT4: se expresa en una amplia variedad de tejidos dependiendo de las isoformas. Los ratones deficientes presentan un menor desarrollo de células tímicas, precursoras de los linfocitos T y un ligero aumento en la respuesta de linfocitos T periféricos (38).

Regulación y función

El dominio regulador de los NFATc (NHD) presenta dos sitios de unión a la fosfatasa calcineurina, y es fosforilado por quinasas en varios residuos. En condiciones basales de inactividad, los NFATc están fosforilados en numerosas serinas y localizados en el citoplasma (**figura 6**) (8). Su activación se produce por receptores de superficie acoplados a la enzima fosfolipasa C (PLC), que da lugar a dos mediadores intracelulares, el inositol trifosfato o IP3, señal que producirá un aumento en la concentración de calcio intracelular, y el diacilglicerol o DAG (8).

El aumento de la concentración de calcio intracelular activa a la proteína calmodulina, que a su vez activa a la fosfatasa calcineurina (cuya actividad se inhibe por los inmunosupresores ciclosporina A y FK506). Los NFATc unidos a calcineurina serán defosforilados en su región reguladora, produciéndose un cambio estructural que expone su señal de localización nuclear (NLS) e induce su translocación al núcleo mediante una vía dependiente de importinas (**figura 6**) (49). Los NFATc defosforilados presentan también un aumento de la afinidad por su secuencia consenso de unión al DNA y un aumento de actividad transcripcional. La vía vuelve a su estado inicial cuando cesa el estímulo y los NFATc son refosforilados de nuevo. Finalizará entonces la expresión génica, se ocultará su señal de localización nuclear, se expondrá su secuencia de exporte (NES) y por un sistema de transporte dependiente de exportinas (Crm1) se relocalizarán en el citoplasma (**figura 6**) (50).

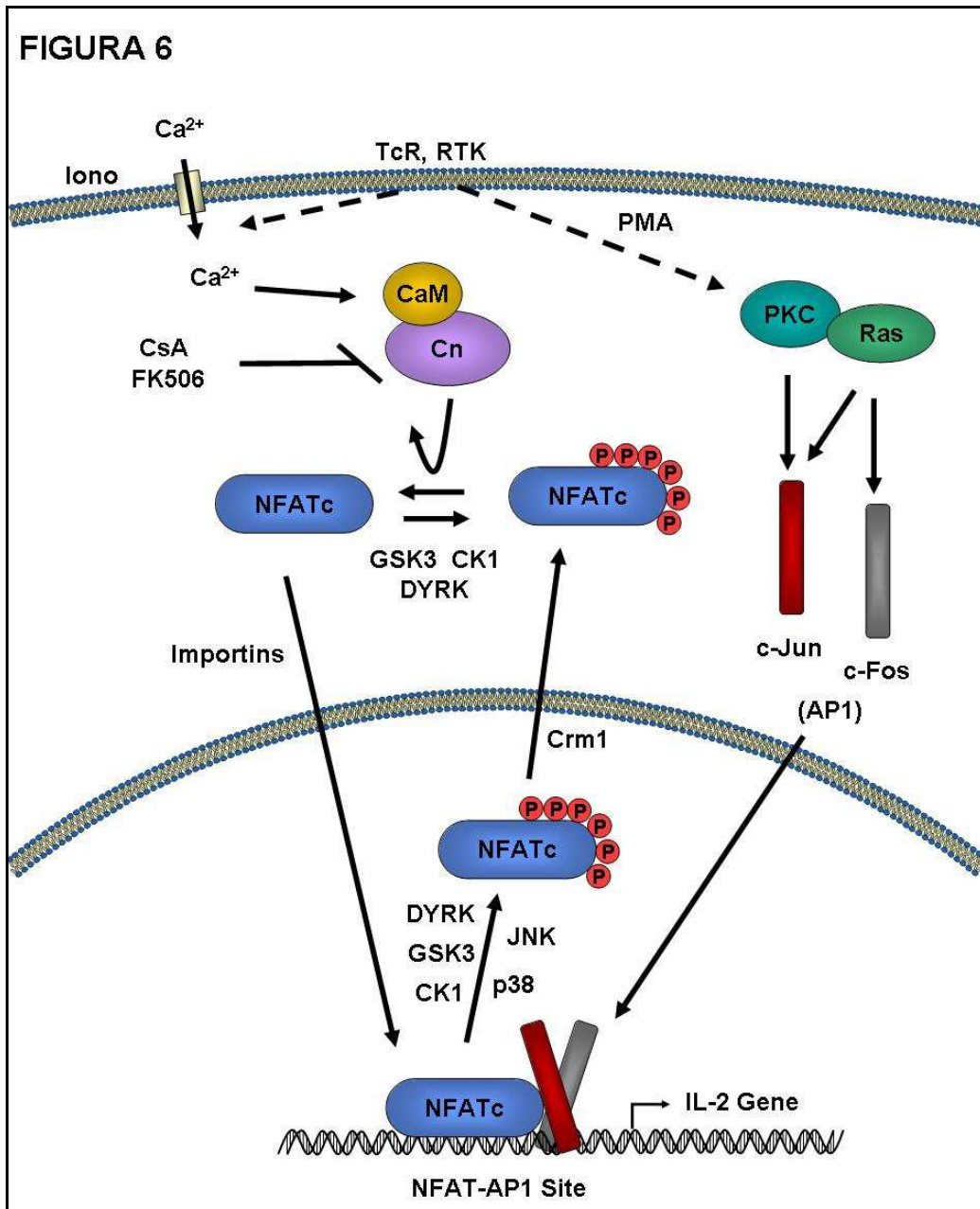


Figura 6. Esquema de la ruta de señalización de los NFATc. Iono, ionomicina. TcR, receptor de células T. RTK, receptores acoplados a tirosin-quinasas. CsA, ciclosporina A. FK506, tacrolimus.

Los NFATc, al igual que los NF- κ B, presentan múltiples niveles de regulación en su cascada de activación, que, junto con la diversidad de miembros e isoformas hace que el mecanismo de expresión de sus genes diana se haga más complejo:

1) Calcineurina. La calcineurina consta de dos subunidades, la A o catalítica, que se une a los NFATc y los defosforila, y la B o reguladora, que se une a la calmodulina unida al calcio. De la subunidad A las isoformas más importantes (la α y la β) tienen una homología superior al 80%. El hecho de expresarse en diferentes tejidos (la α es predominante en el cerebro y riñón, mientras que la β lo es en el sistema inmunitario, músculo y corazón) (51), junto a que los diversos NFATc tienen una expresión diferencial, hace aumentar la complejidad en la regulación de estos factores de transcripción.

Se ha descrito además que la calcineurina se puede localizar también en el núcleo, manteniendo así un estado más prolongado de defosforilación de los NFATc y una expresión génica dependiente de los NFATc de mayor duración (52, 53).

2) Quinasas. La fosfatasa calcineurina defosforila los NFATc en aproximadamente 13 residuos de serina localizados en la región reguladora, en la región amino-terminal (49). Diversas quinasas son las encargadas de fosforilar esas serinas, tanto en estado de reposo como cuando cesa el estímulo activador: la GSK3, CK1, p38, JNK y la recientemente descrita familia DYRK. GSK3 y CK1 son quinasas constitutivas que mantienen el estado de fosforilación basal de los NFATc, y también se encargan de promover su exporte al citoplasma cuando se encuentran defosforilados en el núcleo (54, 55). p38 y JNK en cambio, son quinasas inducibles que promueven el exporte nuclear de los NFATc (**figura 4**). p38 fosforila a NFAT1 y NFAT3, y JNK fosforila a NFAT2 y NFAT4 (56-58). Sobre la familia DYRK se ha descrito que es capaz de contrarrestar la defosforilación promovida por la calcineurina fosforilando ciertos residuos de los NFATc en su región reguladora y favoreciendo posteriormente su fosforilación por acción de las quinasas GSK3 y CK1 (59).

Otras señales además de las de calcio pueden activar a los NFATc. Por ejemplo, el receptor coestimulador CD28, que activa la vía de la PI3K, que a su vez activa la quinasa Akt/PKB. Akt es un inhibidor de GSK3, una quinasa constitutiva exportadora de los NFATc. Así el balance neto es una prolongación de la residencia de los NFATc en el núcleo de los linfocitos T por la activación del TcR en combinación con CD28 (60).

3) Proteínas inhibidoras. La actividad de la calcineurina no sólo es regulada por la calmodulina y por el calcio, sino que hay presentes en la célula varias proteínas

inhibidoras, como la CABIN1, AKAP79 y miembros de la familia DSCR/MCIP, también llamadas calcipresinas y renombradas recientemente como RCAN, reguladores de la calcineurina (8, 61). Otro tipo de moléculas descritas como inhibidoras de los NFATc es un represor de RNA no codificante, que es capaz de unirse y regular a ciertas proteínas de la vía de los NFATc (62). Además, en condiciones basales los NFATc están unidos a la exportina Crm1, lo que impide su internalización. Cuando éstos se estimulan desaparece la interacción con la exportina para permitir su transporte al núcleo (63).

5) Cooperación con otros factores de transcripción. Una de las vías más estudiadas de activación de los NFATc es la que ocurre a través del receptor de células T (TcR), en la cual se activa también el factor de transcripción AP-1 (heterodímero de Jun y Fos). Los NFATc y AP-1 suelen unirse al DNA en sitios adyacentes, interaccionando y cooperando así en la transcripción de sus genes diana (**figura 4**). Recientemente se ha descrito otro factor de transcripción, el FOXP3, como un importante cooperador en la función de los NFATc. Así, dependiendo de a qué factor se unan los NFATc, éstos desempeñarán funciones diferentes en el desarrollo de linfocitos: mientras que los NFATc sólo (o unidos a un factor aún no caracterizado) activan un programa génico de anergia, unidos al AP1 promueven una respuesta efectora y unidos al FOXP3 promueven una respuesta reguladora, en linfocitos T (8, 40, 42, 43). También se ha descrito que los NFATc pueden unirse o cooperar con otros factores de transcripción como IRF-4, PPAR- γ , o miembros de la familia GATA, entre otros (8, 64, 65).

Entre las funciones de los NFATc, las más estudiadas se centran en su actividad en el sistema inmunitario, principalmente en el desarrollo, activación, diferenciación e inducción de tolerancia de los linfocitos T. Sin embargo los NFATc también participan en el desarrollo de osteoclastos, válvulas cardíacas o músculo esquelético y se ha descrito un papel de estas proteínas Rel en el sistema nervioso central, riñón y células hematopoyéticas (8, 38, 45, 48).

4. El NFAT5

Estructura

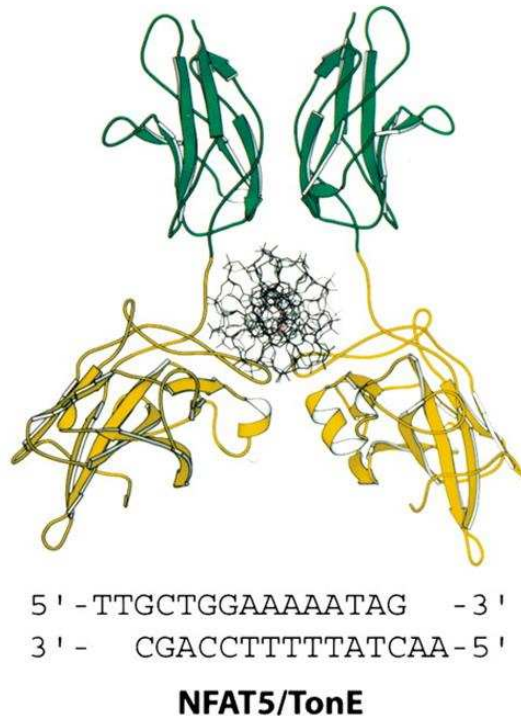
Mientras que los cuatro NFATc son muy homólogos entre sí, el NFAT5 tiene una estructura, regulación y función diferentes a los demás miembros de la familia (1, 2, 8, 38, 66, 67). La única característica que comparte el NFAT5 con los demás NFATc es el dominio de unión a DNA o dominio Rel, que une secuencias de DNA muy similares a las reconocidas por los NFATc (2). El NFAT5 presenta una región amino-terminal al dominio Rel más corta que la de los NFATc, carente de los sitios de unión a calcineurina característicos de éstos, y un dominio de transactivación en el extremo carboxilo-terminal más largo, sin homología con las demás proteínas Rel (**figura 1**) (2, 68). Los mamíferos sólo tienen un gen del NFAT5 y al menos tres isoformas (NFAT5 a, b y c), que presentan diferente longitud en su región amino-terminal y cuya existencia tan sólo ha sido probada a nivel de su mRNA (69).

Experimentos *in vitro* mostraron que el NFAT5 interaccionaba formando homodímeros, tanto en células sin activar como en células activadas, y éste se unía a sus secuencias de unión al DNA también en forma dimérica (68). La dimerización resultó ser un requisito para unir sus sitios diana en el DNA y para poder ejercer su función de transactivación en los genes regulados por este factor. La resolución de la estructura cristalina de su dominio de unión al DNA mostró que el NFAT5 unía el DNA como un homodímero y era estructuralmente similar a los NF- κ B (**figura 7**) (70). Por otra parte, la secuencia consenso de unión al DNA del NFAT5 ((T/A)GGAAA) es muy similar a la de los NFATc (GGAAA) (2, 68, 71). El NFAT5 puede reconocer las mismas regiones del DNA y activar algunos de los genes que activan los NFATc (como el TNF α) (68), aunque el NFAT5 no se une al AP-1 (2). La función, mecanismo de actuación y regulación del NFAT5 están descritos en los apartados que siguen a continuación.

Expresión

A nivel de RNA mensajero el NFAT5 se expresa de forma ubicua, siendo de elevada intensidad en músculo esquelético, cerebro, corazón y linfocitos de sangre periférica (1, 2). La expresión de proteína se ha detectado principalmente en el timo, testículos, algunas zonas del cerebro, linfocitos activados en ratones adultos, y en prácticamente todos los tejidos del embrión en desarrollo, indicando que la expresión del NFAT5 aumenta en células proliferantes. Asimismo, se ha descrito que el NFAT5 se expresa en todas las líneas celulares con las que se ha estudiado hasta ahora (1, 2, 72).

FIGURA 7



Hogan, P. et al (*Genes Dev* 2003)

Figura 7. Estructura cristalina del dominio de unión a DNA del NFAT5 homodimerizando en un elemento de DNA de respuesta a tonicidad o TonE.

Regulación por estrés osmótico

La característica principal y el aspecto más conocido que diferencia al NFAT5 de las otras proteínas Rel es su respuesta a hipertonicidad. El NFAT5/TonEBP se caracterizó en paralelo por dos grupos independientes (1, 2): como un miembro de la familia NFAT, identificado por su homología con el dominio de unión al DNA de los NFATc; y como el factor de transcripción capaz de regular genes encargados de proteger a las células ante un estrés hiperosmótico (el cotransportador de sodio/mio-inositol o SMIT, el cotransportador de sodio/cloruro/betaína o BGT1 y la aldosa reductasa o AR). Estos genes presentan en su promotor unas secuencias conservadas, conocidas como elementos de respuesta a osmolaridad (ORE) o tonicidad (TonE), a las cuales el NFAT5/TonEBP es capaz de unirse en respuesta a un estímulo hipertónico. Posteriormente, se han descrito otros genes regulados por el NFAT5 en respuesta a hiperosmolaridad, como las citoquinas TNF α y linfotoxina- β (68), la chaperona HSP70-2 (73) y los transportadores de urea UT-A (74) y de aminoácidos ATA2 (75), entre otros (**tabla 1**).

Tabla 1

Gen diana	Función	Referencia
Aldosa reductasa (AR)	Convierte la glucosa en sorbitol	(76)
Cotransportador de sodio/mio-inositol (SMIT)	Transporta mio-inositol a través de la membrana	(76)
Cotransportador de sodio/cloruro/betaina (BGT1)	Transporta betaina a través de la membrana	(1,76)
Transportador de urea (UT-A)	Transporta urea regulado por vasopresina	(74)
Transportador de taurina (TauT)	Transporta el amino-ácido taurina a través de la membrana	(77)
HSP70-2	Chaperona, ayuda al plegamiento de proteínas	(73)
Transportador de amino-ácidos neutral acoplado a sodio-2 (ATA2)	Transporta aminoácidos a través de la membrana	(75)
Proteína de estrés osmótico de 94 Kda (Osp94)	Posiblemente otra chaperona	(78)
Aquaporina 2 (AQP2)	Canal de agua de la membrana plasmática	(76,79)
Linfotoxina β (LT β)	Citoquina que participa en organogénesis y apoptosis	(68)
TNF α	Citoquina proinflamatoria	(68,80)

Tabla 1. Lista de genes descritos que son regulados por el NFAT5 (1, 68, 73-80).

La propiedad del NFAT5 de formar dímeros puede ser empleada para inhibirlo específicamente ya que formas del NFAT5 capaces de dimerizar, pero carentes del dominio de transactivación, compiten con la actividad de la proteína endógena y se comportan como dominantes negativos (68).

Se ha visto también que en condiciones hipertónicas, el NFAT5/TonEBP es fosforilado y experimenta un cambio en su localización subcelular. El NFAT5 se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo de células primarias y líneas celulares, aunque suele ser más citoplásmico (1, 2, 68, 75). Frente a un estrés hiperosmótico aumenta su expresión, su fosforilación y su acumulación en el núcleo, consistente con una mayor capacidad transactivadora y de unión al DNA (**figura 8**) (67, 68, 81). Esta regulación se ha visto que es bidireccional ya que en condiciones hipotónicas aumenta la proporción del NFAT5 en el citosol y se reduce su capacidad transactivadora y de unión al DNA (82).

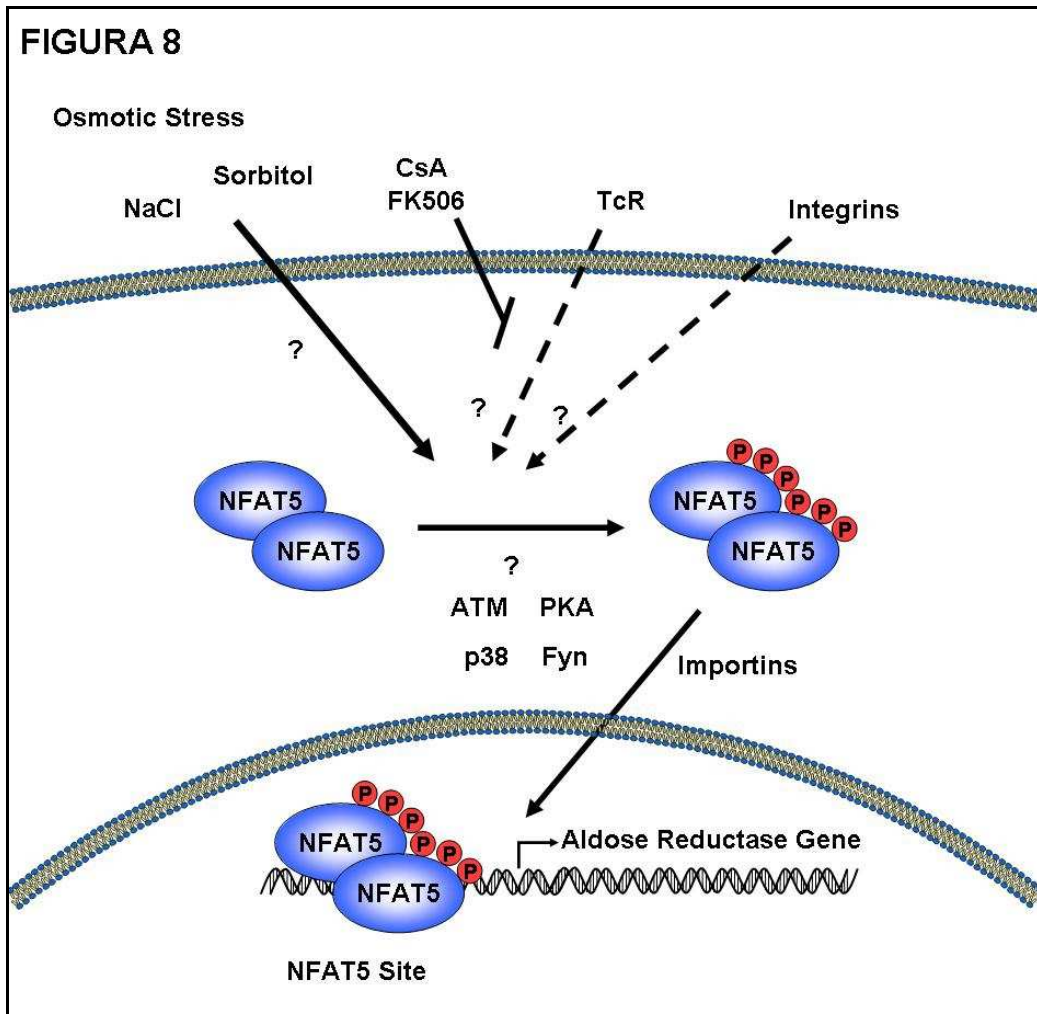


Figura 8. Esquema de la ruta de señalización del NFAT5. NaCl, cloruro sódico. TcR, receptor de células T. CsA, ciclosporina. FK506, tacrolimus. ?, Proceso caracterizado de forma incompleta.

Recientemente se han identificado tres motivos en la región amino-terminal del NFAT5 que controlan su importe hacia el núcleo o exporte al citoplasma (83). Uno de ellos es una secuencia de localización nuclear (NLS), la otra es un dominio de exporte auxiliar (AED), independiente de la exportina Crm1, y la tercera es una secuencia de exporte nuclear (NES) dependiente de Crm1, presente sólo en la isoforma c del NFAT5. En condiciones de estrés osmótico las señales de exporte AED y NES quedan inactivadas, facilitando el transporte al núcleo dependiente del NLS (83).

Lee, SD. y colaboradores demostraron que el dominio carboxilo-terminal del NFAT5 se podía estructurar en varios subdominios, e identificaron en ellos regiones moduladoras y activadoras de la actividad transcripcional en respuesta a un estrés hipertónico (84). Sin embargo, en este trabajo no se observó una correlación entre la fosforilación de estos subdominios y su actividad transcripcional.

Finalmente, para poder determinar el papel del NFAT5 a nivel fisiológico, se han descrito en la literatura dos ratones deficientes para la proteína, en los que se eliminaron exones esenciales para que el NFAT5 pudiera ejercer su función normal (76, 85). En ellos se observa una alta mortalidad perinatal, una disminución en el peso corporal y una incapacidad de regular genes osmoprotectores que causa atrofia renal, uno de los órganos más expuestos a condiciones extremas de osmolaridad. El grupo de Ho SN., encontró además defectos en la celularidad de linfocitos y en las respuestas de anticuerpos específicos de antígenos, en ratones heterocigotos (85). Hay descritos además tres tipos de transgénicos para el NFAT5, realizados con dominantes negativos, que son también un modelo de inhibición del NFAT5. Trama J., y colaboradores produjeron un ratón transgénico de un dominante negativo del NFAT5 (dominio de unión al DNA) expresado bajo el control del promotor del gen CD2, dirigido a expresarse en el timo y en linfocitos T periféricos. El transgén, que se expresó en bazo y timo, provocaba una disminución de la celularidad en estos órganos y una reducción en el desarrollo de linfocitos T, una menor tasa de crecimiento de esplenocitos cultivados *in vitro*, y una menor viabilidad de los esplenocitos cultivados en ausencia de aminoácidos (75). Lam AKM., y colaboradores, a su vez, describieron un ratón transgénico de un dominante negativo del NAT5 expresado bajo el control del promotor de la caderina específica de riñón, que se expresa en células epiteliales de los túbulos colectores renales. Los ratones presentaron poliuria (excesiva producción de orina), polidipsia (excesiva sensación de sed) e hidronefrosis bilateral progresiva (agrandamiento de la pelvis y de las estructuras recolectoras de orina), confirmando un papel importante del NFAT5 como regulador de la concentración de urina y de genes osmoprotectores (86). Wang Y., y colaboradores también desarrollaron un transgénico de un dominante negativo del NFAT5 pero expresado bajo el control del promotor de la α A-cristalina, que se expresa en células de fibras oculares. Los ratones desarrollaron cataratas nucleares de forma temprana, indicando un papel importante del NFAT5 en la función ocular normal (87).

Regulación por otros estímulos

Además del estrés hipertónico se han descrito otros estímulos capaces de activar la actividad transcripcional del NFAT5. Trama, J. y colaboradores implicaron al receptor de linfocitos T (TcR) además de a sus farmacomiméticos, PMA e ionóforo de calcio en la actividad y aumento de expresión del NFAT5 (67). Curiosamente, este estímulo sí era dependiente de calcineurina, hecho que no sucede con los demás estímulos que activan al NFAT5. Células estimuladas con PMA y ionóforo, o activando el TcR por entrecruzamiento con los anticuerpos anti-CD3/CD28, aumentan los niveles

de expresión del NFAT5. Esta activación es capaz de revertirse con el pretratamiento con fármacos inhibidores de la fosfatasa calcineurina (**figura 8**). Posteriormente, el mismo grupo, y como se ha comentado en el apartado anterior, describió un papel importante del NFAT5 en la viabilidad de los esplenocitos por privación de aminoácidos (75).

Jauliac, S. y colaboradores implicaron al NFAT5 en la vía de señalización por integrinas (88). Los autores describieron que la integrina $\alpha_6\beta_4$, que desempeña un papel en la regulación de la invasividad tumoral, activaba a los factores de transcripción NFAT1 y NFAT5 (**figura 8**). La estimulación de la integrina con sus ligandos, que incrementa la migración celular, aumenta la expresión y la actividad transcripcional del NFAT5, efecto que se revierte con dominantes negativos del factor de transcripción.

Otras funciones del NFAT5

Recientemente se han descrito para el NFAT5 otras funciones además de las ya mencionadas, ampliando el espectro de actuación y mostrando la versatilidad de este factor de transcripción. Así, se ha descrito como un factor importante para funciones tan diversas como el desarrollo ocular (87), la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (89) o la migración y diferenciación durante la miogénesis (90).

Quinasas reguladoras del NFAT5

Resultados descritos en la literatura indican que el NFAT5 puede ser regulado por diferentes quinasas (**figura 8**). Ko, BC. y colaboradores describieron la contribución de las quinasas p38 y Fyn en la activación del NFAT5 en respuesta a estrés osmótico (91). Más tarde, Ferraris, JD. y colaboradores implicaron a la quinasa PKA en la misma vía de activación del NFAT5 por estrés osmótico (92, 93). Recientemente Irrazabal, CE y colaboradores han implicado a una quinasa que responde a estrés genotóxico, ATM, como otra quinasa que contribuye a que el NFAT5 responda transcripcionalmente en respuesta a un estímulo hipertónico (93). Aunque se ha conseguido coimmunoprecipitar el NFAT5 unido al ATM y la PKA, aún no se ha podido demostrar si alguna de estas quinasas fosforila al NFAT5 directamente ni se conoce el mecanismo por el cual regulan su actividad transcripcional.

5. La inmunidad innata y adaptativa

La **inmunidad innata**, también llamada inmunidad natural, comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares frente a microorganismos. Estos mecanismos están preparados para responder con rapidez a las infecciones y esencialmente de la misma manera ante infecciones repetidas (no presentan memoria) (94-97). Está formada por barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias antimicrobianas sintetizadas en ellos, como las defensinas), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas), mastocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*), proteínas de la sangre (sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación) y citoquinas, que regulan y coordinan a las células de la inmunidad innata (94, 98-103). Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados, presentan una diversidad limitada (codificada por la línea germinal) y pueden ser incapaces de distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas. La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a los microorganismos.

El reconocimiento de las células de la inmunidad innata a los patógenos se produce a través de receptores (PRR) que reconocen patrones asociados a moléculas patogénicas (PAMP). Entre los principales PRR están los receptores tipo *Toll* (TLR), los receptores tipo NOD (NLR), y los receptores tipo RIG (RLR), que se comentan en los siguientes apartados (104, 105).

La **inmunidad adaptativa** comprende las respuestas inmunitarias que son estimuladas por la exposición a agentes infecciosos y que aumentan en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo determinado (se adapta a ésta). Presenta una especificidad precisa por distintas moléculas, es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas y puede distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso muy relacionados (por eso también se llama inmunidad específica). Esta propiedad de tener una diversidad de respuesta muy amplia es debida a que sus receptores están producidos por la recombinación somática de segmentos génicos. La inmunidad adaptativa está formada por los linfocitos y sus productos (94, 96, 106-108).

El reconocimiento de antígenos de patógenos se produce a través de los receptores de células T y B y requiere moléculas presentadoras de antígeno y proteínas adaptadoras (109).

Las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son componentes de un sistema integrado de defensa del huésped en el que numerosas células y moléculas funcionan

de forma cooperativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan una defensa eficaz frente a las infecciones. Sin embargo, frente a microorganismos que han desarrollado resistencia a la inmunidad innata, se requiere de los mecanismos de la inmunidad adaptativa (94). La inmunidad innata y adaptativa están unidas entre sí en dos aspectos: la inmunidad innata una vez activada estimula la inmunidad adaptativa y regula las respuestas adaptativas; y las respuestas adaptativas utilizan varios mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los microorganismos.

6. Los receptores tipo *Toll* y la inmunidad innata

Los receptores tipo *Toll* o TLR son una familia de receptores que juegan un papel crucial en la respuesta inmunitaria innata a los patógenos invasores. Estos receptores, evolutivamente conservados, son homólogos del gen *Toll* en *Drosophila* (110). Reconocen motivos estructurales muy conservados expresados sólo en patógenos microbianos, llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” o PAMP. Los PAMP incluyen varios componentes de la pared celular bacteriana como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano (PGN), el DNA bacteriano y el RNA viral de doble cadena (104, 111). La estimulación de los TLR por los PAMP inicia una cascada de señalización que involucra a proteínas adaptadoras como el MyD88 o el TRIF, además de quinasas como la IRAK o la TBK1. Estas rutas de señalización producirán una activación de factores de transcripción, como NF- κ B e IRF3, los cuales inducirán la expresión de un programa de genes entre los que destacan citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y enzimas, que además de atacar directamente a los patógenos promoverán la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa para eliminar de forma selectiva a patógenos y a las células infectadas.

Los TLR

Los receptores tipo *Toll* son unas proteínas caracterizadas por un dominio extracelular rico en leucinas, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica que contiene una región conservada llamada dominio del Receptor de *Toll*/IL-1, o dominio TIR. Los TLR se expresan predominantemente en tejidos involucrados en la función inmunitaria, como el bazo, linfocitos de sangre periférica, macrófagos y células dendríticas y en aquellos tejidos expuestos al ambiente externo, como el pulmón, el tracto gastrointestinal y el genitourinario (108, 112). Sin embargo, su patrón de expresión varía entre los diversos tejidos y tipos celulares. Están localizados en la membrana plasmática, con la excepción del TLR3, TLR7-8 y TLR9, los cuales están localizados predominantemente en endosomas (113).

Se han descrito diez miembros de los TLR en humanos y doce en roedores. Del TLR1 al TLR10 en humanos, y del TLR1 al TLR9, el TLR11, TLR12 y TLR13 en roedores (el homólogo murino del TLR10 y el homólogo humano del TLR12 son pseudogenes) (114). Ver **figura 9** para una representación esquemática de los TLR.

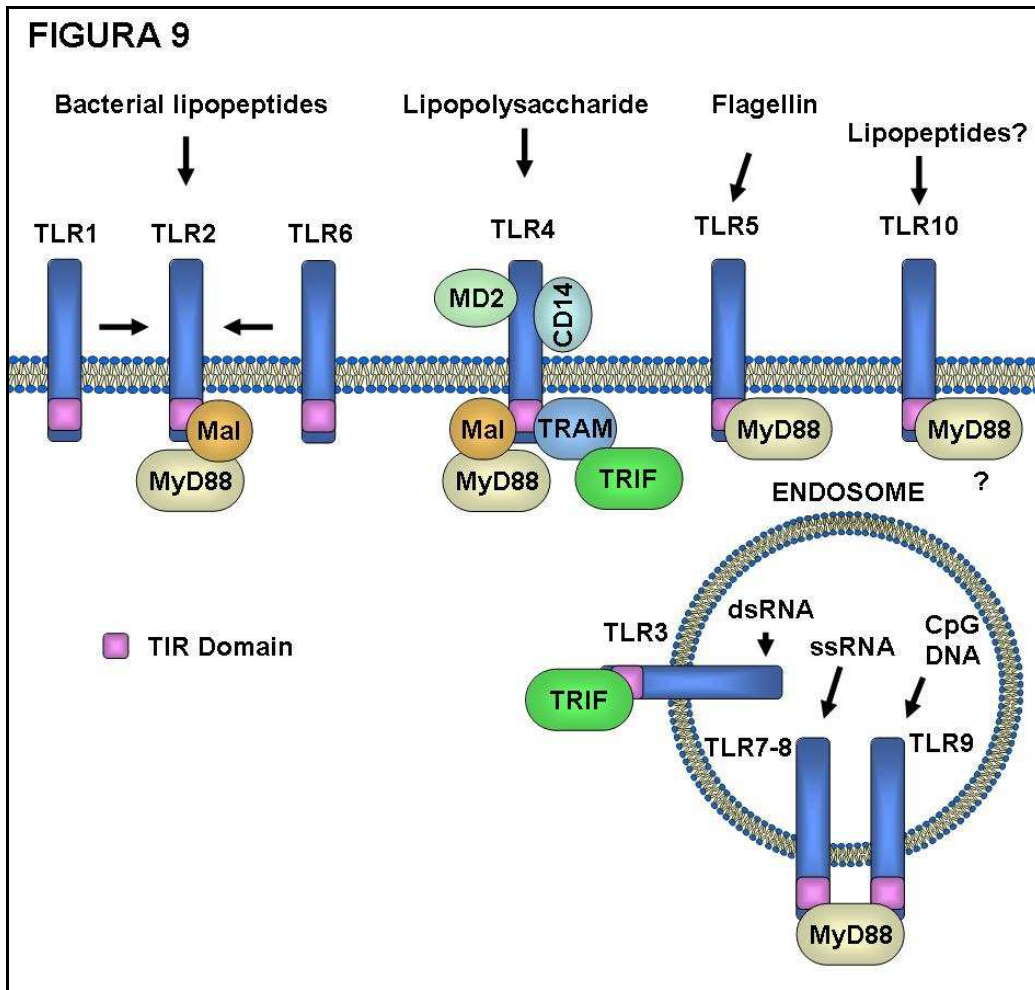


Figura 9. Esquema de la familia de los receptores tipo *Toll* y los adaptadores a los que se unen. dsRNA, RNA de cadena doble. ssRNA, RNA de cadena sencilla.

Cada TLR es capaz de reconocer un patrón específico de moléculas (**figura 9** y **tabla 2**). Además, los TLR, al interactuar con el ligando, son capaces de formar homo o heterodímeros, ampliando de este modo el repertorio de moléculas que pueden reconocer. Así, heterodímeros de TLR2 con TLR1 o TLR6 son capaces de reconocer lipopéptidos de la pared bacteriana (PAM₃CSK₄) o componentes de hongos, como el Zymosan A (Zym). El TLR3 reconoce RNAs virales de doble cadena (dsRNA), el TLR4 lipopolisacárido (LPS), el TLR5 la flagelina, el TLR7 y 8 RNAs virales de cadena sencilla (ssRNA), y el TLR9 DNA procedente de bacterias, rico en motivos CpG no metilado (CpG DNA). Para el TLR10 no está descrito su ligando, pero su homología con el TLR1 y el TLR6 hace hipotetizar que pueda reconocer lipopéptidos. Asimismo, se ha descrito que el TLR11 murino reconoce profilinas. Tampoco están descritos los ligandos para los TLR12 y TLR13 murinos (ver **tabla 2**) (115).

Tabla 2

Ligandos	TLR	Adaptadores	Especie
PAM ₃ CSK ₄	1,2	MyD88, MAL	Humano, Ratón
PAM ₂ CSK ₄	2,X	MyD88, MAL	Humano, Ratón
MALP-2, LTA, Zym	2,6	MyD88, MAL	Humano, Ratón
dsRNA	3	MyD88, MAL, TRIF, TRAM	Humano, Ratón
LPS, VSV-G, MMTV-G	4	MyD88	Humano, Ratón
Flagelina	5	MyD88	Humano, Ratón
ssRNA, IAQ	7	MyD88	Humano, Ratón
ssRNA, IAQ	8	MyD88	Humano, Ratón ^a
CpG-ODN	9	MyD88	Humano, Ratón
Desconocido	10	Desconocido	Humano
Profilina	11	MyD88	Ratón
Desconocido	12	Desconocido	Ratón
Desconocido	13	Desconocido	Ratón

Tabla 2. Lista de ligandos para los diferentes receptores de tipo *Toll*, sus adaptadores intracelulares y la especie, humana o murina, que lo representa. Zym, Zymosan A. LPS, lipopolisacárido. IAQ, imidazoquinolinas. ODN, oligodeoxinucleótido. ^a El TLR8 murino es considerado no funcional al no responder a ninguno de los ligandos del TLR7 y TLR8 humanos, sin embargo recientemente se ha descrito que es activado por ligandos del TLR8 en presencia de ODN (116).

Para aumentar la complejidad, la especificidad de los TLR también está influenciada por moléculas accesorias como el MD-2 y el CD14, los cuales forman un complejo extracelular con TLR4 en respuesta a LPS (117).

Rutas de señalización y factores de transcripción activados por los TLR

Todas las rutas de señalización de los TLR necesitan de proteínas adaptadoras y quinasas para finalmente activar los factores de transcripción que inducirán la expresión de los genes diana (118). Hay cuatro adaptadores principales que poseen dominios TIR y que son los primeros en recibir la señal desde los TLR: **MyD88**, **Mal**, **TRIF** y **TRAM** (ver **figura 9-10**). De los principales y más estudiados, MyD88 y TRIF, **MyD88** es requerido para la señalización de todos los TLR excepto para el TLR3, y **TRIF** actúa en el TLR3 y TLR4.

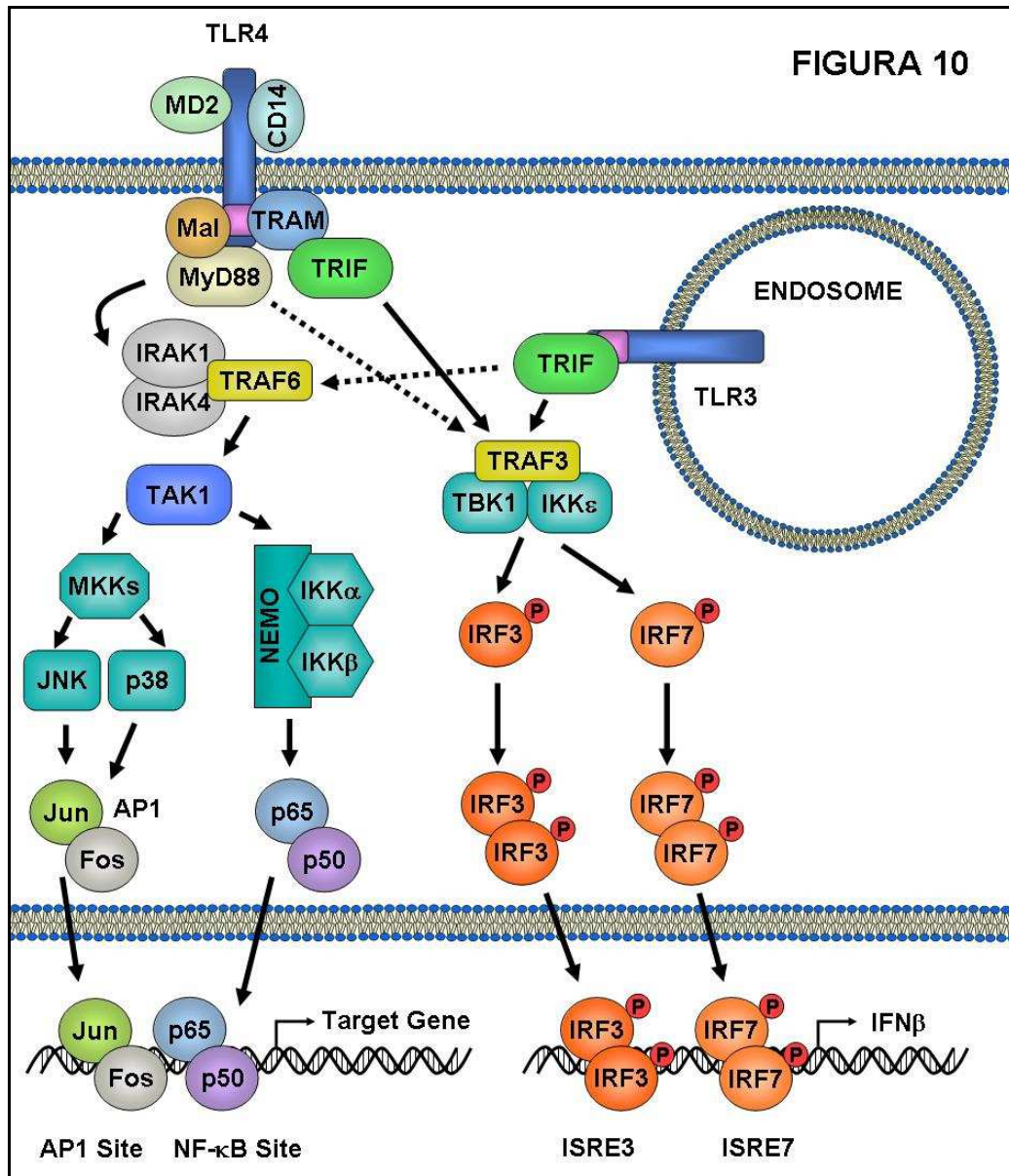


Figura 10. Esquema de la ruta de señalización de los receptores tipo *Toll*, desde los 4 adaptadores, MyD88, Mal, TRIF y TRAM hasta los factores de transcripción activados, NF-κB, IRFs y AP1.

Clásicamente se ha vinculado la actividad de los TLR vía MyD88 como una ruta preferentemente activadora del NF-κB y la del TRIF como una activadora de IRF3. Recientemente se ha descrito que estos adaptadores pueden presentar una activación cruzada de ambos tipos de factores de transcripción, de forma que en general tanto MyD88 como TRIF podrían activar a ambos. Esta función dependerá sin embargo del tipo celular y del tipo, intensidad y duración del estímulo (118).

MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*). Cuando se activan los TLR, MyD88 recluta a la quinasa **IRAK4** (*IL-1R-associated kinase 4*), la cual se une a su vez a la quinasa **IRAK1**. Una diana clave para **IRAK1** es la proteína adaptadora **TRAF6** (*TNF-receptor-associated-factor 6*), que entonces se une a las proteínas **TAK1** (*TNF activated kinase 1*) y **TAB2** (*TAK1 binding protein 2*). Las dianas finales de esta cascada son las quinasas que activan p38 y JNK (de la ruta de las MKKs) y el complejo de las IKKs, que activa a NF- κ B. Recientemente se ha descrito que MyD88 puede unirse también a TRAF3, de forma que participa además en la activación transcripcional dependiente de IRFs (**figura 10**) (118).

Mal (*MyD88 adaptor like*). También conocido como **TIRAP**, es necesario para la ruta de señalización dependiente del TLR2 y del TLR4, y actúa como una proteína puente para unir **MyD88** al complejo de estos TLR. Tanto los TLR como los adaptadores presentan dominios TIR de interacción proteína-proteína. Mal presenta un dominio de unión a fosfatidil inositol bifosfato (PIP2), el cual lo recluta a la membrana, en regiones ricas en los TLR. Por el tipo de carga que presenta Mal en su superficie, interacciona primero con los TLR y posteriormente recluta a **MyD88** (**figura 10**) (118, 119).

TRIF (*TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β*). También conocido como **TICAM-1**, es reclutado tan sólo por el TLR3 y TLR4, siendo el único adaptador tipo TIR reclutado por el TLR3. TRIF se une al adaptador TRAF3 y media la activación de las quinasas TBK1 e IKK ϵ , las cuales fosforilan a los factores de transcripción IRF3 e IRF7. Una vez fosforilados, los IRFs homodimerizan y se desplazan al núcleo para activar transcripcionalmente a sus genes diana. Se ha descrito recientemente que TRIF tiene secuencias consenso de unión a TRAF6 y se une a él, participando también en la activación de NF- κ B (**figura 10**) (118, 119).

TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). También conocido como **TICAM-2**, es el adaptador más restringido de todos, actuando sólo como puente de TRIF en su unión al TLR4, así como lo hace Mal para MyD88. Asimismo, se ha descrito que TRAM debe ser miristilado para ser reclutado tras la activación del TLR4 (118). Sin embargo la falta de TRAM es más severa que la de TRIF en estimulación por LPS, lo que indica que TRAM está involucrado en más rutas de señalización además de la dependiente de TRIF (118).

7. Los receptores intracelulares de reconocimiento de patógenos

Además de los receptores tipo *Toll* hay otras proteínas localizadas en el citoplasma, que juegan un papel muy importante en la inmunidad innata como sensores de patógenos intracelulares. Entre ellos se incluyen los receptores tipo NOD y las proteínas antivirales RIG-I y Mda5.

Sistema antiviral citoplásmico (receptores tipo RIG o RLRs)

Hasta hace poco el conocimiento sobre receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) víricos estaba restringido a los receptores de tipo *Toll* 3, 7 y 8, al reconocer los RNA virales de cadena sencilla (TLR7 y TLR8) o doble (TLR3). Sin embargo, estudios con ratones deficientes para el TLR3 mostraron que las respuestas inflamatorias a ciertas infecciones víricas (como el citomegalovirus o el virus de la estomatitis vesicular) no se veían afectadas por la ausencia de este receptor de tipo *Toll*, indicando la posible existencia de otros sensores a este tipo de estímulos (120).

Posteriormente se ha descrito el **RIG-I** (*retinoic-acid-inducible gene 1*) y el **Mda5** (*melanoma-differentiation-associated gene 5*), dos helicasas de RNA capaces de unir RNA de doble cadena localizado en el citoplasma e inducir citoquinas inflamatorias e interferón (105), aunque RIG-I también puede unir RNA de cadena sencilla (121, 122). El mecanismo de actuación se describió recientemente al identificarse una proteína puente entre estos sensores de RNA de doble cadena y los factores de transcripción, llamado **MAVS** (*mitochondrial antiviral signaling protein*), **CARDIF** (*CARD adaptor inducing IFN- β*), **IPS-1** (*interferon beta promoter stimulator 1*) o **VISA** (*virus induced signaling adaptor*), por los cuatro grupos que lo caracterizaron simultáneamente (123-126).

MAVS es una proteína adaptadora que contiene un motivo de interacción proteína-proteína en su extremo amino-terminal denominado dominio CARD (*caspase activator and recruitment domain*). RIG-I y Mda5 presentan a su vez dos dominios CARD en su extremo amino-terminal. Cuando las helicasas reconocen RNA de doble cadena, éstas interactúan con MAVS a través de los dominios CARD. MAVS señala a través de los complejos NEMO/TRAF3/TBK1/IKK ϵ por un lado y con el IKK α/β y NEMO por otro para activar los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B, respectivamente, e inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias e interferón, en respuesta a las infecciones víricas (**figura 11**) (105, 127).

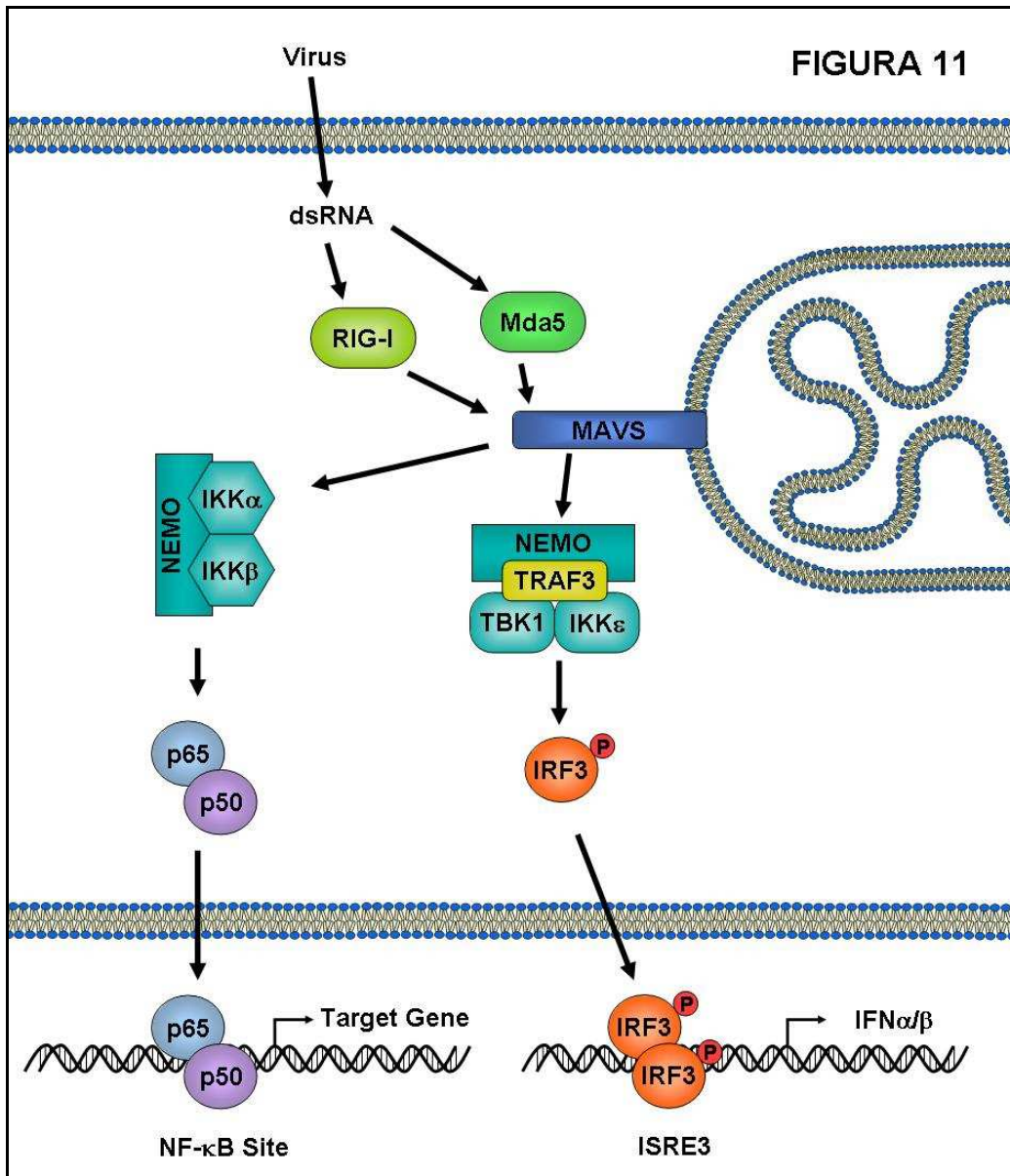


Figura 11. Esquema de la ruta de señalización de los receptores tipo RIG, mostrando los factores de transcripción activados por ellos.

Inflamasomas o receptores de estrés (receptores tipo NOD o NLRs)

Los primeros sensores de PAMPs intracelulares en ser descubiertos fueron NOD1 y NOD2, miembros de la familia de receptores tipo NOD o NLRs. Hasta el momento hay descritos 22 miembros de la familia, muchos de los cuales todavía no han sido caracterizados en profundidad, de forma que su papel biológico aún está por determinar.

De los 22 NLRs descritos, hay cinco miembros de la familia NOD (NOD1-5), 14 miembros de la familia NALP (NALP1-14) y otros tres miembros, las proteínas IPAF, NAIP y CIITA.

De forma general los **NLRs** están formados por un dominio **CARD** (NODs) o un dominio **PYD** (*pyrin effector domain*, NALPs) en su extremo amino-terminal, un dominio llamado **NACHT** (dominio de oligomerización y unión a nucleótidos), y un número variable de repeticiones de leucinas o LRRs (*leucin-rich-repeats*) en el extremo carboxilo-terminal, que reconocen moléculas asociadas a patógenos o daño celular (**figura 12**) (105).

En estado basal la región de LRRs de los NLRs oculta el dominio NACHT bloqueando su oligomerización. Los ligandos, que son muy variados (componentes bacterianos, RNA, toxinas, ATP o incluso ácido úrico), se unen directa o indirectamente a los LRRs y activan la oligomerización de estos sensores. Los NLRs activan posteriormente al NF- κ B, mediante la proteína RIP2 en el caso de los NODs y la caspasa 1 en los otros miembros de NLRs, que induce apoptosis y además procesa y activa las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (128). De esta forma se induce una respuesta inflamatoria a la vez que una muerte celular programada por la presencia de patógenos y otros tipos de estrés (105).

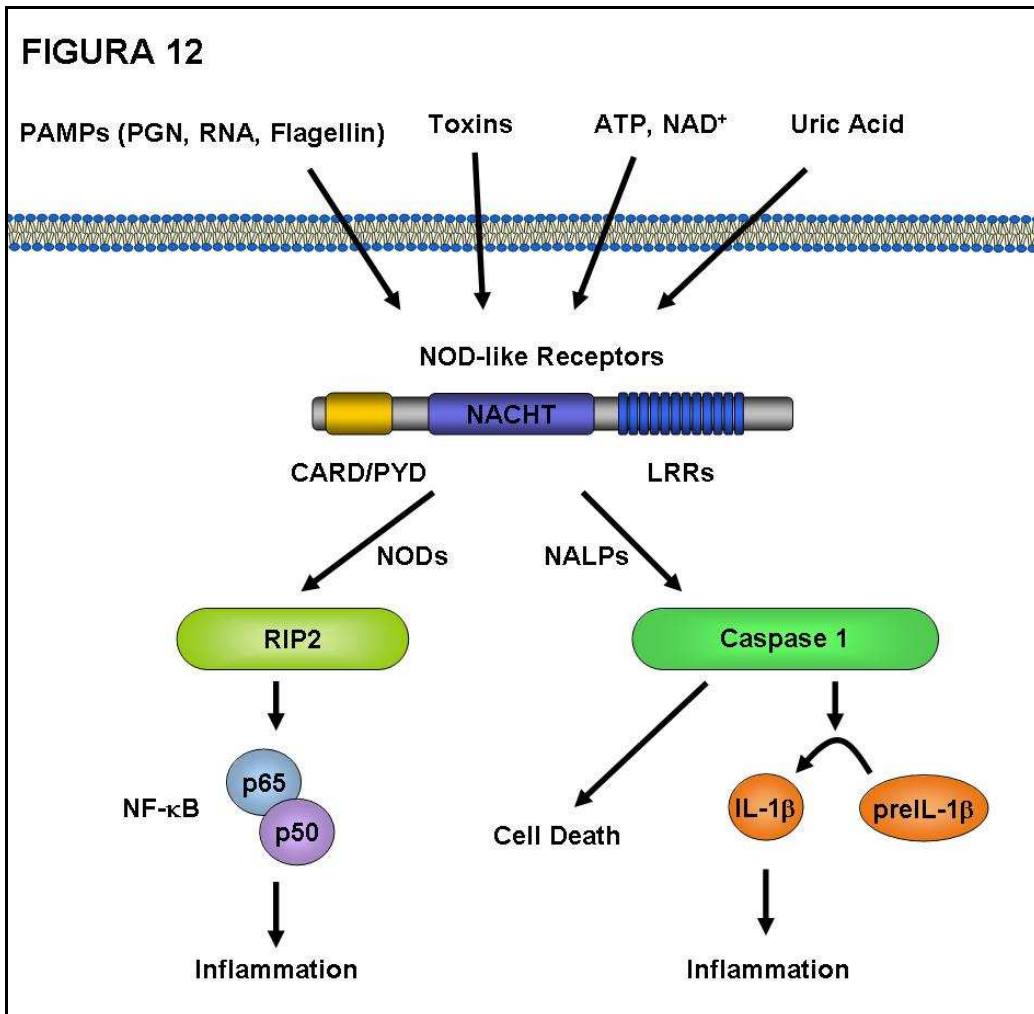


Figura 12. Esquema de la ruta de señalización de los receptores tipo NOD,

8. Los genes regulados por los TLR

IFN α/β

Los interferones son citoquinas importantes para la respuesta inmunitaria, especialmente frente a patógenos intracelulares, como los virus. Son reguladores de la respuesta inmunitaria a infecciones virales y bacterias intracelulares, pero también pueden ser estimulados por los TLR, de forma que pueden ser activados por un amplio espectro de patógenos. Casi todas las células pueden producir interferón, y éste les induce inmunidad antiviral, teniendo además efectos antiproliferativos. También se ha visto que promueven la diferenciación de células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) (129). La producción de interferones de tipo I está regulada por los factores de transcripción NF- κ B, IRFs y AP-1 (30, 130-132).

TNF α

El TNF α es una citoquina proinflamatoria secretada en respuesta a estímulos inflamatorios por múltiples tipos celulares, principalmente macrófagos pero también por células linfoides, endoteliales y fibroblastos. Está implicada en la regulación de un espectro amplio de procesos biológicos en los que se incluyen proliferación, diferenciación, inflamación, tumorigénesis y apoptosis. Se produce en respuesta a lipopolisacárido y otros productos bacterianos (vía TLR), y es el responsable, junto con otras citoquinas, del choque séptico y la fiebre (133). Según el estímulo que lo active (señales de calcio, virus o LPS), la expresión del TNF α está regulada por diversos factores de transcripción, entre ellos los NFATc, AP-1 y NF- κ B (134-137).

IL6

La interleuquina 6 es un regulador de la respuesta inmunitaria innata y adquirida. Inicialmente se consideraba un factor estimulador de linfocitos y un activador de las respuestas de fase aguda. Pero en los últimos años se ha visto que puede jugar un papel estimulador o inhibidor en diferentes fases de las respuestas inflamatorias. De esta forma, ante una respuesta inflamatoria inicial, su papel sería inhibitorio (inhibiendo TNF α y la presencia de neutrófilos en los tejidos afectados, células de la inmunidad innata). Posteriormente su papel sería el de promover, en la región inflamada, el reclutamiento de células mononucleadas, monocitos y linfocitos T y B, participando así en la transición en la zona afectada de la inmunidad innata a la adquirida (138). La expresión de la IL6 está regulada por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (139, 140).

IL12 β

La interleuquina 12 es una citoquina producida principalmente por células dendríticas, monocitos y macrófagos por estimulación de los TLR y ejerce una función muy importante en la generación y mantenimiento de las funciones efectoras de la inmunidad adaptativa, regulando las respuestas de las células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) (141). La expresión de la IL12 β está regulada por varios factores de transcripción, entre los que destacan el NF- κ B, AP-1 e IRF-1 (142-144).

iNOS

La iNOS (óxido nítrico sintasa inducible o inflamatoria, o NOS2) es un miembro de la familia NOS inducible por diversos estímulos tales como ligandos de los TLR, TNF α , IL-1 β e IFN $\alpha/\beta/\gamma$. Está implicado en reacciones inflamatorias posteriores a infecciones, enfermedades o daño tisular, actuando como un enzima que produce óxido nítrico (NO), un efector de la inmunidad innata, a través de la conversión de la arginina a citrulina. Éste presenta propiedades antibacterianas (inhibe la síntesis de DNA bacteriano e induce roturas de doble cadena en el DNA bacteriano) y antivíricas (inhibe las proteasas virales encargadas de procesar y madurar los polipéptidos víricos). Es importante para reducir la trombosis y mejorar el suministro sanguíneo en tejidos dañados, por inducción de vasodilatación (145, 146). La expresión de la iNOS se ha descrito que está regulada por los factores de transcripción NF- κ B, los STAT, AP-1 e IRF-1 (147, 148).

COX2

El gen de la ciclooxigenasa 2 (COX2) es inducido por mediadores inflamatorios y los TLR. Ayuda en la conversión del ácido araquidónico a la prostaglandina PGE2, un mediador inflamatorio importante en la permeabilidad vascular para favorecer la migración de células del sistema inmunitario a tejidos dañados. La PGE2 tiene propiedades proliferativas y antiapoptóticas que favorecen la reparación tisular (149). Modula además la diferenciación, maduración y función de las células dendríticas, esenciales en la respuesta inmunitaria adaptativa a las infecciones (150), y también es importante, junto con otros factores, para la producción de fiebre (151). Su expresión en respuesta a los TLR está regulada por los factores de transcripción NF- κ B e IRF-1 y 2 (152, 153).

RANTES

RANTES (CCL5) es una quimiocina activada en procesos inflamatorios, incluidos los TLR. Induce la migración linfocitaria, modula el tráfico de linfocitos T, monocitos y células dendríticas, entre otras (154). La expresión de la RANTES está regulada por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (155, 156).

OBJETIVOS

Al inicio de este proyecto se sabía poco sobre los mecanismos que regulaban al NFAT5. Asimismo, se desconocía si el NFAT5 participaba en otros procesos y respuestas celulares, además de los descritos hasta el momento, independientes de la respuesta a estrés osmótico. De este modo, nuestros objetivos fueron:

1) Identificar el patrón de proteínas asociado al NFAT5 en condiciones basales y en respuesta al estrés osmótico y otros estímulos activadores.

Algunos de los resultados que obtuvimos sugirieron la posibilidad de que el NFAT5 podría ser regulado por moléculas asociadas a patógenos microbianos, lo que nos condujo a un segundo objetivo:

2) Explorar y desarrollar el estudio de la regulación y función del NFAT5 en respuesta mediada por receptores de tipo *Toll* (*Toll-like Receptors* o TLR), una familia de proteínas con un papel esencial en la inmunidad innata.

MATERIALES Y **MÉTODOS**

Reactivos. El cloruro sódico (NaCl), Trizma base, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicoltetraacético), pirofosfato sódico (NaPPi), ortovanadato sódico (NaOrtovanadate), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), leupeptina, pepstatina A, DNAsa I, SDS (dodecilo sulfato sódico), urea, tritón X-100 (TX-100) y CHAPS (*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*) fueron de SIGMA. El fluoruro sódico (NaF) y el glutaraldehído de MERCK. La aprotinina de ROCHE. El Pam3CSK4 fue de Invivogen (código TLRL-PMS), el pIC (ácido poli-inosínico poli-citidílico, catálogo P0913), lipopolisacárido (LPS) (catálogo L2880) y el Loxoribine (catálogo 496812) fueron de Sigma y el CpG DNA fue de Hycult Biotechnology (catálogo HC4033).

Cultivo celular. Las células RAW 264.7 se cultivaron en RPMI 1640 (Gibco) excepto en los experimentos para medir niveles de nitrito, en los que se usó medio DMEM. El resto de células se cultivaron en DMEM. Los medios estaban suplementados con un 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 2 mM de glutamina (Gibco), 50 μ M β -mercaptoetanol (SIGMA) y 1 mM de piruvato sódico (Gibco).

Condiciones de lisis para la purificación de proteínas. Las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y nuevamente lavadas con PBS. Las células se lisaron (5×10^6 células/ml) en diferentes tampones de lisis:

-Lisis con SDS. 0,5% SDS, Tris pH 7,4 20 mM, EDTA 10 mM, NaPPi 10 mM, NaF 50 mM, NaOrtovanadato 1,5 mM e inhibidores de proteasas: 2 mM PMSF, leupeptina y aprotinina (ambas a 1 μ g/ml) y pepstatina A (1 μ g/ml).

-Lisis con TX-100. TX-100 0,5% (volumen/volumen), Hepes pH 7,4 40 mM, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, NaPPi 10 mM, β -Glicerofosfato 10 mM, DNAsa I 10 mg/ml e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina y aprotinina 5 μ g/ml y pepstatina A 1 μ g/ml).

-Lisis con CHAPS. Igual que con TX-100 pero con 0,5% de CHAPS (peso/volumen).

Condiciones de *cross-linking*. Para el *cross-linking in vivo*, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con DSP (ditiobis-succinimidil propionato, Pierce) en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Las cantidades utilizadas fueron 0,1, 0,2 y 0,5 mg/ml (a partir de un stock concentrado a 10 mg/ml en DMSO), con las células a una concentración de 10×10^6 células/ml. Después se inactivó el exceso de DSP con Tris pH 7,4 0,1 M durante 30 minutos más. Las células se lavaron con PBS nuevamente antes de ser lisadas. Para el *cross-linking in vitro*, las células se lisaron 30 minutos a 4 °C en el tampón de lisis a 5×10^6 células/ml, al cual se le había añadido DSP. Las

concentraciones de DSP fueron 0,1, 0,2, y 0,5 mg/ml, las de glutaraldehído (GDA) 1, 5 y 10 mM. El exceso de DSP o GDA se inactivó con Tris pH 7,4 0,1 M durante 30 minutos más.

Construcciones. Myc-NFAT5-GFP, Myc-NFAT5 Δ Cter-GFP (ND5), DBD5-GFP (dominio de unión a DNA del NFAT5) y IDD5-GFP (dominio de dimerización del NFAT5), se han descrito previamente (68). Para la expresión de GFP se usó la construcción pEGFP-C1 (clontech). Para las construcciones del NFAT5 con epítomos HA y Flag en el extremo amino-terminal y carboxilo-terminal el NFAT5 fue clonado en el vector pOZ-N y pOZ-C, respectivamente (157). El gen reportero dependiente del NFAT5, Ore-luc, se ha descrito previamente (68), el del TNF α -luc fue proporcionado por Anjana Rao y descrito previamente (158), el del iNOS-luc fue proporcionado por Santiago Lamas (Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, Madrid) el del HIV-luc se describió previamente (159) y el del 6kB-Luc fue proporcionado y descrito previamente por Pura Muñoz (160). El control de transfección, TK-Renilla, proviene de Promega. La GFP-PKN1 y la GFP-PKN1-KD fueron proporcionadas por el Dr Peter Parker (161). Para la construcción de PKN1 con epítomos HA y Myc en su extremo amino-terminal, se substituyó la GFP por los epítomos respectivos. Brevemente, se cortó la construcción GFP-PKN1 y los vectores pCMV-HA y pCMV-Myc (Clontech) con los enzimas de restricción SnaBI y XhoI, y se unieron el fragmento corto de la digestión del PKN1-GFP con el fragmento largo de los vectores, defosforilados previamente con fosfatasa alcalina. Los RNAs interferentes para la GFP, y la lamina A/C se han descrito previamente (162) y el del NFAT5 fue proporcionado por Cristina López-Rodríguez, y a partir de su vector vacío, el pBSU6, se ha generado el de la PKN1, utilizando como diana la secuencia de 21 nucleótidos 5'-GGG AGC TGT TCG CCA TCA AGG-3' (secuencia codificante) de la variante 2 (NM_002741) de la PKN1. Los oligonucleótidos utilizados para el clonaje fueron: 1a 5'-ggA gCT gTT CgC CAT CAA ggA-3'; 1b 5'-AgC TTC CTT gAT ggC gAA CAg CTC C-3'; 2a AgC TTC CTT gAT ggC gAA CAg CTC CCT TTT Tg-3'; y 2b 5'-AAT TCA AAA Agg gAg CTg TTC gCC ATC AAg gA-3'. Para la primera fase del clonaje, se cortó el vector pBSU6 con ApaI, se eliminaron los extremos protuberantes con Klenow y posteriormente se cortó con HindIII. Se unió el vector cortado con los oligonucleótidos 1a y 1b (previamente incubados para unirse por complementariedad) con una relación molar vector:inserto de 1:20 a 1:40. Para la segunda fase del clonaje, se cortó la construcción obtenida en la primera fase con los enzimas EcoRI y HindIII y se unió la construcción cortada con los oligonucleótidos 2a y 2b (previamente incubados para unirse por complementariedad), también con una relación molar vector:inserto de 1:20 a 1:40.

Para la unión de los pares de oligonucleótidos, se añadieron 10 μl de los oligonucleótidos (250 pmol/ μl) a un volumen final de 200 μl con agua bidestilada. Se incubaron 5 minutos en un bloque térmico (*heat block*) a 100 °C y se dejó enfriar gradualmente durante 30-60 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente (la concentración final aproximada es de 25 pmol/ μl). Para comprobar la inserción de los oligonucleótidos en las dos fases de las construcciones, éstas se cortaron con BamHI y XhoI en la primera fase y con HindIII y SacI en la segunda, las digestiones se corrieron en un gel de agarosa del 2%, y se comprobó una disminución de la movilidad electroforética en las construcciones que incorporaron los oligonucleótidos (376 pb frente a 324 pb sin inserto en la primera fase, y 90 pb frente a 70 pb sin inserto en la segunda fase).

Transfectantes estables.

Transfección de Myc-NFAT5-GFP en HEK-293. Primero se transfectaron los plásmidos transitoriamente por fosfato cálcico (163). Brevemente, se añadieron 24 μg del plásmido a 500 μl del tampón HBS1X (25 mM HEPES pH 7,1, 50 mM KCl, 140 mM NaCl, 6 mM Glucosa y 0,7 mM Na_2HPO_4), se añadieron 30 μl de CaCl_2 2,5 M, se mezcló bien y después de 20 minutos a temperatura ambiente se añadió la solución a las células (1×10^6 células con 10 ml de DMEM en placas de cultivo de 10 cm). A las 48 horas se replaquearon las células a baja confluencia y se añadió el antibiótico de selección (G418) a una concentración de 1 mg/ml. Una vez se obtuvieron colonias crecidas se procedió a una dilución límite para obtener clones del transfectante estable. Los clones resistentes se analizaron por citometría de flujo y *Western blot* para verificar la expresión de la proteína recombinante.

Transfección de pOZ-N (HA-FLAG-NFAT5) en Phoenix ECO. Las células se transfectaron por fosfato cálcico. El vector en el que se clonó el HA-FLAG-NFAT5, el pOZN (157), presentaba la proteína recombinante, y a continuación un marcador de selección (CD25) que se expresaba conjuntamente mediante un IRES. La selección se realizó mediante bolas magnéticas (dynabeads, de Dynal), acopladas a un anticuerpo anti-CD25 (hibridoma MAR-108 (164)). Tras varias rondas de selección, las células se analizaron para la presencia del marcador de superficie por citometría de flujo y por *Western blot* para la detección del NFAT5 recombinante, y a continuación se procedió a una dilución límite para obtener clones del estable.

Anticuerpos. Los anticuerpos anti-Myc y anti-HA disponibles en el laboratorio provenían de los hibridomas 9E10 y 12CA5, respectivamente. El anti-FLAG M2 era de Sigma, y el anti-GFP JL8 de BDBiosciences. El policlonal de conejo anti-NFAT5

humano era de Affinity Bioreagents (Goleen, CO, USA, catálogo PA1-023) y reconoce el epítipo carboxilo-terminal (DLLVSLQNQGNNLTGSF). El anticuerpo policlonal de conejo para el extremo amino-terminal del NFAT5 humano se generó contra los aminoácidos 2-177 y el que reconoce el dominio de unión a DNA del NFAT5 humano (DBD5) se generó contra los aminoácidos 175-471 (2). El anticuerpo policlonal de conejo anti-albúmina humana era de Sigma (A0483) El anticuerpo de cabra anti-piruvato quinasa (AB1235) era de Chemicon (Hampshire, UF). Los policlonales de conejo anti-I κ B- α (C21) y anti-NOS2 (M19) eran de Santa Cruz Biotechnology. Y los monoclonales de ratón anti-p38 fosforilado (pT189/pY182), anti-ERK1/2 fosforilado (pT202/pY204) y anti-JNK/SAPK fosforilado (pT183/pY185) eran de BD Biosciences. El anticuerpo anti-IgG de cabra acoplado a HRP (catálogo P010.60) era de DAKO (Glostrup, Denmark) y los anti-IgG de ratón (catálogo NA931V) y conejo (catálogo NA934V) acoplados a HRP eran de Amersham (Buckinghamshire, UK). El reactivo de quimioluminiscencia (ECL) era de Pierce.

Inmunoprecipitación y *Western blot*. Para las inmunoprecipitaciones, se utilizó proteína G-Sefarosa (Amersham Biosciences) previamente incubada con los anticuerpos, que se añadió al lisado y se incubó hasta el día siguiente. Se realizaron 4 lavados consecutivos en tampón de lavado (tampón de lisis sin inhibidores de proteasas) tras lo cual las bolas de proteína G-sefarosa se hirvieron 5 minutos en tampón Laemmli (165) para proceder a la electroforesis desnaturalizante y *Western blot*.

Para la detección de proteínas por *Western blot* en la línea RAW 264.7 las células se lisaron en tampón de lisis con Tritón-X-100 1%, Hepes pH 7,4 40 mM, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, NaPPi 10 mM, β -glicerofosfato 10 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina/Aprotinina 5 μ g/ml y Pepstatina A 1 μ g/ml. En algunos experimentos se utilizó NaF 10 mM y ortovanadato sódico 10 mM. Se cuantificaron los niveles de proteína de los lisados con el ensayo de BCA de Pierce (catálogo 23227) para cargar la misma cantidad de proteína en los geles de poliacrilamida de SDS.

Ensayos de elución ácida y con péptido. Para los ensayos de elución ácida se utilizó un tampón de Glicina (Glicina 50 mM, Tritón 0,1% y NaCl 150 mM) ajustando el pH con HCl 1N. Para la elución con péptido Myc (secuencia H-EQKLISEEDL-NH₂), durante el día anterior se incubó el lisado celular (5x10⁶ células) con proteína G-sefarosa unida al anticuerpo anti-Myc. Después de 2 lavados se añadió una curva de péptido (0, 1, 10 y 100 μ g) en un volumen de 1 ml durante 2-4 horas para eluir la proteína unida al anti-Myc. El eluido y una muestra del lisado se resolvieron en geles

de poliacrilamida y SDS y se analizó la cantidad de proteína por *Western blot*. Para la elución con péptido HA (secuencia H-YPYDVPDYA-NH₂) el procedimiento fue similar, con una curva de péptido de 0, 5, 50 y 500 µg/ml.

Inmunofluorescencia. 5×10^5 células se plaquearon en placas de 12 pocillos con cubreobjetos incubados previamente con colágeno (Sigma, catálogo C8919) a una concentración de 0,1 µg/ml en una solución de ácido acético 0,02 N (Sigma) e irradiados con luz ultravioleta para esterilizarlos. A las 24 horas las células se estimularon y a las 18 horas se procedió a la inmunofluorescencia. Las células se fijaron durante 20 minutos en una solución de paraformaldehído al 3% (en tampón fosfato pH 7,4, 0,1 M). Posteriormente se permeabilizaron en un tampón de lavado con NP-40 al 0,5% (Sigma) en PBS, y se bloquearon con el tampón de bloqueo (10% suero fetal bovino, en tampón de lavado) durante 20 minutos. El anticuerpo primario se incubó durante 2 horas en tampón de bloqueo (para anti-HA y anti-Myc se utilizó una dilución 1:50 de sobrenadante de cultivo de los hibridomas 12CA5 y 9E10, respectivamente) y el anticuerpo secundario se incubó durante una hora en tampón de bloqueo (anticuerpo de conejo anti IgG de ratón marcado con Cy3, 1:400). Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio LEICA DMBR.

Columna de afinidad. Para preparar 1 ml de columna, se incubó 1 ml de Proteína G-Sepharosa, previamente lavada con tampón borato pH 9 (200 mM de tetraborato sódico decahidrato, de Sigma), con 200 ml de sobrenadante de cultivo del hibridoma 12CA5 (anti-HA) ó 9E10 (anti-Myc) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La columna se lavó nuevamente con tampón borato, y se incubó durante 30 minutos con el *cross-linker* irreversible DMP (dimetil-pimelimidato, Sigma) 20 mM en tampón borato. Para inactivar el exceso de DMP la columna se lavó dos veces con una solución de Tris 100 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM y se dejó incubando en rotación a 4° C hasta el día siguiente. La columna se almacenó en PBS en una proporción al 50% de columna con un 0,1% de azida sódica a 4 °C.

Purificación del NFAT5 a gran escala. Células de Phoenix ECO (parental) o del estable con HA-FLAG-NFAT5 se trataron durante 2 horas en medio hipotónico (280 mOsm/Kg) o hipertónico (500 mOsm/Kg). El medio hipertónico se preparó añadiendo 100 mM de NaCl al medio de cultivo. Las células se tripsinizaron, lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis con CHAPS junto con la adición de DSP (0,25 mg/ml) a una concentración de 5×10^6 células/ml, durante 30 minutos a 4 °C. El exceso de *cross-linker* se inactivó con 0,1 M de Tris pH 7,4. Posteriormente se añadió DNasa I 10 mg/ml final y el lisado se sonicó para acabar de fragmentar los restos celulares. Para

eliminar proteínas y complejos susceptibles de causar interacciones inespecíficas, se incubó el lisado con una columna de afinidad anti-Myc en rotación a 4 °C hasta el día siguiente. Después, el sobrenadante del lisado se incubó con la columna anti-HA en rotación a 4 °C hasta el día siguiente (lisado de $2,5 \times 10^6$ células/10 μ l de columna anti-HA). La columna se lavó con tampón de lisis con TX-100, se incubó con péptido HA (2,5 μ g HA/10 μ l de columna) en tampón de tritón durante 5 horas. Se recogió el eluido, se hirvió 5 minutos con tampón Laemmli y se cargó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida en gradiente del 5 al 20%.

Tinción de plata y azul de Coomassie de geles de poliacrilamida. Para la tinción del Coomassie coloidal se utilizó la tinción GelCode Blue de Pierce (catálogo 24590) y se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante. Para la tinción de plata compatible con espectrometría de masas, se siguieron las instrucciones dadas por el grupo de proteómica de la Universidad. Brevemente, se fijó el gel durante un mínimo de 3 horas (etanol 40% y ácido acético 10%, en agua bidestilada), se lavó (agua bidestilada 5 minutos) y se procedió a la sensibilización (con 10,2 g de acetato sódico y 0,45 g de tiosulfato sódico pentahidratado por cada 150 ml, en 30% de etanol) durante una hora. Después de varios lavados durante una hora en agua bidestilada se añadió la reacción de plata (150 mg de nitrato de plata por cada 150 ml de agua bidestilada) durante 30 minutos, se lavó tres veces con agua bidestilada y se añadió la solución para resolver (4,5 g de carbonato sódico y 37,5 μ l de formaldehído al 37% para 150 ml de agua bidestilada) durante 3-5 minutos. Una vez aparecieron las bandas de proteína se lavó el gel y se añadió la solución de parada (2,2 g de EDTA para 150 ml de agua bidestilada).

Transfección de la línea RAW 264.7 y ensayo de luciferasa. Las células RAW 264.7 se transfectaron por electroporación. 10×10^6 células en 0,4 ml de RPMI por cubeta (4 mm, Isogen) se electroporaron en un Gene Pulser II (BIO-RAD) con 20 μ g de DNA a 320 V y 975 μ F, dando una constante de tiempo de 20-22 milisegundos. Para los experimentos de genes reporteros, las células se lisaron en tampón de lisis (PLB de Promega) a 5×10^6 células/ml y se midió la actividad luciferasa y renilla en un luminómetro (FB12 Berthold). Se añadió 10 μ l del lisado a 10 μ l del reactivo LAR II (Promega) para medir la actividad luciferasa, y a continuación 10 μ l del reactivo Stop&Glo (Promega) para la actividad Renilla. Para normalizar los puntos, además del control de transfección (mediante el gen reportero TK-Renilla), se analizó la viabilidad celular midiendo la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el lisado celular, con el ensayo "*CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*" (Promega, catálogo

G1780). A 5-10 μl de lisado se le añadieron 25-50 μl del reactivo de ensayo (*substrate mix*) durante 2-5 minutos hasta observar un color rojo en las muestras. La reacción se paró con 25-50 μl de la solución de parada (ácido acético 1 M). Las muestras se midieron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Obtención y cultivo de células primarias (esplenocitos, macrófagos peritoneales y los BMDM). Para la obtención de esplenocitos, se extrajo el bazo de los ratones, se disgregó el tejido con un separador celular con un tamaño de poro de 70 μm (BD Falcon, catálogo 352350), y se separaron las células muertas y no leucocitarias por sedimentación en gradiente con Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS) (166). Para la extracción de macrófagos peritoneales, se inyectaron 5 ml de PBS frío en la cavidad peritoneal. Tras un minuto se recuperó el PBS con las células peritoneales, se repitió el procedimiento y las células recuperadas en PBS se centrifugaron a 4 °C y se plaquearon a $1-2 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 96 pocillos (Corning) en 100-200 μl de DMEM. Para la obtención de macrófagos derivados de médula ósea se perfundieron con medio incompleto los fémures y tibias de los ratones con jeringuillas de insulina de 1 ml y agujas 25G. Las células se plaquearon en 4 placas no tratadas para cultivo celular de 15 cm con 40 ml de medio DMEM, un 70% con medio fresco y un 30% de medio condicionado de la línea L929, como fuente de M-CSF.

Citometría de flujo. 2×10^5 células se bloquearon 20 minutos con una solución de PBS, 3% de suero fetal bovino (FCS) y anticuerpo anti-receptor- $\text{FC}\gamma$ (catálogo 553142 de BD Biosciences). Después de lavar las células con PBS se incubaron otros 20 minutos con los anticuerpos para marcadores de superficie indicados en PBS con 3% de FCS. Los anticuerpos para marcadores murinos B220-FITC (catálogo 553088), CD69-PE (catálogo 55237), CD11b-FITC (catálogo 553310), CD11c-PE (catálogo 557401) y CD4-PE (catálogo 553048) eran de BD Biosciences. Para los anticuerpos se usó 1 $\mu\text{g}/10^6$ células. Las poblaciones celulares se determinaron usando el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

RT-QPCR. Los BMDM de ratón se lisaron con en tampón de lisis RLT y se extrajo el RNA usando el ensayo RNeasy (catálogo 74104, QIAGEN). Después de comprobar la integridad del RNA con un bioanalyzer, se convirtió a DNA complementario con el kit de síntesis de cDNA (Invitrogen, catálogo 11904-018). Para la PCR cuantitativa en tiempo real, se utilizó una pre-mezcla de SybrGreen (Power SYBRGreen PCR master mix, catálogo 4367659, Applied Biosystems) y el aparato ABI7900HT (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La secuencia de los cebadores utilizados está descrita más adelante.

ELISA. Las citoquinas secretadas al medio se midieron por ELISA. Se midieron el TNF α (Pharmingen, catálogo 555268 para la RAW 264.7 y R&D, catálogo DY410 para los BMDM), IL6 e IL12 β (R&D, catálogo IL6 DY406 e IL12 β DY2398).

Medida de los niveles de nitrito. El sobrenadante de células cultivadas en DMEM se analizó mediante el ensayo de Griess de cuantificación de nitrito (Molecular Probes, catálogo G7921). En placas de 96 pocillos se añadieron 50 μ l de medio, 90 μ l de agua bidestilada y 10 μ l de la mezcla de reactivo A + B del ensayo. Tras 30 minutos de reacción las muestras se midieron en un espectrofotómetro a 550 nm.

Inmunoprecipitación de cromatina. Para la detección del NFAT5 unido al promotor del gen iNOS se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, basados en el protocolo de Abcam con modificaciones. Los BMDM en placas de 15 cm de bacterias (20 ml) se fijaron con formaldehído (0,75% final) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El exceso de *cross-linker* se inactivó con 3 ml de glicina 2,5 M durante 5 minutos. Después de lavar con PBS frío se recogieron las células en PBS con PMSF 1 mM con recogedores celulares (*scrapers*, Costar catálogo 3010). Las células se lisaron con 0,75 ml de tampón de lisis por placa (HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM pH 8, TX-100 1%, deoxicolato sódico 0,1%, SDS 0,1%, PMSF 1 mM, leupeptina/aprotinina 5 μ g/ml y pepstatina A 1 μ g/ml) durante 30 minutos en hielo. A continuación el lisado se sonicó (sonicador Branson modelo 250, Branson Sonic Power, Danbury, CT) durante cinco ciclos de 10 segundos con frecuencia constante e intensidad 4, para obtener fragmentos de DNA de entre 500-1000 pares de bases. Después de centrifugar la muestra se apartó un 5% para comprobar el tamaño del DNA sonicado y como control de carga. El resto se diluyó diez veces con tampón de dilución (TX-100 1%, EDTA 2 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, PMSF 1 mM, leupeptina/aprotinina 5 μ g/ml y pepstatina A 1 μ g/ml). Se realizaron dos pre-aclaramientos de la muestra con bolas de proteína A-sefarosa (catálogo 17-0780-01 de Amersham), preabsorbidas previamente con DNA de esperma de salmón, (catálogo 11 467 140 001 de Roche) 1 hora a 4 $^{\circ}$ C en agitación. Posteriormente se añadieron 3 μ g de anticuerpo anti-NFAT5 o anti-albúmina humana (Sigma A0483) o suero preinmune (de los conejos de los que procedían los anticuerpos utilizados) en agitación a 4 $^{\circ}$ C hasta el día siguiente. Se añadieron después bolas de proteína A-sefarosa 1 hora a 4 $^{\circ}$ C en agitación. Finalmente se lavaron las bolas 3 veces con tampón de lavado (SDS 0,1%, TX-100 1%, EDTA 2 mM pH 8, NaCl 150 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8) y una vez con tampón de lavado final (SDS 0,1%, TX-100 1%, EDTA 2 mM pH 8, NaCl 500 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8).

Para eluir el DNA de las bolas, éstas se incubaron con tampón de elución (SDS 1% y NaHCO₃ 100 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. La reversión del *cross-linking* tanto de la muestra final como del input (5% de la muestra apartada inicialmente como control de carga) se realizó añadiendo 2µl de RNAsa libre de DNAsa (catálogo 11 119 915 001 de Roche) y calentando la muestra 4-5 horas a 65° C en un tampón con SDS 1% y bicarbonato sódico 100 mM. El DNA se purificó con el ensayo de purificación de los productos de PCR (catálogo 28104, QIAGEN).

Diseño de los cebadores. Los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa en tiempo real fueron:

1) Expresión de genes (mRNA):

L32

FORWARD: 5' ACC AgT CAg ACC gAT ATg Tg 3' (20nt, 50% GCs)

REVERSE: 5' ATT gTg gAC CAg gAA CTT gC 3' (20nt, 50% GCs)

Fragmento amplificado: 176 pares de bases

NFAT5

FORWARD: 5' CAg CCA AAA ggg AAC Tgg Ag 3' (20nt, 50% GCs)

REVERSE: 5' gAA AgC CTT gCT gTg TTC Tg 3' (20nt, 50% GCs)

Fragmento amplificado: 173 pares de bases

TNF α

FORWARD: 5' TCg TAg CAA ACC ACC AAg Tg 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' ggA gTA gAC AAg gTA CAA CC 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 134 pares de bases.

IL6

FORWARD: 5' gAA gTT CCT CTC TgC AAg Ag 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' ggT ATA gAC Agg TCT gTT gg 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 139 pares de bases.

IL12 β

FORWARD: 5' AgA TgA Agg AgA CAg Agg Ag 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' ACT TgC TgC ACg Agg AAT Tg 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 138 pares de bases.

RANTES

FORWARD: 5' TTC TAC ACC AgC AgC AAg Tg₃' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' CTC TAT CCT AgC TCA TCT CC 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 133 pares de bases.

iNOS

FORWARD: 5' TCA TgA CAT CgA CCA gAA gC 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' ggA CAT CAA Agg TCT CAC Ag 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 146 pares de bases.

COX2

FORWARD: 5' TCT CCA ACC TCT CCT ACT AC 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' ACT CTC TCC gTA gAA gAA CC 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 135 pares de bases.

2) ChIP (promotores):

pL6upstream

FORWARD: 5' AgA TAg CCA AgA gAC CAC Tg 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' TgT gCA gTT gTT TCC Agg Ag 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 138 pares de bases.

pL6downstream

FORWARD: 5' ATg CTC AAg TgC TgA gTC AC 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' gAT TgC ACA ATg TgA CgT Cg 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 143 pares de bases.

piNOS

FORWARD: 5' TCC ATg CCA TgT gTg AAT gC 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' AgC CTg gTC TAC AgA gTA Ag 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 136 pares de bases.

Exón 5 del NFAT5 (control negativo):

FORWARD: 5' gCg AgA TgA TgT CAC TTC Ag 3' (20nt, 50% GCs).

REVERSE: 5' gTg gAA gTT TgA CTg Tgg AC 3' (20nt, 50% GCs).

Fragmento amplificado: 169 pares de bases.

Producción de citoquinas *in vivo*. Se inyectó LPS (5 µg/g ratón) intraperitoneal y al cabo de 60 minutos se extrajo sangre de los ratones por sangrado de la cola, se aisló el suero y se midieron los niveles de citoquinas por ELISA.

RESULTADOS

Problemática de la identificación de proteínas asociadas al NFAT5

El objetivo inicial de nuestro proyecto fue identificar el patrón de proteínas asociadas al NFAT5 como estrategia para caracterizar mecanismos de regulación de este factor de transcripción.

A la hora de diseñar un abordaje que permita identificar el patrón de proteínas asociadas al NFAT5 hemos tenido en cuenta distintas observaciones:

1) Los dominios del NFAT5 (amino-terminal, dominio de unión a DNA y carboxilo-terminal) por sí solos no reproducen la regulación de la proteína completa (68). En este sentido, el dominio de unión a DNA necesita de la región carboxilo-terminal para activar la transcripción de genes diana. Por otra parte, la región carboxilo-terminal necesita ser dimérica para funcionar. Estas observaciones indican que hemos de utilizar la forma del NFAT5 completa para aislar proteínas asociadas ya que usando fragmentos de la misma se podrían perder interacciones relevantes o identificar interacciones artefactuales.

2) El NFAT5 es específico de vertebrados (66). Además, se desconocen los mecanismos postraduccionales que regulan este factor. Por tanto, abordajes como el doble híbrido en levaduras o purificar por afinidad usando el NFAT5 recombinante producido en bacterias, levaduras o células de insecto acarrea la incógnita importante de que el entorno celular de los organismos utilizados no reproduzca modificaciones postraduccionales relevantes en la regulación del NFAT5 en células de mamífero.

Por estas consideraciones optamos por purificar el NFAT5, y sus proteínas asociadas, directamente de células de mamífero en condiciones bien establecidas de reposo y activación de este factor (condiciones isotónicas e hipertónicas).

1. Estrategia de purificación de proteínas asociadas al NFAT5

Para purificar el complejo de proteínas asociado al NFAT5 y determinar la composición del mismo seguimos la estrategia resumida en el **esquema 1**, que consistió en:

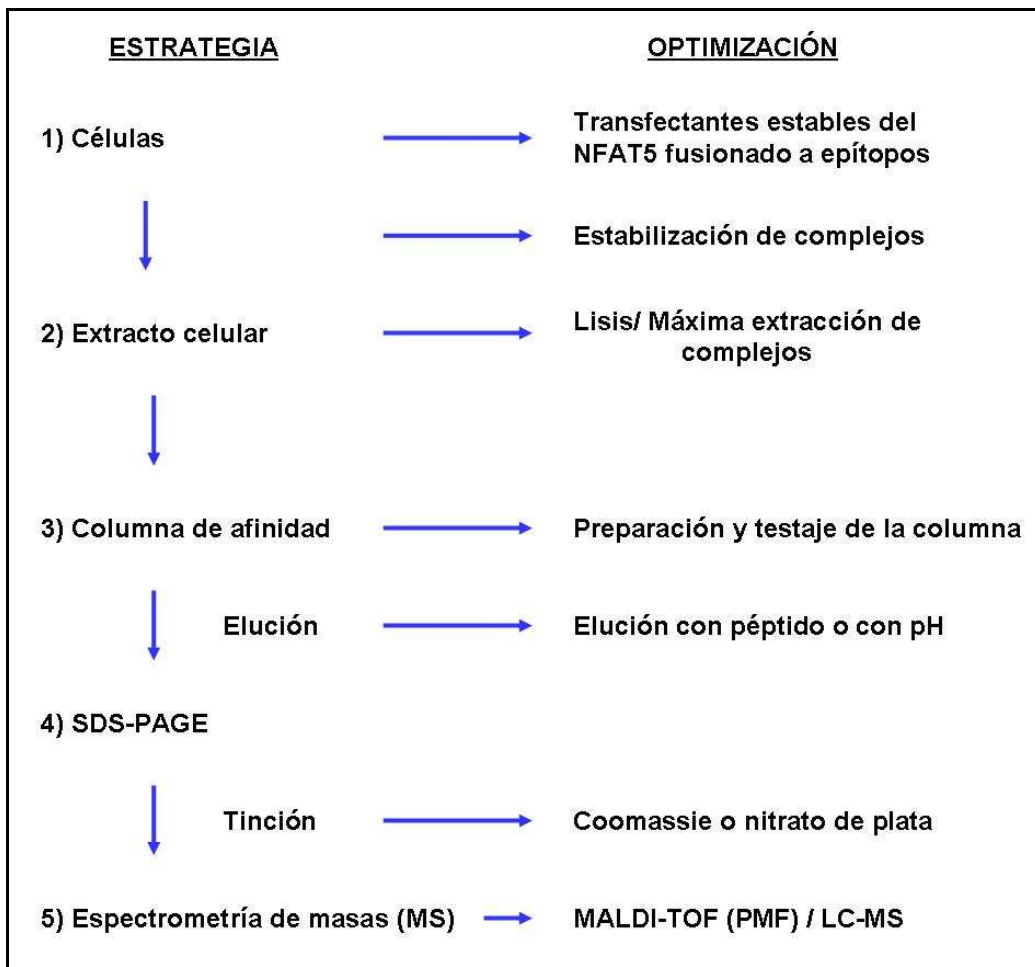
1) Obtención de líneas transfectantes estables que expresaran el NFAT5 fusionado a epítopos y caracterización de estas líneas para determinar el comportamiento del NFAT5 transfectado respecto al endógeno.

2) Puesta a punto de las condiciones de estabilización de complejos multiproteicos mediante cross-linkers y métodos de lisis para maximizar la extracción de complejos del NFAT5.

3) Preparación y validación de la columna de afinidad y los métodos específicos de elución de los complejos purificados.

4) Tinción de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida utilizados para la resolución y separación de las proteínas asociadas.

5) Caracterización de las bandas específicamente purificadas por espectrometría de masas por MALDI-TOF o por LC-MS-MS.



Esquema 1. Estrategia de purificación de proteínas asociadas al NFAT5.

2. Optimización de las condiciones de copurificación de proteínas asociadas al NFAT5 a pequeña escala

En la purificación de proteínas asociadas al NFAT5 empleamos agentes entrecruzantes (*cross-linkers*) con el fin de que permitieran mantener la máxima proporción de complejos y fueran a su vez compatibles con métodos de purificación por columna de afinidad.

Se probaron diferentes métodos de lisis, utilizando detergentes / agentes desnaturizantes fuertes (SDS, UREA) y detergentes suaves (TX-100, CHAPS) así como métodos de lisis mecánica (DOUNCE).

Para estabilizar los complejos moleculares en los que forma parte el NFAT5, usamos *cross-linkers*. Éstos se emplean de modo rutinario en inmunoprecipitaciones de cromatina (ChIP) para encontrar interacciones entre factores de transcripción, histonas y el DNA (167). Sin embargo, también se ha descrito su utilización para facilitar la identificación de interacciones moleculares débiles (168-170).

Los *cross-linkers* son compuestos químicos cuyos extremos presentan grupos reactivos capaces de unirse covalentemente a diversas cadenas laterales de los aminoácidos. Se distinguen y clasifican por su selectividad con los grupos reactivos, por la repetición o no de sus grupos reactivos a cada extremo (homo o heterobifuncionales, respectivamente), por la longitud de su brazo espaciador que separa los grupos reactivos, por su solubilidad, por su permeabilidad a través de membranas celulares y por su reversibilidad de unión (una buena fuente de información se puede encontrar en la página web de la casa comercial Pierce, www.piercenet.com).

El uso del *cross-linker* puede ser *in vitro*, siendo añadido después de lisar las células, o *in vivo*, en el que éste se incubaba con las células antes de lisarlas. Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes. El método *in vivo* permite estabilizar los complejos tal y como se presentan dentro de la célula, en su estado funcional. Es esperable la obtención de una mayor proporción de complejos nativos. Sin embargo la estabilización *in vivo* de complejos disminuye el rendimiento de la extracción de proteína y la recuperación global de los complejos es menor. La adición del *cross-linker* en el lisado estabiliza los complejos una vez son liberados al lisar las células. De esta forma es posible perder interacciones más débiles, pero la recuperación de proteína se incrementa. Es por ello que en el método *in vivo* se utilizan métodos de lisis fuertes (SDS o UREA), mientras que se opta por métodos más suaves (TX-100, CHAPS o DOUNCE) en el *cross-linking* es después de la lisis.

El *cross-linker* escogido en nuestra estrategia fue el ditiobis-succinimidilpropionato (reactivo de Lomant) o DSP. Éste es un compuesto permeable a la membrana, homobifuncional, es decir, con dos grupos reactivos equivalentes a ambos lados de la molécula, con capacidad de unión covalente a grupos amino distantes entre sí de unos 12 Å (principalmente lisinas). Este *cross-linker* es reversible ya que contiene un puente disulfuro que puede romperse con agentes reductores (ditiotreitól y β-mercaptoetanol).

También evaluamos otros *cross-linkers* más generales, como el glutaraldehído y el formaldehído, que forman puentes covalentes entre aminoácidos separados por distancias más cortas aunque de forma más inespecífica, y cuya unión es irreversible. Con estos agentes comprobamos si éramos capaces de estabilizar un mayor número de complejos que con el DSP.

Los ensayos de puesta a punto se realizaron principalmente en células HEK293T transfectadas transitoriamente (mediante el método del fosfato cálcico, ver materiales y métodos) con las construcciones Myc-NFAT5-GFP y Myc-NFAT5-ΔCter-GFP (delección del dominio carboxilo-terminal del NFAT5, también denominada ND5) (2). Para evaluar la especificidad del *cross-linking*, también se utilizaron las construcciones Myc-GFP (los dos epítomos utilizados en la construcción del NFAT5), DD5-GFP (dominio de dimerización del NFAT5) y DBD5-GFP (dominio de unión al DNA del NFAT5). Si el *cross-linking* es específico, deberíamos esperar que la construcción de Myc-GFP por sí sola no formara complejos ya que esta proteína no interacciona con otras proteínas de mamífero. Sin embargo las construcciones más pequeñas del NFAT5, que contienen el dominio de dimerización, deberían interaccionar con el NFAT5 completo para formar heterodímeros entre sí de diferentes tamaños. La **figura 13** muestra una representación esquemática de estas construcciones.

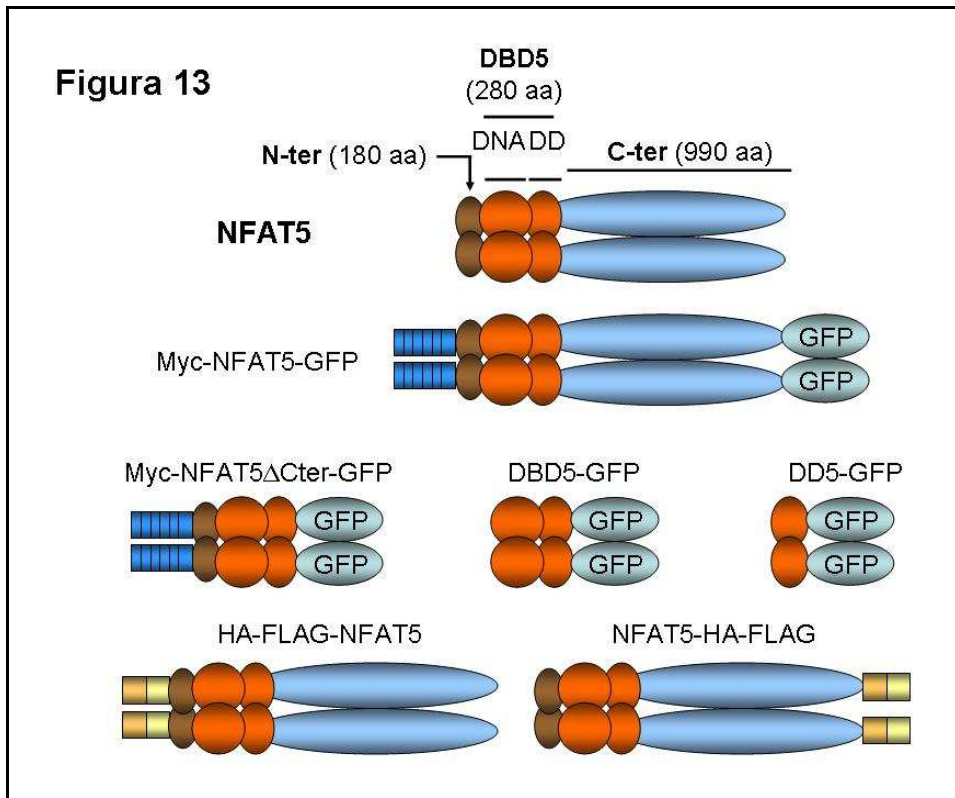


Figura 13. Representación esquemática de las construcciones del NFAT5 con sus epítomos utilizadas. Se muestra la longitud aproximada de aminoácidos (aa) de la región amino-terminal (N-ter) el dominio de unión a DNA (DBD5) y la región carboxilo-terminal (C-ter). DNA, región de unión al DNA; DD, dominio de dimerización). DD5, dominio de dimerización del NFAT5. GFP, proteína verde fluorescente. Myc, HA y FLAG, epítomos utilizados comúnmente en la construcción de proteínas para facilitar su reconocimiento mediante anticuerpos específicos.

En nuestros primeros experimentos empezamos evaluando la capacidad que tienen diversos métodos de lisis con diferentes concentraciones de DSP. Para determinar la eficacia del *cross-linker* comprobamos el retraso en la movilidad electroforética del NFAT5 mediante su visualización por la técnica del *Western blot*.

Así, el NFAT5 en su forma monomérica migra con un tamaño aparente de unos 200 KDa (110 KDa para la construcción que carece del dominio carboxilo-terminal, NFAT5 Δ Cter, fusionado a la GFP). Añadiendo *cross-linkers* en el lisado, se debería ver al menos la aparición del complejo dimérico, con una movilidad electroforética menor, de unos 400 KDa (200 KDa para la construcción carente del carboxilo-terminal).

Como muestra la **figura 14A-B**, utilizando concentraciones crecientes del *cross-linker* aumenta la proporción de complejos del NFAT5, a la vez que disminuye la de la proteína monomérica. Para ver estos complejos tuvimos que transferir no solamente el gel separador sino también el gel apilador (*stacking*).

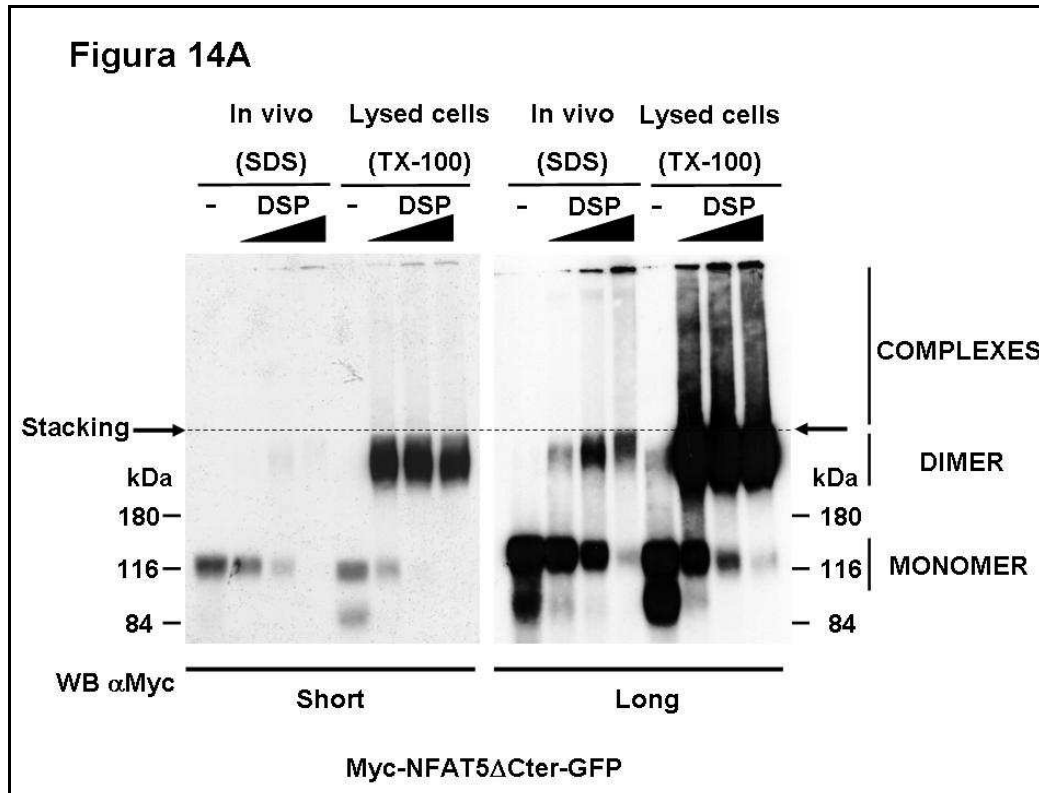


Figura 14A. Cross-linking del NFAT5. Células HEK293T se transfectaron con la construcción Myc-NFAT5ΔCter-GFP y se lisaron con *cross-linking in vivo* (DSP antes de lisis con SDS), o *in vitro* (DSP junto con lisis con TX-100), con diferentes concentraciones de DSP (ver materiales y métodos). Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida de SDS y se procedió a la visualización del NFAT5 mediante *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-Myc. Se muestran dos exposiciones, una corta y una larga, para comprobar las diferencias entre los dos métodos de *cross-linking*.

Cuando el cross-linking era *in vivo*, lisando con SDS después de añadir DSP, se apreció una mayor proporción de complejos de tamaño superior al dímero del NFAT5, que son detectables en el gel apilador, mientras que cuando el DSP se añadió al lisado, se consiguió una menor proporción de complejos de alto peso molecular.

También evaluamos la capacidad de otros *cross-linkers* como el glutaraldehído (GDA) y el formaldehído (FA) para estabilizar complejos del NFAT5, (**figura 14C**). Estos experimentos se realizaron añadiendo el *cross-linker* al lisado hecho con el detergente CHAPS. Como muestra la **figura 14B** tanto el glutaraldehído como el DSP son capaces de estabilizar complejos del NFAT5 de alto peso molecular, mientras que el formaldehído fue incapaz de estabilizar los complejos del NFAT5.

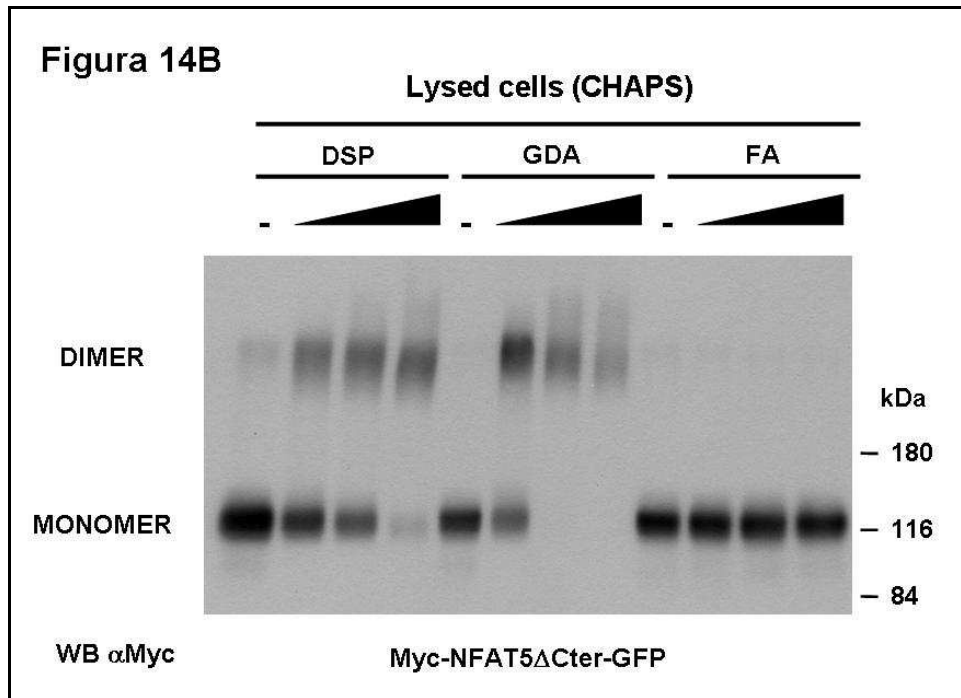


Figura 14B. Cross-linking del NFAT5. Células Phoenix se transfectaron con Myc-NFAT5 Δ Cter-GFP, se lisaron con CHAPS añadiendo el *cross-linker* en el lisado (*cross-linking in vitro*).

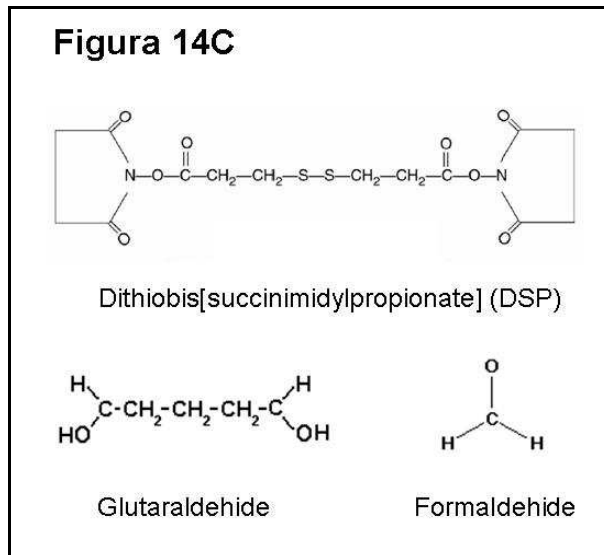


Figura 14C. Cross-linking del NFAT5. Estructura de los *cross-linkers* utilizados.

Para asegurarnos que el *cross-linking* afectaba a interacciones específicas, co-transfectamos construcciones del NFAT5 de diferentes tamaños esperando observar la formación de heterodímeros. Con las construcciones de NFAT5 Δ Cter se forman complejos diméricos además de complejos de mayor tamaño. Sin embargo, con NFAT5 Δ Cter más DD5 (dominio de dimerización) o DBD5 (dominio de unión al DNA) se forman otros complejos que corresponden a los heterodímeros de las dos construcciones, siendo menor la proporción de los homodímeros con NFAT5 Δ Cter, mostrando así que las interacciones que el *cross-linker* estabiliza son específicas (ver **figura 15A** para una representación esquemática y las **figuras 15B y C**).

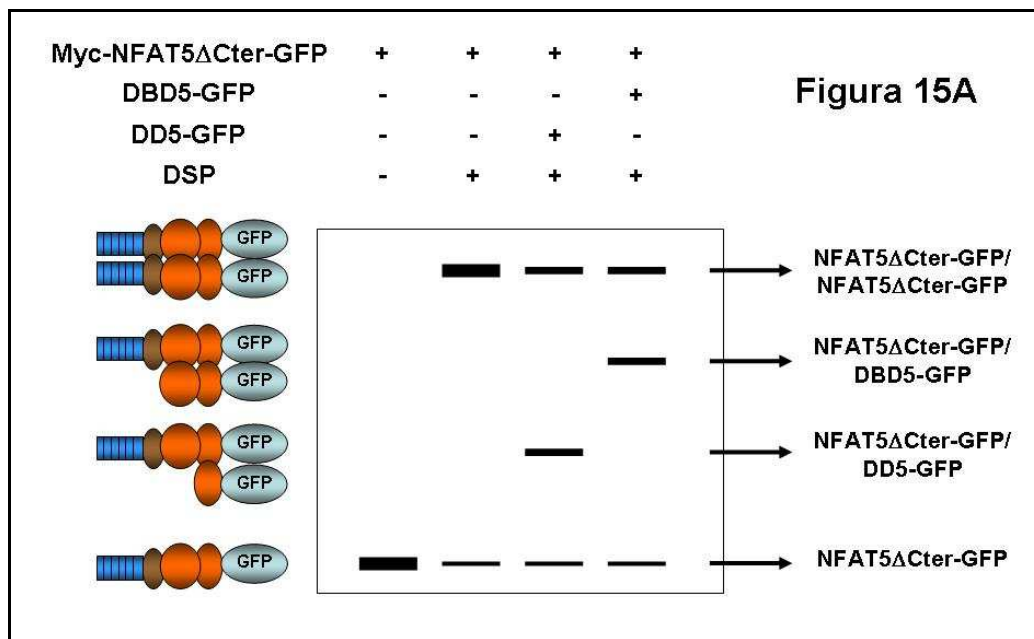


Figura 15A. Figura esquemática de las bandas esperadas transfectando diversas construcciones del NFAT5, lisando con CHAPS y DSP y detectando la construcción con el dominio carboxilo-terminal deletado, por *Western blot* con anticuerpos anti-Myc.

Las construcciones del NFAT5 que utilizamos para los ensayos presentaban epítomos Myc (6 copias, en posición amino-terminal) y/o GFP (una copia, en posición carboxilo-terminal). Para descartar que la estabilización de los complejos del NFAT5 mediante *cross-linkers* se produjera a través de los epítomos, comprobamos que éstos, por si solos, no formaban complejos, como muestran los carriles de la proteína quimérica Myc-GFP en la **figura 15B**.

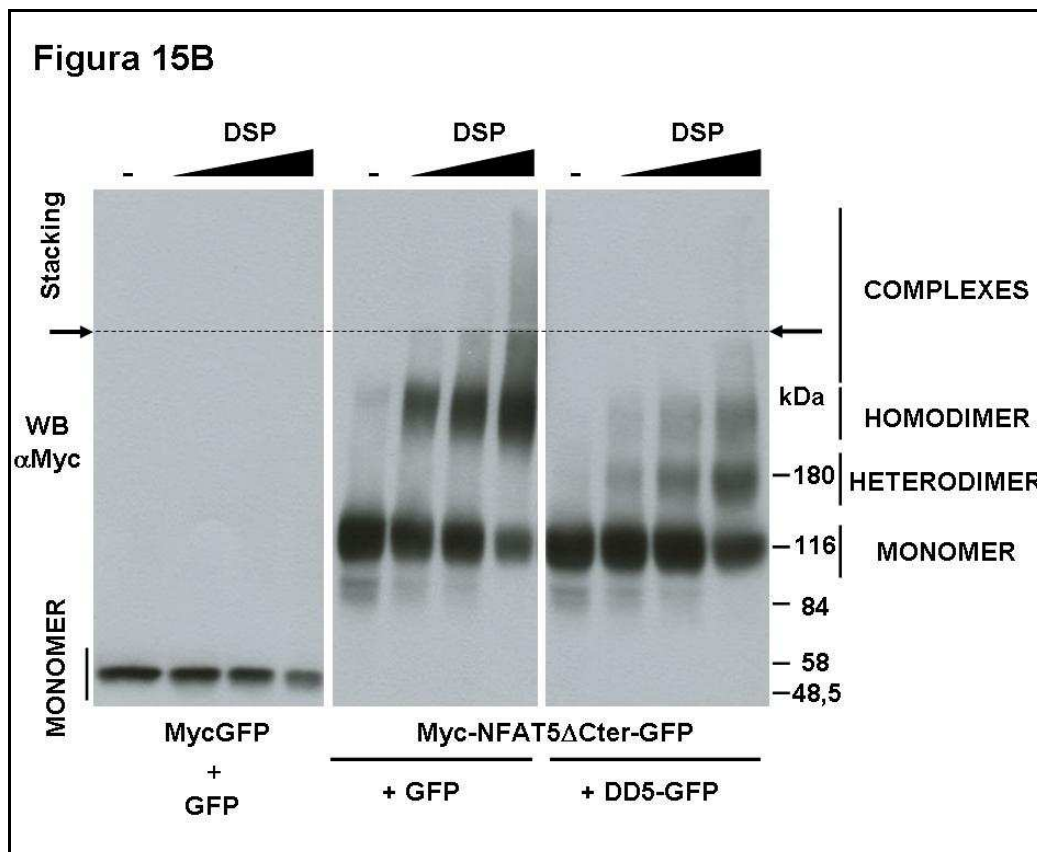


Figura 15B. El *cross-linking* del NFAT5 es específico. Células Phoenix se transfectoron con las construcciones Myc-GFP o Myc-NFAT5ΔCter-GFP junto con GFP o DD5-GFP. En estos experimentos se utilizó *cross-linking in vitro* en lisados con CHAPS. Las figuras muestran *Western blot* con anti-Myc. Se puede observar la aparición de heterodímeros formados por NFAT5ΔCter y DD5, con una movilidad electroforética mayor que el homodímero de NFAT5ΔCter.

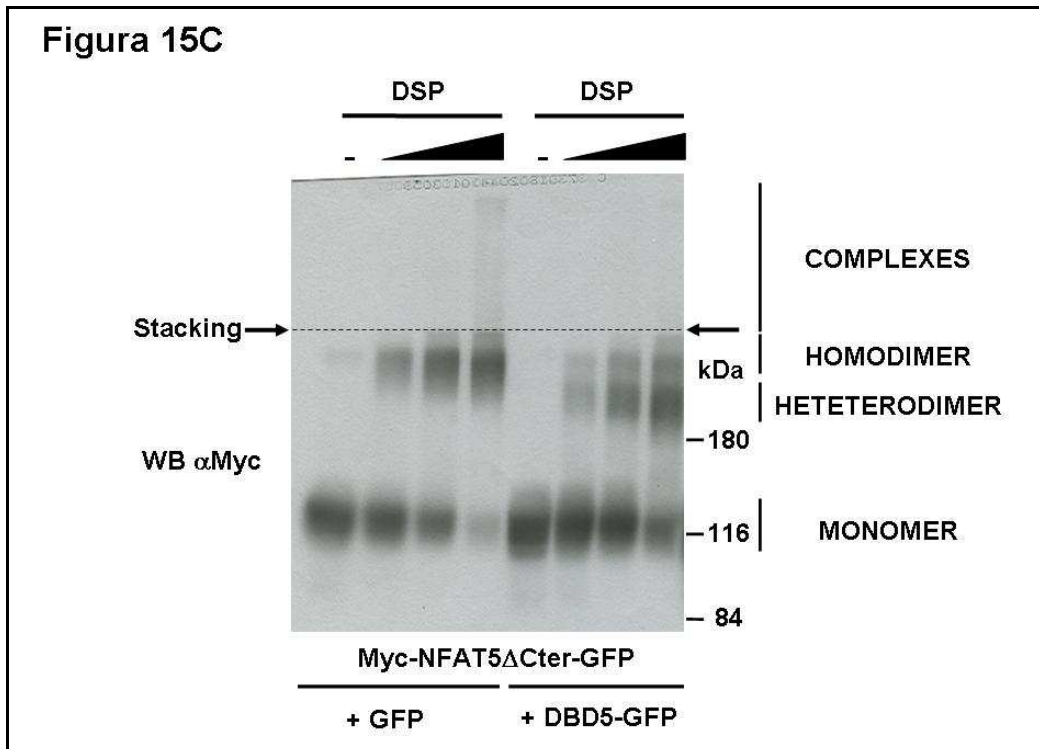


Figura 15C. El *cross-linking* del NFAT5 es específico. Experimento realizado como en la figura 3A pero cotransfectando Myc-NFAT5 Δ Cter-GFP con GFP o DBD5-GFP. Se puede comprobar que los heterodímeros formados por NFAT5 Δ Cter y DBD5 presentan una movilidad electroforética menor que los formados por NFAT5 Δ Cter con el dominio DD5 (figura 3A) (la construcción de DBD5 es mayor que la de DD5).

La construcción del NFAT5 que utilizamos para validar las condiciones fue la que carece del dominio carboxilo-terminal (NFAT5 Δ Cter), porque su menor tamaño permite apreciar mejor los complejos formados. Como muestra la **figura 15D**, la forma completa del NFAT5 también fue capaz de formar complejos de elevado peso molecular en las condiciones anteriormente mencionadas.

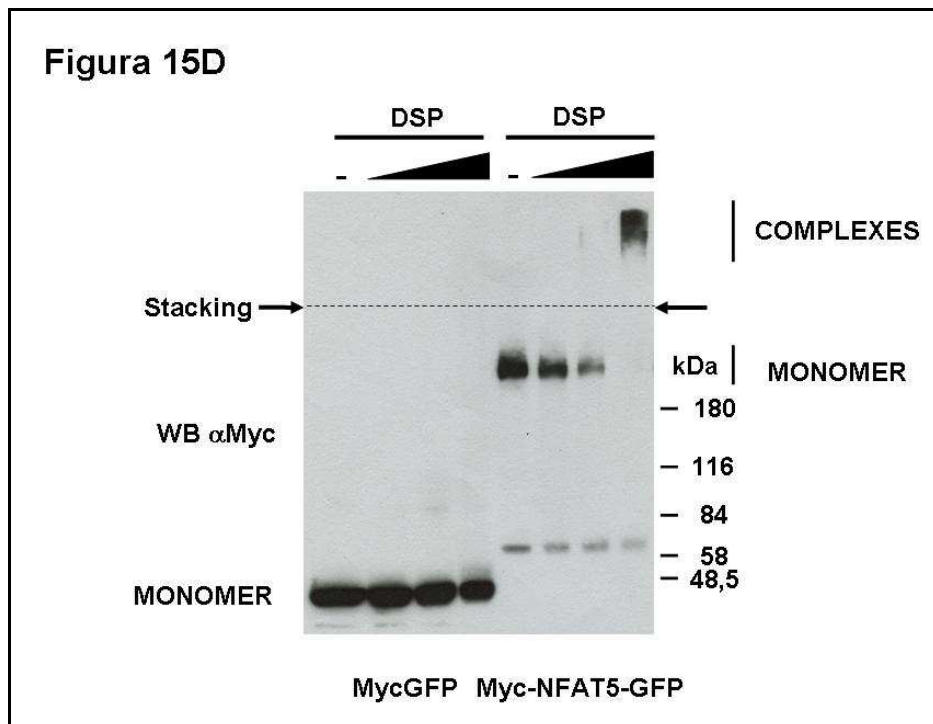


Figura 15D. El *cross-linking* del NFAT5 es específico. Experimento realizado en *cross-linking* con DSP en lisis con CHAPS en células transfectadas con las construcciones Myc-GFP o Myc-NFAT5-GFP.

El siguiente objetivo fue comprobar que las condiciones de *cross-linking* y lisis seleccionadas eran compatibles con la inmunoprecipitación de los complejos, mediante anticuerpos que reconocieran los epítomos fusionados al NFAT5.

Como muestra la **figura 16A**, las construcciones del NFAT5 con epítomos Myc podían de ser inmunoprecipitadas tras *cross-linking* con DSP en lisados con CHAPS.

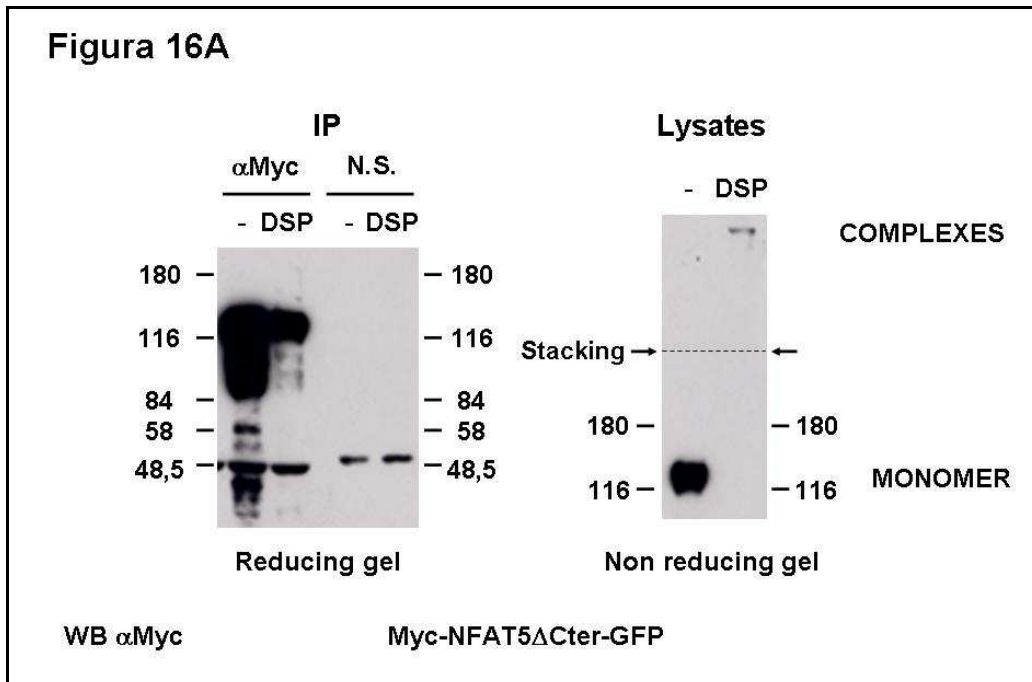


Figura 16A. El epítipo Myc es compatible con *cross-linking*. Inmunoprecipitación y *Western blot* anti-Myc de células Phoenix transfectadas con la construcción Myc-NFAT5ΔCter-GFP, con *cross-linking* con DSP en lisados con CHAPS. N.S. Anticuerpo no específico (anti-HA).

En cuanto a las construcciones del NFAT5 con epítipos HA y FLAG observamos cómo el epítipo HA sólo era reconocible por los anticuerpos cuando estaba dispuesto en el extremo amino-terminal, mientras que el epítipo FLAG fue reconocible independientemente de su posición, pero sólo en ausencia de *cross-linking* (en el epítipo FLAG hay una lisina, susceptible de ser modificada covalentemente por el DSP) (**figura 16B**). Así, para estas últimas construcciones, nuestro método de purificación de proteínas asociadas al NFAT5 fue compatible sólo con la utilización del NFAT5 fusionado al epítipo HA en el extremo amino-terminal.

Figura 16B

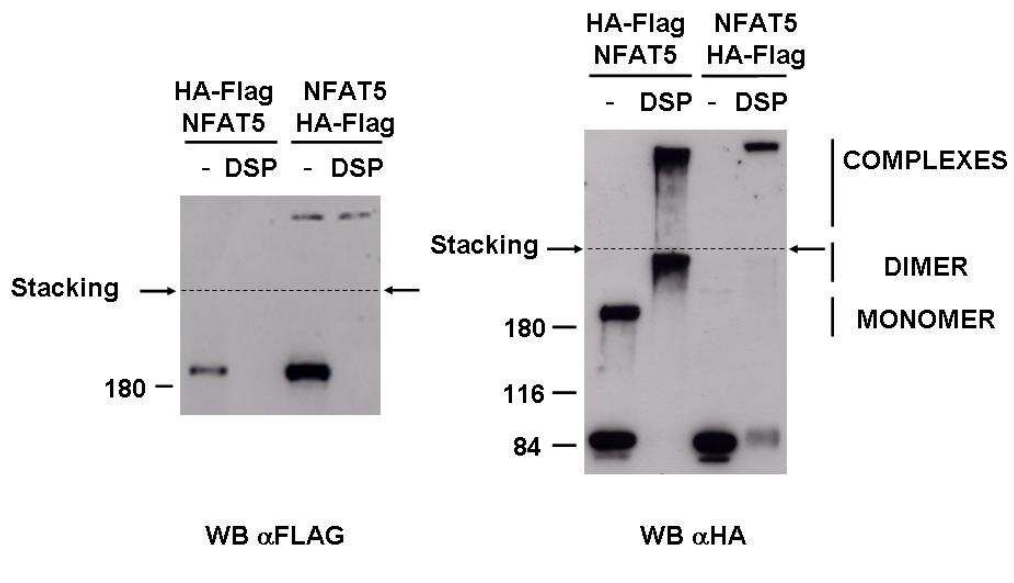


Figura 16B. El epítipo HA es compatible con cross-linking. *Western blot* con anticuerpos anti-HA o anti-FLAG de células Phoenix transfectadas con HA-FLAG-NFAT5 o NFAT5-HA-FLAG, tras *cross-linking* con DSP y lisis con CHAPS.

3. Obtención y caracterización de líneas transfectantes estables que expresan el NFAT5

Para poder purificar complejos asociados al NFAT5 a gran escala era necesario disponer de líneas celulares que expresaran de forma estable una forma del NFAT5 unida a epítomos. Decidimos generar líneas celulares estables en la línea de células T Jurkat y en HEK293T que expresaran la construcción Myc-NFAT5-GFP y HA-FLAG-NFAT5 (ver materiales y métodos).

En la línea Jurkat no fuimos capaces de obtener estables de estas construcciones. Finalmente, obtuvimos transfectantes estables en dos líneas: HEK293T con la construcción Myc-NFAT5-GFP y Phoenix (derivada de la HEK293T) con la construcción HA-FLAG-NFAT5.

Verificamos los niveles de expresión del NFAT5 en las dos líneas. En la **figura 17A** se puede observar que la línea estable en HEK293T expresa unos niveles de Myc-NFAT5-GFP comparables a los del NFAT5 endógeno (panel inferior), mientras que la línea en Phoenix expresa unos niveles de HA-FLAG-NFAT5 tres o cuatro veces mayores.

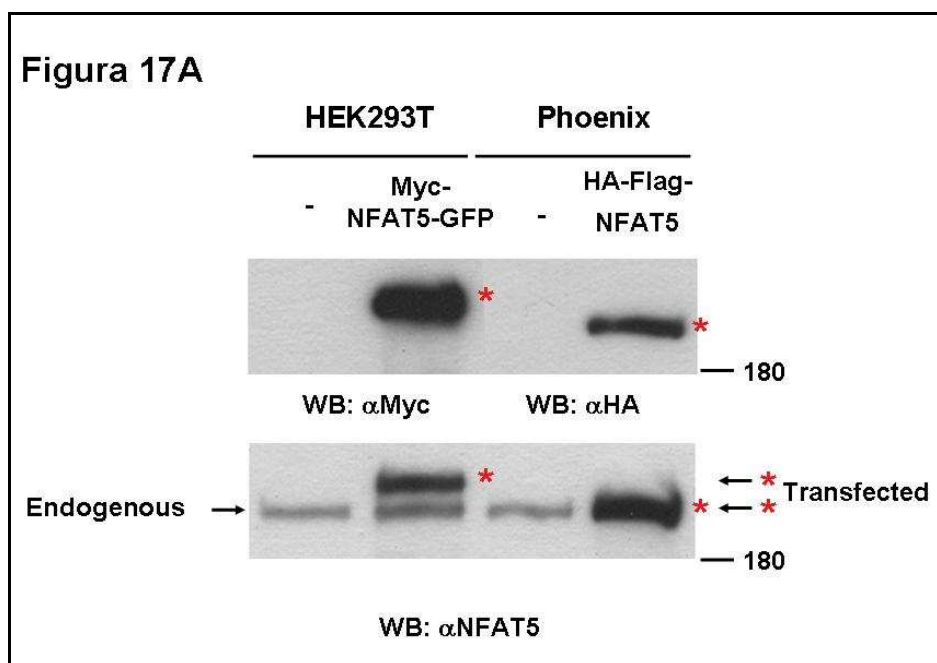


Figura 17A. Líneas estables del NFAT5. *Western blot* de transfectantes estables con Myc-NFAT5-GFP, y HA-FLAG-NFAT5, respectivamente (*), y células no transfectadas.

Sin embargo, en respuesta a estrés osmótico, los niveles del NFAT5 endógeno en el estable de HEK293T aumentan de 3 a 10 veces, mientras que los del recombinante se mantienen (**figura 17B**). En el estable de Phoenix, los niveles del NFAT5 endógeno aumentan en respuesta a estrés osmótico (**figura 17C**).

Estos resultados muestran que los niveles de expresión de las proteínas transfectadas son comparables a los del NFAT5 endógeno, disminuyendo la posibilidad de artefactos de interacción debidos a sobreexpresión de los transfectantes (171).

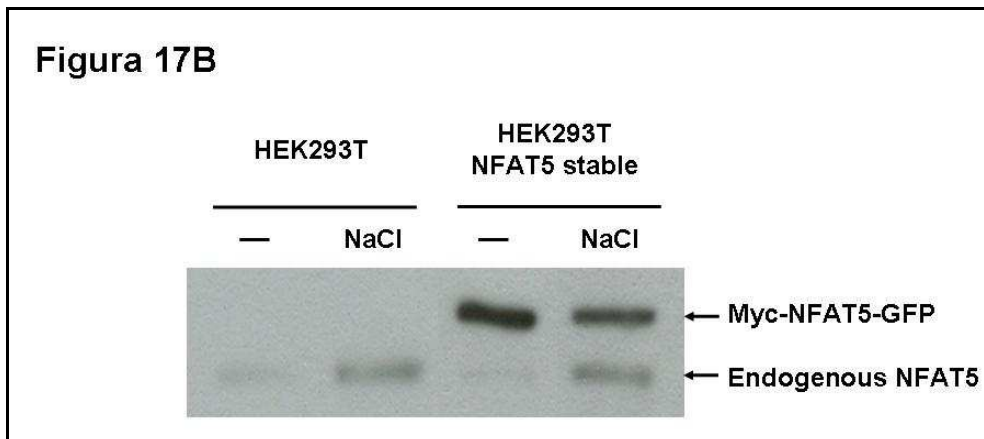


Figura 17B. Líneas estables del NFAT5. *Western blot* anti-NFAT5 de células HEK293T tratadas o no con un estímulo hipertónico (NaCl 100 mM, 2 horas).

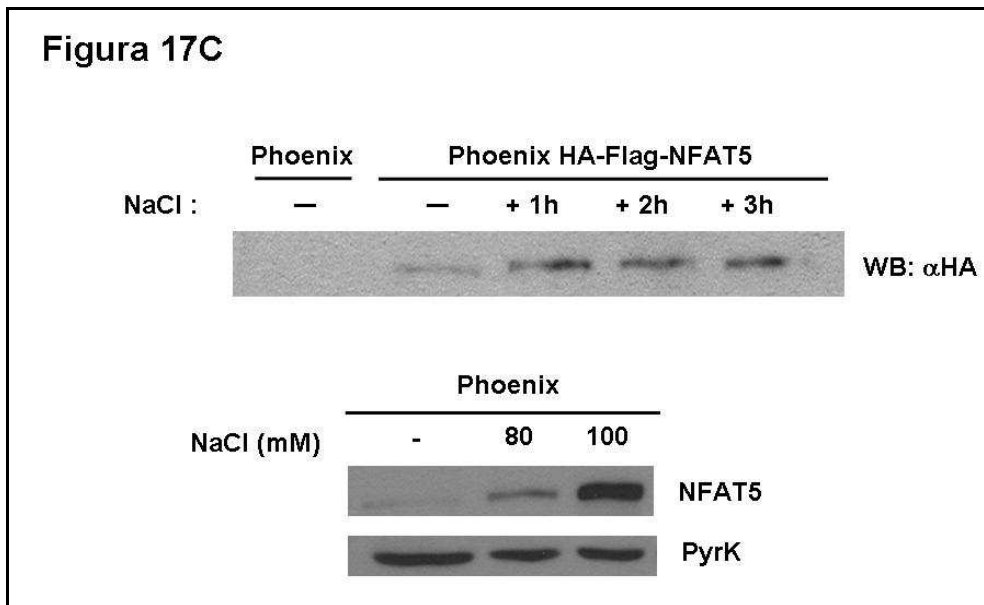


Figura 17C. Líneas estables del NFAT5. *Western blot* anti-HA de la línea estable en Phoenix estimulada a diferentes tiempos con NaCl 100 mM (panel superior), y *Western blot* anti-NFAT5 de la línea parental Phoenix estimulada 2 horas con diferentes concentraciones de NaCl (panel inferior).

Nuestra siguiente comprobación fue verificar la capacidad de las líneas estables de responder a hipertonicidad, tal y como ocurre con la proteína nativa. En la **figura 17D** se muestra una inmunofluorescencia para el reconocimiento del NFAT5 en las dos líneas estables sometidas a condiciones hipotónicas e hipertónicas. Mientras que en medio hipotónico el NFAT5 se mantiene mayoritariamente citoplásmico, un estímulo hipertónico induce su acumulación en el núcleo.

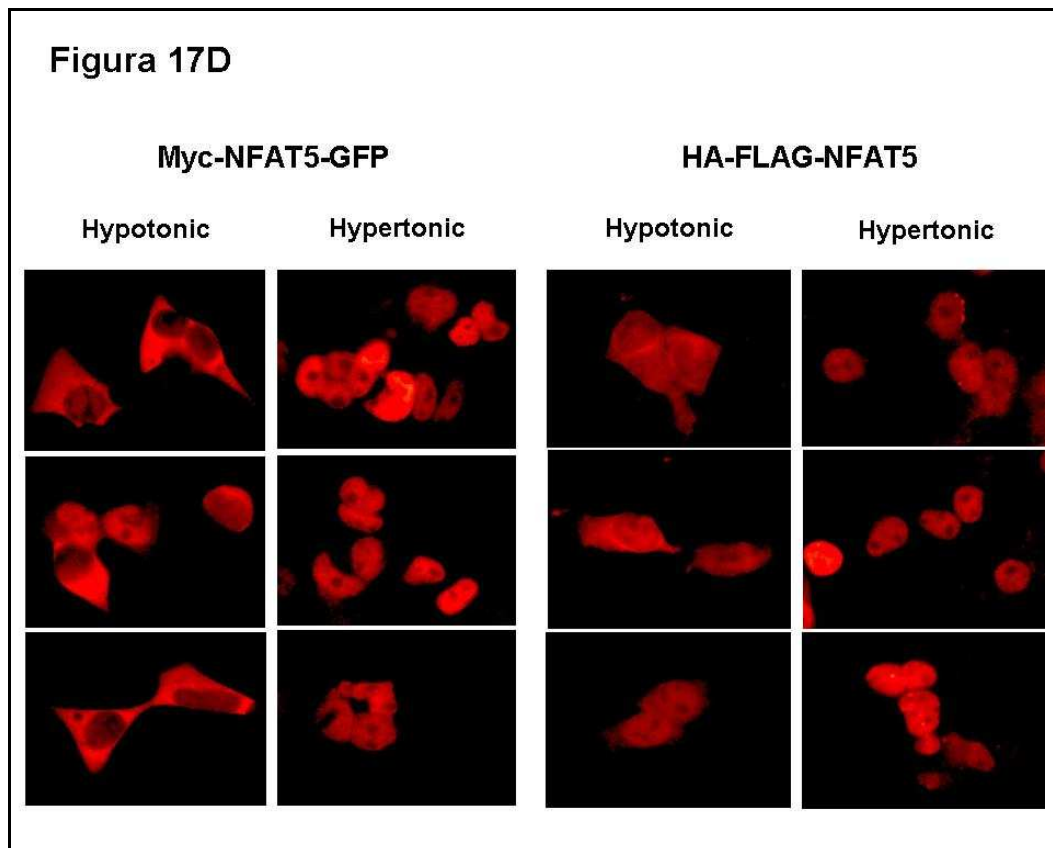


Figura 17D. Líneas estables del NFAT5. Inmunofluorescencia del NFAT5 en las dos líneas estables obtenidas, en condiciones hipotónicas (280 mOsm/Kg) o hipertónicas (480 mOsm/Kg con NaCl 100 mM durante 2 horas).

4. Inmunoprecipitación de las líneas estables y métodos de elución

A partir de las dos líneas estables obtenidas, hicimos ensayos de inmunoprecipitación y de elución del NFAT5. Disponíamos en nuestro laboratorio de anticuerpos monoclonales anti-Myc y anti-HA, así como de los péptidos sintéticos con la secuencia de los epítomos.

Las **figuras 18A** y **18B** muestran la inmunoprecipitación del NFAT5 con el anticuerpo anti-Myc en la línea estable de HEK293T (Myc-NFAT5-GFP) en condiciones de *cross-linking in vitro* con DSP tras lisis con CHAPS. Sin embargo, el péptido Myc, como método de elución, no fue capaz de competir la interacción epítomo-anticuerpo, debido probablemente a la naturaleza de la construcción (seis copias de Myc en tándem pueden presentar una avidéz muy elevada por el anticuerpo). Sin embargo, la interacción entre el epítomo Myc fusionado al NFAT5 y el anticuerpo se disociaba en un tampón de elución a pH 2.

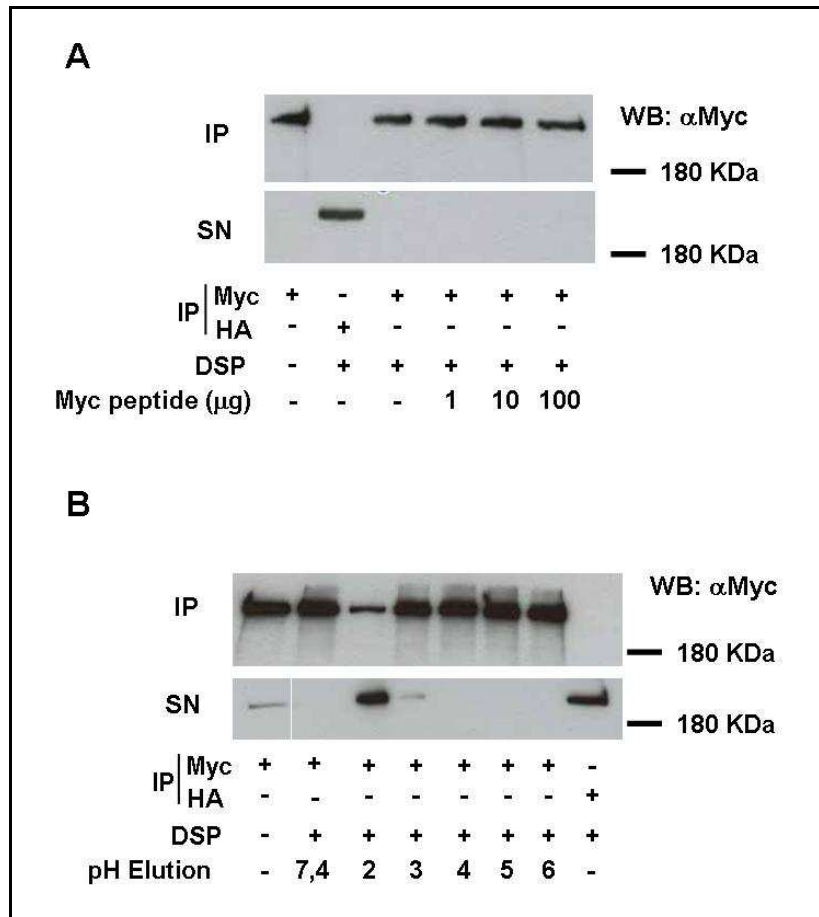


Figura 18A-B. Prueba de elución de las líneas estables del NFAT5. Inmunoprecipitación con anti-Myc en lisados de la línea estable HEK293T Myc-NFAT5-GFP y elución a diferentes concentraciones de péptido Myc (A), o a diferentes pH (B). Las células fueron lisadas con CHAPS, con o sin DSP.

Comprobamos también la capacidad de inmunoprecipitación y elución con péptido de la otra línea estable, con HA-FLAG-NFAT5 en Phoenix. Como muestra la **figura 18C**, el anticuerpo anti-HA inmunoprecipita la proteína en lisados con CHAPS tratados con DSP y el NFAT5 inmunoprecipitado se puede eluir con péptido HA.

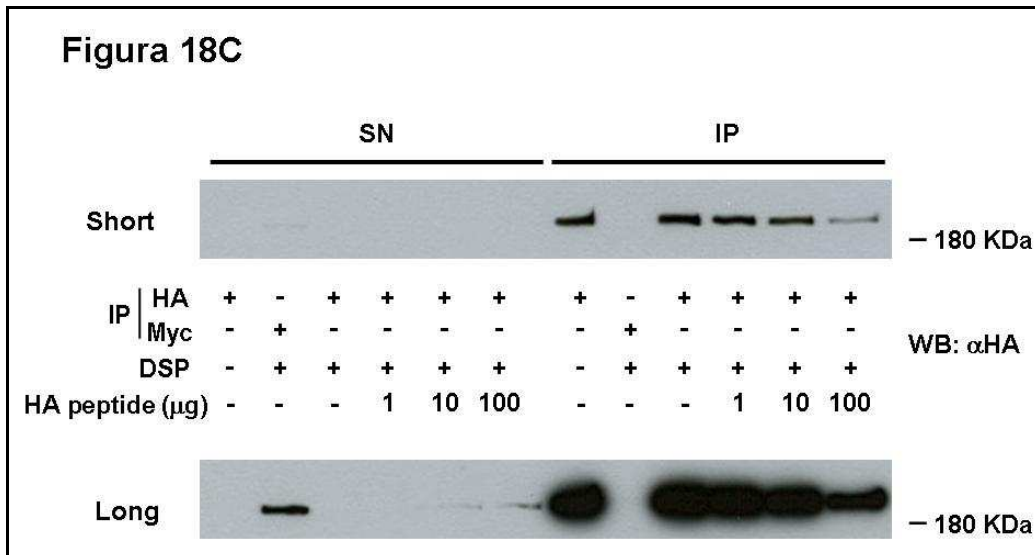


Figura 18C. Prueba de elución de las líneas estables del NFAT5. Inmunoprecipitación anti-HA de la línea estable Phoenix HA-FLAG-NFAT5 y elución a diferentes concentraciones de péptido HA. Se muestra una exposición corta (panel superior) y larga (panel inferior) para mostrar la proteína eluida en el sobrenadante (SN) ya que las muestras de SN estaban 6 veces más diluidas que las de los inmunoprecipitados (IP).

Una vez caracterizadas las dos líneas, decidimos utilizar la línea Phoenix HA-FLAG-NFAT5, para la purificación a gran escala ya que la inmunoprecipitación de la construcción es compatible con el DSP y el inmunoprecipitado se puede eluir con péptido.

5. Obtención de la columna de afinidad anti-HA

Previamente comparamos una columna comercial acoplada al anticuerpo anti-HA (Roche) con una columna acoplada no covalentemente al anti-HA disponible en nuestro laboratorio (hibridoma 12CA5), y comprobamos que la columna comercial tenía menor capacidad de inmunoprecipitación (datos no mostrados).

Decidimos entonces acoplar covalentemente nuestro anticuerpo anti-HA a una matriz de proteína G-Sefarosa mediante un *cross-linker* irreversible, el dimetilpimelimidato o DMP (ver materiales y métodos). En la **figura 19** se muestra que esta matriz es capaz de capturar el NFAT5 recombinante, en lisados tratados con DSP, y que esta interacción es reversible por el péptido HA de forma dependiente de dosis.

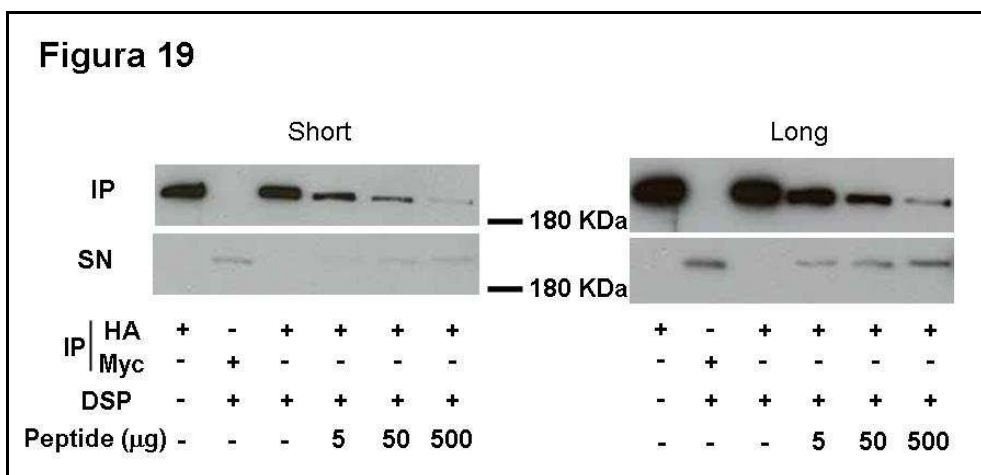


Figura 19. Prueba de la columna de anticuerpo anti-HA. Inmunoprecipitación con la columna de anti-HA de la línea estable Phoenix HA-FLAG-NFAT5, incluyendo elución con péptido HA. Cada carril corresponde a 10 µl de la matriz anti-HA y 5x10⁶ células del estable. Las células fueron lisadas con CHAPS, con o sin cross-linking *in vitro* con DSP. Se muestran tiempos de exposición corta (paneles de la izquierda) y larga (paneles de la derecha).

6. Purificación a gran escala de complejos asociados al NFAT5 y análisis por espectrometría de masas

A partir de las condiciones optimizadas en los apartados anteriores, procedimos a la purificación a gran escala del NFAT5 y proteínas asociadas. A lo largo de un año se realizaron cinco experimentos independientes, con cantidades crecientes de células desde 10^8 células hasta 5×10^8 células. Cada experimento incluyó un control en paralelo con el mismo número de células de la línea parental no transfectante, para determinar el patrón de bandas inespecíficas asociadas a la columna de anti-HA y eluidas con el péptido HA. De los cinco experimentos conseguimos material apto para su análisis por proteómica en tres de ellos.

En los dos primeros, de 1×10^8 y 2×10^8 células respectivamente, sólo se realizó la purificación del NFAT5 de células no estimuladas (cultivadas en condiciones hipotónicas a 280 mOsm/Kg) (**figura 20A y 20B**). Los complejos del NFAT5 y proteínas asociadas coprecipitadas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida en gradiente del 5 al 20% y en condiciones reductoras para disociar los complejos estabilizados por el *cross-linker* DSP. Los geles se tiñeron con una solución de plata compatible con espectrometría de masas y aquellas porciones del gel que contenían bandas visibles se escindieron y procesaron para su análisis.

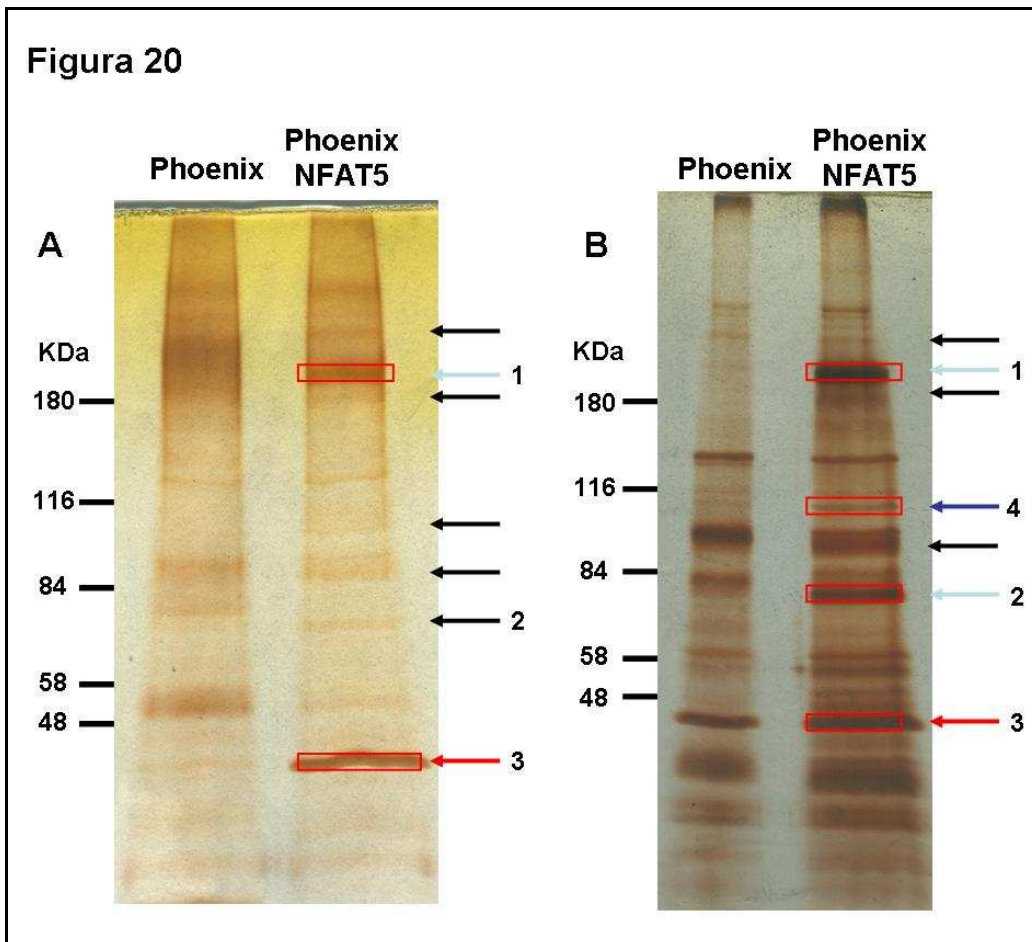


Figura 20A y 20B. Purificación a gran escala de los complejos asociados al NFAT5. Purificación con 1×10^8 células (A) y 2×10^8 células (B) de la línea estable HA-FLAG-NFAT5 y la parental como control. Los números indican las proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF): 1) El NFAT5, identificado en las dos purificaciones (control positivo); 2) La HSP70.1, identificada en B; 3) La β -actina, identificada en A y B; 4) Identificación parcial no significativa, ver texto principal.

El análisis de las proteínas se realizó por *peptide mass fingerprint* o PMF, (172) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La técnica del PMF consiste en proteolizar la banda de proteína obtenida con una proteasa conocida (en este caso la tripsina).

La proteasa, que reconoce una diana específica, corta la proteína por diversos sitios determinados por su secuencia, formándose un conjunto de péptidos cuyo tamaño o peso será único para esa proteína. El patrón de masas peptídicas obtenidas en la digestión se compara con una base de datos que presenta el patrón de digestión proteica de todas las proteínas conocidas (y también el patrón predicho para proteínas sin caracterizar) y mediante un programa de análisis estadístico se determinará la probabilidad de que nuestro patrón de masas sea una proteína determinada u otra.

En el primer experimento, de las 7 bandas específicas que se observaron respecto al control se pudieron obtener péptidos de dos de ellas, y se identificaron el NFAT5 (nuestro control positivo), y la proteína de citoesqueleto β -actina (**figura 20A**).

En el segundo experimento, al partir del doble de células, se pudieron observar al menos 17 bandas específicas respecto al control, incluyendo en ellas las 7 bandas de la primera purificación (en la figura sólo se han señalado las más evidentes). Sólo se obtuvieron péptidos con identificación estadísticamente significativa en tres bandas: el NFAT5 (como control positivo), la β -actina (esta banda resultó ser inespecífica) y la chaperona HSP70.1 (**figura 20B**).

También se obtuvieron masas de péptidos de varias de las bandas detectadas en el gel, aunque no fue posible asignar la identidad de esas proteínas por PMF de forma estadísticamente significativa. La razón más probable es la falta de suficiente cantidad de proteína para conseguir el número de péptidos necesario para una identificación fiable.

Otra posibilidad es que las bandas recortadas del gel para un determinado peso molecular contengan distintas proteínas, de modo que los péptidos resultantes procedan de una mezcla compleja, disminuyendo así la representación relativa de cada proteína individual. El programa de análisis está optimizado para detectar un patrón de masas peptídicas correspondiente a una sola proteína. Sin embargo, podría llegar a detectar una mezcla de dos proteínas, aunque la potencia de la técnica disminuiría considerablemente. Para bandas más complejas, el programa de análisis no tiene suficiente capacidad para identificar las proteínas, puesto que aumenta considerablemente la complejidad del patrón de masas peptídicas.

La presencia de varias proteínas diferentes en una misma banda en geles de una dimensión ha sido descrita en otros ejemplos, y un caso ilustrativo es el de la purificación de 170 proteínas asociadas a la chaperona 14-3-3 (173).

Aunque el análisis no identificó ninguna proteína (además de la HSP70.1) con significación estadística aceptable, encontramos que en una de las bandas de aproximadamente 100 KDa (**figura 20B**, banda 4), 8 de las 25 masas de péptidos obtenidas en la proteólisis, analizadas por separado, eran compatibles con el patrón PMF de la proteína quinasa N1 (PKN1), mientras que las demás masas no eran asignables a ninguna proteína concreta. La PKN1 es una quinasa de 100 KDa de la superfamilia de la PKC que es activada por la ruta de Rho y de la cual se ha descrito recientemente que también es activada por estrés osmótico en células de mamífero (161). Esta quinasa es citoplásmica, al igual que una fracción del NFAT5 en células en

reposo y era plausible proponer que quizá la PKN1 podría regular la activación del NFAT5 por hipertoncicidad. Por lo tanto, y simultáneamente a la preparación de nuevos experimentos de purificación del NFAT5, optamos por investigar si la PKN1 podría regular al NFAT5. Estos resultados se describen más adelante.

En cuanto a los sucesivos experimentos de purificación del NFAT5 y proteínas asociadas aumentamos la escala hasta 5×10^8 células. Estos experimentos incluyeron células sin estimular y células estimuladas durante 2 horas con estrés osmótico (500 mOsm/Kg), además del control de especificidad con la línea parental no transfectada. Algunas de las bandas del experimento pudieron ser analizadas por PMF por MALDI-TOF y también por secuenciación de los péptidos obtenidos por QSTAR (técnica mucho más resolutive pero que necesita más cantidad de material). De nuevo, y a pesar de obtenerse bastantes masas de péptidos (entre 18 y 22) de varias de las bandas de proteínas detectables por MALDI-TOF, el análisis (bien por MALDI-TOF o QSTAR) no identificó ninguna aparte del propio NFAT5 y de nuevo la HSP70.1 (**figura 20C**).

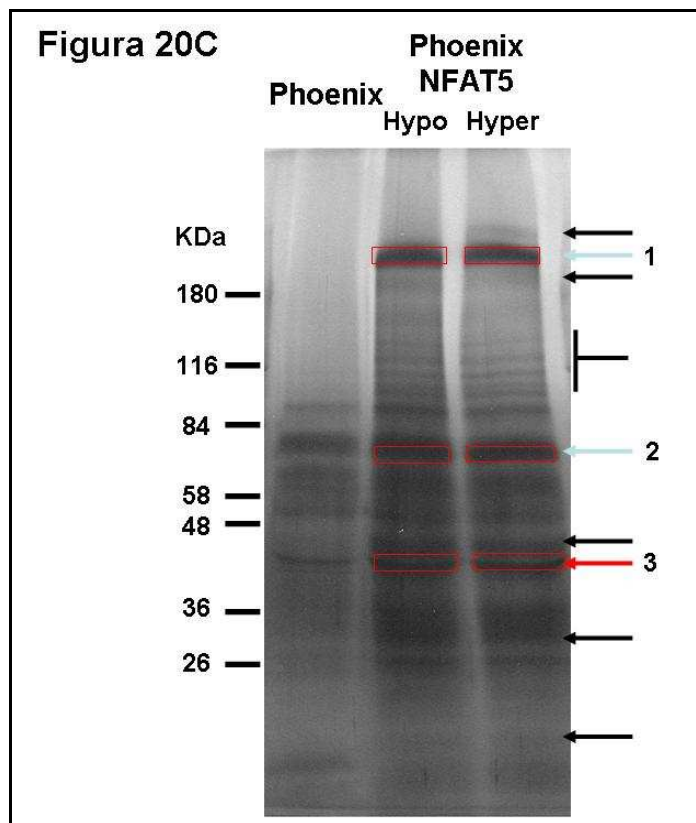


Figura 8C. Purificación a gran escala de los complejos asociados al NFAT5. Experimento realizado como en la figura 8A y 8B pero con 5×10^8 células. Se incluyen dos puntos con la línea estable, una de ellas con en cultivo con medio hipotónico (280 mOsm/Kg) y la otra con estimulación hipertónica (500 mOsm/Kg, 2 horas). Las flechas indican las bandas específicamente asociadas al NFAT5. Los números indican las proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF): 1) El NFAT5 (control positivo); 2) La HSP70.1; 3) La β -actina.

A pesar de que no hayamos obtenido la identidad de las proteínas asociadas al NFAT5 en nuestras condiciones experimentales (aparte de la HSP70.1), los experimentos realizados han aportado información relevante. Por una parte, hemos observado un patrón reproducible de al menos 6 proteínas asociadas al NFAT5, cuyas masas relativas en geles de SDS-poliacrilamida abarcan un rango de entre 10 y 300 KDa (**figura 20**). Este patrón es esencialmente el mismo en condiciones isotónicas y tras estimulación con estrés osmótico, a excepción de dos diferencias: hay un incremento en la asociación del NFAT5 y una proteína de unos 300 KDa tras estimulación hipertónica y cambios en el patrón de proteínas asociadas en la zona de 70 KDa (la calidad de la imagen reproducida en la **figura 20C** no permite ver estos cambios). Estas diferencias sugieren que las proteínas localizadas en estas bandas podrían ser relevantes en el proceso de activación del NFAT5.

7. El NFAT5 y la PKN1

A partir de los resultados de la banda cuatro obtenidos en el segundo experimento de purificación (**figura 8B**), optamos por investigar si la quinasa PKN1 era capaz de regular al NFAT5.

Para determinar si la PKN1 interacciona con el NFAT5 y regula su actividad llevamos a cabo tres tipos de experimentos. Primero, ensayos de actividad de genes reporteros de luciferasa dependientes del NFAT5 en células Jurkat transfectadas con la PKN1 nativa o un mutante inactivo (PKN1-KD) (161). Segundo, ensayos de coimmunoprecipitación entre el NFAT5 y la PKN1 mediante transfección transitoria en células HEK293T con HA-FLAG-NFAT5 (la misma construcción expresada en la línea estable) y PKN1. Por último, generamos y validamos un RNA interferente específico de la PKN1 humana que utilizamos para determinar si la supresión de esta quinasa afectaba a la actividad transcripcional del NFAT5.

Los experimentos de genes reporteros mostraron que ni la sobreexpresión de la PKN1 nativa ni el dominante negativo afectaron a la activación del NFAT5 inducida por hipertonicidad en la línea T Jurkat (**figura 21A**).

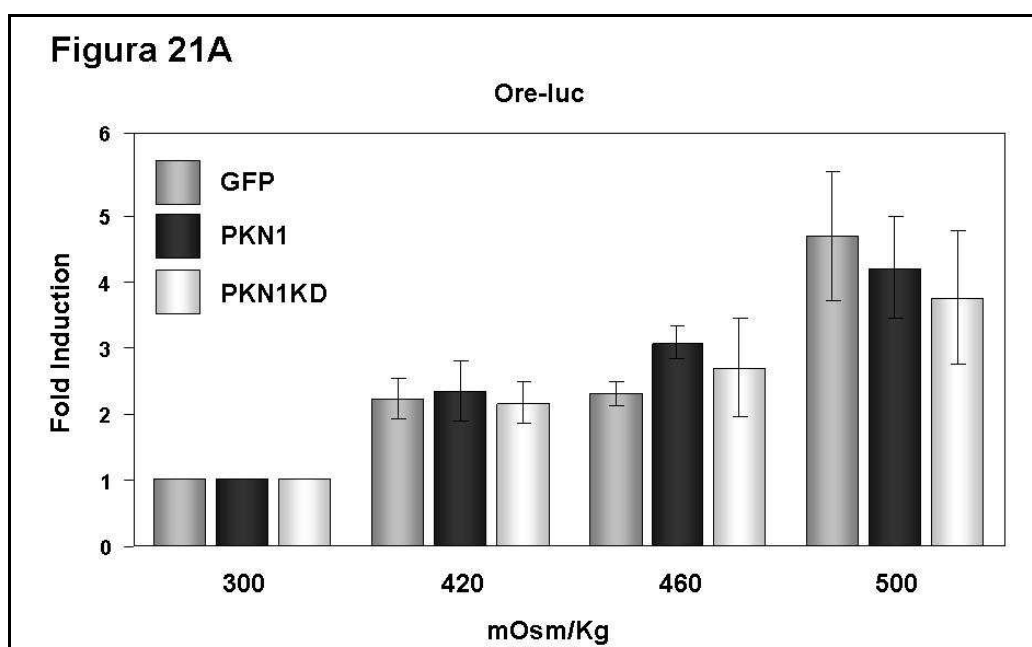


Figura 21A. La sobreexpresión de la quinasa activada por estrés osmótico, PKN1, y su mutante inactivo, no afectan a la actividad del NFAT5. Células Jurkat se transfectaron por electroporación con el gen reportero dependiente del NFAT5, Ore-luc, la TK-Renilla como control de transfección y con las construcciones GFP, GFP-PKN1, o su mutante inactivo, GFP-PKN1KD. A las 24 horas de transfección, se monitorizó la expresión de las construcciones de PKN1 por fluorescencia mediante citometría de flujo, las células se estimularon 18 horas a diferentes tonicidades y posteriormente se recogieron, lisaron, y se midió su actividad

luciferasa. La figura muestra la media y desviación estándar (SD) de tres experimentos realizados de forma independiente. Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

Por otra parte, el resultado de los experimentos de coimmunoprecipitación en células HEK293T, realizados en el mismo tampón que la purificación a gran escala e incluyendo DSP, fue negativo, indicando que el NFAT5 no interactuaba con la PKN1. La ausencia de interacción detectable entre ambas proteínas no era atribuible a una expresión insuficiente de éstas, la cual verificamos por *Western blot* en los lisados de las células transfectadas (**figura 21B**). Sin embargo, cabía la posibilidad de que el epítipo GFP fusionado a la PKN1 en la construcción utilizada interfiriese con una hipotética interacción con el NFAT5. Generamos construcciones de la PKN1 con una única copia (en el extremo N-terminal) de un epítipo mucho menor, HA, de 9 aminoácidos. Tampoco observamos interacción del NFAT5 con esta construcción (datos no mostrados).

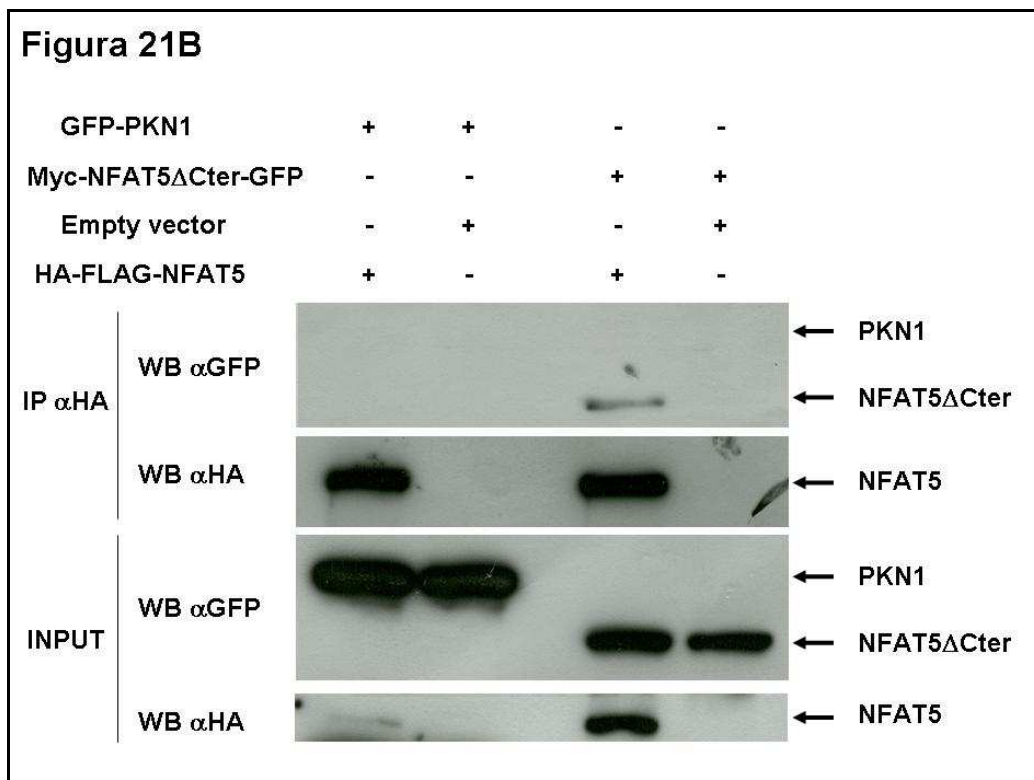


Figura 21B. Inmunoprecipitación de la PKN1 y el NFAT5. Células Phoenix se transfectaron con las construcciones GFP-PKN1, Myc-NFAT5 Δ Cter-GFP, HA-FLAG-NFAT5 o un vector vacío. A las 48 horas de transfección, las células se lisaron en tampón con DSP y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-HA. Los lisados e inmunoprecipitados se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP y anti-HA. La construcción Myc-NFAT5 Δ Cter-GFP se utilizó como control positivo de interacción con HA-FLAG-NFAT5. La figura es representativa de al menos tres experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados indicaban que la PKN1 no parecía interactuar con el NFAT5 ni regular su actividad en respuesta a estrés osmótico. A la vista de estos resultados parece poco probable que los péptidos analizados por PMF correspondiesen a la PKN1.

A la par que realizamos los experimentos descritos antes, produjimos un RNA interferente (shRNA) específico para la PKN1 para poder bloquear su expresión endógena y estudiar si afectaba a la activación del NFAT5 (denominamos a la construcción shPKN1). La secuencia de oligonucleótidos del RNA interferente, de 21 nucleótidos de longitud, se examinó previamente mediante "*nucleotide blast*" para asegurarnos de que no mostraba hibridación cruzada con ninguna especie de RNA aparte del de la PKN1. Confirmamos que este shRNA inhibía eficazmente la expresión de la PKN1 en células cotransfectadas con vectores de expresión de PKN1 y shPKN1 (**figura 21C**). El vector de shRNA no inhibió la expresión de otra proteína no relacionada (GFP). Aunque no hemos confirmado que este shRNA inhibiera la expresión de la PKN1 endógena al no disponer de anticuerpos directos contra la quinasa, la eficiencia de la inhibición de la proteína recombinante sobreexpresada sugería que este shRNA era eficaz para suprimir la proteína endógena.

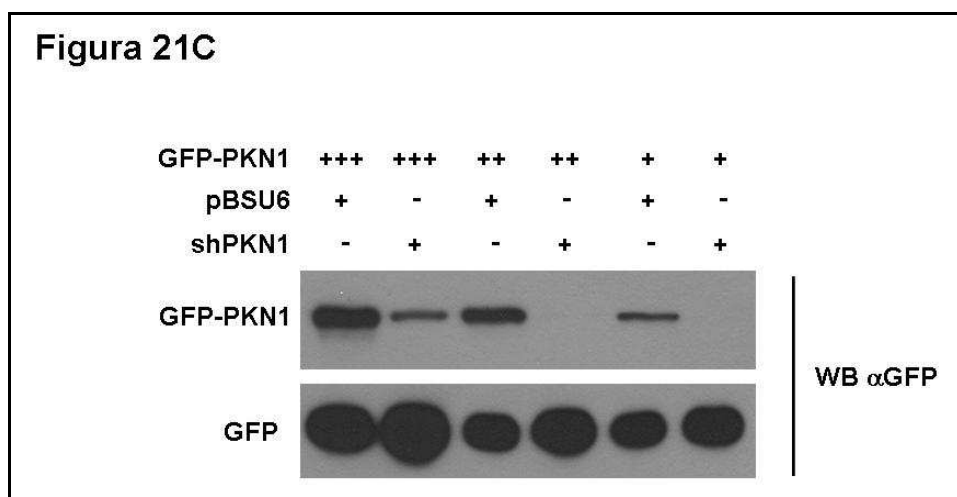


Figura 21C. Especificidad del RNA de interferencia para la quinasa PKN1. Células Phoenix se transfectaron con diferentes concentraciones de GFP-PKN1 o GFP, con pBSU6 (vector vacío) o el RNA interferente de PKN1. A las 24 horas se recogieron las células y se lisaron para analizar la expresión de PKN1 o GFP por *Western blot*.

Finalmente, analizamos la actividad transcripcional del NFAT5 en células transfectadas con un gen reportero específico para este factor y cotransfectadas bien con el shPKN1 o con el vector pBSU6. Un shRNA específico para el NFAT5 se incluyó como control de inhibición. Observamos en esta ocasión que el shPKN1 ejerció un efecto positivo sobre la activación transcripcional del NFAT5, en condiciones de estrés osmótico (**figura 21D**).

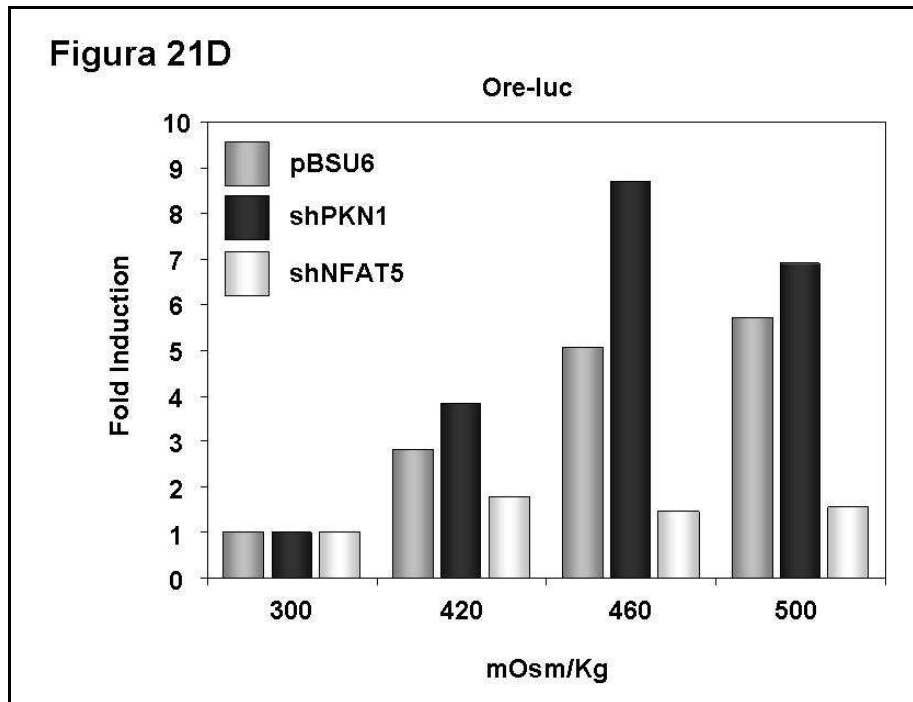


Figura 21D. El RNA de interferencia para la PKN1 activa al NFAT5. Células Jurkat se transfectaron por electroporación con el gen reportero Ore-luc, TK-Renilla y RNAs interferentes (para la PKN1, el NFAT5 y el vector pBSU6). A las 24 horas de la transfección, las células se trataron durante 18 horas en medio hipertónico (420-500 mOsm/Kg). Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

8. Los RNA interferentes y el NFAT5

A partir del resultado del apartado anterior, decidimos repetir el experimento pero cotransfectando no solamente el vector vacío (pBSU6) sino otros RNAs interferentes para proteínas irrelevantes, como el RNA interferente de la lamina A y el de la GFP (162). De forma inesperada, los tres RNAs interferentes, excepto el del NFAT5, fueron capaces de cooperar en la actividad del gen reportero del NFAT5 en respuesta a estrés osmótico, respecto a la transfección con el vector vacío (**figura 21E**). Este experimento se repitió a varias dosis de estrés osmótico y con dos tipos celulares (Jurkat y Phoenix) y los resultados fueron similares (datos no mostrados).

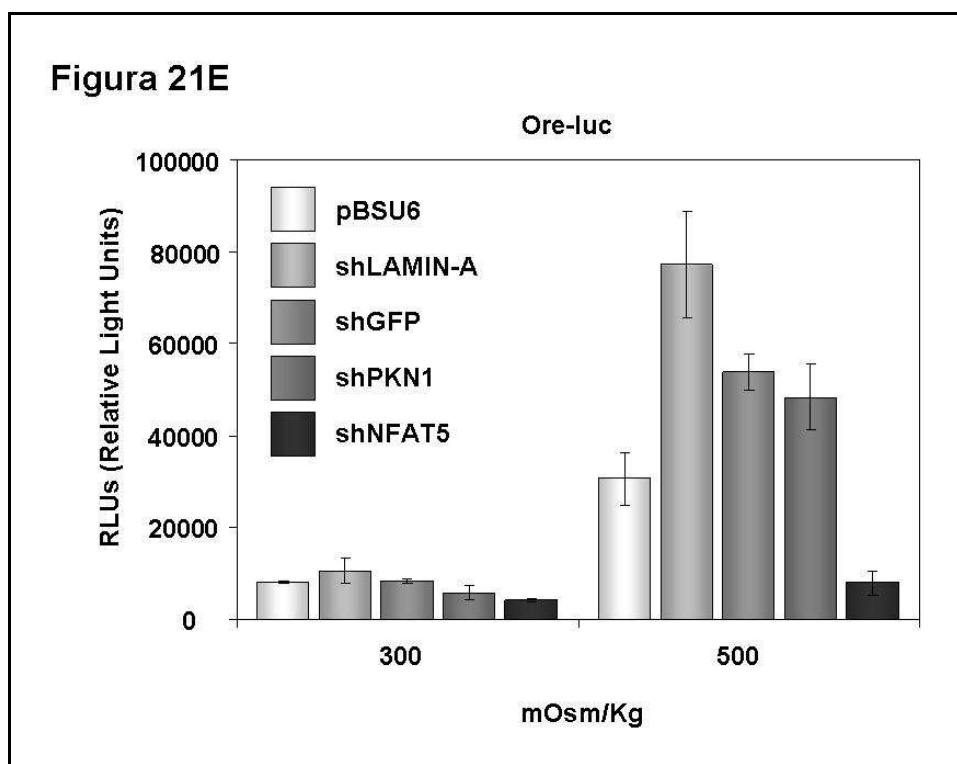


Figura 21E. RNAs de interferencia inespecíficos activan al NFAT5. Experimento realizado como en la figura 9D pero transfectando además RNAs interferentes para la lamina A y la GFP. La figura muestra la media y SD de muestras medidas por duplicado y es representativa de dos experimentos independientes. Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

La interpretación a este resultado es que pequeños RNA de doble cadena (dsRNA) son capaces de potenciar la actividad del NFAT5 en respuesta a estrés osmótico.

9. Los RNA de doble cadena y proteínas involucradas

Los shRNA (*short hairpin*) y siRNA (*small interfering*) empleados para suprimir la expresión de proteínas en células de mamífero son moléculas de RNA pequeñas (menos de 23 nucleótidos) para evitar activar la respuesta fisiológica frente a los RNA de doble cadena largos característicos de infecciones virales (174). Sin embargo, se ha descrito que pequeños RNA de doble cadena pueden activar también la vía del interferón y algunos componentes de la respuesta antiviral (175-177).

A la vista de nuestras observaciones de que distintos shRNA podrían aumentar la activación del NFAT5, nos preguntamos si el NFAT5 podría ser regulado mediante componentes de la respuesta celular frente a virus y potencialmente otros tipos de patógenos. La respuesta frente a dsRNA virales implica a diferentes proteínas, tales como el TLR3, la PKR, la RIG-I y la Mda5.

1) El receptor de tipo *Toll* o **Toll-like Receptor 3** (TLR3) es una proteína de membrana que se localiza en endosomas (178) y el tercer miembro de una familia de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Interviene en la respuesta extracelular a infecciones virales (virus con RNA de doble cadena) induciendo citoquinas proinflamatorias. Es capaz de responder a dsRNA largos pero también cortos, como los RNA de interferencia (174, 179). La señal del receptor activa los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B.

2) La proteína quinasa R o **PKR**, localizada en el citoplasma, responde a infecciones virales (180). Induce apoptosis al fosforilar a la proteína eIF2A, que inhibe la traducción de proteínas. Está involucrada también en la ruta de señalización del TLR3 (infección viral) y TLR4 (infección bacteriana). Como el TLR3, es capaz también de reconocer dsRNA largos y cortos (181).

3) Las **RIG-I** y **Mda5**, localizadas también en el citoplasma, son helicasas que interaccionan con dsRNA. Responden a infecciones virales e inducen citoquinas proinflamatorias. Hasta ahora sólo se ha descrito su papel con RNA de doble cadena largos, y RNA fosforilado en su extremo 5' (para la RIG-I) (121, 122, 182). Su activación conlleva la activación de los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B.

Decidimos investigar a continuación si el NFAT5 podría participar en la respuesta celular a patógenos mediados por los TLR.

10. Activación del NFAT5 por la estimulación de los TLR

Nuestro primer abordaje consistió en transfectar el gen reportero del NFAT5 Ore-Luc en la línea de macrófagos murina RAW 264.7 (la cual expresa todos los TLR (183)) y analizar si el NFAT5 respondía a la estimulación con ligandos de estos receptores.

Los resultados de la **figura 22A** muestran como tanto el pIC, que activa al TLR3, como el LPS, que activa al TLR4, fueron capaces de forma modesta pero reproducible de activar el reportero Ore-Luc. Además, esta inducción era cooperativa cuando se añadía un estímulo hiperosmótico.

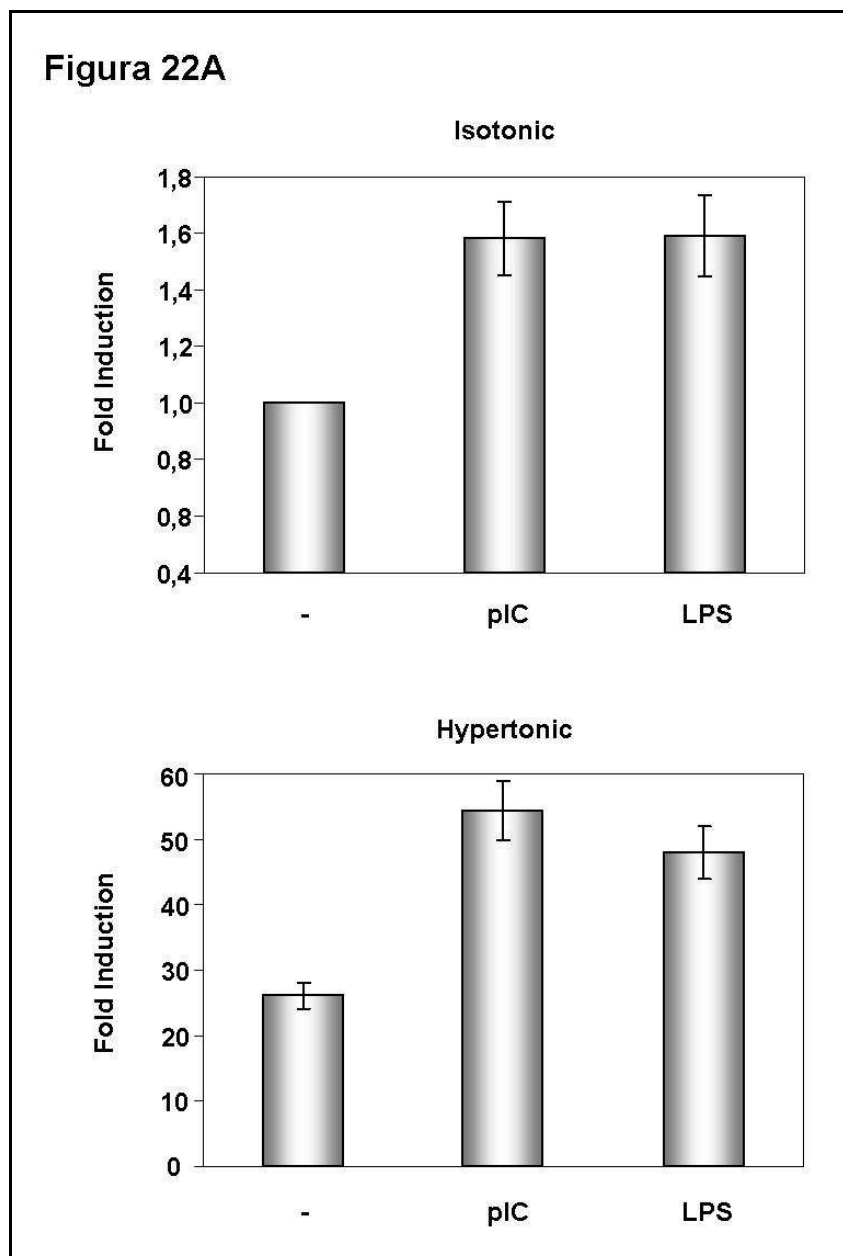


Figura 22A. Ligandos de los TLR son capaces de activar un gen reportero dependiente del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron por electroporación (ver materiales y métodos) con el gen reportero Ore-luc y TK-Renilla. A las 24 horas de la transfección, las células se estimularon con pIC (100 µg/ml) o LPS (25 µg/ml) en medio isotónico (300 mOsm/Kg, panel superior) o hipertónico (460 mOsm/Kg, cloruro sódico 80 mM, panel inferior) durante 20 horas. La figura muestra la media y la media del error estándar (SEM) de tres experimentos realizados de forma independiente. Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

De manera similar, observamos que otros ligandos de TLR también potenciaban la actividad del reportero Ore-Luc, estimulando con los compuestos Pam3CSK4, ligando del dímero TLR1:2, Zymosan A, ligando del dímero TLR2:6, Loxoribine, ligando del TLR7-8 y CpG DNA, ligando del TLR9 (**figura 22B**).

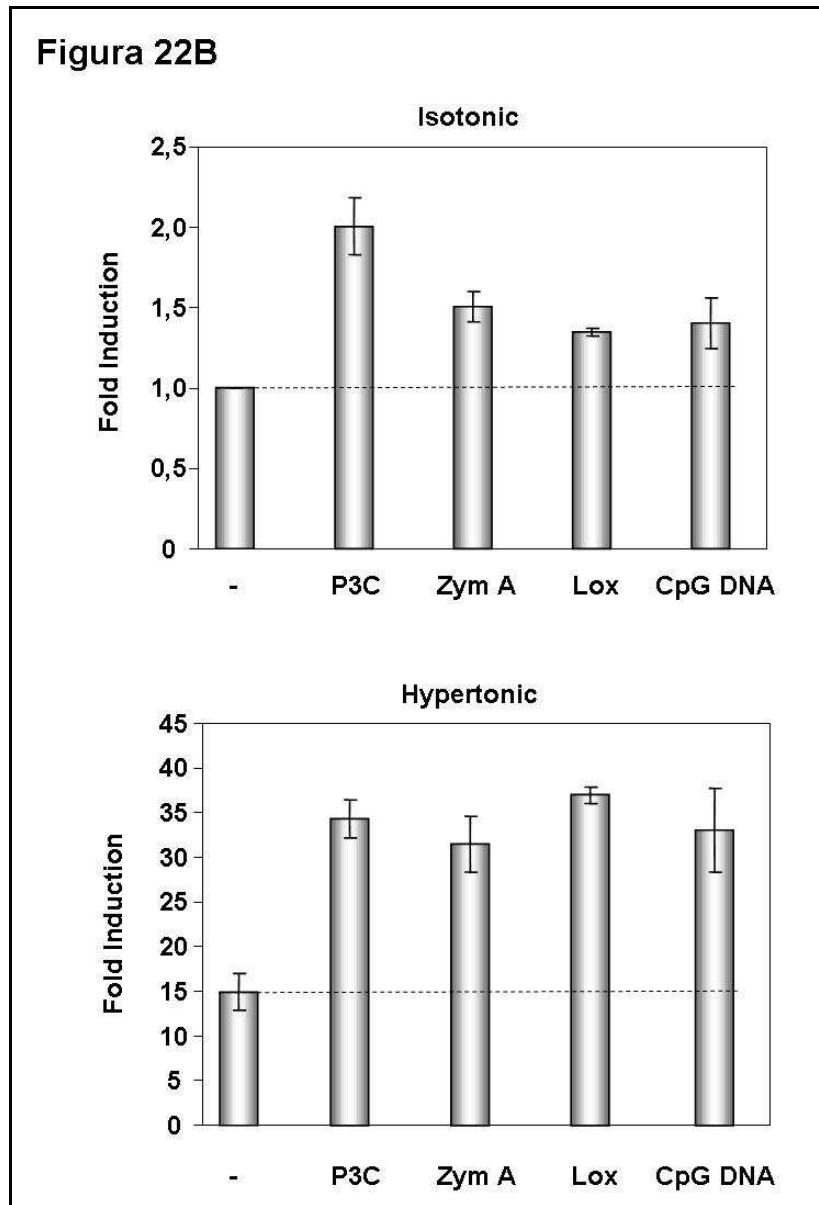


Figura 22B. Ligandos de los TLR son capaces de activar un gen reportero dependiente del NFAT5. Experimento realizado como en la figura 22A, pero en este caso las células se estimularon con Pam3CSK4 (100 ng/ml), Zymosan A (100 µg/ml), Loxoribine (500 µM) y CpG DNA (10 µM). La figura muestra la media y la SEM de tres experimentos realizados de forma independiente.

La activación del Ore-Luc por ligandos de TLR fue suprimida en células transfectadas con un RNA interferente para el NFAT5, indicando que esta activación estaba mediada por el NFAT5 (**figura 22C**).

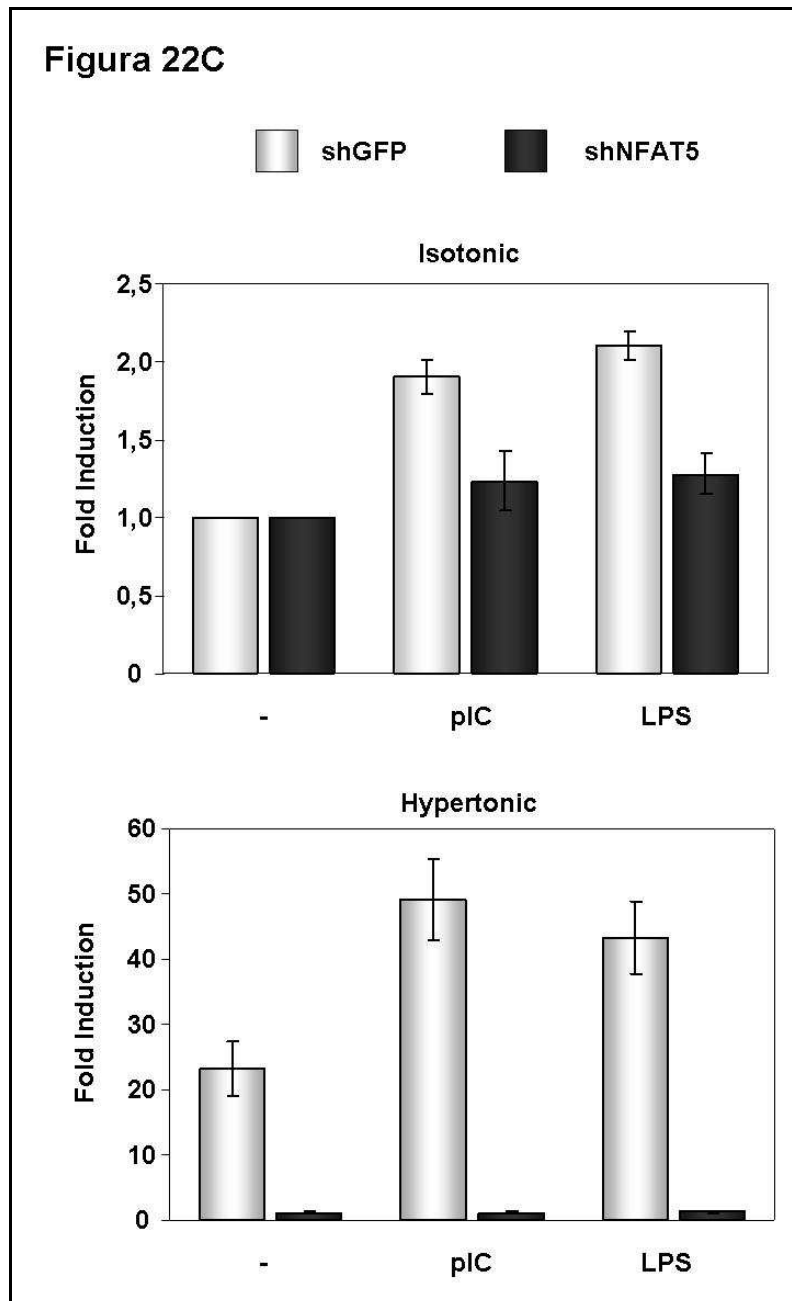


Figura 22C. Ligandos de TLR son capaces de activar un gen reportero dependiente del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron con el gen reportero Ore-luc y TK-Renilla y los RNAs de interferencia para el NFAT5 o la GFP. A las 24 horas se estimularon con pIC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o LPS (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio isotónico (300 mOsm/Kg, panel superior) o hipertónico (460 mOsm/Kg, cloruro sódico 80 mM, panel inferior) durante 20 horas. La figura muestra la media y la SEM de tres experimentos realizados de forma independiente.

La baja magnitud de la estimulación con ligandos de TLR podría ser atribuible a que el reportero Ore-Luc es activado por el *enhancer* del gen de la aldosa reductasa, el cual se induce específicamente en respuesta a hipertonicidad y podría no ser un reportero óptimo para estudiar la regulación del NFAT5 por otros estímulos tales como los ligandos de los TLR.

11. Los TLR inducen la expresión del NFAT5

Dado que la estimulación del reportero dependiente del NFAT5 (Ore-Luc) era moderada con los ligandos de TLR, utilizamos un criterio independiente para analizar el efecto de estos receptores sobre el NFAT5 y analizamos la expresión de este factor en células estimuladas via TLR.

Como se muestra en la **figura 22D** la línea RAW 264.7 presentó unos niveles bajos de expresión del NFAT5, que se indujeron 10-20 veces al tratar las células con pIC (100 μ g/ml) o LPS (25 μ g/ml). Como control positivo se trataron las células con estrés hipertónico, el cual induce la expresión del NFAT5 (72). Esta inducción se inhibió completamente al cotransfectar las células con un RNA interferente para el NFAT5.

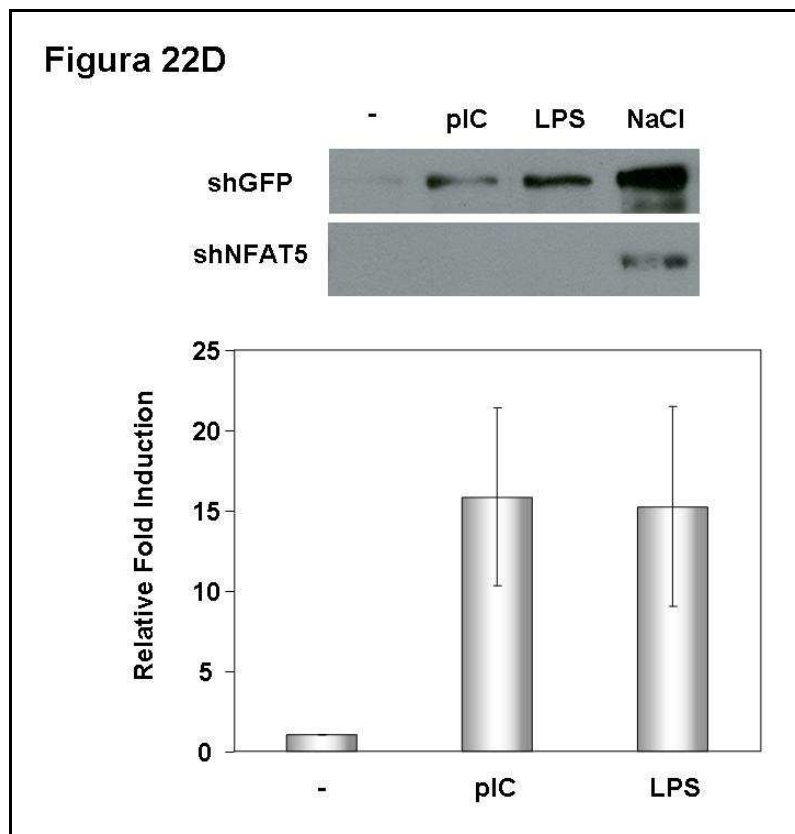


Figura 22D. Estímulos patogénicos son capaces de inducir la expresión del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron con RNAs de interferencia para el NFAT5 o control (GFP). A las 24 horas se estimularon con pIC (100 μ g/ml) o con LPS (25 μ g/ml) durante 24 horas más. Posteriormente se lisaron para medir la expresión del NFAT5 por *Western blot*. El gráfico inferior muestra la cuantificación de tres experimentos independientes, mostrando la media y la SEM.

Otros ligandos de los TLR, como el Pam3CSK4 (TLR1:2), Zymosan A (TLR2:6), Loxoribine (TLR7-8) y el CpG DNA (TLR9) también indujeron la expresión del NFAT5 en la línea RAW 264.7 a diferentes dosis, y a 24 horas (**figura 22E**).

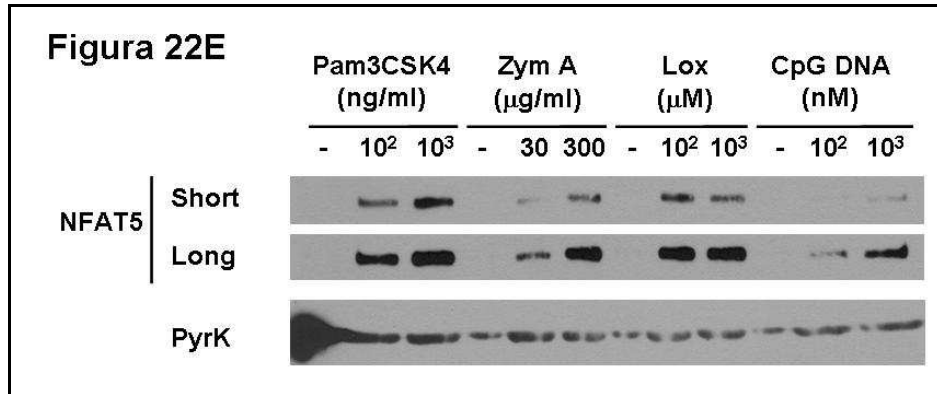


Figura 22E. Estímulos patogénicos son capaces de inducir la expresión del NFAT5. Células RAW 264.7 se estimularon con Pam3CSK4, Zymosan A, Loxoribine y CpG DNA, a diferentes concentraciones, durante 24 horas. La expresión del NFAT5 y la del control de carga piruvato quinasa (PyrK) se analizó por Western blot. Para el NFAT5 se muestran dos tiempos de exposición.

12. Expresión del NFAT5 en células primarias. Macrófagos derivados de médula ósea

A continuación decidimos explorar los niveles de expresión del NFAT5 en macrófagos primarios. Para ello, obtuvimos macrófagos derivados de médula ósea (ver materiales y métodos), y los estimulamos con diferentes ligandos de los TLR, a diferentes dosis y a diferentes tiempos.

Los resultados, muestran cómo el NFAT5 se indujo con pIC y LPS a dosis bajas (0,1 µg/ml de pIC y 0,1 ng/ml de LPS) y desde tiempos cortos (2 horas, **figura 23A y B**). También se observó en esplenocitos (datos no mostrados). Además, la expresión del NFAT5 también se indujo con dosis altas y a tiempos largos.

Además de pIC y LPS los otros cuatro ligandos analizados también fueron capaces de inducir la expresión del NFAT5 tanto a dosis bajas (10 ng/ml de Pam3CSK4, 30 µg/ml de Zymosan A, 10 µM de Loxoribine y 10 nM de CpG DNA) como a tiempos cortos (2 horas, **figura 23C y D**).

Estos resultados, junto con los de la línea RAW 264.7 muestran que la ruta de los receptores tipo *Toll* está activando tanto la expresión como la actividad del NFAT5. Así pues, el NFAT5 es regulado por un amplio espectro de moléculas patogénicas, lo que sugiere que este factor podría jugar un papel en la regulación de genes regulados por los TLR.

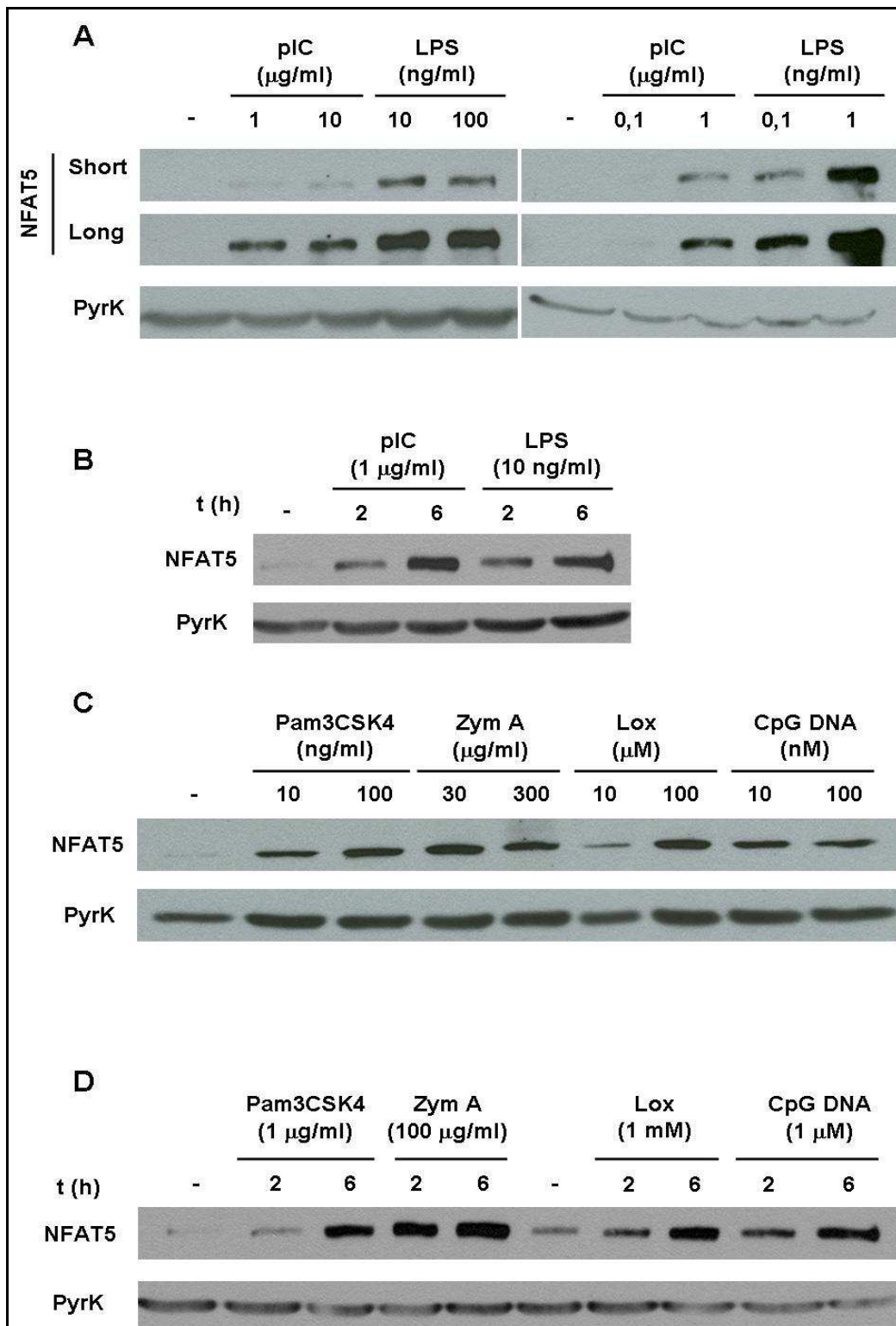


Figura 23. Los ligandos de los TLR inducen la expresión del NFAT5 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Los BMDM se estimularon con pIC o LPS a diferentes tiempos y dosis con ligandos de los TLR y se analizó la expresión del NFAT5 por *Western blot*. (A) BMDM estimulados con pIC o LPS durante 24 horas. Se muestran dos experimentos representativos con varias dosis utilizadas. (B) BMDM estimulados con poli-IC o LPS durante 2-6 horas. (C) Los BMDM se estimularon con diferentes dosis de Pam3CSK4, Zimosan A, Loxoribine y CpG DNA durante 24 horas. (D) Los BMDM se estimularon con Pam3CSK4, Zimosan A, Loxoribine o CpG DNA durante 2-6 horas. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

13. Papel del NFAT5 en la expresión de los genes regulados por los TLR. Línea RAW 264.7

Disponíamos en el laboratorio de un gen reportero de luciferasa activado por el promotor de la iNOS, enzima que produce óxido nítrico, también regulado por la activación de los TLR.

Los experimentos del gen reportero de la iNOS indicaron una clara dependencia del NFAT5 en la activación de este enzima por estimulación con pIC y LPS (**figura 24A**). Células transfectadas con el RNA interferente del NFAT5 y estimuladas con los ligandos de los TLR activaron la iNOS débilmente, en comparación con la transfección de un shRNA control (GFP).

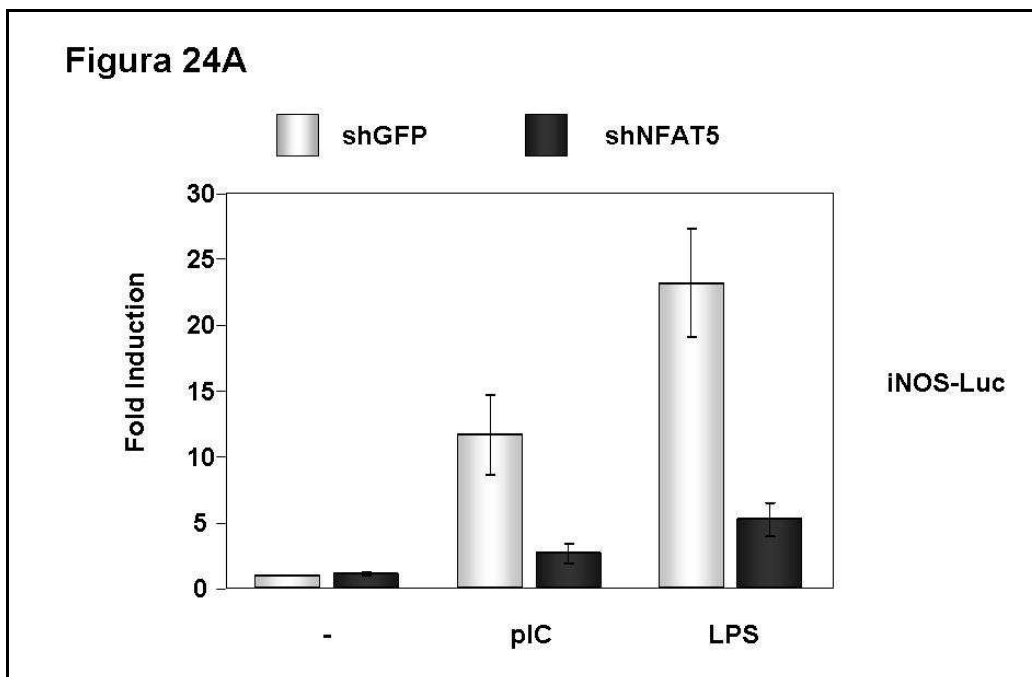


Figura 24A. La estimulación de la iNOS por los TLR es dependiente del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron con el gen reportero iNOS-luc, la TK-Renilla, y con los RNAs de interferencia para el NFAT5 o control (GFP). 24 horas después se estimularon con pIC (100 µg/ml) o LPS (25 µg/ml) durante 20 horas más y se midió la actividad luciferasa. Los gráficos muestran la media y la SEM de 4 experimentos independientes. Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

El análisis por *Western blot* de la expresión de la iNOS endógena mostró una fuerte inducción del enzima al estimular las células con los ligandos de los TLR (pIC y LPS). Sin embargo, en células transfectadas con un RNA de interferencia para el NFAT5 esta activación se inhibió casi totalmente (**figura 24B**).

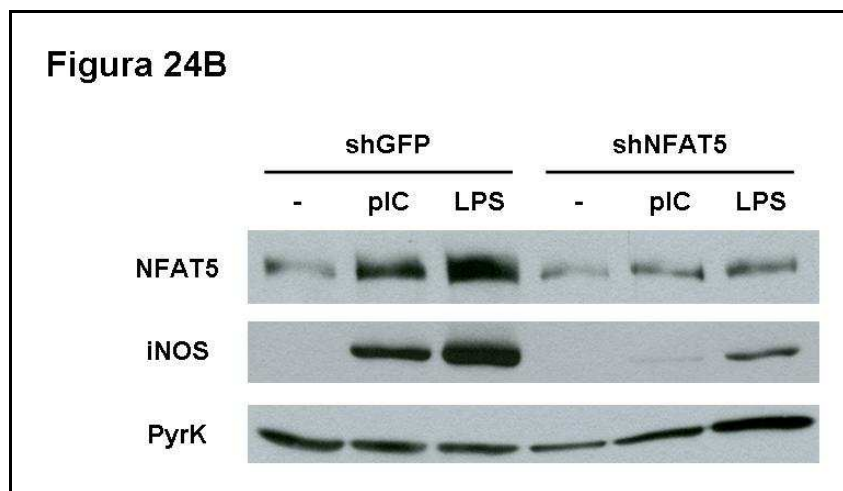


Figura 24B. La estimulación de la iNOS por los TLR es dependiente del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron con los RNAs de interferencia para el NFAT5 o control (GFP). 24 horas después se estimularon con pIC (100 μ g/ml) o LPS (25 μ g/ml) durante 20 horas más y se midió la expresión del NFAT5, iNOS y piruvato quinasa (control de carga) por *Western blot*. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Para medir la actividad de la enzima iNOS, analizamos los niveles de nitrito en el medio de cultivo (ver materiales y métodos). Como se muestra en la **figura 24C**, células transfectadas con el RNA interferente del NFAT5 y estimuladas 24 horas con pIC o LPS presentaron unos niveles de nitrito muy inferiores respecto a la transfección control.

Incluso con otros ligandos de los TLR pudimos ver que en ausencia del NFAT5 el gen reportero presentaba una activación menor (principalmente Pam3CSK4, Zymosan A y Loxoribine, **figura 24D**) y la expresión de la iNOS fue inhibida casi en su totalidad en células transfectadas con un RNA de interferencia para el NFAT5 (**figura 24E**).

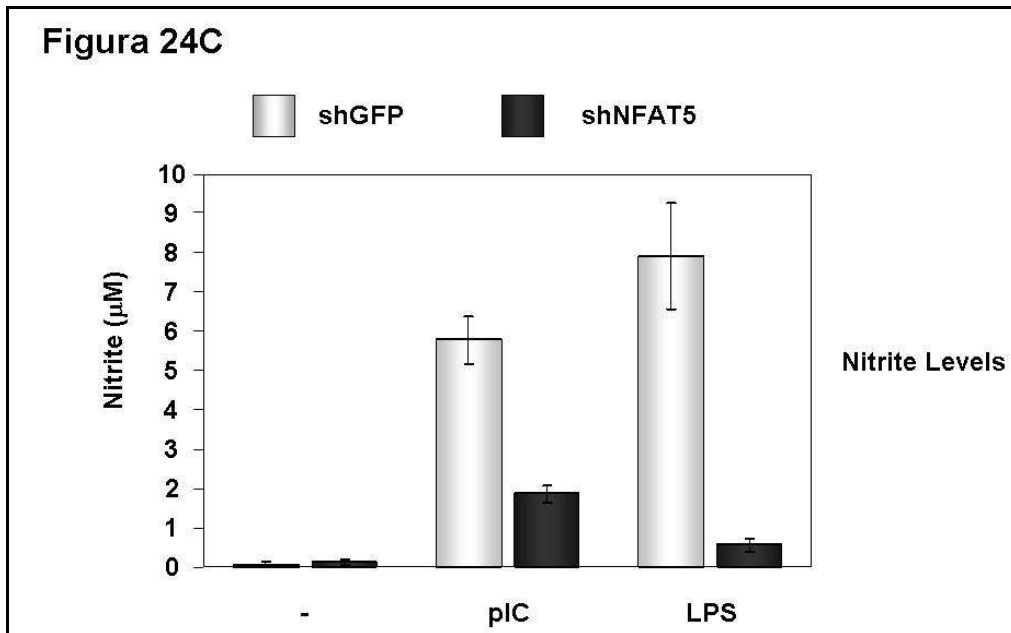


Figura 24C. La estimulación de la iNOS por los TLR es dependiente del NFAT5. Del experimento realizado en la figura 24A se midieron los niveles de nitrito en el medio de cultivo mediante el ensayo de Griess (ver materiales y métodos). Los gráficos muestran la media y la SEM de 4 experimentos independientes.

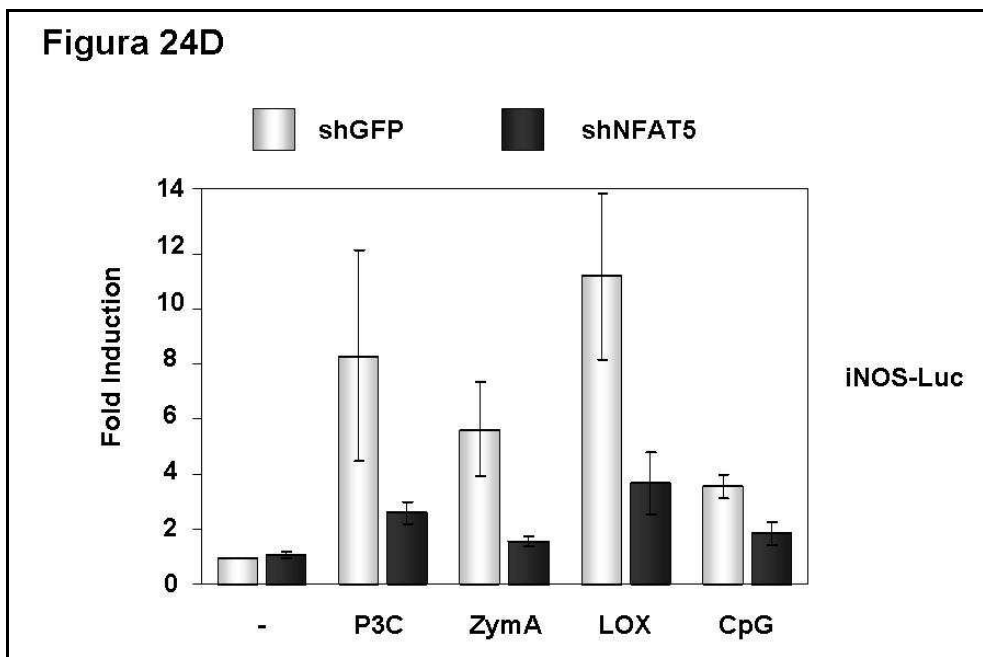


Figura 24D. La estimulación de la iNOS por los TLR es dependiente del NFAT5. Células RAW 264.7 se transfectaron con el gen reportero iNOS-luc, la TK-Renilla, y con los RNAs de interferencia para el NFAT5 o control (GFP). 24 horas después se estimularon con Pam3CSK4 (1 µg/ml), Zymosan A (300 µg/ml), Loxoribine (1 mM) o CpG DNA (1 µM) y se midió la actividad luciferasa. Los gráficos muestran la media y la SEM de 3 experimentos independientes. Las cuentas están normalizadas por TK-Renilla (control de transfección) y LDH.

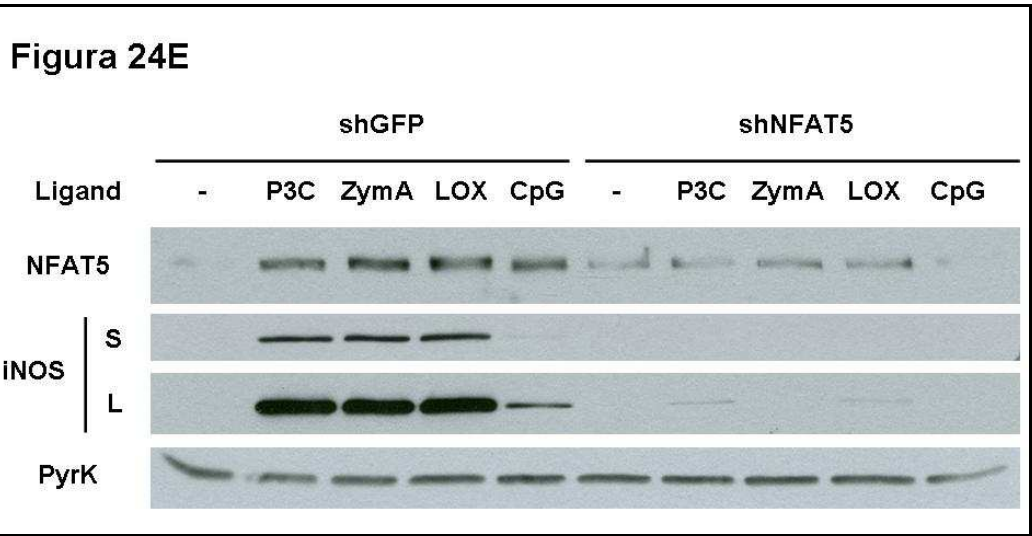


Figura 24E. La estimulación de la iNOS por los TLR es dependiente del NFAT5. *Western blot* del NFAT5, iNOS y piruvato quinasa como en B pero las células se estimularon con Pam3CSK4 (1 $\mu\text{g/ml}$), Zymosan A (300 $\mu\text{g/ml}$), Loxoribine (1 mM) o CpG DNA (1 μM). Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes. Para la iNOS se muestran dos tiempos de exposición (S, corta y L, larga).

14. La ausencia del NFAT5 no inhibe la activación del NF- κ B por los TLR

Está bien caracterizado en la literatura que la activación de la iNOS por estimulación de los TLR es dependiente de NF- κ B (184). Nuestros experimentos realizados en la línea RAW 264.7 muestran que el NFAT5 sería un nuevo factor de transcripción que también jugaría un papel relevante en la regulación de este gen.

Para descartar la posibilidad de que la ausencia del NFAT5 afectase a la activación del factor de transcripción NF- κ B, clave en la regulación de la iNOS (147, 148), realizamos experimentos con dos genes reporteros activados por el NF- κ B (HIV-Luc y 6 κ B-Luc). Células estimuladas con pIC y LPS durante 20 horas fueron capaces de activar los genes reporteros HIV-Luc (unas 3 veces) y 6 κ B-Luc (unas 6 veces) y esta activación no se vio disminuida cuando las células se transfectaron con el RNA interferente para el NFAT5 (**figura 25A y B**).

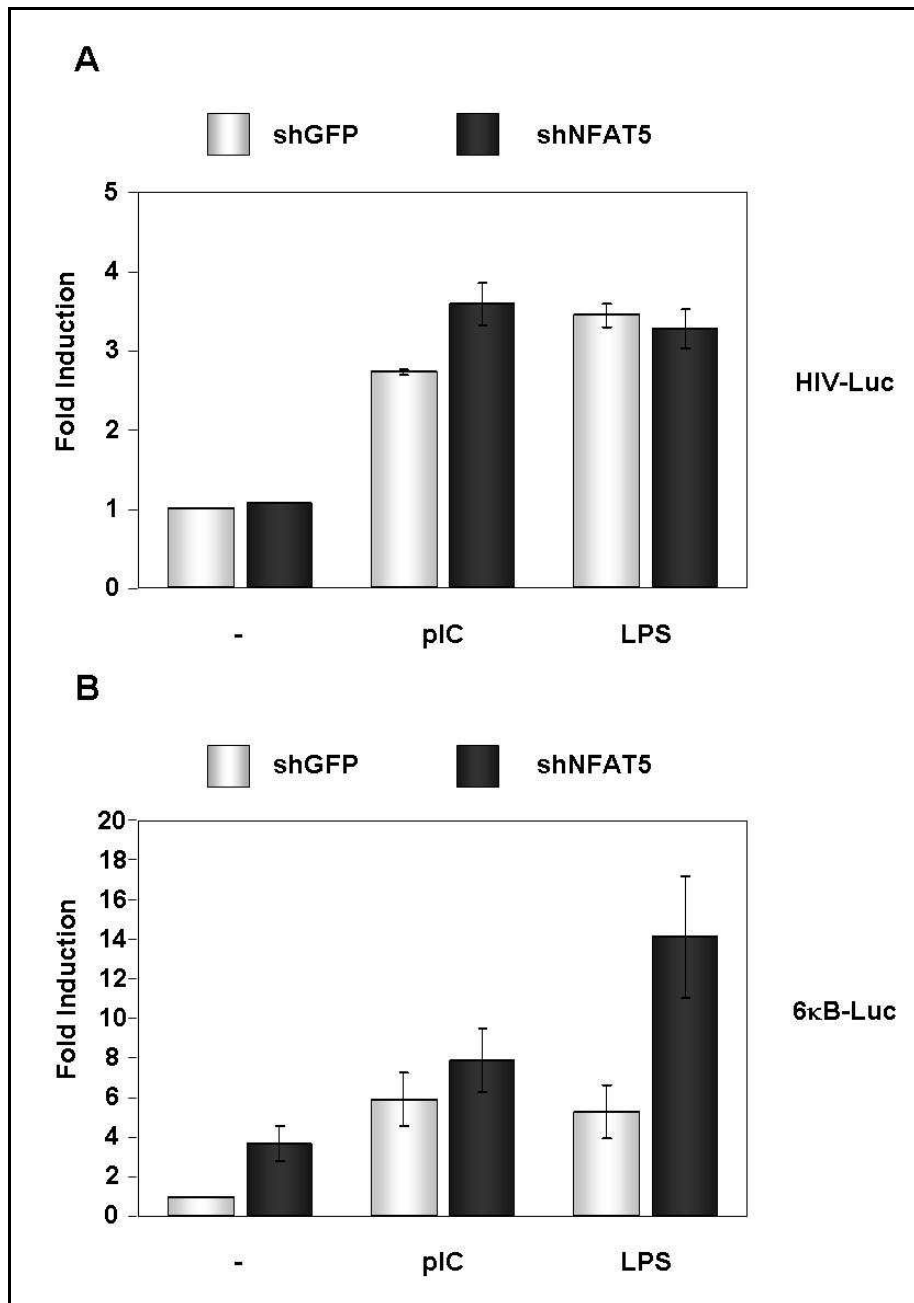


Figura 25. La ausencia del NFAT5 no inhibe en la actividad transcripcional del NF- κ B. Células RAW 264.7 se transfectaron con los genes reporteros HIV-luc (A) o 6κB-luc (B) y TK-Renilla y con los RNAs de interferencia para el NFAT5 o control (GFP). 24 horas después se estimularon con poli-IC (100 μ g/ml) o LPS (25 μ g/ml) durante 20 horas más y se midió su actividad luciferasa. Las barras muestran la media y la SEM de tres (HIV) o cinco (6κB) experimentos independientes.

15. Papel del NFAT5 en la estimulación por los TLR en células primarias

A partir de los resultados obtenidos en la línea RAW 264.7 decidimos analizar en profundidad en células primarias la contribución del NFAT5 en la activación de varios genes proinflamatorios por estimulación de los TLR. Hay varios tipos celulares descritos que responden a los TLR tales como macrófagos peritoneales, derivados de médula ósea y células B, entre otros, los cuales se estudian rutinariamente en modelos murinos (104, 108, 185, 186).

16. Los esplenocitos

Exploramos el comportamiento de los esplenocitos procedentes del bazo de ratón en respuesta a la activación de los TLR. Los linfocitos B pueden estimularse con LPS y expresan el marcador de activación temprano CD69 (187-189).

Comparamos la expresión de este marcador en esplenocitos de ratones normales y deficientes para el NFAT5 (para los que presentaran el marcador B220, de linfocitos B) estimulados con pIC y LPS a diferentes dosis y tiempos. Como muestra la **figura 26A-D**, los esplenocitos que expresaban B220 expresaron tempranamente CD69 en respuesta a la activación por LPS y también por pIC (6 horas) y esta expresión se mantuvo a tiempos largos (24 horas). La activación fue dependiente de la dosis utilizada. De acuerdo con observaciones previas de nuestro grupo, los bazos de ratones deficientes para el NFAT5 contarían con una mayor proporción de linfocitos B que los de ratones normales (**figura 26A-D y 26E**).

Figura 26A

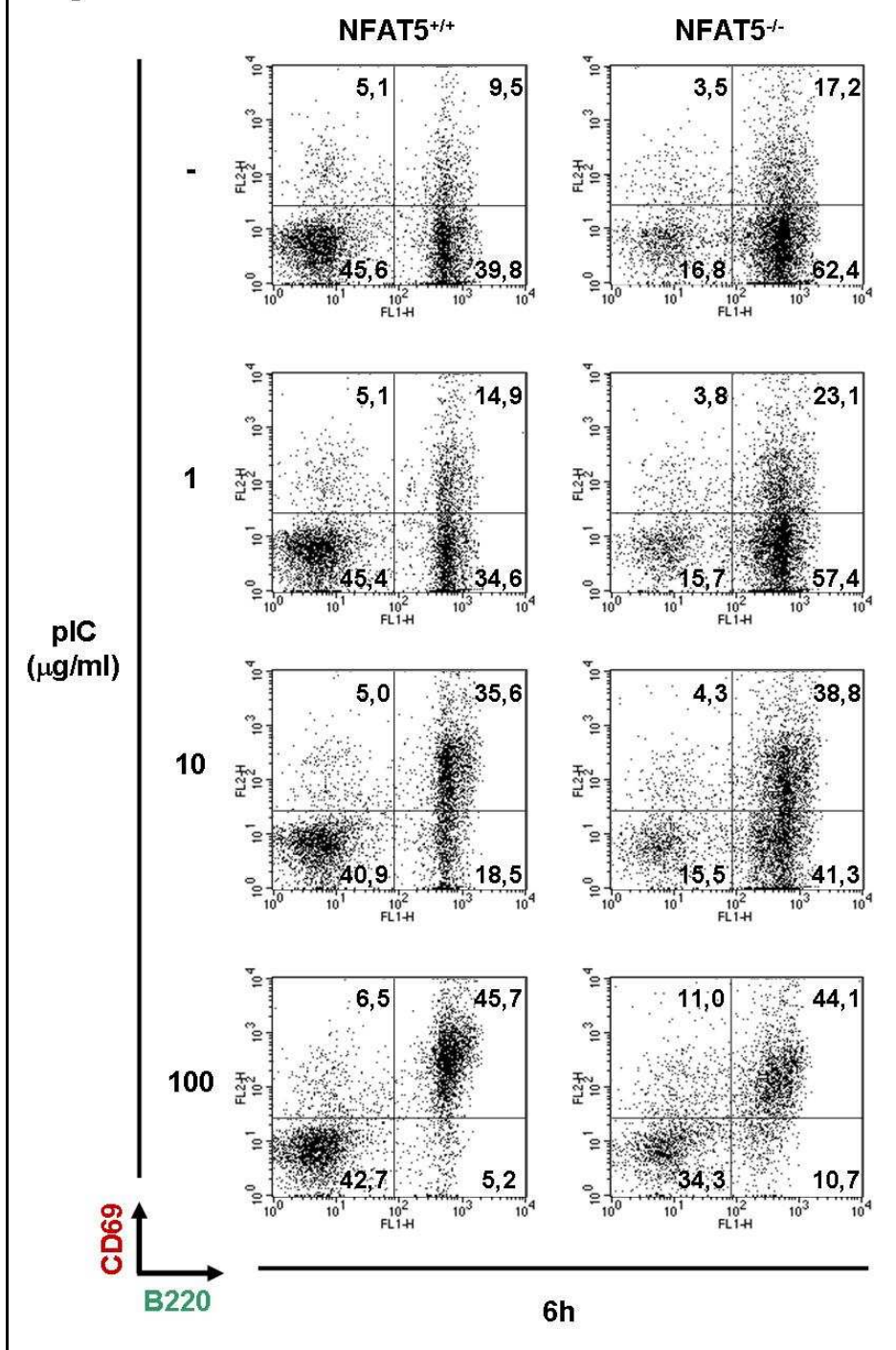


Figura 26A. Activación de esplenocitos por los TLR. Los esplenocitos extraídos de bazo de ratones normales y deficientes para el NFAT5 se estimularon con pIC durante 6 horas con las dosis indicadas y se analizó la expresión del marcador de activación CD69 en las células que expresaran B220 por citometría de flujo. Los gráficos son representativos de cinco experimentos independientes.

Figura 26B

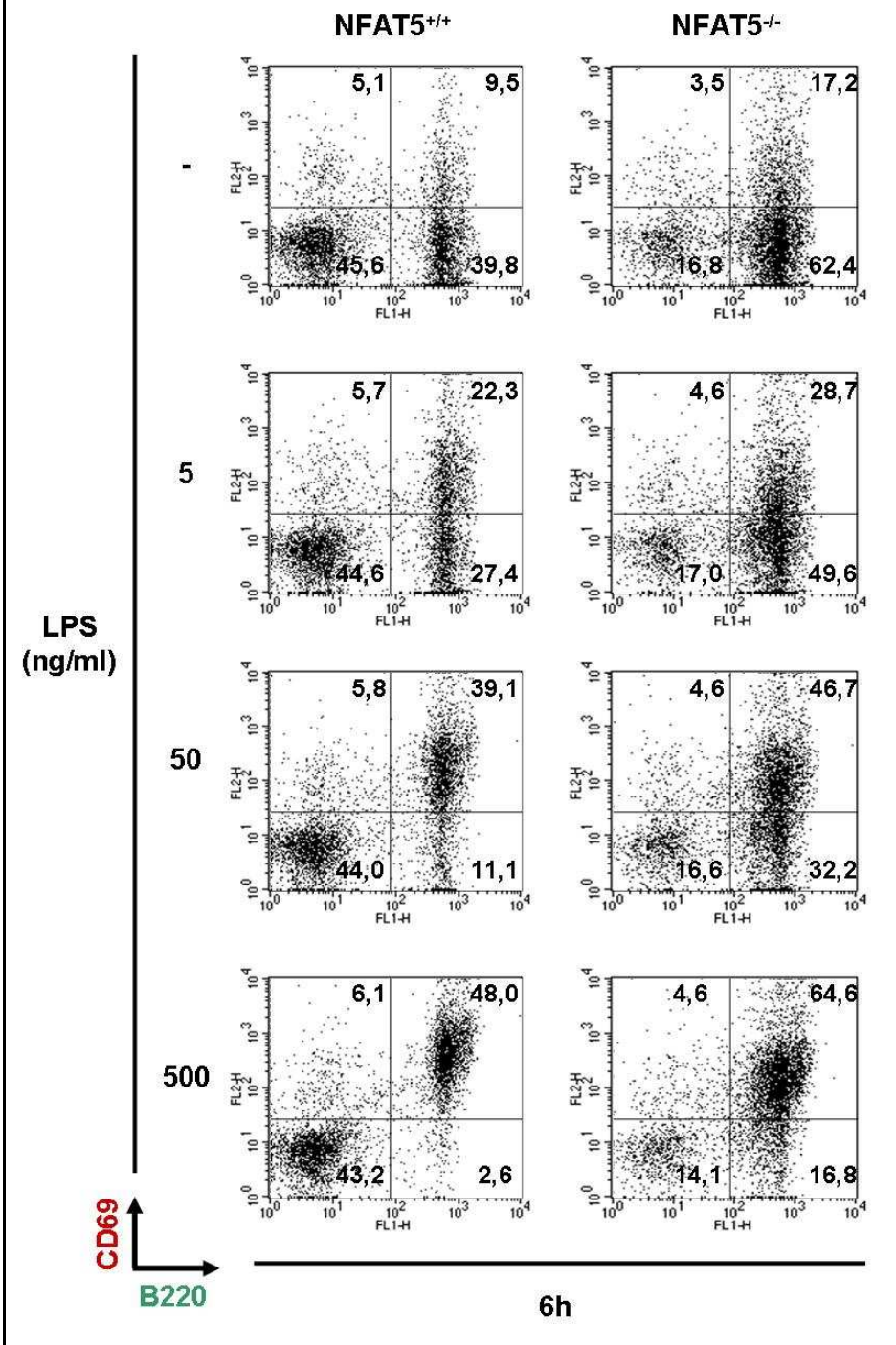


Figura 26B. Activación de esplenocitos por los TLR. Experimento realizado como en la figura 15A, pero las células se estimularon con LPS.

Figura 26C

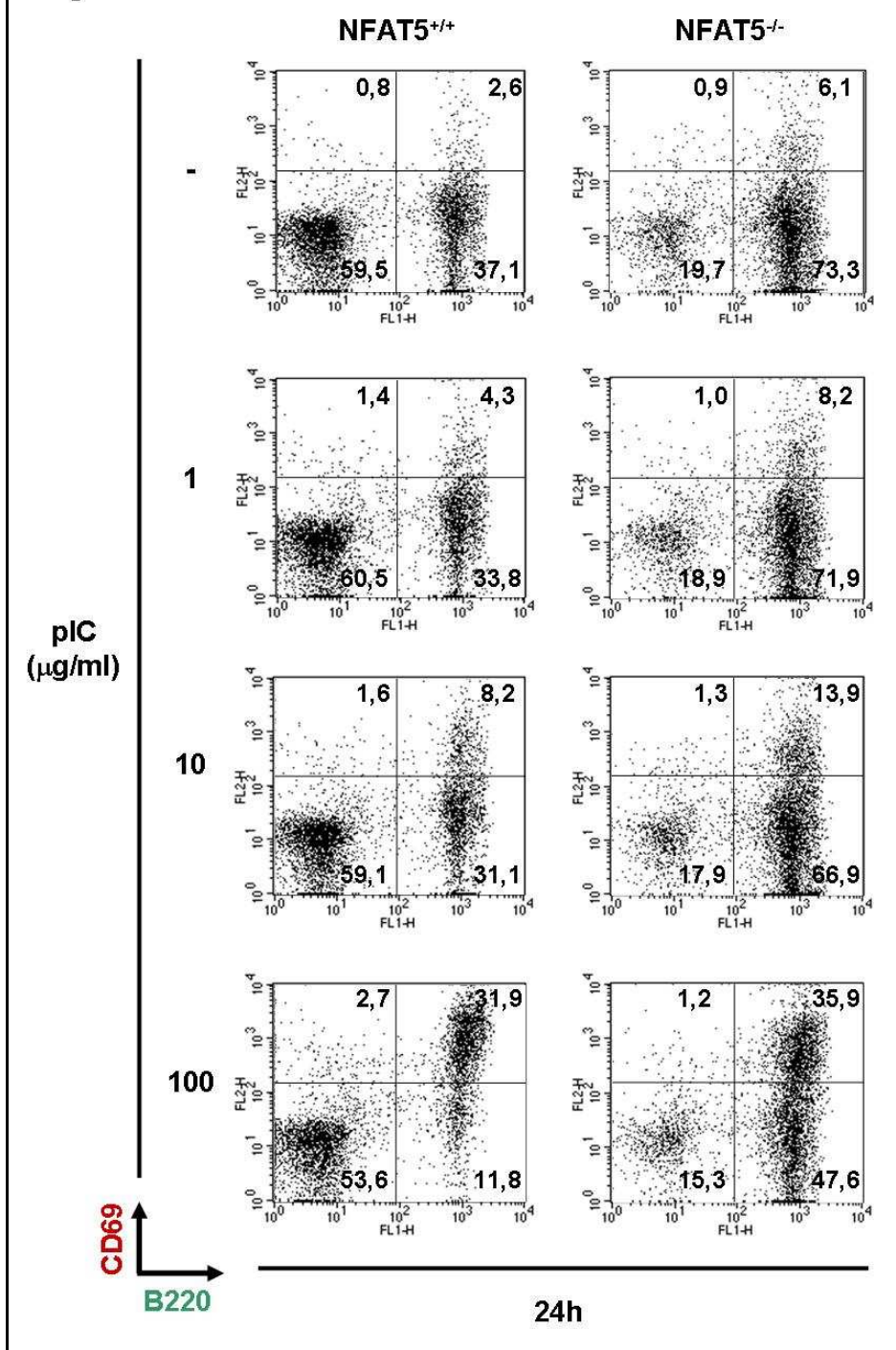


Figura 26C. Activación de esplenocitos por los TLR. Experimento realizado como en la figura 15A, pero las células se estimularon con pIC durante 24 horas.

Figura 26D

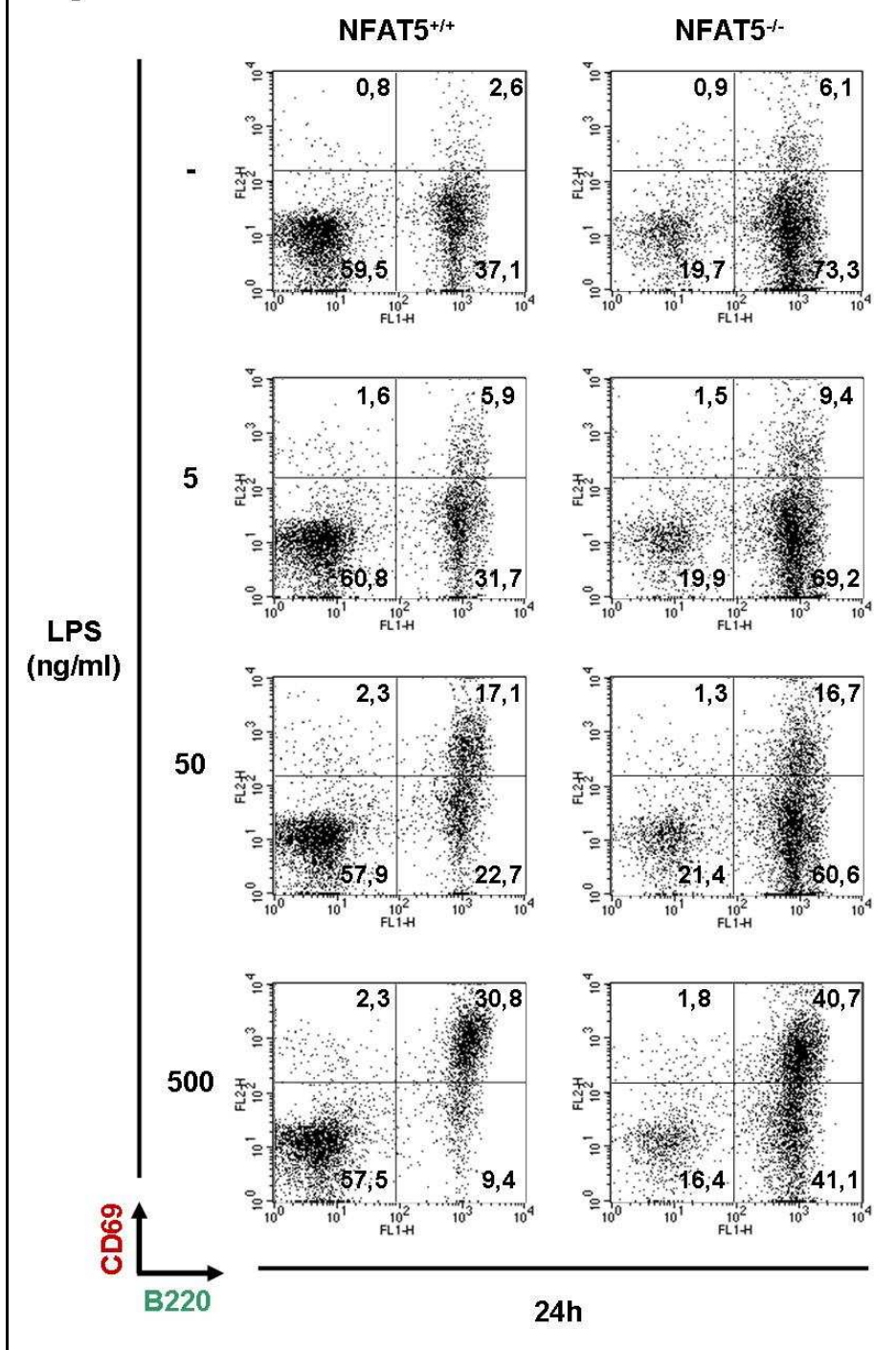


Figura 26D. Activación de esplenocitos por los TLR. Experimento realizado como en la figura 15C, pero las células se estimularon con LPS durante 24 horas.

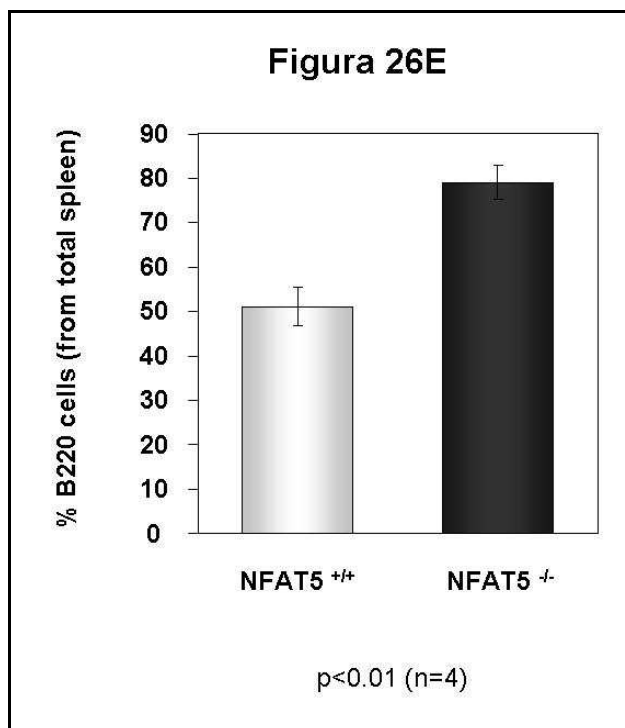


Figura 26E. Activación de esplenocitos por los TLR. Porcentaje de células B220 positivas de los esplenocitos extraídos. Se muestra la media y la SEM (n=4 $p < 0,01$).

Mientras que a tiempos cortos (6 horas de activación), la proporción de células positivas para CD69 varió muy poco en células normales respecto a las deficientes para el NFAT5 (**figura 26F**), a 24 horas pudimos ver indicios de una menor activación de los linfocitos B en los ratones deficientes para el NFAT5 (**figura 26G**). A dosis altas de pIC (100 $\mu\text{g/ml}$) y LPS (50 y 500 ng/ml) hubo indicios de una menor intensidad en la expresión de CD69 en células deficientes para el NFAT5 (cerca de ser estadísticamente significativa).

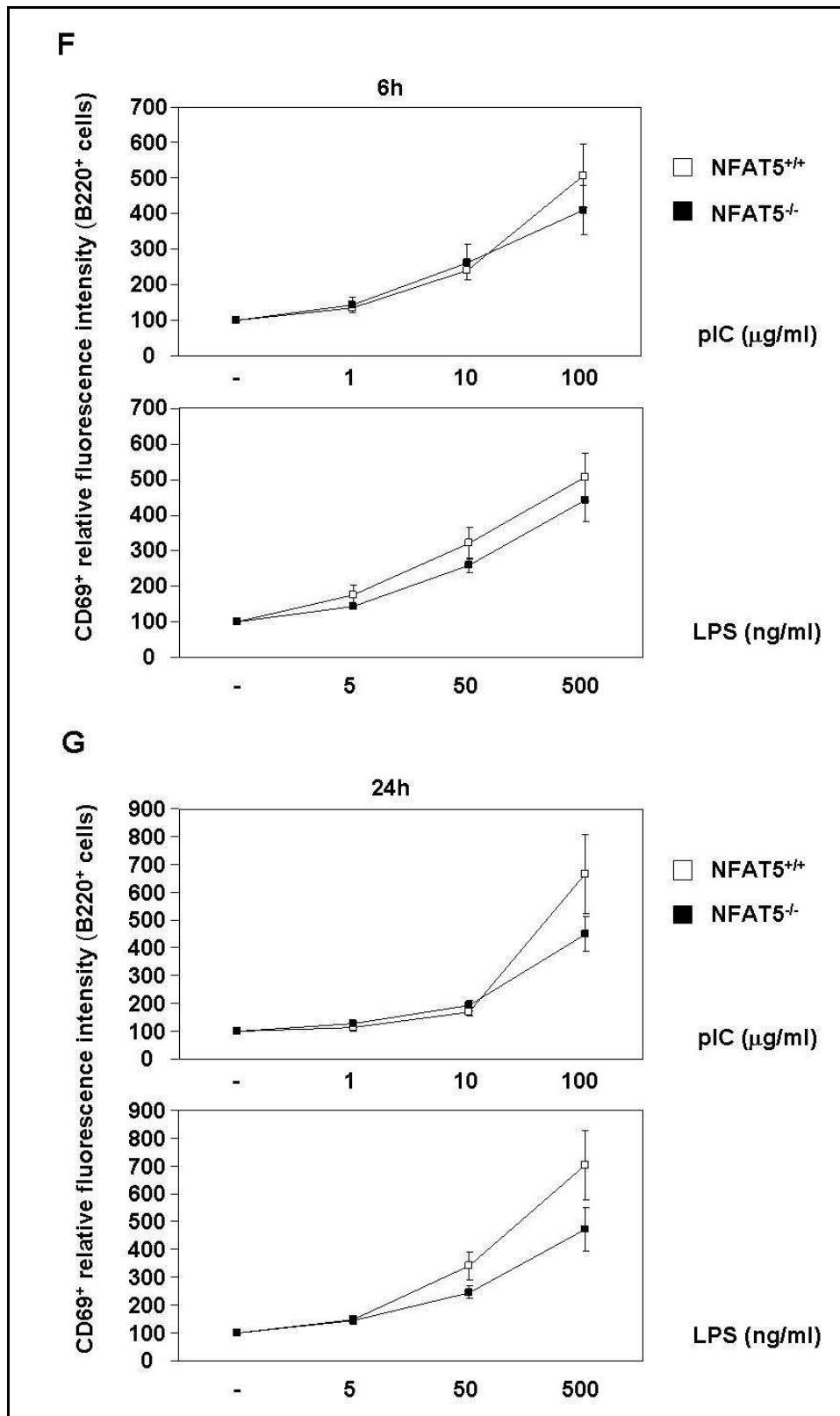


Figura 26F y G. Activación de esplenocitos por los TLR. Intensidad de fluorescencia del CD69 en esplenocitos (células B220 positivas) de ratones deficientes para el NFAT5 respecto a ratones normales, estimulados 6 horas (F) o 24 horas (G) con los estímulos mostrados en A-D. Se muestra la media y la SEM de cinco experimentos independientes. En G, pIC 100 µg/ml $p=0,115$, LPS 50 ng/ml $p=0,059$ y 500 ng/ml $p=0,074$.

17. Los macrófagos peritoneales

Aislamos macrófagos peritoneales y tras 24 horas en cultivo los estimulamos 24 horas más con pIC y LPS, recogimos el sobrenadante y medimos los niveles de nitrito como medida de activación de la iNOS. Un análisis por citometría de flujo del marcador de macrófagos CD11b (ver también siguiente apartado) mostró que más del 90% de las células eran positivas (**figura 27B**).

Como se muestra en la **figura 27A** las células deficientes para el NFAT5 presentan una reducción en la producción de nitrito a bajas dosis de estímulo y a medida que se aumenta el estímulo la producción va aumentando y es similar a la respuesta de las células normales.

Este resultado indicaba que macrófagos deficientes para el NFAT5 presentaban una respuesta disminuida a los TLR. Sin embargo, dado que la cantidad de macrófagos peritoneales extraídos de cada ratón es baja y dificulta los experimentos que requieren de un gran número de células, continuamos el análisis de la función del NFAT5 en macrófagos utilizando macrófagos derivados de médula ósea (BMDM).

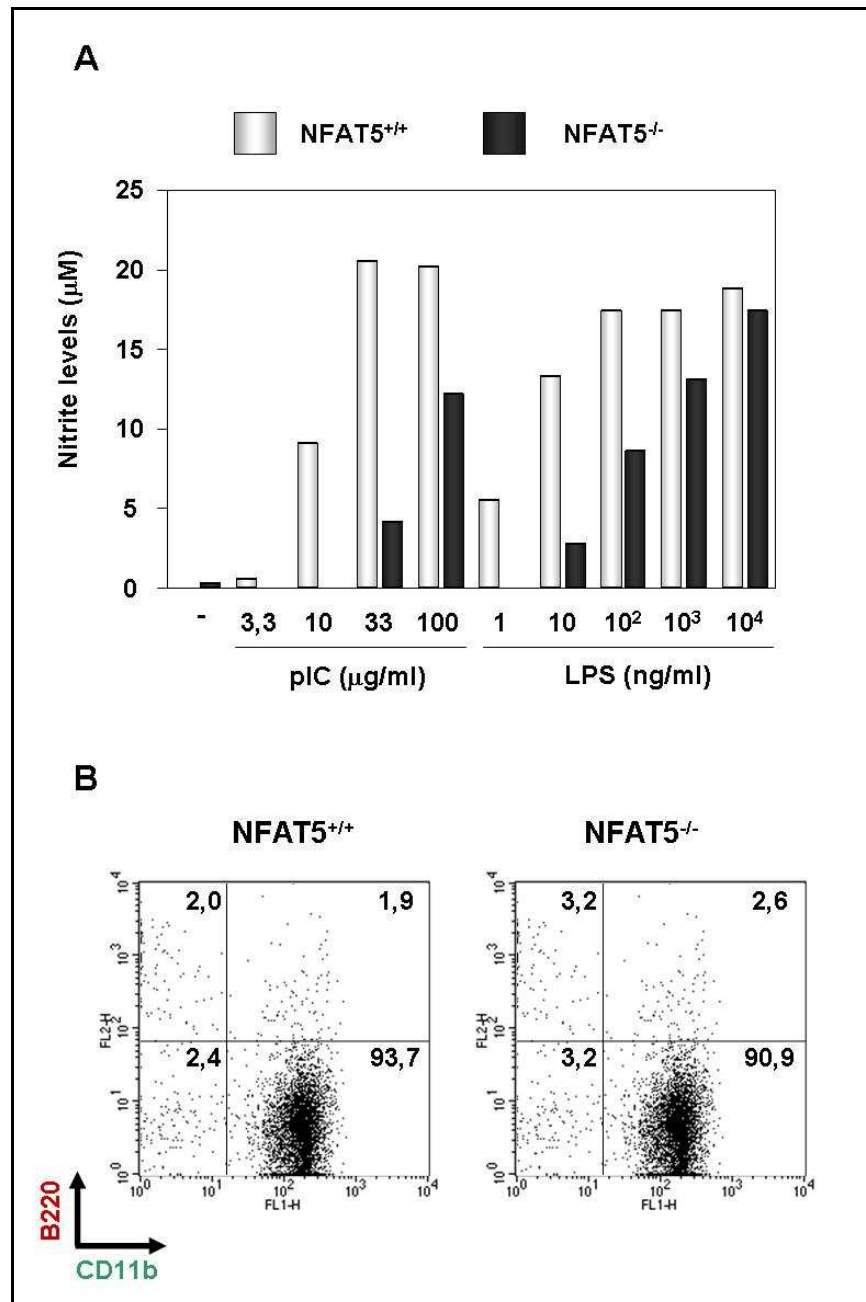


Figura 27. Efecto de la ausencia del NFAT5 en la actividad de la iNOS en macrófagos peritoneales por estimulación de PIC y LPS. (A) Macrófagos peritoneales de ratones normales y deficientes para el NFAT5 se estimularon durante 24 horas con PIC o LPS, se recogió el sobrenadante del medio y se midieron los niveles de nitrito, como un indicador de la actividad del enzima iNOS. La figura es representativa de tres experimentos independientes. (B) Expresión del marcador CD11b por citometría de flujo de macrófagos peritoneales usados en A.

18. Los macrófagos derivados de médula ósea

Comparación de marcadores moleculares de diferenciación en ratones normales y deficientes para el NFAT5.

Decidimos analizar en profundidad en los BMDM la contribución del NFAT5 en la activación de varios genes proinflamatorios por estimulación de los TLR.

Los ratones deficientes para el NFAT5 que se utilizan en el laboratorio han sido descritos recientemente en la literatura (76). Éstos presentan elevada mortalidad embrionaria y perinatal, un tamaño inferior a los ratones normales, una morfología y función alteradas del riñón, y una incapacidad de inducir genes osmoprotectores, como la aldosa reductasa. Se optimizó la viabilidad de este modelo animal al introducirlo en diferentes fondos genéticos y observar que en el fondo 129sv su viabilidad se incrementaba notablemente de modo que un 20-40% de los ratones NFAT5^{-/-} sobreviven más de 2 meses de vida. Otro grupo que también ha descrito ratones deficientes para el NFAT5 indica que hay además una disminución de celularidad en el timo y en el bazo y en el crecimiento normal de estas células, atribuido a que el microambiente en órganos linfoides es ligeramente hipertónico (85).

En estos dos trabajos publicados no todos los tipos celulares, como por ejemplo los macrófagos derivados de médula ósea, han sido caracterizados, aunque otro trabajo publicado recientemente no ha observado diferencias en macrófagos deficientes para el NFAT5 (90). Para descartar que los efectos observados en nuestros experimentos pudieran deberse a una diferenciación anómala de los BMDM en los ratones deficientes para el NFAT5, analizamos por citometría de flujo una serie de marcadores de superficie utilizados para caracterizarlos:

- CD11b, también llamado Mac-1 es el marcador típico de macrófagos (190) y es el más utilizado en la literatura para monitorizar la correcta diferenciación de la médula ósea con M-CSF o sobrenadante de la línea murina L929.

- CD11c es un marcador típico de células dendríticas, aunque se ha descrito que además está presente en macrófagos diferenciados *in vitro* (191-193).

- B220 es un marcador típico de células B, aunque ciertas células dendríticas (plasmacitoides) lo presentan y en principio no está presente en macrófagos (194, 195).

- CD4 es un marcador típico de una población de células T, aunque también se ha descrito en aproximadamente un 5% de los macrófagos (196, 197).

Como se observa en la **figura 28A-C**, más del 90% de los macrófagos diferenciados presentaban CD11b, un 20-25% CD11c, un 3-4% CD4 y menos de un 2% B220. No se observaron diferencias significativas en la proporción de los marcadores entre los BMDM de ratones deficientes para el NFAT5 y los normales, indicando que la ausencia del NFAT5 no afectaba al proceso de diferenciación *in vitro* de los macrófagos, al menos en lo que a expresión de marcadores se refiere.

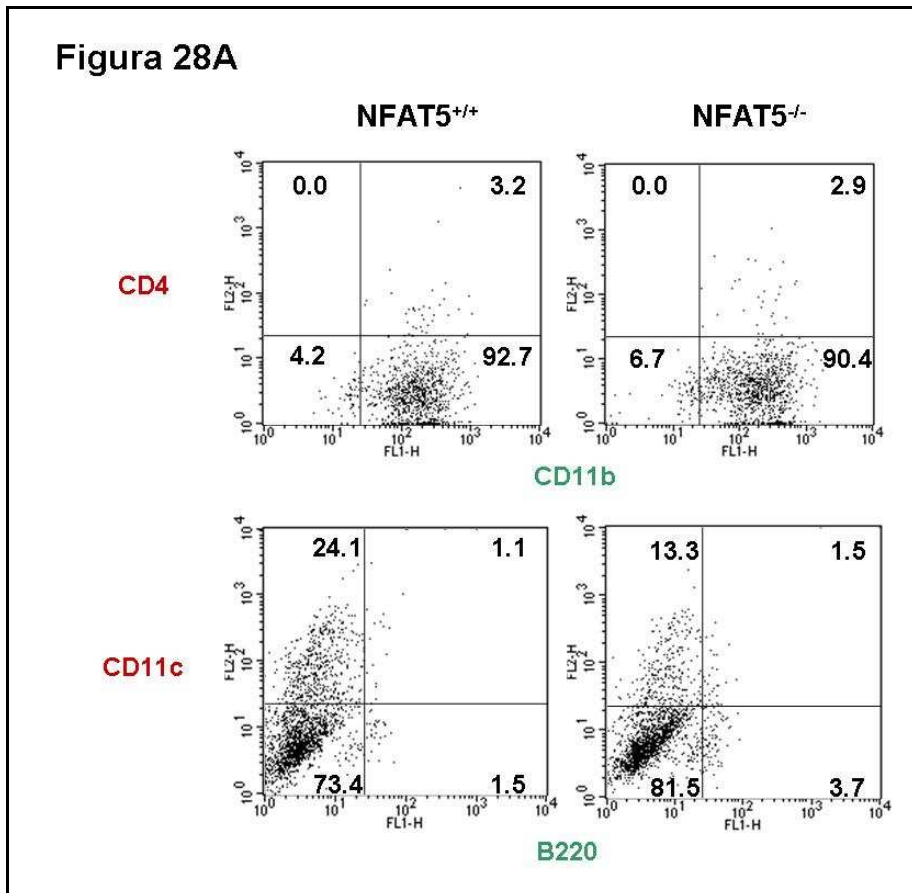


Figura 28A. Los BMDM de los ratones NFAT5^{+/+} y NFAT5^{-/-} se diferencian de forma similar. Análisis de diferentes marcadores de superficie de los BMDM de ratones NFAT5^{+/+} y NFAT5^{-/-} (ver texto). Se muestra un diagrama de citometría, representativo de al menos seis parejas de ratones.

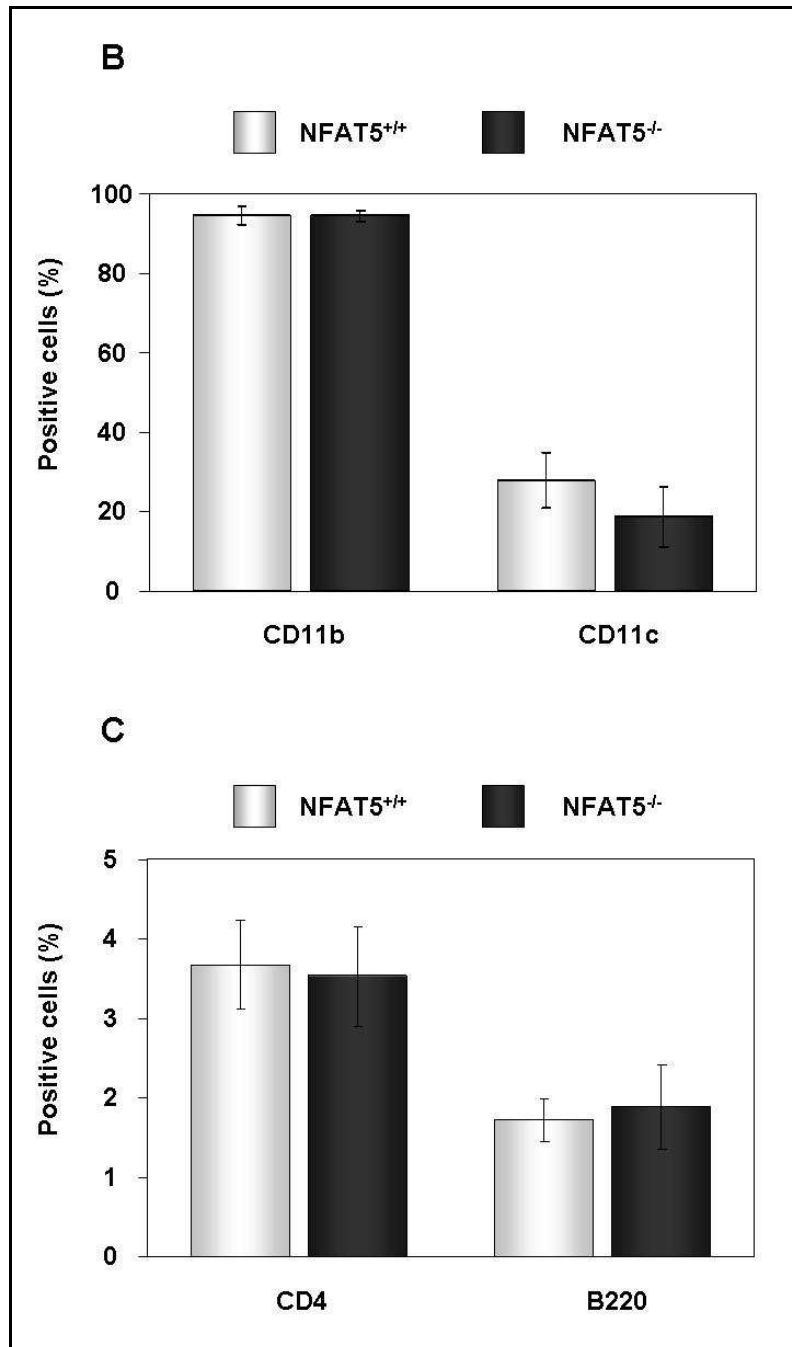


Figura 28B y C. Los BMDM de los ratones NFAT5^{+/+} y NFAT5^{-/-} se diferencian de forma similar. Porcentajes de los marcadores de superficie por separado, entre el ratón NFAT5^{+/+} y el NFAT5^{-/-}. Los gráficos muestran la media y la SEM de al menos 6 parejas de ratones.

19. Análisis de la expresión de genes proinflamatorios en los BMDM por PCR cuantitativa (RT-QPCR)

A continuación, llevamos a cabo el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR) de la expresión del RNA mensajero (mRNA) de una serie de genes que están regulados por la estimulación de los TLR. Como se muestra en la **tabla 3**, utilizando como control el gen L32, se analizó la expresión de varias citoquinas (TNF α , IL-6 y IL-12 β), quimioquinas (RANTES) y enzimas (iNOS y COX2) en macrófagos normales y deficientes para el NFAT5 estimulados a tiempos cortos y largos con pIC y LPS.

Gen	Función	Referencias
L32	Proteína del complejo ribosomal, usada comúnmente como control de carga en experimentos de RT-QPCR	(198)
Citoquinas y quimioquinas	Función	Referencias
TNF α	Hematopoyesis, protección contra infecciones bacterianas, activación de la inmunidad innata.	(133)
IL6	Reclutamiento y activación linfocitarios, importante en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa	(138)
IL12 β	Activación de la inmunidad adaptativa	(141)
RANTES	Citotoxicidad, quimiotaxis, activación de leucocitos	(154)
Enzimas	Función	Referencias
iNOS	Inhibición de enzimas bacterianos y víricos	(145, 146)
COX2	Síntesis de prostaglandinas, mediador de fiebre y presente en los sitios de inflamación	(149-151)

Tabla 3. Lista de genes utilizados para los experimentos de expresión de mRNA en los BMDM por RT-QPCR.

Los resultados de dicho análisis (**figura 29**) muestran que la estimulación con pIC y LPS indujo la acumulación del RNA mensajero del NFAT5. En cuanto a la expresión de genes regulados por los TLR, observamos que los macrófagos deficientes para el NFAT5 mostraron deficiencias en la inducción del mRNA de la IL6, IL12 β , COX2 e iNOS en respuesta a pIC y LPS. La inducción del RANTES fue moderadamente más baja en células NFAT5^{-/-} y no observamos deficiencias en la inducción del TNF α .

También se quiso explorar la expresión de los genes de interferón α y β . Sin embargo los cebadores diseñados no funcionaron y queda pendiente analizarlos con nuevos cebadores.

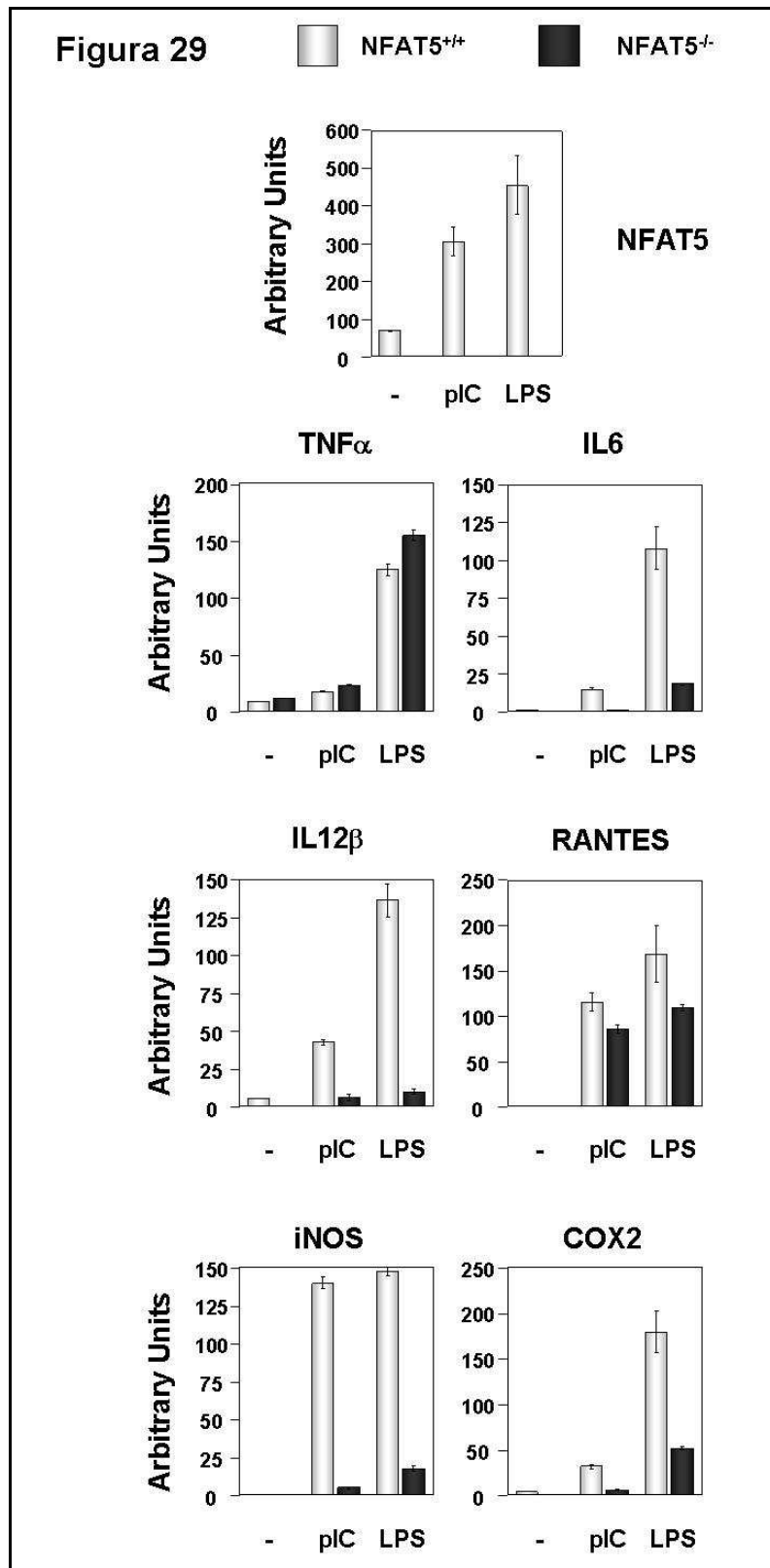


Figura 29. Patrón de expresión del NFAT5 por estimulación con pIC y LPS a 24 horas. Los BMDM se estimularon durante 24 horas con pIC (10 μ g/ml) o LPS (100 ng/ml), se lisaron y se extrajo RNA total a partir del cual se sintetizó el DNA complementario (cDNA) para medir el patrón de expresión del NFAT5, TNF α , IL6, IL12 β , RANTES, iNOS y COX2 por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR). Los resultados están normalizados por el gen L32 y se muestra la media y la desviación estándar de duplicados o triplicados de un experimento representativo de tres.

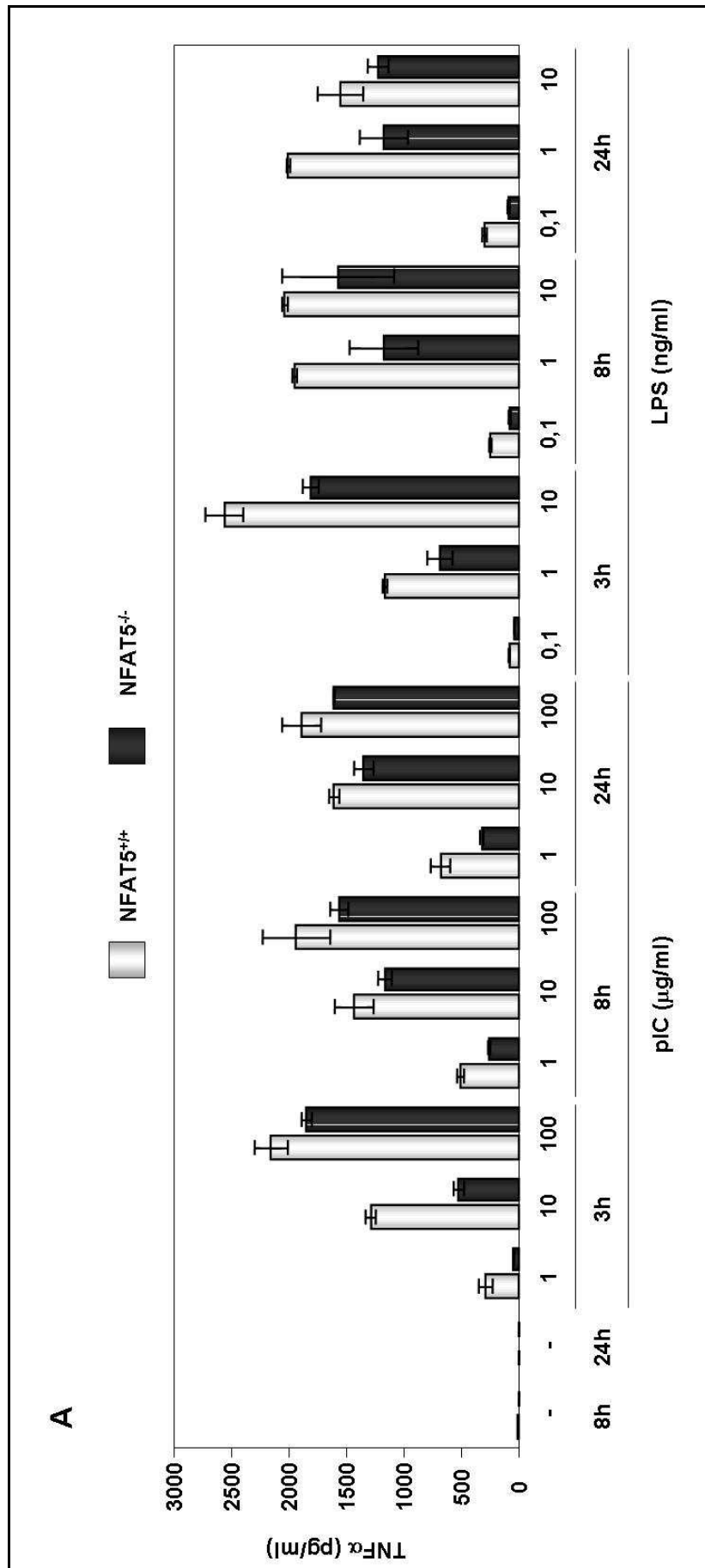
20. Análisis de la producción de citoquinas por los BMDM

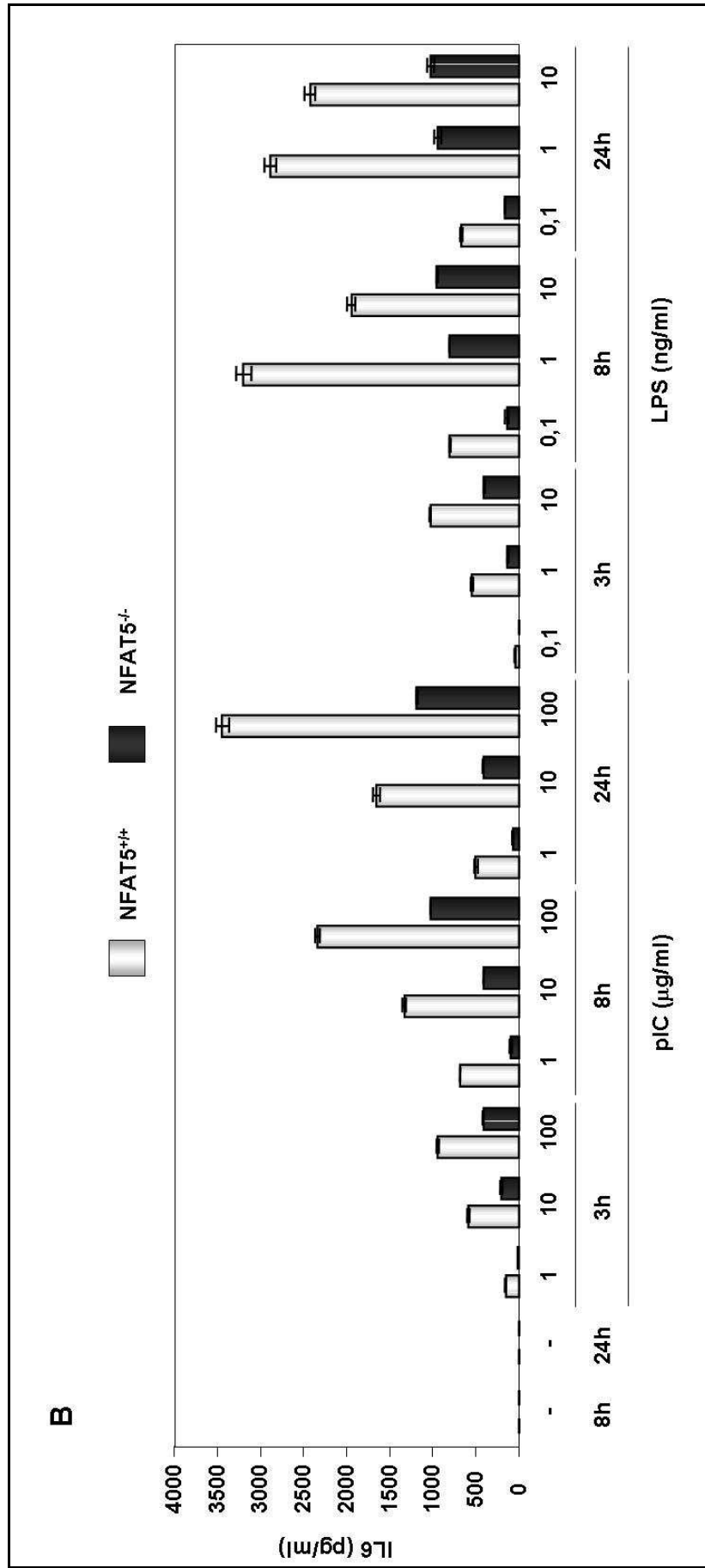
A partir de los resultados de expresión del RNA mensajero, decidimos medir por ELISA la producción de la **IL6**, la **IL12 β** y el **TNF α** en los BMDM. Utilizamos pIC y LPS a tres dosis diferentes (1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ para pIC y 0,1, 1 y 10 ng/ml para LPS) y a tres tiempos diferentes (3, 8 y 24 horas).

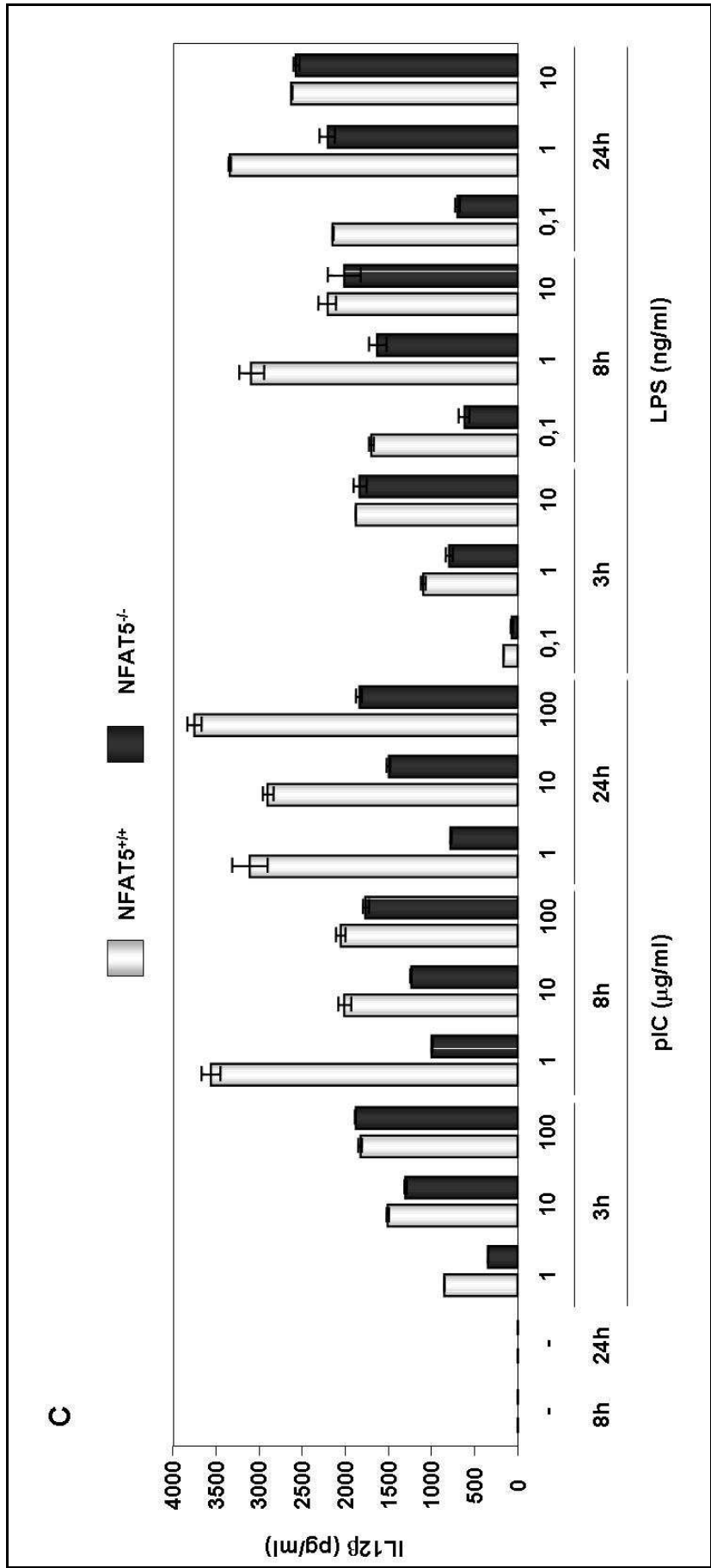
Como muestran las **figuras 30A-C** tanto la producción del **TNF α** , de la **IL6** como de la **IL12 β** se vieron afectadas en los BMDM deficientes para el NFAT5, principalmente a dosis bajas de estímulo. La **figura 30D** muestra la contribución en porcentaje de la producción de citoquinas del *knockout* respecto al *wild type*.

En la **figura 30D** se puede observar cómo con 1 $\mu\text{g/ml}$ de pIC durante 3 horas los BMDM del *knockout* produjeron sólo un 10-30% de las citoquinas respecto a los *wild type*. A 10-100 $\mu\text{g/ml}$ esta proporción aumentó para todas las citoquinas, y a 100 $\mu\text{g/ml}$ en algunos casos fue superior a los BMDM *wild type*. Para el LPS los resultados fueron similares, en el rango de estimulación de 0,1, 1 y 10 ng/ml .

Las diferencias en la producción de citoquinas en el *knockout* del NFAT5 fueron más notables a dosis bajas de estímulo, particularmente para el **TNF α** y la **IL12 β** . Sin embargo, los ratones deficientes produjeron niveles de ambas citoquinas comparables a los ratones *wild type* a dosis altas de estímulo. En cuanto a la **IL6**, los ratones deficientes mantuvieron una deficiente producción de la citoquina en todas las dosis analizadas (altas y bajas).







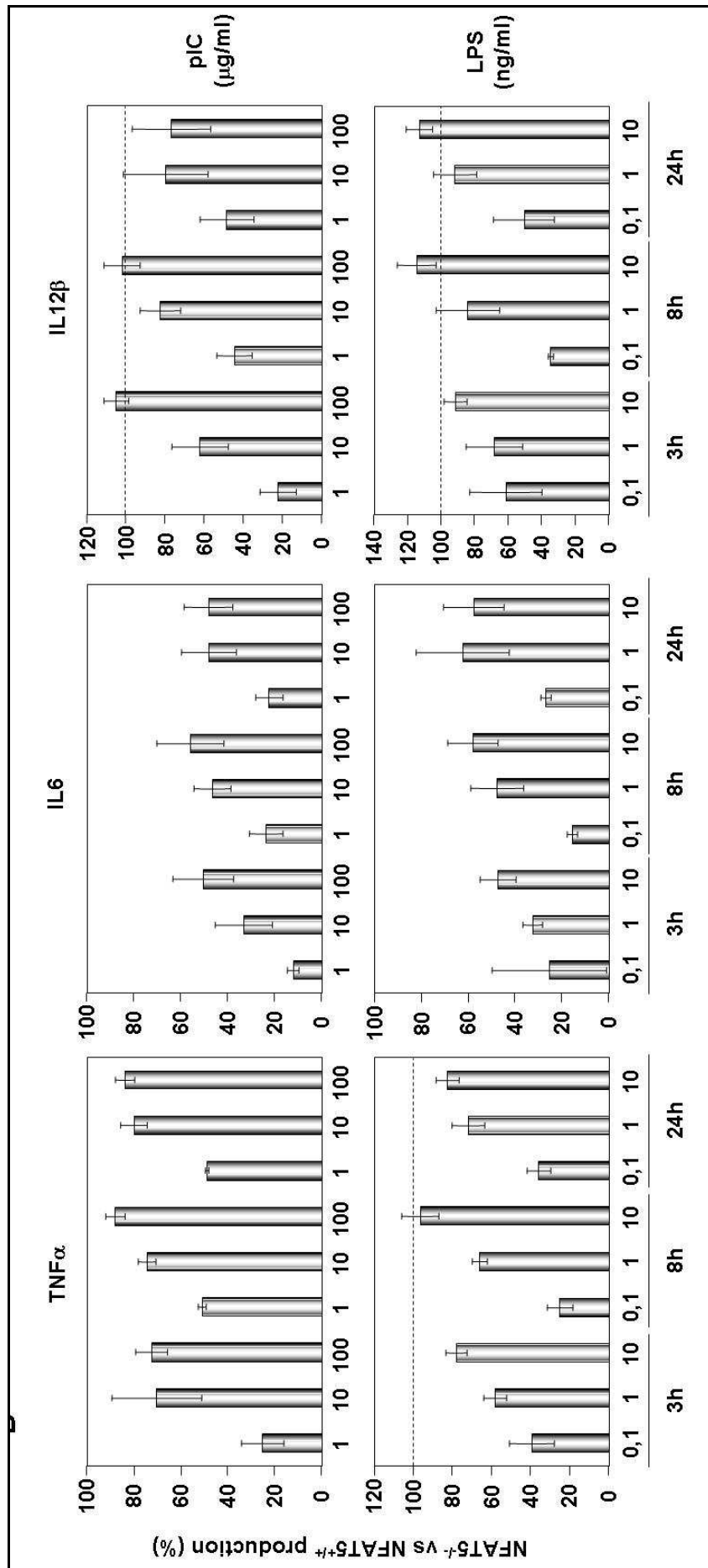


Figura 30. Liberación de citoquinas en el medio en los BMDM NFAT5^{-/-} por estimulación de pIC y LPS a diferentes tiempos. (A-C) Los BMDM se estimularon durante los tiempos y dosis indicados con pIC o LPS, se recogió el sobrenadante del medio y se midió la cantidad de TNF α (A) IL6 (B) o IL12 β (C) liberado al medio por ELISA. Los gráficos muestran la media y SD de medidas por duplicado, representativos de tres experimentos independientes con resultados similares. (D) Porcentaje de citoquinas liberadas medidas en A-C por los BMDM NFAT5^{-/-} respecto a los NFAT5^{+/+}. Se muestra la media y SEM de los tres experimentos independientes utilizados en A-C. El punto de 0,1 ng/ml de LPS se analizó en dos de los tres experimentos analizados.

21. Análisis de la expresión de la iNOS en los BMDM

También analizamos la expresión de la iNOS por *Western blot* en los BMDM estimulados con los ligandos de los TLR. Usamos nuevamente los estímulos pIC y LPS y elegimos las dosis basándonos en los experimentos de producción de citoquinas (ELISA), siendo las elegidas las dosis intermedias de ambos estímulos: 10 $\mu\text{g/ml}$ de pIC y 1 ng/ml de LPS.

Como se muestra en la **figura 31** la expresión de la iNOS se indujo en los BMDM de ratones normales estimulados con pIC (10 $\mu\text{g/ml}$) o LPS (1 ng/ml), con un máximo a 8 horas para pIC y 24 horas para LPS. En cambio macrófagos deficientes para el NFAT5 presentaron una pronunciada disminución o una ausencia de la expresión del enzima, en concordancia con los resultados de expresión de mRNA en los BMDM, niveles de nitrito en macrófagos peritoneales, y gen reportero, expresión de proteína y niveles de nitrito en la línea RAW 264.7, obtenidos anteriormente.

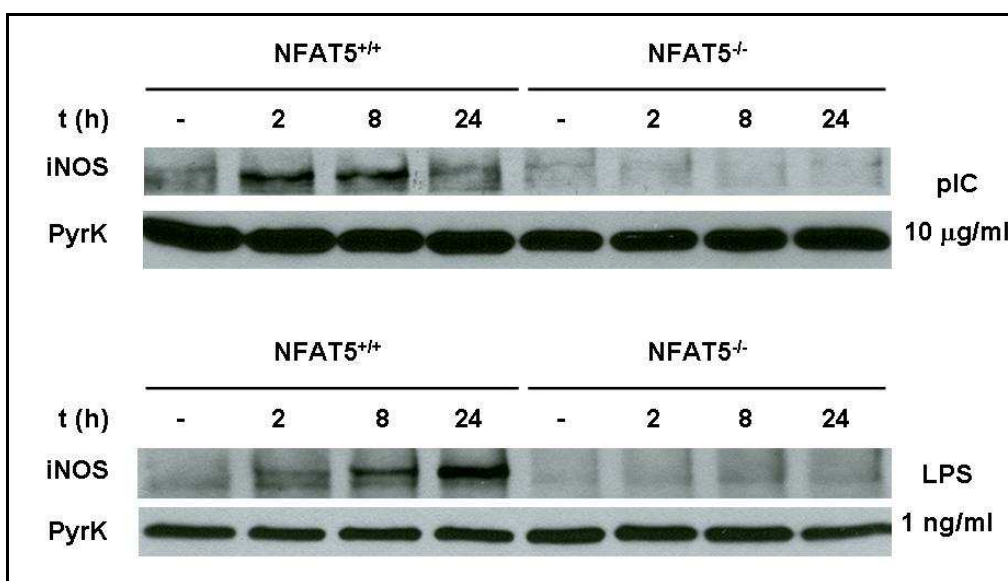


Figura 31. La inducción de la iNOS por los TLR es deficiente en ausencia del NFAT5. Macrófagos derivados de médula ósea se estimularon con pIC (10 $\mu\text{g/ml}$) y LPS (1 ng/ml) durante los tiempos indicados y se analizó la expresión de iNOS por *Western blot*. Se utilizó como control la expresión de la piruvato quinasa (PyrK). La figura es representativa de tres experimentos independientes.

22. Análisis de otras rutas de señalización activadas por los TLR en los BMDM

Estudiamos si las diferencias observadas en los BMDM por la falta del NFAT5 pudieran deberse a cambios en la actividad de vías de señalización relevantes activadas por los TLR, tales como la ruta del NF- κ B y la de las MAP quinasas (MAPKs).

Para la ruta del NF- κ B monitorizamos la degradación del I κ B α , una proteína inhibidora del NF- κ B que lo retiene en el citoplasma. La activación de los TLR causa la degradación de esta proteína en minutos, permitiendo al NF- κ B translocar al núcleo y activar sus genes diana (7). Para la ruta de las MAPKs monitorizamos la fosforilación de las tres principales quinasas de las tres rutas, p38, JNK y ERK que, mediante fosforilaciones de quinasas en cascada, activarán otra serie de factores de transcripción, como ATF2 y Jun (199). Esta fosforilación también ocurre a tiempos muy tempranos tras una estimulación de los TLR (200, 201). Para este análisis empleamos los estímulos pIC y LPS y las dosis intermedias de ambos estímulos: 10 μ g/ml de pIC y 1 ng/ml de LPS.

Los resultados de la **figura 32A** muestran cómo la I κ B α se degrada a tiempos cortos de estimulación. Para el pIC, la degradación ocurre a los 10 minutos de estimulación, y el I κ B α se vuelve a inducir a los 60 minutos. En el caso del LPS, la proteína se degrada más tarde, a los 30 minutos y no se detecta a los 60 minutos.

La fosforilación de la p38 se produjo a los 10 minutos de estimulación con pIC y ésta disminuyó progresivamente, permaneciendo aún a los 60 minutos. Con LPS la fosforilación fue máxima a los 30 minutos, disminuyendo tras 60 minutos. La cinética de fosforilación del JNK fue similar a la de la p38, para pIC fue máxima a 10 minutos de estimulación, disminuyendo después progresivamente y para LPS el máximo estuvo en 30 minutos. La ERK presentó una fosforilación basal, que aumentó a los 10 minutos de estimulación con pIC y disminuyó después progresivamente, y con LPS la fosforilación aumentó a 30 minutos y disminuyó a los 60 minutos.

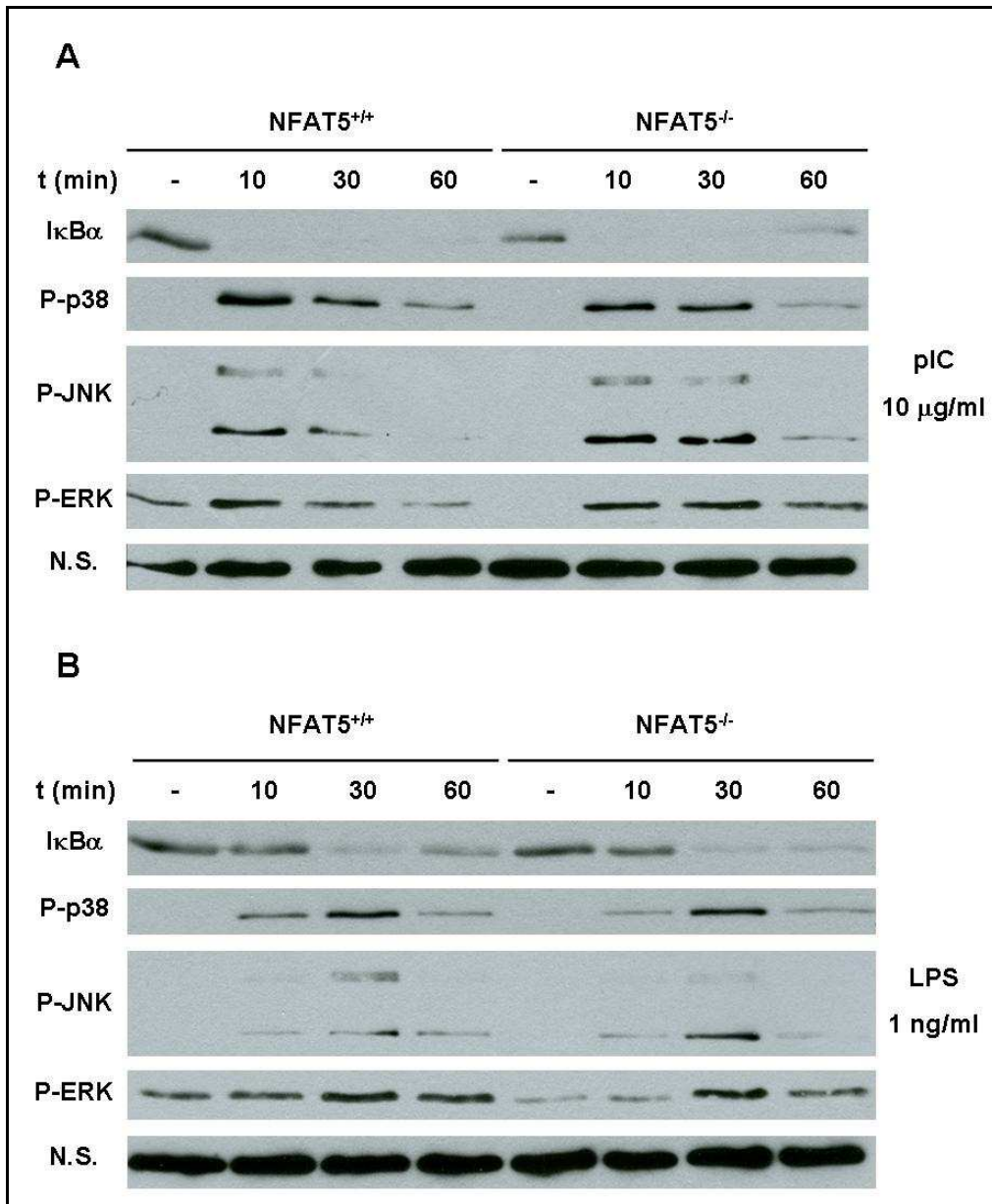


Figura 32. Activación de rutas de señalización en los BMDM NFAT5^{-/-} por la vía de los TLR. Los BMDM se estimularon con pIC (10 µg/ml, A) o LPS (1 ng/ml, B) durante los tiempos indicados y se analizó la expresión de IκBα y la fosforilación de p38, ERK y JNK por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. N.S. Banda inespecífica del anticuerpo anti-ERK como control de carga.

Para las cuatro proteínas analizadas, IκBα, p38, JNK y ERK, no observamos diferencias consistentes en los BMDM de ratones deficientes para el NFAT5 respecto a ratones normales, indicando que tanto la vía del NF-κB como la de las MAPKs no estaban afectadas por la ausencia del NFAT5 en la ruta de señalización por los TLR.

23. Inmunoprecipitación de cromatina

Al ser el NFAT5 un factor de transcripción, su función en la regulación de los genes activados por los TLR podría ser directa o indirecta, es decir, podría unirse directamente a los promotores de los genes para los cuales hemos visto diferencias (vía directa), o podría estar regulando otras proteínas que se unirían a los promotores de éstos genes para activarlos (vía indirecta). Por ello, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de cromatina para comprobar el tipo de regulación que ejerce el NFAT5.

La inmunoprecipitación de cromatina o ChIP permite determinar si un factor de transcripción se une a una región concreta del DNA *in vivo* (202, 203). Para encontrar las condiciones adecuadas probamos diferentes condiciones de cross-linking, de extracción, de sonicación y de cantidad de la muestra (ver materiales y métodos). Por otra parte, para el NFAT5 disponemos de tres tipos de anticuerpos (todos ellos policlonales): uno que reconoce la región amino-terminal, uno que reconoce el dominio de unión al DNA y uno que reconoce el extremo carboxilo-terminal.

Decidimos realizar los experimentos de ChIP para los promotores de los genes de la iNOS y la IL6, al ser éstos los que más dependencia del NFAT5 han mostrado en los experimentos previos. En primer lugar comprobamos que en la secuencia de los promotores de la IL6 y la iNOS había secuencias consenso para unirse el NFAT5 ((T/A)GGAAA) (2, 68). Diseñamos cebadores específicos para amplificar esa región en los experimentos de ChIP. La **figura 33A** muestra un esquema de las regiones promotoras de la **iNOS** y la **IL6**, con las posibles secuencias consenso de unión al NFAT5, y la localización de los cebadores diseñados.

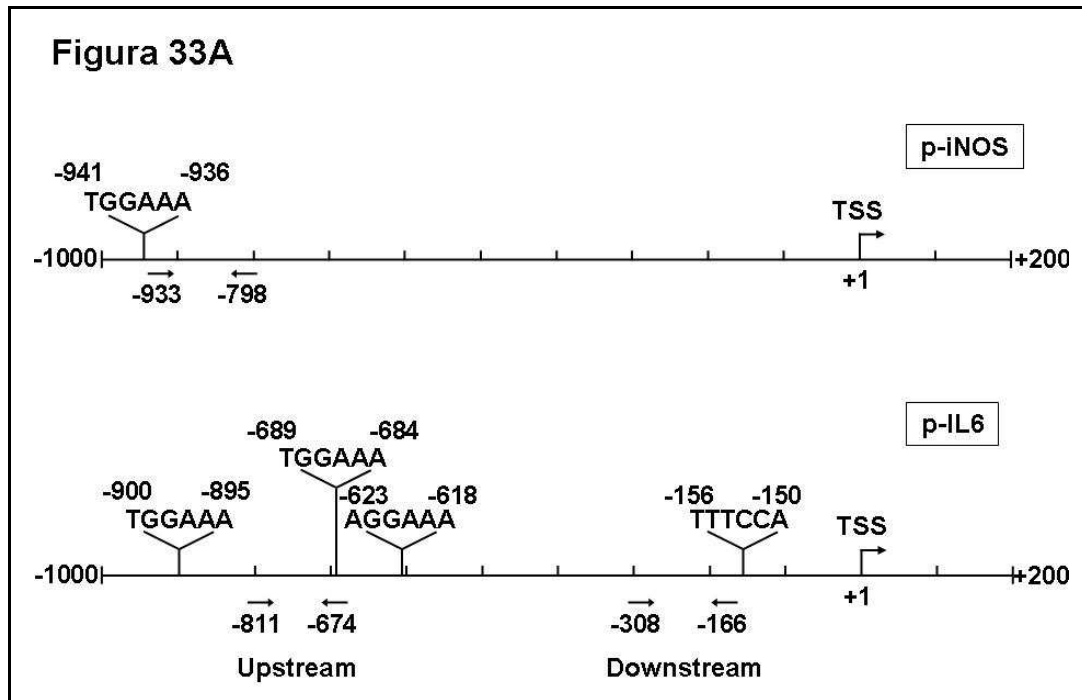


Figura 33A. Esquema del promotor de la iNOS y la IL6. El diagrama muestra las secuencias potenciales de unión al NFAT5 y la posición de los cebadores usados en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para la IL6 se muestran dos pares de cebadores diseñados, uno proximal y uno distal, respecto al inicio de transcripción.

Una vez optimizados los primeros pasos de la técnica (cantidad de muestra, cross-linker a utilizar y fragmentación de la cromatina), probamos de inmunoprecipitar cromatina en los BMDM estimulados con pIC (10 μ g/ml durante 4 horas) utilizando diferentes anticuerpos disponibles para el NFAT5, y amplificar por RT-QPCR las regiones específicas de los promotores de la iNOS (región distal) y la IL6 (región proximal) susceptibles de unirse el NFAT5.

En algún caso pudimos observar que el NFAT5 se estaba uniendo al promotor de la IL6 (región proximal), estimulando con pIC y utilizando el anticuerpo que reconocía el extremo carboxilo-terminal del NFAT5. Sin embargo estos resultados no fueron reproducibles y la ChIP con este anticuerpo fue además inespecífica ya que también arrastraba el promotor de la IL6 en células deficientes para el NFAT5. La utilización del anticuerpo que reconoce el dominio de unión a DNA del NFAT5, o el uso de los cebadores distales no dio mejores resultados (datos no mostrados). Hasta el momento en el que se empezó a escribir esta tesis no hubo tiempo de comprobar si un tercer anticuerpo, el que reconoce el extremo amino-terminal del NFAT5, era o no capaz de detectar la proteína unida al promotor de la IL6.

Para la iNOS, el uso del anticuerpo que reconocía el extremo carboxilo-terminal del NFAT5 también dio algún resultado positivo, pero no reproducible en todos los experimentos realizados (datos no mostrados). Sin embargo, para el anticuerpo que reconoce el DBD, sí fuimos capaces de detectar de forma reproducible la interacción del NFAT5 con el promotor de la iNOS, y ésta interacción fue inducible por pIC (**figura 33B**) y LPS (datos no mostrados).

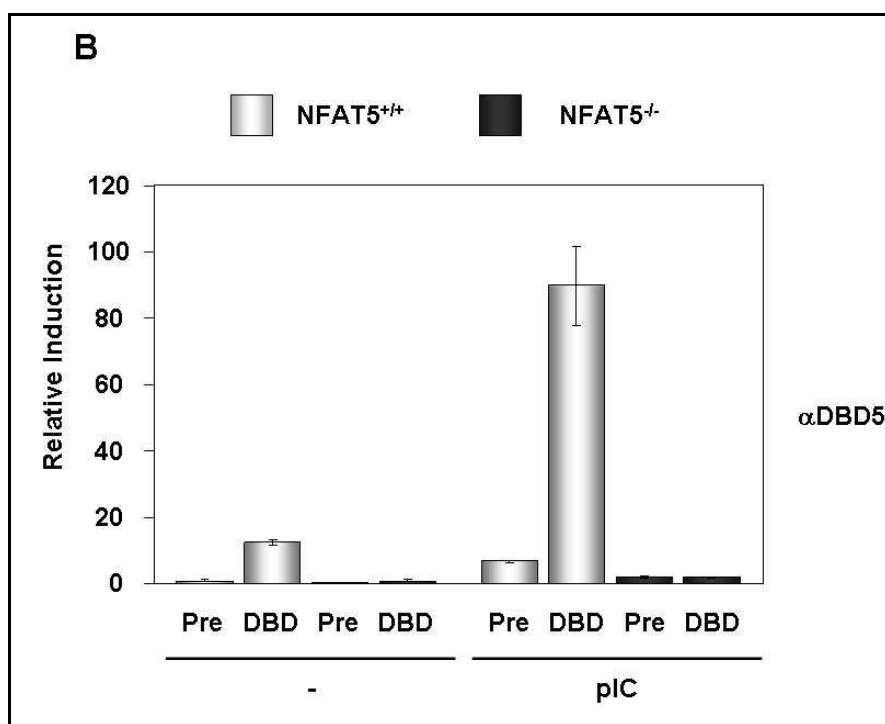


Figura 33B. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el promotor de la iNOS en los BMDM NFAT5^{-/-}. Los BMDM se estimularon durante 4 horas con pIC (10 µg/ml) y se detectó la unión del NFAT5 al promotor de la iNOS por ChIP con un anticuerpo específico para el dominio de unión al DNA del NFAT5 (DBD), utilizando como control negativo el suero preimmune (Pre). Los gráficos son representativos de cuatro experimentos independientes.

En resumen, los experimentos de ChIP muestran que el NFAT5 se une al promotor de la iNOS de forma inducible por ligandos de los TLR. Estos datos indican que el NFAT5 es un factor de transcripción que participa en la regulación de la iNOS por la estimulación de los TLR y que esta regulación es directa, a nivel del mismo promotor del gen. Estos datos coinciden con los resultados de activación del promotor de la iNOS en células RAW 264.7 (**figura 12**).

Actualmente estamos analizando las regiones reguladoras de otros genes para detectar el reclutamiento específico del NFAT5 tras la estimulación de diferentes TLR.

24. Reducción de citoquinas en respuesta al choque séptico *in vivo*

Por último, hemos comenzado a estudiar si la respuesta al choque séptico, inducido por LPS *in vivo*, está afectado en ratones deficientes para el NFAT5. Estos experimentos están aún en marcha, por lo que disponemos de pocos datos.

Resultados iniciales muestran que la inducción de choque séptico con concentraciones elevadas de LPS induce una respuesta de TNF α de mayor magnitud en los ratones *knockout* para el NFAT5 que en los *wild type* (**figura 34**). Este resultado difiere de los obtenidos con los BMDM y plantea otras interpretaciones que se discuten en detalle más adelante.

El choque séptico se hace a concentraciones de LPS mucho más elevadas de las que hemos usado en nuestros experimentos con los BMDM (5 μ g/g en ratones respecto a un máximo de 100 ng/ml en los cultivos de los BMDM).

Actualmente estamos analizando si existen diferencias a dosis bajas, que es cuando el NFAT5 es más relevante en los BMDM.

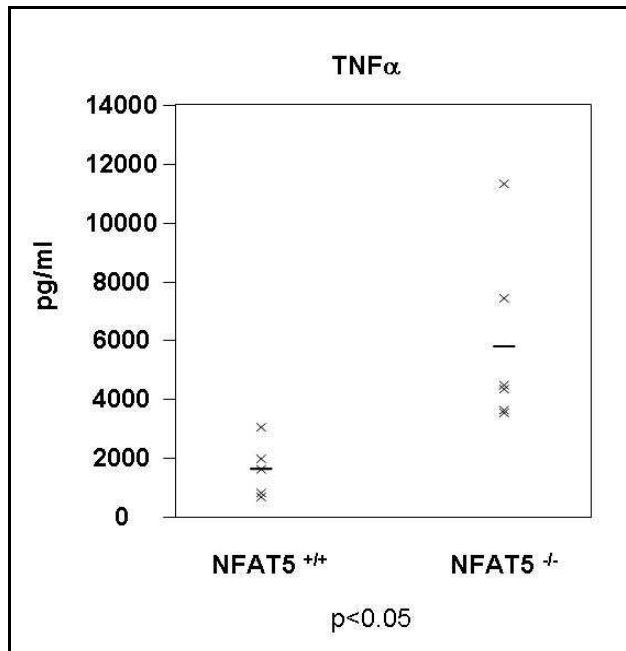


Figura 34 Producción del TNF α *in vivo* tras la inducción de choque séptico en ratones NFAT5 $^{-/-}$. Ratones normales y deficientes para el NFAT5 se estimularon con LPS por inyección intraperitoneal (5 μ g/g de ratón). Después de una hora se extrajo sangre, se aisló el suero y se midieron los niveles del TNF α .

DISCUSIÓN

1. Problemática de la identificación de proteínas asociadas al NFAT5

El objetivo inicial de este proyecto de tesis doctoral fue la identificación de interacciones entre el NFAT5 y otras proteínas que fueran relevantes para su actividad y función.

En la primera parte de este trabajo se ha descrito la puesta a punto y desarrollo de los objetivos metodológicos necesarios para abordar la purificación a gran escala del NFAT5 asociado a complejos de proteínas.

Nuestros experimentos nos han permitido purificar en condiciones reproducibles el NFAT5 asociado al menos a 6 proteínas con masas relativas desde 10 hasta 300 KDa. Obtener suficiente cantidad de proteína para la identificación por espectrometría de masas ha sido nuestro peor obstáculo. En los experimentos realizados sólo hemos podido identificar con certeza la chaperona HSP70.1. Esta interacción podría ser relevante en la función del NFAT5. Recientemente, Chen, Y. y colaboradores encontraron por un abordaje diferente 14 proteínas asociadas a una forma trunca del NFAT5 (los primeros 500 aminoácidos), en las que también encontraron dos chaperonas, una de las cuales jugaría un papel regulador en la función del NFAT5 por estrés osmótico (204).

La segunda parte de este trabajo produjo un número considerable de resultados. Éstos mostraron al NFAT5 como un nuevo regulador de una compleja y relevante vía de señalización, con un papel fundamental en la inmunidad innata. Por este motivo, la discusión de esta tesis doctoral se centrará en la regulación y función que ejerce el NFAT5 en la vía de activación de los receptores tipo *Toll*.

2. Expresión y actividad del NFAT5 en respuesta a la estimulación de macrófagos por receptores tipo Toll

Nuestros resultados muestran que la estimulación de macrófagos por ligandos de receptores tipo *Toll* inducen la expresión y activación del NFAT5. Éstos hallazgos identifican al NFAT5 como un nuevo regulador de la respuesta a los TLR.

La estimulación de los TLR aumentó la actividad transcripcional del NFAT5. Todos los ligandos analizados activaron un gen reportero dependiente del NFAT5, tanto de forma aislada como en combinación con estrés hipertónico (**figura 22**).

El efecto modesto, aunque reproducible, que los ligandos de los TLR ejercieron en la actividad del NFAT5, contrastado con la inducción de la proteína, mucho más acusada, fue llamativo. El gen reportero utilizado (*Ore-Luc*) está constituido por un fragmento del *enhancer* de la aldosa reductasa, un gen osmoprotector que está regulado por el NFAT5 en condiciones de estrés osmótico. Este gen reportero es adecuado para monitorizar la actividad del NFAT5 en respuesta a osmolaridad, pero es posible que no sea válido para medir la actividad del NFAT5 por otros tipos de estímulos. En nuestros experimentos, la actividad dependiente del NFAT5 se indujo de 15 a 20 veces en respuesta a un estrés hipertónico, mientras que los ligandos de los TLR lo aumentaron sólo 2 veces en la línea de macrófagos RAW 264.7, en contraste con el aumento de expresión de la proteína, de al menos 10 veces (**figura 22**).

Los dos estímulos que activan al NFAT5, la hipertonicidad y los TLR son marcadamente diferentes, teniendo en cuenta las quinasas que jugarían un papel en ellas. Se ha descrito que para la activación del NFAT5 por hipertonicidad son necesarias las quinasas **p38**, **Fyn**, **ATM** y **PKA** (91-93). Aunque algunas de ellas (ATM, PKA) interactúan con el NFAT5, no se ha demostrado que lo fosforilen directamente. Es posible que estas quinasas regulen otros factores que se unirían a las regiones promotoras de los genes activados.

Para la ruta de los TLR, en cambio, las quinasas implicadas son **IRAK1-4** e **IKK α/β** (para el **NF- κ B**), **TBK1/IKK ϵ** (para el IRF3) y las **MAPKs**, incluida la **p38** (para Jun/Fos, ver introducción). Aunque no sepamos qué sitios de fosforilación o qué vía de regulación afectarán al NFAT5 por esta ruta, es probable que sea diferente a la activación por estrés osmótico.

La activación de genes que regulan la respuesta al estrés osmótico o a los TLR probablemente necesita de otros tipos de factores que cooperan con el NFAT5 de forma específica para cada estímulo, hecho que explicaría la divergencia entre

expresión y actividad transcripcional (medida con el reportero Ore-Luc) del NFAT5 encontrados por estimulación de los TLR.

El NFAT5 presentó unos niveles basales de expresión muy reducidos tanto en la línea murina RAW 264.7, como en esplenocitos o en los BMDM de ratón. Éstos aumentaron de forma notable al estimular las células con ligandos de los TLR. La inducción ocurrió tanto a tiempos cortos como largos y no fue específica de ningún miembro de la familia *Toll*, puesto que todos los ligandos analizados aumentaron la expresión del NFAT5 (Pam₃CSK₄, Zymosan A, pIC, LPS, Loxoribine y CpG DNA, **figuras 22 y 23**).

Los análisis de mRNA en los BMDM muestran que la expresión del NFAT5 también aumenta por estimulación de los TLR (**figura 29**). Para el estrés osmótico, aumenta tanto el mRNA como la proteína del NFAT5. Aunque se desconoce si la proteína se estabiliza, aumentando su vida media, se ha descrito que la estimulación con hipertoncidad aumenta la estabilidad del mRNA del NFAT5, jugando un papel importante la región 5' no traducida del mRNA (5' UTR) (205). Es posible que esta región sea también necesaria para la estabilidad del mRNA del NFAT5 inducido por la vía de los TLR.

3. Función del NFAT5 en la expresión de genes inducidos en respuesta a los receptores tipo Toll

Los experimentos para determinar los niveles de expresión de genes inducidos por la vía de los TLR, por RT-QPCR y genes reporteros, mostraron cómo varios de ellos eran regulados por el NFAT5. La citoquina más afectada en células deficientes para el NFAT5 estimuladas con los ligandos del TLR3 y TLR4 fue la interleuquina 6, cuya expresión se redujo considerablemente tanto a tiempos cortos como largos (**figura 30B**). La inducción de COX2 y RANTES (éste último en menor medida) también fue reducida en el *knockout* (**figura 30B-C**). La interleuquina 12 β y la iNOS también estaban afectadas (**figura 30B-C y 25**). Respecto a la iNOS, la reducción en los niveles del mRNA y la proteína en los BMDM NFAT5^{-/-} coincidió con la disminución de la expresión y actividad del gen reportero en la línea RAW 264.7 en células transfectadas con un shRNA para el NFAT5 (**figura 24A, 29B y 33B**).

Como muestran los resultados de las **figuras 24, 25, 31 y 32**, las diferencias a nivel del mRNA se observaron también a nivel de proteína para las citoquinas TNF α , IL6 e IL12 β y para la iNOS. Los resultados más claros fueron para la iNOS y la IL6, que fueron los más sensibles a la ausencia del NFAT5. TNF α e IL12 β se vieron afectados en menor medida.

Para las citoquinas TNF α , IL6 e IL12 β , su inducción se mostró más afectada en las células del *knockout* cuando se estimularon con ligandos de los TLR a bajas dosis. A dosis más elevadas del estímulo, en cambio, los BMDM deficientes para el NFAT5 mostraron una capacidad de producción de citoquinas comparable a las *wild type*. Aunque la IL6 siguió siendo dependiente del NFAT5, la falta de este factor de transcripción no pareció ser decisiva para la expresión del TNF α y la IL12 β (**figura 31**). Puesto que estas tres citoquinas están reguladas por el NF- κ B vía TLR, una posible explicación a la observación de que la ausencia del NFAT5 causa defectos serios, notables a dosis bajas de estímulo podría ser que a bajas dosis el NF- κ B se activase menos que el NFAT5 de manera que éste ejercería un papel fundamental en la regulación de estos genes (las dosis bajas utilizadas son capaces de activar a NF- κ B) (206, 207). A dosis más elevadas, sin embargo, el NF- κ B tendría mayor actividad transcripcional y al llegar al promotor sería éste el factor predominante. La falta del NFAT5 no sería entonces limitante en la transcripción génica. Experimentos futuros de inmunoprecipitación de cromatina del NF- κ B y el NFAT5 estimulando con ligandos de los TLR a diferentes dosis y tiempos podrán esclarecer esta cuestión.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina sobre uno de los genes que se ha mostrado más dependiente del NFAT5, el de la iNOS, muestran que el NFAT5 se unió al promotor de la iNOS estimulando con pIC y LPS (**figura 34** y datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en el análisis *in vivo* de producción de citoquinas por choque séptico en ratones deficientes para el NFAT5 han sido inesperados. Mientras que en los BMDM del *knockout* obtuvimos niveles inferiores del TNF α , IL6 e IL12 β , la inyección de LPS peritoneal en ratones y posterior medida de citoquinas en suero ha dado como resultado mayores niveles del TNF α en ratones *knockout* respecto a los *wild type*.

Este hecho podría tener varias posibles explicaciones:

1) Efecto de la dosis. Los experimentos en los BMDM muestran que la ausencia del NFAT5 afecta de manera más pronunciada a la exposición del TNF α , IL6 e IL12 β a dosis bajas de estímulo (tanto pIC como LPS), mientras que a dosis elevadas la producción no se vio afectada (para TNF α e IL12 β). La dosis de LPS utilizada para la inducción del shock séptico es bastante elevada, 5 μ g/ml (5 μ g/g de ratón, asumiendo como aproximación 1 g = 1 ml), en comparación con el rango de 0,1-10 ng/ml en el que detectamos defectos en la producción del TNF α , IL6 e IL12 β en los BMDM deficientes para el NFAT5. Experimentos posteriores con dosis inferiores podrían esclarecer esta cuestión.

2) Efecto de la osmolaridad. Datos de nuestro laboratorio indican que el plasma de los ratones deficientes para el NFAT5 es hipertónico, hecho que podría afectar en la respuesta a LPS *in vivo*. Se ha descrito que el estrés osmótico es capaz de inducir la producción de IL6 en células del epitelio intestinal (208). También se ha visto un efecto sinérgico del estrés osmótico con moléculas derivadas de patógenos en la producción del TNF α o la IL-1 β (209, 210). Es posible pues que la producción de citoquinas *in vivo* en ratones deficientes para el NFAT5 esté afectada por la hiperosmolaridad del plasma de estos ratones.

3) Ratones deficientes alterados. Los ratones deficientes para el NFAT5 no sólo son hiperosmóticos si no que también presentan otros cambios fisiológicos y patológicos. Tienen elevada mortalidad perinatal y embrionaria, un tamaño reducido, problemas renales y alteraciones de la función tímica y del bazo. En este sentido presentan una capacidad de respuesta de la inmunidad adaptativa reducida: menor desarrollo de linfocitos T y B y reducción en la producción de anticuerpos dependiente de células T CD4 (75, 85). Recientemente se ha descrito un papel fundamental de la inmunidad adaptativa como regulador de la inmunidad innata (211, 212). Tanto los

linfocitos T CD4, CD8 como los reguladores son capaces de inhibir la producción del $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL6 inducidos por la vía de los TLR. La deficiencia en células T CD4 y CD8 en los ratones $\text{NFAT5}^{-/-}$ podría contribuir en una mayor inducción del $\text{TNF}\alpha$ en respuesta al choque séptico.

4) Hay otros modelos animales que presentan respuestas inflamatorias similares, dependientes de la dosis de estímulo. Así, ratones deficientes para la proteína Tollip, que se ha descrito como un inhibidor del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y JNK en la vía de varios TLR (TLR2 y TLR4) presentan sin embargo una menor producción de citoquinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ e IL6) en respuesta a dosis bajas de LPS (en macrófagos y células dendríticas) pero no a dosis altas (inducción de choque séptico) (213). Además, la presencia de CD14, un adaptador del TLR4 necesario para la respuesta a lipopolisacárido, se ha visto que es necesaria a dosis bajas de LPS pero no a dosis altas, indicando diferentes rutas de señalización activadas por LPS según sean éstas dependientes o no de CD14, hecho que podría ser importante para el NFAT5 (214).

Nuestros datos proponen un modelo de activación del NFAT5 adaptado a situaciones de infecciones por patógenos más fisiológicas, en etapas tempranas de la infección o en condiciones de baja exposición a patógenos, mientras que en posteriores fases en las que la infección ha progresado o en condiciones patológicas de exposición a elevadas cantidades de patógenos la contribución del NFAT5 en la regulación del sistema inmunitario sería de menor relevancia.

4. El NFAT5 y la ruta de señalización por los TLR

Uno de los aspectos que no han sido abordados en esta tesis por falta de tiempo es esclarecer la ruta de señalización a través de la cual el NFAT5 es activado por los TLR. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos podemos en principio sugerir o descartar ciertos adaptadores o quinasas.

Un dato importante a tener en cuenta es que tanto la expresión como la actividad de la proteína se inducen en respuesta a todos los ligandos analizados, que activan al TLR1:2, TLR2:6, TLR3, TLR4, TLR7-8 y TLR9.

Además, en la línea murina RAW 264.7 se ha visto que la inducción de la expresión de la iNOS es dependiente del NFAT5, también por todos los ligandos utilizados. Para el resto de genes analizados, utilizamos los ligandos del TLR3 y TLR4.

Estos resultados sugieren que el estímulo que activa al NFAT5 puede ser transmitido a través del adaptador MyD88 en varios TLR, aunque para el TLR3 el adaptador involucrado sería TRIF.

Como se ha descrito en la introducción (**página 33**), MyD88 recluta las quinasas IRAK4 e IRAK1 que reclutan a su vez al adaptador TRAF6. Este adaptador promueve la activación de la quinasa TAK1 que activa a las IKK α/β , quinasas encargadas de fosforilar al I κ B, el inhibidor del NF- κ B, que posteriormente se degradará por la vía del proteasoma. TRAF3 también es reclutado por MyD88.

Hay descritas en la literatura varias secuencias de unión para las proteínas TRAFs:

(P/S/A/T)x(Q/E)E y **PxQxxD**, siendo “x” cualquier aminoácido. Son las 2 secuencias consenso de unión a las proteínas TRAF 1, 2, 3 y 5 (215, 216).

PxQxS/T/D, secuencia de unión a TRAF 1, 2, 3 y 6 (217).

PxExx(Ar/Ac), siendo “Ar” un aminoácido aromático y “Ac” un aminoácido acídico. Se ha descrito como una secuencia de unión a TRAF6 (218).

Como se puede observar en la **figura 35**, el NFAT5 presenta en su secuencia varias regiones susceptibles de ser sitios de unión a diversos TRAFs:

1) En el extremo amino-terminal, antes del dominio de unión al DNA, presenta la secuencia **PPEDLL**, que coincide con la secuencia consenso de unión a TRAF6.

1 MGGACSSFTTSSSPTIYSTSVTDSKAMQVESCSSAVGVSNRQVSEKQLTSNTVQQHPSTP
 61 KRHTVLYISP **PPEDLL** DNSRMSCQDEGCLESEQSCSMWMEDSPSNFSNMSTSSYNDNTE
 121 VPRKSRKRNPQKQRPQVGRDCEESNMDIFDADSAKAPHYVLSQLTTDNKGNSKAGNGTLE
 181 NQKGTGV--KKSPMLCGQYPVKSEKELKIVVQPETQHRARYLTEGSRGVSVDRTQQGFPTV
 241 KLEGHNEPVVLQVFGNDSEGRVVKPHGFYQACRVTGRNTTPCKEVDIEGTTVIEVGLDPSN
 301 NMTLAVDCVILKLRNADVEARIGIAGSKKKSTRARLVFRVNIMRKDGSTLTLQTPSSPI
 361 LCTQPAGVPEILKSLHSCSVKGEEVFLIGKNFLKGTQVIFQENVSDENSWKSEAIDM
 421 ELFHQNHLLIVKVPYHDQHITLPVSVGIYVVTNAGRSHDVQPFTYTPD--PAAAGALNVNVK
 481 KEISSPARPC **SFEE** AMKAMKTTGCNLDKVNIIIPNALMTPLIPSSMIKSEDTVPMEVTAEK
 541 RSSTIFKTKSVGSTQQTLENISNIAGNGSFSSPSSSHLPSENEKQQQIQPKAYNPETLT
 601 TIQTQDISQPGTFPAVSASSQLPNSDALLQQATQFQTRETQSREILQSDGTVVNLSQLTE
 661 ASQQQQQS **PLQE** QAQTLQQQISSNIFSPNSVSQLQNTIQQQLQAGSFTGSTASGSSGSVD
 721 LVQQVLEAQQQLSSVLFAPDGNENVQEQLSADIFQQVSIQSGVSPGMFSSTEPTVHTR
 781 PDNLLPGRAESVHPQSENTLSNQQQQQQQQQQVMESSAAMVMEMQQSICQAAAQIQSELF
 841 PSTASANGNLQQSPVYQQTSHMMSALSTNEDMQMQCELFSSPPAVSGNETSTTTTQQVAT
 901 PGTTMFQTSSSGDGEETGTQAKQIQNSVFQTMVQMQHSGDNQPQVNLFSSTKSMMSVQNS
 961 GTQQQGNLGFQQGNEMMSLQSGNFLQQSSHSQAQLFHPQNPIADAQNLQSQETQGSFLHSP
 1021 NPIVHSQTSTTSSEMQPPMFHSQSTIAVLQGSSVPQDQQSTNIFLSQSPMNNLQNTNTVA
 1081 QEAFFAAPNSISPLQSTSNSEQQAAFQQQAPISHIQTPMLSQEQAQPPQQGLFQPQVALG
 1141 SLPPNPMPQSQQGTMFQSQHSIVAMQSNS **PSQE** QQQQQQQQQQQQQQQQQSILFSNQNTM
 1201 ATMASPKQPPPNMIFNPQNPM **ANQE** QQNQSIFHQSNMAPMNQEQQPMQFQSQSTVSSL
 1261 QNPGPTQSESSQTPLFHSSPQIQLVQGSP **SSQE** QQVTLFLSPASMSALQTSINQQDMQQS
 1321 PLYSPQNNMPGIQGATSSPQPQATLFHNTAGGTMNQLQNSPGSSQQTSGMFLFGIQNNCS
 1381 QLLTSGPATLPDQLMAISQPGQPQNEGQPPVTLLSQMPENSPLASSINTNQNIKIDL
 1441 LVSLQNQGNN LTGSF

(P/S/A/T)x(Q/E)E TRAF 1,2,3,5 binding site (Ye, H. et.al. 1999)

PxExx(Ar/Ac) TRAF 6 binding site (Wu, H. et.al. 2003)

Figura 35. Secuencia de aminoácidos del NFAT5 con los posibles sitios de unión a proteínas TRAF. Encuadrado se muestra el dominio de unión a DNA (DBD). En la secuencia se muestran destacados (negrita y subrayados) los posibles sitios de unión a los diversos TRAFs descritos en la literatura (parte inferior, secuencias consenso de unión a los diversos TRAFs). X, cualquier aminoácido, Ar, aminoácido aromático, Ac, aminoácido ácido.

2) En el extremo carboxilo-terminal, posterior al dominio de unión al DNA, el NFAT5 presenta cinco secuencias, **SFEE**, **PLQE**, **PSQE**, **ANQE** y **SSQE**, que coinciden con una de las secuencias consensos de unión a diversos TRAFs descrita por Ye, H. y colaboradores en 1999.

Teniendo en cuenta que tanto TRAF3 como TRAF6 son proteínas adaptadoras involucradas en la ruta de señalización de los TLR, no sería de extrañar que el NFAT5 actuara en esta ruta por unión a estas proteínas mediante alguna de las secuencias encontradas. De confirmarse tal interacción, la hipótesis lógica sería que el NFAT5 pudiera ser activado por alguna de las quinasas activadas por la vía, como IRAK1-4, TAK1, TBK1 o IKKε.

El descubrimiento de la interacción o reclutamiento directo de estos TRAFs al NFAT5, junto con quinasas activadoras, no solamente podría aportar el mecanismo molecular por el cual el NFAT5 estaría siendo activado por los TLR, sino también la explicación al efecto diferencial de la dosis de estímulo en la dependencia de los genes proinflamatorios por el NFAT5.

5. El NFAT5 es un nuevo factor de transcripción regulador de la expresión génica mediada por los receptores tipo *Toll*

Nuestros experimentos abren una nueva área en la regulación de la vía de los TLR. El NF- κ B, junto con los IRF, son los que han sido más estudiados y caracterizados en la literatura. Hasta ahora el único factor de transcripción activado por el amplio abanico de la familia de los TLR que esté bien documentado es el **NF- κ B**. Otros factores, como los miembros de la familia del IRF (IRF3-7) están más restringidos a ciertos miembros de los TLR, como el TLR3-4 para el IRF3 o el TLR7-9 para IRF7 (111, 112, 219). Recientemente se ha descrito al **IRF5** como un nuevo factor de transcripción esencial en la ruta de señalización de los TLR, de forma paralela al NF- κ B, aunque está menos caracterizado (220).

Así pues, nuestros resultados revelan que el NFAT5 se puede incluir entre los factores de transcripción que responden a un amplio espectro de moléculas patogénicas, de la misma forma que el NF- κ B e IRF5. Además el papel que juega el NFAT5 en la regulación de citoquinas proinflamatorias por la activación de los TLR es relevante, a juzgar por los resultados de expresión de TNF α , IL6, IL12 β , RANTES, COX2 e iNOS en los macrófagos deficientes para el NFAT5.

Es necesario comprender la implicación funcional en la regulación de estos genes por el NFAT5. Un denominador común es que todos están incluidos en el control de la inmunidad innata (TNF α , IL6, iNOS y COX2) y adquirida (IL6, COX2 e IL12 β). Así, viendo el amplio espectro de genes regulados por el NFAT5, éste jugaría un papel importante en la inmunidad de la defensa a patógenos en diversos puntos: **1)** Inflamación general y respuesta inicial de la inmunidad innata (TNF α , RANTES, COX2, iNOS) y **2)** Conversión y regulación de la inmunidad innata a la adquirida (IL6 e IL12 β). Diversos estudios de infección con patógenos *in vivo* y en células primarias podrían llevarse a cabo para esclarecer la importancia funcional del NFAT5 en la vía de los receptores tipo *Toll*.

CONCLUSIONES

1) El NFAT5 es un nuevo factor de transcripción involucrado en la vía de los receptores tipo Toll.

2) Estímulos activadores de los TLR 2:1, 2:6, 3, 4, 7-8 y 9 inducen la expresión y actividad del NFAT5 en los macrófagos derivados de médula ósea y en la línea de macrófagos murina RAW 264.7.

3) La activación por los TLR 3 y 4 de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL6 e IL12 β es dependiente del NFAT5. Los niveles de expresión del mRNA y producción de proteína en los BMDM deficientes para el NFAT5 es menor respecto a macrófagos control. Esta diferencia es más acentuada a dosis bajas de los ligandos de los TLR.

4) La expresión y actividad de la iNOS activadas por los TLR es dependiente del NFAT5. Los niveles de expresión del mRNA y la proteína son inferiores en los BMDM deficientes para el NFAT5. Asimismo, la actividad del promotor de la iNOS inducida por ligandos de los TLR se inhibe en la línea RAW 264.7 transfectada con un RNA interferente para el NFAT5.

5) El NFAT5 es capaz de unirse al promotor de la iNOS en BMDM estimulados con ligandos del TLR3 y TLR4, medido por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

6) Diversas rutas de señalización activadas por la vía de los TLR (actividad de gen reportero del NF- κ B, degradación del I κ B y fosforilación del p38, JNK y ERK), no están afectadas por la ausencia del NFAT5.

7) Ensayos *in vivo* de inducción de choque séptico por LPS producen un aumento de liberación del TNF α en suero en ratones deficientes para el NFAT5.

BIBLIOGRAFÍA

1. Miyakawa, H., S. K. Woo, S. C. Dahl, J. S. Handler, and H. M. Kwon. 1999. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2538-2542.
2. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, A. S. Rakeman, and A. Rao. 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7214-7219.
3. Ko, B. C., C. W. Turck, K. W. Lee, Y. Yang, and S. S. Chung. 2000. Purification, identification, and characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270:52-61.
4. Pan, S., R. Tsuruta, E. S. Masuda, R. Imamura, F. Bazan, K. Arai, N. Arai, and S. Miyatake. 2000. NFATz: a novel rel similarity domain containing protein. *Biochem Biophys Res Commun* 272:765-776.
5. Gilmore, T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.
6. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh. 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25:6706-6716.
7. Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
8. Hogan, P. G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232.
9. Chen, L., J. N. Glover, P. G. Hogan, A. Rao, and S. C. Harrison. 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392:42-48.
10. Gerondakis, S., R. Grumont, R. Gugasyan, L. Wong, I. Isomura, W. Ho, and A. Banerjee. 2006. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25:6781-6799.
11. Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
12. Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Kohler, I. Julkunen, and K. Melen. 2005. NF-kappaB is transported into the nucleus by importin alpha3 and importin alpha4. *J Biol Chem* 280:15942-15951.
13. Beg, A. A., and A. S. Baldwin, Jr. 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 7:2064-2070.
14. Tam, W. F., L. H. Lee, L. Davis, and R. Sen. 2000. Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 20:2269-2284.
15. Scheidereit, C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25:6685-6705.
16. Hauer, J., S. Puschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers, C. Federle, and H. Engelmann. 2005. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2874-2879.
17. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
18. Claudio, E., K. Brown, S. Park, H. Wang, and U. Siebenlist. 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3:958-965.
19. Kayagaki, N., M. Yan, D. Seshasayee, H. Wang, W. Lee, D. M. French, I. S. Grewal, A. G. Cochran, N. C. Gordon, J. Yin, M. A. Starovasnik, and V. M. Dixit.

2002. BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 17:515-524.
20. Novack, D. V., L. Yin, A. Hagen-Stapleton, R. D. Schreiber, D. V. Goeddel, F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum. 2003. The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 198:771-781.
 21. Schneider, G., D. Saur, J. T. Siveke, R. Fritsch, F. R. Greten, and R. M. Schmid. 2006. IKKalpha controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J* 25:3801-3812.
 22. Dejardin, E., N. M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z. W. Li, M. Karin, C. F. Ware, and D. R. Green. 2002. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17:525-535.
 23. Heissmeyer, V., D. Krappmann, F. G. Wulczyn, and C. Scheidereit. 1999. NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J* 18:4766-4778.
 24. Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293:1495-1499.
 25. Zhong, H., R. E. Voll, and S. Ghosh. 1998. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1:661-671.
 26. Vermeulen, L., G. De Wilde, P. Van Damme, W. Vanden Berghe, and G. Haegeman. 2003. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* 22:1313-1324.
 27. Duran, A., M. T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2003. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J* 22:3910-3918.
 28. Buss, H., A. Dorrie, M. L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch, and M. Kracht. 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kappaB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including IkappaB kinase (IKK)-alpha, IKKbeta, IKKepsilon, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* 279:55633-55643.
 29. Gerritsen, M. E., A. J. Williams, A. S. Neish, S. Moore, Y. Shi, and T. Collins. 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2927-2932.
 30. Panne, D., T. Maniatis, and S. C. Harrison. 2007. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 129:1111-1123.
 31. Hiroi, M., and Y. Ohmori. 2003. The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J Biol Chem* 278:651-660.
 32. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
 33. Stein, B., P. C. Cogswell, and A. S. Baldwin, Jr. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13:3964-3974.
 34. Heckman, C. A., J. W. Mehew, and L. M. Boxer. 2002. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 21:3898-3908.
 35. Lim, C. A., F. Yao, J. J. Wong, J. George, H. Xu, K. P. Chiu, W. K. Sung, L. Lipovich, V. B. Vega, J. Chen, A. Shahab, X. D. Zhao, M. Hibberd, C. L. Wei, B. Lim, H. H. Ng, Y. Ruan, and K. C. Chin. 2007. Genome-wide mapping of

- RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol Cell* 27:622-635.
36. Perkins, N. D. 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25:6717-6730.
 37. Serfling, E., S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, T. Bopp, M. Stassen, and E. Schmitt. 2006. NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 36:2837-2843.
 38. Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472-484.
 39. Jin, L., P. Sliz, L. Chen, F. Macian, A. Rao, P. G. Hogan, and S. C. Harrison. 2003. An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat Struct Biol* 10:807-811.
 40. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
 41. Stroud, J. C., and L. Chen. 2003. Structure of NFAT bound to DNA as a monomer. *J Mol Biol* 334:1009-1022.
 42. Rudensky, A. Y., M. Gavin, and Y. Zheng. 2006. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* 126:253-256.
 43. Hu, H., I. Djuretic, M. S. Sundrud, and A. Rao. 2007. Transcriptional partners in regulatory T cells: Foxp3, Runx and NFAT. *Trends Immunol* 28:329-332.
 44. Giffin, M. J., J. C. Stroud, D. L. Bates, K. D. von Koenig, J. Hardin, and L. Chen. 2003. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat Struct Biol* 10:800-806.
 45. Crabtree, G. R., and E. N. Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-79.
 46. Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24:607-656.
 47. Bushdid, P. B., H. Osinska, R. R. Waclaw, J. D. Molkentin, and K. E. Yutzey. 2003. NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ Res* 92:1305-1313.
 48. Graef, I. A., F. Chen, L. Chen, A. Kuo, and G. R. Crabtree. 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105:863-875.
 49. Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P. G. Hogan, and A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6:539-550.
 50. Kehlenbach, R. H., A. Dickmanns, and L. Gerace. 1998. Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J Cell Biol* 141:863-874.
 51. Gooch, J. L. 2006. An emerging role for calcineurin Aalpha in the development and function of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F769-776.
 52. Musaro, A., K. J. McCullagh, F. J. Naya, E. N. Olson, and N. Rosenthal. 1999. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400:581-585.
 53. Al-Daraji, W. I., K. R. Grant, K. Ryan, A. Saxton, and N. J. Reynolds. 2002. Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 118:779-788.
 54. Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner, and G. R. Crabtree. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-1934.

55. Zhu, J., F. Shibasaki, R. Price, J. C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara, and F. McKeon. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93:851-861.
56. Chow, C. W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens, and R. J. Davis. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278:1638-1641.
57. Gomez del Arco, P., S. Martinez-Martinez, J. L. Maldonado, I. Ortega-Perez, and J. M. Redondo. 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* 275:13872-13878.
58. Yang, T. T., Q. Xiong, H. Enslin, R. J. Davis, and C. W. Chow. 2002. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 22:3892-3904.
59. Gwack, Y., S. Sharma, J. Nardone, B. Tanasa, A. Iuga, S. Srikanth, H. Okamura, D. Bolton, S. Feske, P. G. Hogan, and A. Rao. 2006. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441:646-650.
60. Diehn, M., A. A. Alizadeh, O. J. Rando, C. L. Liu, K. Stankunas, D. Botstein, G. R. Crabtree, and P. O. Brown. 2002. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11796-11801.
61. Davies, K. J., G. Ermak, B. A. Rothermel, M. Pritchard, J. Heitman, J. Ahnn, F. Henrique-Silva, D. Crawford, S. Canaider, P. Strippoli, P. Carinci, K. T. Min, D. S. Fox, K. W. Cunningham, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, Z. Zhang, R. S. Williams, H. P. Gerber, M. Perez-Riba, H. Seo, X. Cao, C. B. Klee, J. M. Redondo, L. J. Maltais, E. A. Bruford, S. Povey, J. D. Molkentin, F. D. McKeon, E. J. Duh, G. R. Crabtree, M. S. Cyert, S. de la Luna, and X. Estivill. 2007. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J* 21:3023-3028.
62. Willingham, A. T., A. P. Orth, S. Batalov, E. C. Peters, B. G. Wen, P. Aza-Blanc, J. B. Hogenesch, and P. G. Schultz. 2005. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309:1570-1573.
63. Gomez, M. F., L. V. Bosc, A. S. Stevenson, M. K. Wilkerson, D. C. Hill-Eubanks, and M. T. Nelson. 2003. Constitutively elevated nuclear export activity opposes Ca²⁺-dependent NFATc3 nuclear accumulation in vascular smooth muscle: role of JNK2 and Crm-1. *J Biol Chem* 278:46847-46853.
64. Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh, and L. H. Glimcher. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195:1003-1012.
65. Yang, X. Y., L. H. Wang, T. Chen, D. R. Hodge, J. H. Resau, L. DaSilva, and W. L. Farrar. 2000. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275:4541-4544.
66. Graef, I. A., J. M. Gastier, U. Francke, and G. R. Crabtree. 2001. Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5740-5745.
67. Trama, J., Q. Lu, R. G. Hawley, and S. N. Ho. 2000. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* 165:4884-4894.
68. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, L. Jin, A. S. Rakeman, M. Michino, and A. Rao. 2001. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15:47-58.
69. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, A. S. Rakeman, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, S. Thomas, C. Disteche, N. A. Jenkins, and A. Rao. 1999. NF-AT5: the

- NF-AT family of transcription factors expands in a new direction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64:517-526.
70. Stroud, J. C., C. Lopez-Rodriguez, A. Rao, and L. Chen. 2002. Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 9:90-94.
 71. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
 72. Aramburu, J., K. Drews-Elger, A. Estrada-Gelonch, J. Minguillon, B. Morancho, V. Santiago, and C. Lopez-Rodriguez. 2006. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol* 72:1597-1604.
 73. Woo, S. K., S. D. Lee, K. Y. Na, W. K. Park, and H. M. Kwon. 2002. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 22:5753-5760.
 74. Nakayama, Y., T. Peng, J. M. Sands, and S. M. Bagnasco. 2000. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* 275:38275-38280.
 75. Trama, J., W. Y. Go, and S. N. Ho. 2002. The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J Immunol* 169:5477-5488.
 76. Lopez-Rodriguez, C., C. L. Antos, J. M. Shelton, J. A. Richardson, F. Lin, T. I. Novobrantseva, R. T. Bronson, P. Igarashi, A. Rao, and E. N. Olson. 2004. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2392-2397.
 77. Ito, T., Y. Fujio, M. Hirata, T. Takatani, T. Matsuda, S. Muraoka, K. Takahashi, and J. Azuma. 2004. Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382:177-182.
 78. Kojima, R., J. D. Randall, E. Ito, H. Manshio, Y. Suzuki, and S. R. Gullans. 2004. Regulation of expression of the stress response gene, *Osp94*: identification of the tonicity response element and intracellular signalling pathways. *Biochem J* 380:783-794.
 79. Kasono, K., T. Saito, T. Saito, H. Tamemoto, C. Yanagidate, S. Uchida, M. Kawakami, S. Sasaki, and S. E. Ishikawa. 2005. Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol Dial Transplant* 20:509-515.
 80. Esensten, J. H., A. V. Tsytsykova, C. Lopez-Rodriguez, F. A. Ligeiro, A. Rao, and A. E. Goldfeld. 2005. NFAT5 binds to the TNF promoter distinctly from NFATp, c, 3 and 4, and activates TNF transcription during hypertonic stress alone. *Nucleic Acids Res* 33:3845-3854.
 81. Dahl, S. C., J. S. Handler, and H. M. Kwon. 2001. Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C248-253.
 82. Woo, S. K., S. C. Dahl, J. S. Handler, and H. M. Kwon. 2000. Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F1006-1012.
 83. Tong, E. H., J. J. Guo, A. L. Huang, H. Liu, C. D. Hu, S. S. Chung, and B. C. Ko. 2006. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J Biol Chem* 281:23870-23879.
 84. Lee, S. D., E. Colla, M. R. Sheen, K. Y. Na, and H. M. Kwon. 2003. Multiple domains of TonEBP cooperate to stimulate transcription in response to hypertonicity. *J Biol Chem* 278:47571-47577.
 85. Go, W. Y., X. Liu, M. A. Roti, F. Liu, and S. N. Ho. 2004. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10673-10678.

86. Lam, A. K., B. C. Ko, S. Tam, R. Morris, J. Y. Yang, S. K. Chung, and S. S. Chung. 2004. Osmotic response element-binding protein (OREBP) is an essential regulator of the urine concentrating mechanism. *J Biol Chem* 279:48048-48054.
87. Wang, Y., B. C. Ko, J. Y. Yang, T. T. Lam, Z. Jiang, J. Zhang, S. K. Chung, and S. S. Chung. 2005. Transgenic mice expressing dominant-negative osmotic-response element-binding protein (OREBP) in lens exhibit fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks. *J Biol Chem* 280:19986-19991.
88. Jauliac, S., C. Lopez-Rodriguez, L. M. Shaw, L. F. Brown, A. Rao, and A. Toker. 2002. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4:540-544.
89. Ranjbar, S., A. V. Tsytsykova, S. K. Lee, R. Rajsbaum, J. V. Falvo, J. Lieberman, P. Shankar, and A. E. Goldfeld. 2006. NFAT5 regulates HIV-1 in primary monocytes via a highly conserved long terminal repeat site. *PLoS Pathog* 2:e130.
90. O'Connor, R. S., S. T. Mills, K. A. Jones, S. N. Ho, and G. K. Pavlath. 2007. A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci* 120:149-159.
91. Ko, B. C., A. K. Lam, A. Kapus, L. Fan, S. K. Chung, and S. S. Chung. 2002. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/TonEBP). *J Biol Chem* 277:46085-46092.
92. Ferraris, J. D., P. Persaud, C. K. Williams, Y. Chen, and M. B. Burg. 2002. cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/ osmotic response element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16800-16805.
93. Irrazabal, C. E., J. C. Liu, M. B. Burg, and J. D. Ferraris. 2004. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8809-8814.
94. Abbas, A., and A. Lichtman. 2003. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
95. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5:971-974.
96. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
97. Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2:346-353.
98. Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203.
99. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
100. Gasque, P. 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41:1089-1098.
101. Hawiger, J. 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 23:99-109.
102. Hume, D. A., I. L. Ross, S. R. Himes, R. T. Sasmono, C. A. Wells, and T. Ravasi. 2002. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 72:621-627.
103. Hume, D. A. 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 18:49-53.
104. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
105. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39-44.

106. Bendelac, A., M. Bonneville, and J. F. Kearney. 2001. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1:177-186.
107. Pancer, Z., and M. D. Cooper. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24:497-518.
108. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6:1382-1387.
109. Weil, R., and A. Israel. 2004. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 16:374-381.
110. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
111. O'Neill, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18:3-9.
112. Doyle, S. L., and L. A. O'Neill. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72:1102-1113.
113. Nishiya, T., and A. L. DeFranco. 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 279:19008-19017.
114. Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, L. E. Hood, and A. Aderem. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9577-9582.
115. Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24:353-389.
116. Gorden, K. K., X. X. Qiu, C. C. Binsfeld, J. P. Vasilakos, and S. S. Alkan. 2006. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 177:6584-6587.
117. Miyake, K. 2003. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* 3:119-128.
118. O'Neill, L. A., and A. G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353-364.
119. Kagan, J. C., and R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955.
120. Edelmann, K. H., S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K. L. Tyler, R. A. Flavell, and M. B. Oldstone. 2004. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 322:231-238.
121. Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001.
122. Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994-997.
123. Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122:669-682.
124. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437:1167-1172.
125. Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-988.

126. Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai, and H. B. Shu. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19:727-740.
127. Zhao, T., L. Yang, Q. Sun, M. Arguello, D. W. Ballard, J. Hiscott, and R. Lin. 2007. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* 8:592-600.
128. Mariathasan, S., and D. M. Monack. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:31-40.
129. Decker, T., M. Muller, and S. Stockinger. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5:675-687.
130. Panne, D., T. Maniatis, and S. C. Harrison. 2004. Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. *EMBO J* 23:4384-4393.
131. Merika, M., and D. Thanos. 2001. Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11:205-208.
132. Berkowitz, B., D. B. Huang, F. E. Chen-Park, P. B. Sigler, and G. Ghosh. 2002. The x-ray crystal structure of the NF-kappa B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta -kappa B site. *J Biol Chem* 277:24694-24700.
133. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
134. Udalova, I. A., A. Richardson, A. Denys, C. Smith, H. Ackerman, B. Foxwell, and D. Kwiatkowski. 2000. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 20:9113-9119.
135. Tsai, E. Y., J. V. Falvo, A. V. Tsytsykova, A. K. Barczak, A. M. Reimold, L. H. Glimcher, M. J. Fenton, D. C. Gordon, I. F. Dunn, and A. E. Goldfeld. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* 20:6084-6094.
136. Tsytsykova, A. V., and A. E. Goldfeld. 2002. Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 22:2620-2631.
137. Barthel, R., A. V. Tsytsykova, A. K. Barczak, E. Y. Tsai, C. C. Dascher, M. B. Brenner, and A. E. Goldfeld. 2003. Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol Cell Biol* 23:526-533.
138. Jones, S. A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-3468.
139. Grassl, C., B. Luckow, D. Schlondorff, and U. Dendorfer. 1999. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10:1466-1477.
140. Xiao, W., D. R. Hodge, L. Wang, X. Yang, X. Zhang, and W. L. Farrar. 2004. NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther* 3:1007-1017.
141. Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202:96-105.
142. Plevy, S. E., J. H. Gemberling, S. Hsu, A. J. Dorner, and S. T. Smale. 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* 17:4572-4588.
143. Zhu, C., K. Gagnidze, J. H. Gemberling, and S. E. Plevy. 2001. Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-

- 12 p40 promoter. Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. *J Biol Chem* 276:18519-18528.
144. Kang, B. Y., E. Kim, and T. S. Kim. 2005. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cell Signal* 17:665-673.
 145. Galea, E., and D. L. Feinstein. 1999. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 13:2125-2137.
 146. Lowenstein, C. J., and E. Padalko. 2004. iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci* 117:2865-2867.
 147. Taylor, B. S., and D. A. Geller. 2000. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 13:413-424.
 148. Kleinert, H., A. Pautz, K. Linker, and P. M. Schwarz. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500:255-266.
 149. Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A. S. Vamadevan, L. S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, M. Arditi, A. J. Dannenberg, and M. T. Abreu. 2006. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131:862-877.
 150. Harizi, H., and N. Gualde. 2006. Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol* 3:271-277.
 151. Romanovsky, A. A., A. A. Steiner, and K. Matsumura. 2006. Cells that trigger fever. *Cell Cycle* 5:2195-2197.
 152. Zhang, S., K. Thomas, J. C. Blanco, C. A. Salkowski, and S. N. Vogel. 2002. The role of the interferon regulatory factors, IRF-1 and IRF-2, in LPS-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in vivo and in vitro. *J Endotoxin Res* 8:379-388.
 153. Chun, K. S., and Y. J. Surh. 2004. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68:1089-1100.
 154. Appay, V., and S. L. Rowland-Jones. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 22:83-87.
 155. Roebuck, K. A., L. R. Carpenter, V. Lakshminarayanan, S. M. Page, J. N. Moy, and L. L. Thomas. 1999. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 65:291-298.
 156. Song, A., T. Nikolcheva, and A. M. Krensky. 2000. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol Rev* 177:236-245.
 157. Ogawa, H., K. Ishiguro, S. Gaubatz, D. M. Livingston, and Y. Nakatani. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296:1132-1136.
 158. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao. 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 19:4783-4795.
 159. Aramburu, J., M. B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L. C. Cantley, P. G. Hogan, and A. Rao. 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-2133.
 160. Baeza-Raja, B., and P. Munoz-Canoves. 2004. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell* 15:2013-2026.
 161. Torbett, N. E., A. Casamassima, and P. J. Parker. 2003. Hyperosmotic-induced protein kinase N 1 activation in a vesicular compartment is dependent upon Rac1 and 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J Biol Chem* 278:32344-32351.

162. Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, and W. C. Forrester. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5515-5520.
163. Rodriguez, A., and E. K. Flemington. 1999. Transfection-mediated cell-cycle signaling: considerations for transient transfection-based cell-cycle studies. *Anal Biochem* 272:171-181.
164. Rincon, M., A. Tugores, A. Lopez-Rivas, A. Silva, M. Alonso, M. O. De Landazuri, and M. Lopez-Botet. 1988. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* 18:1791-1796.
165. Simpson, R. 2003. *Proteins and Proteomics*. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press.
166. Minguillon, J., B. Morancho, S. J. Kim, M. Lopez-Botet, and J. Aramburu. 2005. Concentrations of cyclosporin A and FK506 that inhibit IL-2 induction in human T cells do not affect TGF-beta1 biosynthesis, whereas higher doses of cyclosporin A trigger apoptosis and release of preformed TGF-beta1. *J Leukoc Biol* 77:748-758.
167. Weinmann, A. S. 2004. Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:381-386.
168. Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. M. Sabatini. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.
169. Rappsilber, J., S. Siniosoglou, E. C. Hurt, and M. Mann. 2000. A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. *Anal Chem* 72:267-275.
170. Biswas, G., H. K. Anandatheerthavarada, M. Zaidi, and N. G. Avadhani. 2003. Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkkappaBbeta. *J Cell Biol* 161:507-519.
171. Chen, D., N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin, and W. Gu. 2005. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121:1071-1083.
172. Gras, R., and M. Muller. 2001. Computational aspects of protein identification by mass spectrometry. *Curr Opin Mol Ther* 3:526-532.
173. Jin, J., F. D. Smith, C. Stark, C. D. Wells, J. P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J. R. Woodgett, L. K. Langeberg, J. D. Scott, and T. Pawson. 2004. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 14:1436-1450.
174. Schlee, M., V. Hornung, and G. Hartmann. 2006. siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Mol Ther* 14:463-470.
175. Bridge, A. J., S. Pebernard, A. Ducraux, A. L. Nicoulaz, and R. Iggo. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264.
176. Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
177. Persengiev, S. P., X. Zhu, and M. R. Green. 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10:12-18.
178. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154-3162.
179. Sledz, C. A., and B. R. Williams. 2004. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 32:952-956.

180. Shir, A., I. Friedrich, and A. Levitzki. 2003. Tumor specific activation of PKR as a non-toxic modality of cancer treatment. *Semin Cancer Biol* 13:309-314.
181. Zheng, X., and P. C. Bevilacqua. 2004. Activation of the protein kinase PKR by short double-stranded RNAs with single-stranded tails. *RNA* 10:1934-1945.
182. Bowie, A. G., and K. A. Fitzgerald. 2007. RIG-I: tri-ning to discriminate between self and non-self RNA. *Trends Immunol* 28:147-150.
183. Applequist, S. E., R. P. Wallin, and H. G. Ljunggren. 2002. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14:1065-1074.
184. Kleinert, H., P. M. Schwarz, and U. Forstermann. 2003. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384:1343-1364.
185. Fillatreau, S., and R. A. Manz. 2006. Tolls for B cells. *Eur J Immunol* 36:798-801.
186. Peng, S. L. 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17:230-236.
187. Ziegler, S. F., F. Ramsdell, and M. R. Alderson. 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12:456-465.
188. Hayashi, E. A., S. Akira, and A. Nobrega. 2005. Role of TLR in B cell development: signaling through TLR4 promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2. *J Immunol* 174:6639-6647.
189. Lauzurica, P., D. Sancho, M. Torres, B. Albella, M. Marazuela, T. Merino, J. A. Bueren, A. C. Martinez, and F. Sanchez-Madrid. 2000. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 95:2312-2320.
190. Springer, T., G. Galfre, D. S. Secher, and C. Milstein. 1979. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 9:301-306.
191. Myones, B. L., J. G. Dalzell, N. Hogg, and G. D. Ross. 1988. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest* 82:640-651.
192. Hogg, N., L. Takacs, D. G. Palmer, Y. Selvendran, and C. Allen. 1986. The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expression of class II molecules. *Eur J Immunol* 16:240-248.
193. Metlay, J. P., M. D. Witmer-Pack, R. Agger, M. T. Crowley, D. Lawless, and R. M. Steinman. 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 171:1753-1771.
194. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144-1150.
195. Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194:1171-1178.
196. Hanna, Z., C. Simard, A. Laperriere, and P. Jolicoeur. 1994. Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+ CD8- and immature CD4+ CD8+ T cells and in macrophages of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 14:1084-1094.
197. Hanna, Z., N. Rebai, J. Poudrier, and P. Jolicoeur. 2001. Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice. *Blood* 98:2275-2278.
198. Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251-263.

199. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117:5965-5973.
200. Guha, M., and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94.
201. Symons, A., S. Beinke, and S. C. Ley. 2006. MAP kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* 27:40-48.
202. Das, P. M., K. Ramachandran, J. vanWert, and R. Singal. 2004. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 37:961-969.
203. Kuo, M. H., and C. D. Allis. 1999. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19:425-433.
204. Chen, Y., M. P. Schnetz, C. E. Irazabal, R. F. Shen, C. K. Williams, M. B. Burg, and J. D. Ferraris. 2007. Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F981-992.
205. Cai, Q., J. D. Ferraris, and M. B. Burg. 2005. High NaCl increases TonEBP/OREBP mRNA and protein by stabilizing its mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F803-807.
206. Rice, J. B., L. L. Stoll, W. G. Li, G. M. Denning, J. Weydert, E. Charipar, W. E. Richenbacher, F. J. Miller, Jr., and N. L. Weintraub. 2003. Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1576-1582.
207. Bjorkbacka, H., K. A. Fitzgerald, F. Huet, X. Li, J. A. Gregory, M. A. Lee, C. M. Ordija, N. E. Dowley, D. T. Golenbock, and M. W. Freeman. 2004. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics* 19:319-330.
208. Hubert, A., B. Cauliez, A. Chedeville, A. Husson, and A. Lavoinne. 2004. Osmotic stress, a proinflammatory signal in Caco-2 cells. *Biochimie* 86:533-541.
209. Shapiro, L., and C. A. Dinarello. 1997. Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Exp Cell Res* 231:354-362.
210. Zhang, S., A. Yanaka, M. Tauchi, H. Suzuki, T. Shibahara, H. Matsui, A. Nakahara, and N. Tanaka. 2006. Hyperosmotic stress enhances interleukin-1beta expression in Helicobacter pylori-infected murine gastric epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 21:759-766.
211. Dong Kim, K., J. Zhao, S. Auh, X. Yang, P. Du, H. Tang, and Y. X. Fu. 2007. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med* 13:1248-1252.
212. Palm, N. W., and R. Medzhitov. 2007. Not so fast: adaptive suppression of innate immunity. *Nat Med* 13:1142-1144.
213. Didierlaurent, A., B. Brissoni, D. Velin, N. Aebi, A. Tardivel, E. Kaslin, J. C. Sirard, G. Angelov, J. Tschopp, and K. Burns. 2006. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 26:735-742.
214. Perera, P. Y., S. N. Vogel, G. R. Detore, A. Haziot, and S. M. Goyert. 1997. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J Immunol* 158:4422-4429.
215. Ye, H., Y. C. Park, M. Kreishman, E. Kieff, and H. Wu. 1999. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* 4:321-330.
216. Gil, J., M. A. Garcia, P. Gomez-Puertas, S. Guerra, J. Rullas, H. Nakano, J. Alcamí, and M. Esteban. 2004. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 24:4502-4512.
217. Ely, K. R., and C. Li. 2002. Structurally adaptive hot spots at a protein interaction interface on TRAF3. *J Mol Recognit* 15:286-290.

218. Wu, H., and J. R. Arron. 2003. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 25:1096-1105.
219. Hertzog, P. J., L. A. O'Neill, and J. A. Hamilton. 2003. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 24:534-539.
220. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.