

María Inmaculada Hernández Muñoz

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DEL TNF $\alpha$  SOBRE LA SINTESIS DE COLAGENO Y LA EXPRESION  
GENETICA DEL PROCOLAGENO  $\alpha_1(I)$  EN LIPOCITOS EN CULTIVO**

Director: Dr. J.A. Solís Herruzo

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

1993

A mis padres

En el curso del presente trabajo de investigación, realizado con una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid, han colaborado y me han ofrecido su ayuda muchas personas.

En primer lugar, quiero darles las gracias a Paz, a Maite, a Joaquín y a José Antonio porque además de ser compañeros y amigos en todo momento, también han colaborado en la obtención de los resultados que aquí se exponen. También quiero agradecerlos a los que compartís el tiempo y el espacio conmigo cada día en el Centro de Investigación del "Doce de Octubre" vuestra amistad y ayuda: Rosa, Yolanda, Belencita, Belén, María Antonia, Lola, Pilar, Elena A. y Elena T., Montse, Miluchi, Mar, Angel, etc.

A los que ya no están en el Centro, pero que en algún momento me echaron una mano, y siguen en mi mente, Belén, Cris, Joaquín, Pilar, Paco y Jesús, muchas gracias.

José Manuel y Javier han hecho posibles numerosos "pequeños" detalles de esta tesis: que esté paginada, el encabezamiento, que las fotografías existan y no se caigan, que exista más de un ejemplar...

Quiero agradecer, así mismo, a Blanca Feijó su atención y sus consejos, que siempre apreciaré.

En un aspecto menos científico, muchas personas, y en muchos momentos, han estado animándome a seguir cada día: mis padres, mis hermanos, y mis abuelos. Aunque no he conseguido que entiendan el tema de la tesis, siguen creyendo en mi trabajo.

Agradezco a mis amigos que también en esto me hayan ayudado: a José Antonio, a Joaquín y a Paz.

"Sólo" me queda agradecer al Dr. José Antonio Solís que me haya permitido trabajar con él, que haya obtenido algunos resultados que aquí se exponen, que me dirija la tesis, que me anime a seguir aunque las cosas no salgan, que me enseñe...Muchas gracias por todo.

## ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico
AC	Adenilato ciclase
BPB	Bromuro de parabromofenacilo
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CO	Ciclooxigenasa
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
DAG	1,2-diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
H-7	1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina
H-8	N-(2-(metilamino)etil)-5-isoquinolinasulfonamida
IL	Interleuquina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
LO	Lipooxigenasa
LT	Leucotrieno
mRNA	RNA mensajero
PA	Acido fosfatídico
PAF	1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosfocolina
PC	Glicerofosfolípido de colina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PI	Fosfatidilinositol
PKA	Proteínquinasa A
PKC	Proteínquinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
NDGA	Acido nordihidroguayarático
PMA	Acetato de miristoilforbol

TFP	Trifluoroperazina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF $\alpha$	Factor necrosante tumoral $\alpha$ o caquectina
TNF $\beta$	Factor necrosante tumoral $\beta$ o linfotoxina
W-7	N-(6-aminohehil)-5-cloro-1-naftalenosulfonamida

## INDICE

1. INTRODUCCION .....	1
1.1. La fibrosis .....	2
1.1.1. Definición .....	2
1.1.2. Etiología de la fibrosis hepática .....	2
1.1.3. Tipos celulares responsables de la fibrosis hepática .....	4
1.2. El colágeno .....	8
1.2.1. Estructura .....	8
1.2.2. Clasificación .....	10
1.2.3. Biosíntesis del colágeno .....	11
1.2.4. Degradación .....	13
1.2.5. Determinación genética .....	15
1.2.6. Regulación de la expresión del gen de procolágeno $\alpha_1(I)$ .....	16
1.2.6.1. Control transcripcional .....	16
1.2.6.2. Control postranscripcional .....	19
1.2.7. Modulación de la expresión genética del colágeno tipo I por distintos factores .....	21
1.3. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) .....	22
1.3.1. Desarrollo histórico .....	23
1.3.2. Estructura del TNF $\alpha$ .....	24
1.3.3. Determinación genética del TNF $\alpha$ .....	26
1.3.4. Regulación de la expresión del gen del TNF $\alpha$ .....	27
1.3.4.1. Control transcripcional .....	27
1.3.4.2. Control traduccional .....	28
1.3.5. Inducción de la síntesis de TNF $\alpha$ por distintos factores .....	28
1.3.6. Mecanismo de acción del TNF $\alpha$ .....	30
1.3.6.1. Receptores del TNF $\alpha$ .....	30
1.3.6.2. Proteínas G .....	34

1.3.6.3. Vía del ácido araquidónico	35
1.3.6.4. Vía de la fosfolipasa C	38
1.3.6.4.1. Calcio	40
1.3.6.4.2. Diacilglicerol	44
1.3.6.5. Vía de la adenilato ciclasa	47
1.3.6.6. Factores de transcripción	49
2. OBJETIVOS	52
3. MATERIAL Y METODOS	54
3.1. Material	55
3.2. Cultivo de lipocitos	56
3.3. Producción de colágeno	57
3.4. Proliferación y citotoxicidad	57
3.4.1. Proliferación	57
3.4.2. Evaluación de la citotoxicidad	58
3.5. Medición de la prolina intracelular	58
3.6. Determinación de la secreción de colágeno	58
3.7. Determinación de la hidroxilación de la prolina	59
3.8. Técnica del "Northern blot"	59
3.8.1. Extracción del RNA	59
3.8.2. Preparación de las sondas de cDNA	60
3.8.3. "Northern blot"	60
3.9. Ensayos de unión del TNF $\alpha$ a su receptor	60
3.10. Técnica del retardo en gel ( <i>Mobility shift assay</i> )	61
3.10.1. Preparación de los extractos nucleares	61
3.10.2. Ensayo de retardo en gel	62
3.11. Técnica de la cloranfenicol acetiltransferasa	62
3.11.1. Amplificación y purificación del plásmido COLCAT1	62

3.11.2. Transfección de los lipocitos .....	64
3.11.3. Medición de la actividad cloranfenicol acil transferasa ( <i>CAT assay</i> ) .....	65
3.12. Determinación de la concentración de proteínas .....	66
3.13. Tratamiento estadístico .....	66
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
4.1. Efectos del TNF $\alpha$ sobre la producción de proteínas colágenas y no colágenas .....	68
4.1.1. Producción de colágeno .....	68
4.1.2. Producción de proteínas no colágenas .....	68
4.2. Efectos proliferativos y citotóxicos .....	68
4.2.1. Proliferación .....	68
4.2.2. Citotoxicidad .....	69
4.3. Niveles intracelulares de prolina .....	69
4.4. Secreción de colágeno e hidroxilación de la prolina intracelular .....	70
4.4.1. Secreción de colágeno .....	70
4.4.2. Hidroxilación de la prolina .....	70
4.5. Niveles de mRNA de procolágeno $\alpha_1(I)$ murino .....	70
4.6. Mecanismos intracelulares implicados en la transducción de señal del TNF $\alpha$ .....	71
4.6.1. Unión del TNF $\alpha$ a su receptor .....	71
4.6.2. Internalización .....	72
4.6.3. Proteínas G .....	72
4.6.4. Vía de la fosfolipasa $A_2$ y del ácido araquidónico .....	72
4.6.5. Vía de la fosfolipasa C .....	74
4.6.5.1. Calcio libre intracelular .....	74
4.6.5.2. Calmodulina .....	75
4.6.5.3. Proteinquinasa C .....	76



4.6.6. Vía de la adenilato ciclasa .....	77
4.6.7. Implicación de NF- $\kappa$ B en la señal inducida por el TNF $\alpha$ sobre los lipocitos en cultivo .....	78
4.7. Efectos del TNF $\alpha$ sobre el promotor del gen de procolágeno $\alpha_1(I)$ murino .....	79
4.8. Regiones del promotor sobre las que actúa el TNF $\alpha$ .....	80
4.9. Vías moduladoras de la transcripción del gen de procolágeno $\alpha_1(I)$ murino .....	81
5. DISCUSION .....	115
6. RESUMEN .....	125
7. CONCLUSIONES .....	129
8. BIBLIOGRAFIA .....	133

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. **LA FIBROSIS**

### 1.1.1. **Definición**

La fibrosis es un proceso reparativo normal que ocurre tras el daño tisular. En una reparación normal, la fibrosis se inicia cuando los fibroblastos se infiltran en el área dañada, proliferan y sintetizan los componentes de la matriz conectiva tisular. Esta restructuración del tejido da lugar a la cicatrización y a una terminación ordenada de la respuesta fibrótica. Sin embargo, en enfermedades fibróticas, como la formación de queloides cutáneos, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva), la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar idiopática, las enfermedades crónicas de rechazo de injertos, y la esclerodermia localizada, la fibrosis, iniciada por causas variadas (y muchas desconocidas todavía) no acaba de forma ordenada y resulta en el desplazamiento del tejido funcional normal por una cantidad excesiva de matriz tisular conectiva, produciendo la disfunción del tejido y del órgano (Berman & Duncan, 1989).

### 1.1.2. **Etiología de la fibrosis hepática**

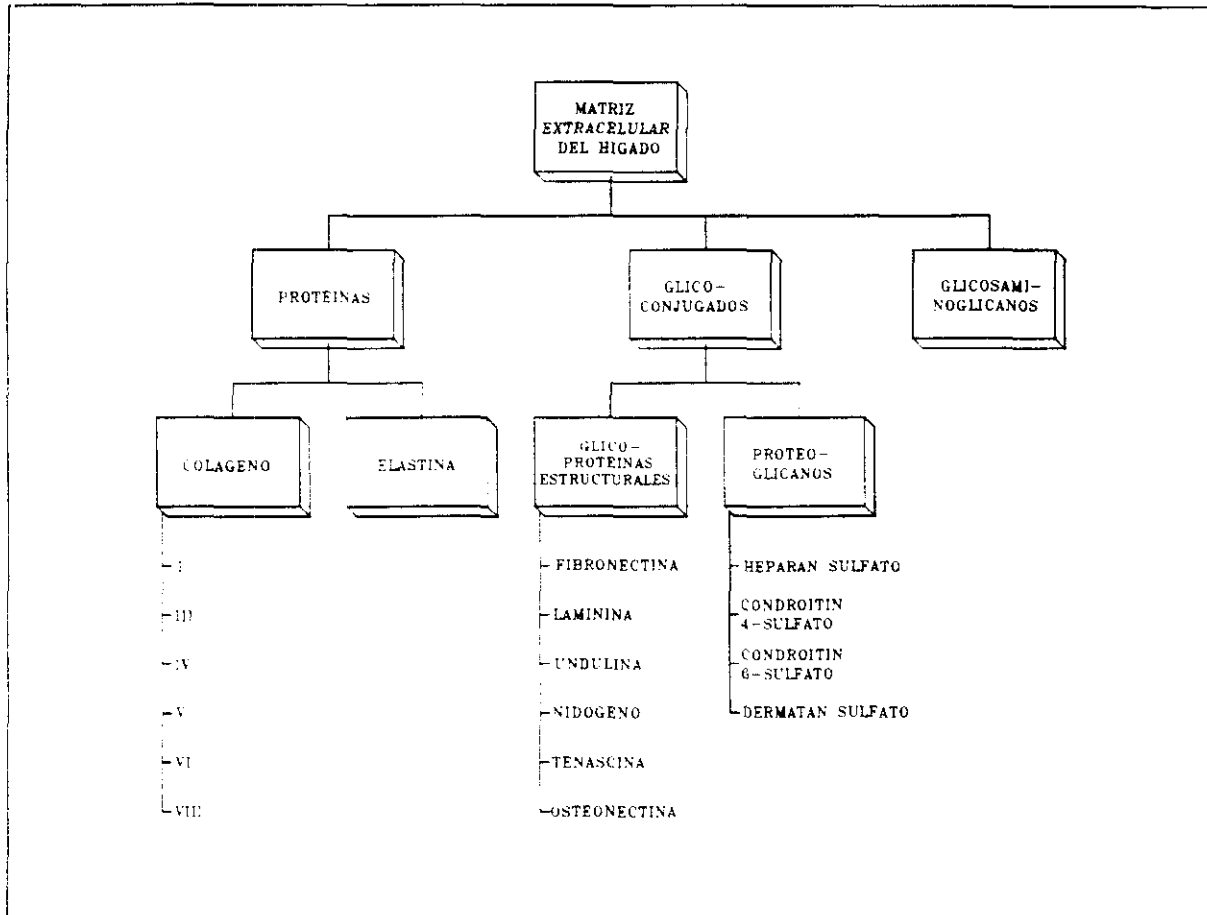
La fibrosis hepática puede desencadenarse como consecuencia de una inflamación crónica del hígado. Su etiología es muy diversa: tóxica, viral, inmunológica o parasitaria y, menos frecuentemente, puede tener un origen metabólico o congénito.

El hecho predominante de esta fibrosis es el depósito excesivo de biomatriz intercelular, que normalmente está presente en pequeñas cantidades; en el hígado fibrótico aparecen los siguientes cambios:

- las moléculas de matriz extracelular se incrementan de 3 a 6 veces;
  - entre estas moléculas, colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales se elevan de forma desproporcionada;
  - hay cambios en la microcomposición de algunas de estas moléculas de forma específica.
- Por ejemplo, varía el grado de hidroxilación de las cadenas  $\alpha$  de los colágenos y el número

y grado de sulfatación de los glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos;

- existe una redistribución topográfica de la matriz extracelular dando lugar a una deposición subendotelial temprana e importante del tejido conectivo en el espacio de Disse (fibrosis perisinusoidal) y en otras zonas (fibrosis periportal, difusa y local) (Gressner, 1991).



Composición de la matriz extracelular del hígado (Gressner, 1991).

El mecanismo de acumulación de las fracciones mayoritarias de esta matriz implica la activación de su biosíntesis *de novo* en células hepáticas (Van Zantenn *et al.*, 1988). Parece que la fibrosis perisinusoidal es la que produce las mayores consecuencias clínicas de la fibrosis (Gressner, 1991): bloquea las funciones sistémicas de los hepatocitos y de las células no parenquimatosas mediante el desarrollo de barreras de difusión, aumentando la resistencia vascular intrahepática e interfiriendo la hemodinámica portal. Las consecuencias clínicas de este proceso son el síndrome de hipertensión portal, la ascitis, la insuficiencia hepatocelular

y la propia progresividad de la hepatopatía.

En las enfermedades crónicas activas del hígado en las que no hay necrosis, el mayor depósito de colágeno no se produce cerca del centro del lóbulo, sino en la periferia, empezando por áreas portales en estrecho contacto con células inflamatorias. El colágeno formado y el infiltrado celular, que destruye el lóbulo hepático, constituyen el llamado septa temprano (Hassan *et al.*, 1989).

El hígado normal contiene niveles pequeños de colágeno I, III, IV, V y VI fundamentalmente, aunque se piensa que también puede estar presente minoritariamente el tipo VIII (Kittelberger *et al.*, 1990). Los tipos I y III están presentes aproximadamente en la misma cantidad, y constituyen el 0.5-2% del total de proteínas del hígado.

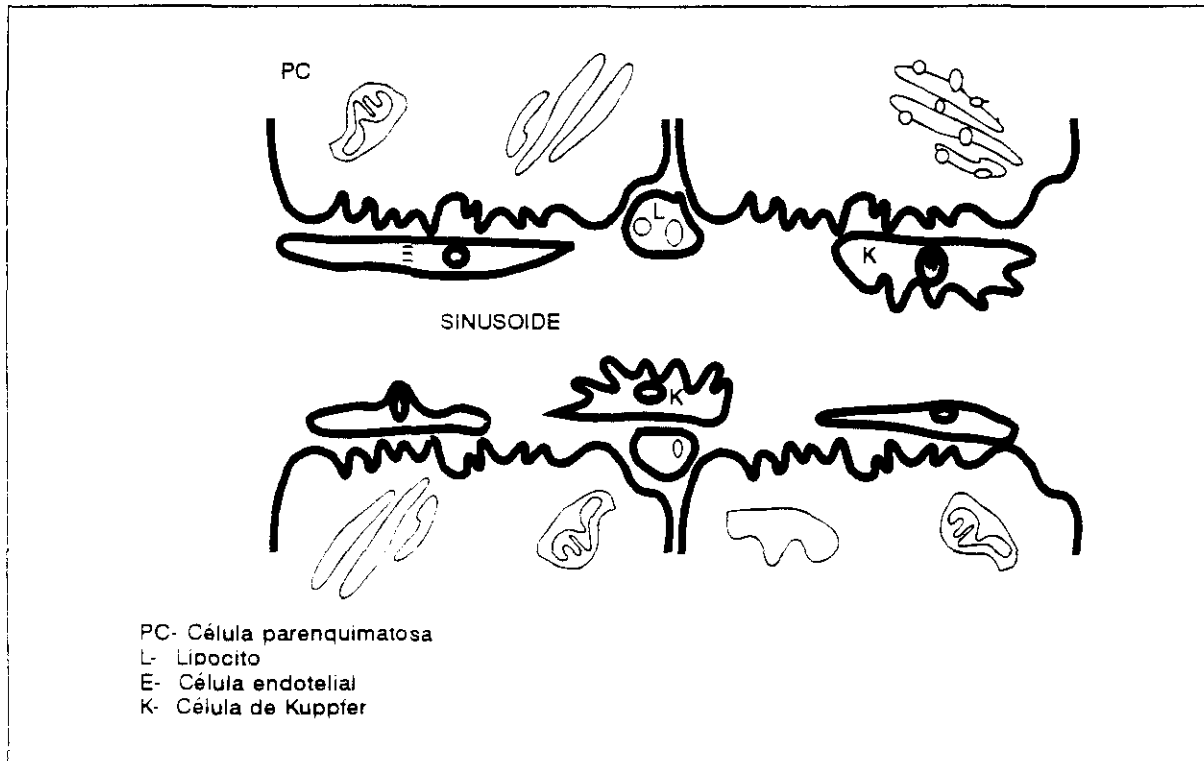
En el hígado fibrótico y cirrótico, el contenido total en algunos de estos tipos de colágenos aumenta desproporcionadamente (Rojkind, 1982; Gressner, 1991). Además, existen alteraciones en la síntesis y distribución de otros componentes de matriz extracelular, como son los proteoglicanos y glicoproteínas. Por ejemplo, en el hígado normal, la laminina (glicoproteína mayoritaria de membranas basales) se deposita en el espacio de Disse. Cuando existe un daño hepático, esta glicoproteína se acumula entre los sinusoides, posiblemente para facilitar la regeneración de los hepatocitos (Milani *et al.*, 1989b).

Sin embargo, todavía no se conoce cual es la secuencia de la alteración de los distintos componentes de la matriz extracelular hepática. Martínez-Hernández (1985), en un modelo de cirrosis inducida con tetracloruro de carbono, indica que la primera modificación se observa en la distribución y cuantía de fibronectina, y posteriormente en el colágeno I. Tras este aumento en colágeno I se incrementarían los colágenos III y IV (Pierce *et al.*, 1987; Milani *et al.*, 1989a) y finalmente la laminina (Martínez-Hernández, 1985).

### **1.1.3. Tipos celulares responsables de la fibrosis hepática**

Las células hepáticas que contribuyen a la producción de colágeno no han sido identificadas claramente, aunque prácticamente todos los elementos celulares del hígado,

excepto los de origen hematológico, están capacitados para ello. El lóbulo hepático contiene células parenquimatosas (hepatocitos), y otros tipos de células, como son las células de Kupffer (de origen hematológico), células endoteliales, lipocitos, fibroblastos y miofibroblastos, y las células de los ductos biliares. Entre todos existen influencias mutuas que determinan que el comportamiento funcional así como el aspecto morfológico de cada uno de ellos se modifique cuando se encuentran aislados de los restantes.



Tipos celulares del hígado (Gressner, 1991).

El potencial de los hepatocitos en la producción de matriz extracelular es actualmente motivo de controversia. Algunos autores indican que el hepatocito representa la fuente principal de colágeno tanto en el hígado normal como en las enfermedades crónicas del hígado (Martínez-Hernández, 1985; Chojkier & Filip, 1986; Chojkier *et al.*, 1988; Hassan *et al.*, 1989; Brenner *et al.*, 1990). Sin embargo, estas conclusiones (obtenidas por inmunohistoquímica y por marcaje isotópico dual del colágeno) están en contradicción con los resultados obtenidos por técnicas de hibridación *in situ* (Gressner, 1991). Se estima que al menos el 50% de todo el colágeno producido en el hígado cirrótico se debe a los lipocitos

o a los correspondientes miofibroblastos (Mak *et al.*, 1984; Shiratori *et al.*, 1986; Milani *et al.*, 1990). Es posible que los lipocitos no sólo sean los responsables del incremento del colágeno en el daño hepático, sino que también sean los productores mayoritarios de esta proteína en condiciones normales (Friedman *et al.*, 1985; Milani *et al.*, 1989a).

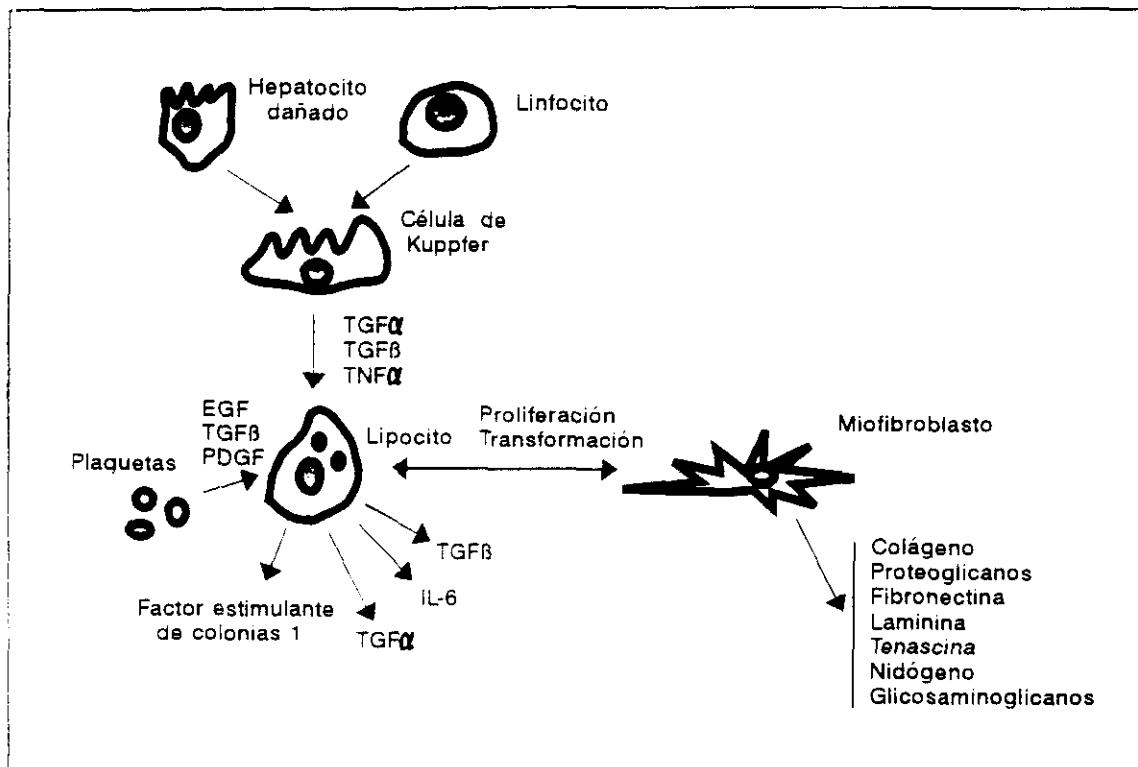
Los lipocitos (células perisinusoidales, "fat storing cells", células de Ito) son células estrelladas distribuidas casi homogéneamente por todas las zonas del lóbulo hepático. Las células de Ito localizadas en el espacio de Disse o espacio perisinusoidal tienen como función el almacén de vitamina A en el hígado, y son tan numerosas como las células de Kupffer (Blomhoff & Wake, 1991).

Además del almacenamiento de esta vitamina, los lipocitos hepáticos juegan un papel importante en la producción de distintos componentes de matriz extracelular. Las células de Ito en cultivo primario secretan colágeno tipo I fundamentalmente (72-86% del colágeno), siendo el colágeno el 5% del total de las proteínas sintetizadas por estas células (en los hepatocitos sólo es el 0.2%, y en células endoteliales el 1.7%) (Friedman *et al.*, 1985). Los lipocitos también sintetizan, aunque en menor cantidad, proteoglicanos, fibronectina, laminina, nidógeno, etc.

Otra de las funciones de las células de Ito es la modulación autocrina y paracrina de la síntesis de colágeno (y de otras proteínas de matriz extracelular), mediante la síntesis y la liberación de factores como el TGF $\alpha$ , el TGF $\beta$ , la IL-6, el IGF-1 y el factor estimulante de colonias 1 (Greenwel *et al.*, 1991; Gressner, 1991).

En el proceso de la fibrosis hepática, las células de Ito se transforman a células transicionales o miofibroblastos, caracterizadas por la deplección de acúmulos grasos, dispersión de la cromatina nuclear, largas extensiones citoplásmicas e hipertrofia del retículo endoplásmico rugoso (Mak *et al.*, 1984; Friedman & Arthur, 1989; Friedman *et al.*, 1989; Bachem *et al.*, 1992). Esta transformación fenotípica ocurre también espontáneamente en cultivos celulares y en áreas de necroinflamación (Mak *et al.*, 1984; Gressner, 1991). Friedman *et al.* (1985) indican que los lipocitos serían los precursores de las células fibroides

observadas en el daño hepático, y en la fibrosis hepática asociada con hipervitaminosis A.



Funciones del lipocito (Gressner, 1991).

Las células de origen hematológico no sintetizan colágeno, pero liberan varios factores que modulan la actividad de los restantes elementos celulares. Este es el caso de la IL-1 y del TNF $\alpha$ , que son liberados principalmente por los macrófagos, del TNF $\beta$ , que es secretado por los linfocitos, del TGF $\beta$  y del PDGF, que son liberados por distintas líneas celulares y en especial por las plaquetas. Como se ha indicado anteriormente, algunos de estos factores influyen sobre la síntesis de colágeno actuando directamente sobre ésta, y otros regulando la proliferación de las células capacitadas para esa síntesis o liberando factores quimiotácticos o transformadores (Solís-Herruzo, 1988).

Tras la agresión y el daño tisular, se produce un acúmulo inmediato de plaquetas que es seguido por un infiltrado inflamatorio. Por orden de aparición, se puede reconocer la llegada de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos inflamatorios, linfocitos, macrófagos activados y, finalmente, de fibroblastos (Diegelman *et al.*, 1987).

Para poder desarrollar una terapéutica racional de la fibrosis, es preciso llegar a



conocer los mecanismos moleculares y celulares que dan lugar al desarrollo bioquímico y patológico de esta enfermedad. Los resultados obtenidos hasta ahora no sólo indican que existe una gran complejidad en la red de factores que interaccionan, sino que también existe una uniformidad a nivel molecular en las reacciones fibróticas en los distintos tejidos y órganos.

## 1.2. COLAGENO

En los organismos multicelulares, muchos de los elementos estructurales más importantes están en la matriz extracelular. Los componentes proteicos más abundantes de esta matriz son los colágenos; estos son, de hecho, las proteínas presentes en mayor cantidad en el reino animal. Los colágenos son los elementos estructurales fibrosos mayoritarios de cartílago, tendón, piel, hueso, pulmón y vasos sanguíneos, y sirven para mantener unidas a las células en los distintos tejidos.

Existen al menos 14 tipos de colágenos distintos en vertebrados (Van der Rest & Garrone, 1991).

### 1.2.1. Estructura

La familia de los colágenos engloba a una serie de proteínas con unas características comunes:

- todas ellas presentan dominios o regiones de triple hélice, combinadas de diferentes maneras con regiones globulares amplias o con regiones no helicoidales;
- presentan una síntesis intracelular compleja, y posteriormente son secretadas. En el espacio extracelular se modifican, se agregan las moléculas, y se forma una estructura especializada. La agregación supone la estabilización.

Las fibras del colágeno están constituidas por tres cadenas polipeptídicas  $\alpha$  dispuestas en paralelo y enrolladas entre sí helicoidalmente. La adopción de esta disposición es posible debido a que cada tercer aminoácido, en cada una de las cadenas, corresponde a una molécula



Las cadenas laterales de los aminoácidos que forman cada propéptido de colágeno están siempre orientadas hacia el exterior de la molécula. Esta asociación se produce sin la presencia de ningún factor ajeno al propio colágeno. Esto se debe a que, cada 234aa y de forma alternativa, aparece uno con y otro sin carga eléctrica. Esto determina que la carga de la molécula cambie periódicamente cada 234aa (67nm). Gracias a las fuerzas que genera esta diversidad eléctrica e hidrofóbica, las moléculas de colágeno se unen en paralelo, pero desplazadas, una respecto a su vecina, la misma distancia periódica de 67nm. En esta posición se establece el mayor número posible de uniones electrostáticas.

La molécula sintetizada por las células presenta en ambos extremos (amino y carboxilo) regiones terminales denominadas propéptidos de extensión o porciones globulares. A la triple hélice antes descrita flanqueada por los propéptidos terminales se le denomina procolágeno. En estas regiones terminales las tres cadenas permanecen independientes, no forman hélice. El propéptido carboxiterminal es completamente no helicoidal y posee una extensión de N-acetilglucosamina; el aminoterminal es, en casi toda su extensión, no helicoidal, pero posee un pequeño fragmento de 12nm en el que las tres cadenas se enrollan de forma semejante a como ocurre en la porción central. En cada propéptido hay, además, puentes disulfuro que unen por algunos puntos a una misma cadena. En el C-terminal, estos puentes también unen cadenas distintas.

### 1.2.2. Clasificación

Existen distintos tipos de colágenos. Los grupos más importantes son:

\* Colágenos fibrilares: a este grupo pertenecen los tipos I, II, III, V y XI. Muestran las siguientes características comunes:

- semejante ruta biosintética;
- similar tamaño de las cadenas  $\alpha$  ( $M_r > 95.000$ );
- el dominio de triple hélice es largo e ininterrumpido con una secuencia de aminoácidos Gly-X-Y repetida;

- forman fibras presentes en numerosos tejidos conectivos.
- \* Colágenos no fibrilares: este grupo lo constituyen los tipos IV, VI, VII y VIII. Todos presentan:
  - cadenas  $\alpha$  cortas ( $M_r < 95.000$ );
  - interrupciones en la secuencia repetida de Gly-X-Y de los dominios de triple hélice;
  - forman hojas que constituyen membranas basales.
- \* Colágenos de cadena corta: son los colágenos tipo IX, XII y XIV.
  - las cadenas  $\alpha$  tienen un tamaño mucho menor que las de los grupos anteriores ( $M_r \ll 95.000$ );
  - son colágenos asociados a fibras de colágeno I y II que presentan interrupciones en la triple hélice (FACITs) (Van der Rest & Garrone, 1991)

### 1.2.3. **Biosíntesis del colágeno**

La síntesis de las cadenas de procolágeno se inicia en los ribosomas. Posteriormente sufren diversos cambios, muchos cuando aún permanecen unidos a ellos.

Según se va sintetizando la cadena polipeptídica naciente, va entrando en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. En este orgánulo se produce la formación de algunos puentes disulfuro, y residuos específicos de prolina de las regiones destinadas a formar la triple hélice sufren hidroxilación por la prolil 4-hidroxilasa y la prolil 3-hidroxilasa unidas a membrana. También sufren hidroxilación algunos residuos de lisina, mediante la lisil hidroxilasa. El ácido ascórbico o vitamina C es un cofactor esencial de ambas hidroxilasas. En ausencia de ascorbato, el colágeno no se hidroxila suficientemente y las cadenas no pueden formar la triple hélice estable, impidiéndose por tanto también su agregación en fibras. Estas cadenas anormales de procolágeno son degradadas dentro de la célula.

Todavía en el retículo endoplásmico, el procolágeno sufre la adición de oligosacáridos en la región amino terminal, con importancia en la posterior secreción de la molécula.

En el aparato de Golgi se produce la adición de galactosa a algunos residuos de

hidroxilisina, mediante la galactosil hidroxilisil transferasa, y de glucosa a la galactosa anteriormente unida, mediante glucosil transferasas. Además, se forman puentes disulfuro inter e intracatenarios, que contribuyen a la estabilización de la asociación de las tres cadenas anterior a la formación de la triple hélice.

Finalmente, la conversión de procolágeno a tropocolágeno (unidad estructural de la mayoría de los colágenos fibrilares formada por tres cadenas enrolladas helicoidalmente alrededor de un eje central) y el ensamblaje del tropocolágeno para formar las fibras de colágeno tienen lugar tras la secreción en reacciones catalizadas por enzimas extracelulares. Paralelamente, o poco después de la exocitosis, las moléculas de procolágeno sufren la rotura proteolítica que elimina los segmentos N-terminal y C-terminal. Estas reacciones son independientes y están catalizadas por distintas enzimas denominadas procolágeno peptidasas. En muchos casos, primero se rompe el extremo N-terminal (cuando el procolágeno sale de la célula), y más tarde el C-terminal. Una vez en el espacio extracelular, las moléculas de tropocolágeno se agregan, formándose las fibras de colágeno.

Es muy probable que en el depósito de las moléculas de colágeno y en el crecimiento de las fibras participen otros elementos de la matriz extracelular, tales como la fibronectina (Kleinman *et al.*, 1981), que se une a las fibras de colágeno, y algunos tipos de proteoglicanos que recubren las fibras y detienen su crecimiento. Como ya se ha indicado, en el daño hepático experimental inducido por tetracloruro de carbono, se puede comprobar que el depósito de colágeno tipo I va precedido por el depósito de fibronectina (Martínez-Hernández, 1985; Popper & Udenfriend, 1970; Rojkind & Dunn, 1979).

Al mismo tiempo que se forman las fibras, se produce la oxidación de algunos residuos de lisina e hidroxilisina por la lisil oxidasa, que permitirá la formación de uniones específicas covalentes entre dos cadenas polipeptídicas de moléculas de colágeno adyacentes o entre cadenas la misma molécula (Darnell *et al.*, 1986). La D-penicilamina y los latirógenos (por ejemplo, el  $\beta$ -aminopropionitrilo) impiden la agregación de las moléculas de colágeno y la formación de uniones firmes entre ellas. La primera lo hace quelando el  $\text{Cu}^{2+}$ , cofactor

de la lisiloxidasas, y los latirógenos por inactivación de la enzima (Siegel & Fu, 1976; Nakamura *et al.*, 1975).

#### 1.2.4. Degradación del colágeno

La degradación del colágeno tiene lugar no sólo una vez que se ha depositado en el espacio intercelular, sino también antes de salir de las células. Se estima que entre el 15 y el 40% del colágeno producido por las células se destruye a los pocos minutos de su formación, cuando aun permanece en el interior de ellas (Steinmann *et al.*, 1979). Este proceso se incrementa cuando la prolina permanece sin ser hidroxilada y el procolágeno no adopta la estructura helicoidal y no es secretado. Los productos de su degradación frenan, además, la síntesis de colágeno a nivel transcripcional y traduccional (Solís-Herruzo, 1988). Esta degradación intracelular tiene lugar en los lisosomas y en ella participan, acelerándola, las prostaglandinas y el cAMP (Bienkowski *et al.*, 1978; Baum *et al.*, 1980). La menor producción de colágeno que se describe en algunos modelos experimentales con estos mediadores está determinada por un aumento de la degradación intracelular de esta proteína.

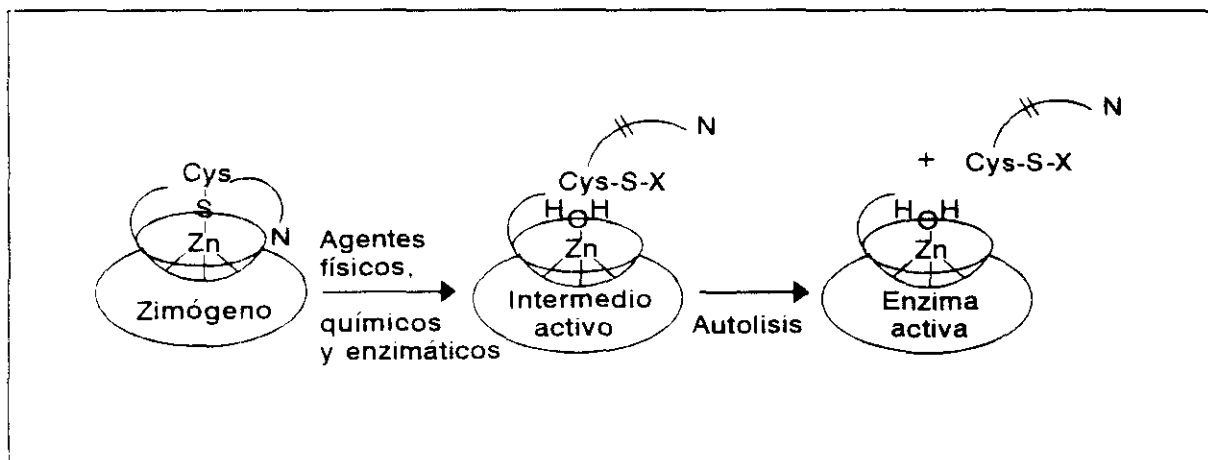
El colágeno es degradado por un conjunto de metaloenzimas dependientes del zinc (Harris & Krane, 1974; Harper, 1980) pertenecientes a la familia de las matrixinas (o metaloproteinasas de matriz) (Woessner, 1991). Son activas a pH y temperatura fisiológicas sobre el colágeno nativo que conserva su estructura helicoidal. Cuando éste se halla desnaturalizado, y esa estructura se pierde, puede ser fragmentado por otras muchas proteasas y peptidasas.

Existen diferentes tipos de colagenasas. La colagenasa intersticial y la de neutrófilos actúan fundamentalmente sobre los colágenos I, II y III, las gelatinasas (de 72kD y de 92kD) sobre los colágenos IV y V, y las estromelisininas sobre una gran variedad de colágenos y de otras proteínas de matriz extracelular (Woessner, 1991). En cualquier caso, fragmentan la molécula de colágeno por un punto concreto que se sitúa a 3/4 de distancia del extremo N-terminal (Gross & Nagai, 1965). En este lugar existe siempre una unión, bien glicina-

isoleucina o bien glicina-leucina (Highberger *et al.*, 1978). El que otras uniones similares situadas a lo largo de la molécula de colágeno resistan a la acción de esta enzima parece depender de la presencia de hidroxiprolina en el triplete contiguo a ellos. Los fragmentos resultantes de la digestión por colagenasa pueden ser degradados por otras proteasas y peptidasas, tales como imidopeptidasa, imidodipeptidasas, etc. Todas estas enzimas son efectivas sobre el colágeno desnaturalizado por el calor a gelatina.

Las colagenasas, en general, no están almacenadas (excepto en neutrófilos y macrófagos), y es precisa su síntesis *de novo* y su secreción a la matriz cuando alguna señal indica que son precisas. Estas señales regulatorias actúan casi siempre a nivel de transcripción genética. Entre ellas se encuentran el TNF $\alpha$  (Dayer *et al.*, 1985), la IL-1 (Stephenson *et al.*, 1987), los ésteres de forbol (Angel *et al.*, 1987), el PDGF (Bauer *et al.*, 1985), las prostaglandinas, el cAMP, la citocalasina B, la heparina, y factores liberados por los macrófagos presentes en el líquido sinovial (Harper, 1980). El TGF $\beta$  puede bloquear los efectos inductores de algunos de estos factores. El gen que determina la síntesis de colagenasa ha sido caracterizado, así como su región sensible a los ésteres de forbol y la proteína moduladora de su actividad (Angel *et al.*, 1987).

La enzima se segrega en forma de procologenasa inactiva. La activación supone el desprendimiento de una parte de su molécula, y la separación de un residuo de cisteína que está unido al zinc del centro activo (Woessner, 1991).



Activación de las colagenasas (Woessner, 1991).

Esta activación puede producirse por agentes físicos (caótopos), químicos (organomercuriales) y enzimáticos (tripsina, quimotripsina, catepsina B, calicreína, plasmina) (Harper, 1980; Woessner, 1991). Algunas de las enzimas activadoras de la colagenasa son a su vez estimuladas por linfoquinas (Harper, 1980), colchicina (Gordon & Werb, 1976) y citocalasina B (Gross & Nagai, 1965). En el mismo sentido actúan el colágeno (Highberger *et al.*, 1978) y el hierro.

La actividad colagenásica existente en cada momento es el resultado de un complejo equilibrio en el que los factores activadores mencionados se encuentran contrarrestados por otros inhibidores. Entre los inhibidores se han identificado la  $\alpha_2$ -macroglobina, el factor 4 plaquetario, la tromboglobina y productos proteicos extraídos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoides o de diversos tejidos humanos (Harper, 1980). El factor tisular inhibidor de las metaloproteínas (TIMP) es potenciado por el TGF $\beta$ . Además, la fibronectina, al adherirse al colágeno, puede impedir el acceso de la colagenasa a este último y por ello frenar su degradación. El papel opuesto parecen jugar los proteoglicanos (Popper & Udenfriend, 1970).

#### 1.2.5. Determinación genética

La síntesis de los diferentes polipéptidos que forman los distintos tipos de colágeno está determinada al menos por 24 genes.

El colágeno tipo I, como ya se ha indicado, es el colágeno sintetizado mayoritariamente por los lipocitos en cultivo. Además, es la proteína más abundante de huesos y tendones, y el colágeno fibrilar más importante de otros tejidos conectivos (dermis, córnea y vasos sanguíneos). Está compuesto por dos cadenas  $\alpha_1$  y una cadena  $\alpha_2$ , que interaccionan para formar la triple hélice característica. En el hombre, los genes que codifican estas dos cadenas se localizan en los cromosomas 17 y 7 respectivamente (Huerre *et al.*, 1982; Junien *et al.*, 1982; Wet *et al.*, 1987). Ambos presentan alrededor de 50 exones, con



otros tantos intrones, siendo característicos los exones de 54bp (la mayor parte tienen 54, 108 o 162 pares de bases; el resto son de 45 o de 99bp). Esta estructura genética infrecuente está muy conservada en todos los genes que codifican para los colágenos fibrilares.

La expresión de los genes de procolágeno  $\alpha_1(I)$  y  $\alpha_2(I)$  está regulada coordinadamente (en la mayoría de las situaciones fisiológicas y patológicas), manteniendo una relación estequiométrica 2:1 (Rossow *et al.*, 1987). Este hecho hace pensar que existen sitios de unión a factores reguladores en los promotores de ambos genes (o en el primer intrón) conservados a lo largo de la evolución (Karsenty & de Crombrugge, 1991), o bien que aunque las secuencias reguladoras de los genes del colágeno I sean distintas estructuralmente, se puedan unir a factores activadores semejantes (Boast *et al.*, 1990).

#### 1.2.6. **Regulación de la expresión del gen del procolágeno $\alpha_1(I)$**

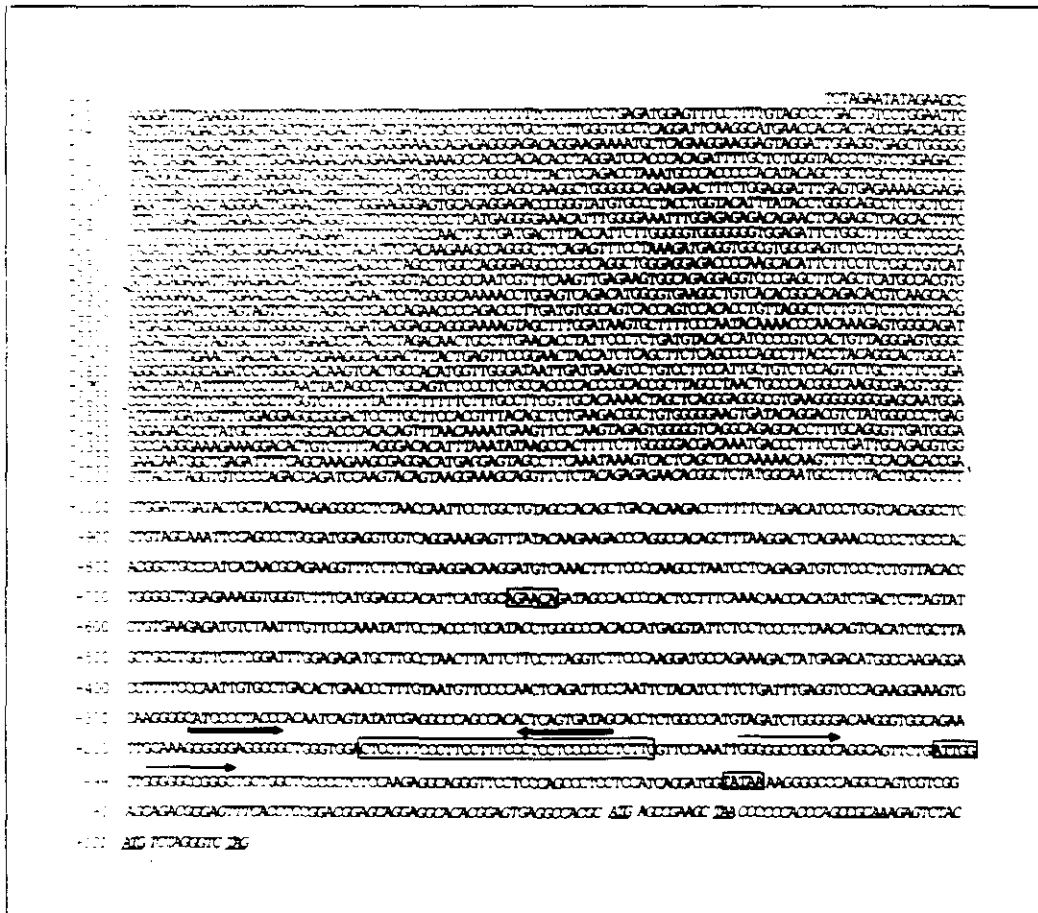
##### 1.2.6.1. **Control transcripcional**

La secuencia completa del promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata fue descrita por Lichter *et al.* en 1989. Este promotor tiene una secuencia aproximada de 3.6kb. Existe un alto grado de homología entre las secuencias humana y murina (Harbers *et al.*, 1984; Chu *et al.*, 1985). La secuencia de bases de este promotor también guarda cierta semejanza con los promotores de otros tipos de colágeno (Liau *et al.*, 1985).

El promotor del procolágeno  $\alpha_1(I)$  presenta una secuencia TATA localizada de 20 a 30bp por encima del origen de transcripción. Entre -130 y -80 se localizan dos motivos CCAAT (Rossow *et al.*, 1987; Karsenty & de Crombrugge, 1990, 1991). Dentro de las 300bp del promotor cercanas al origen de transcripción también existen varias secuencias ricas en GC (existe una también dentro del primer exón del gen)(Rossow *et al.*, 1987; Karsenty & de Crombrugge, 1990, 1991).

Actualmente se están descubriendo numerosos factores de transcripción que modulan la síntesis de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Karsenty y de Crombrugge (1990), utilizando una región corta del promotor del colágeno  $\alpha_1(I)$  murino (-222 a -80) describen cuatro sitios de

unión a factores de transcripción. El factor CBF se une a los motivos CCAAT. Un segundo factor, IF-1, se une a dos secuencias ricas en GC situadas entre -190 y -170 y entre -160 a -130. El tercer factor, IF-2, reconoce una región de 12bp formada fundamentalmente por pares GC, y localizada entre los dos motivos CCAAT. La unión de IF-2 está inhibida por CBF, y tanto IF-1 como IF-2 son inhibidores transcripcionales, mientras que CBF actúa activando el promotor de colágeno  $\alpha_1(I)$ . Posteriormente los mismos autores (Karsenty y de Crombrughe, 1991) indican que IF-2 se une a dos regiones ricas en GC; una de ellas es la indicada anteriormente y la otra situada por debajo de la secuencia CCAAT próxima al origen de transcripción. En este nuevo modelo CBF sólo reconoce el CCAAT proximal.



Promotor del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata (Litcher *et al.*, 1989).

Nehls *et al.* (1991, 1992) han identificado dos factores, SP-1 y NF-1, que se corresponden con los denominados por Karsenty y de Crombrugge como IF-2 y CBF, y que

se unen a las regiones localizadas entre -129 y -110 y entre -105 y -78. Estas dos proteínas se unen a secuencias que se solapan, y por ello la acción de una interfiere la de la otra.

En extractos nucleares de fibroblastos NIH 3T3 se ha identificado un nuevo factor que se une a la secuencia localizada entre -339 y -361 del promotor de colágeno  $\alpha_1(I)$  de ratón. Cuando se introduce una mutación en tres pares de bases de este elemento del promotor, la actividad de la transcripción se incrementa hasta cuatro veces, lo cual indica que se trata de un elemento regulador negativo. Además, este factor nuclear sólo está presente en líneas celulares productoras de colágeno tipo I, por lo que es posible que esté implicado en la regulación del gen  $\alpha_1(I)$  específica de algunos tejidos (Ravazzolo *et al.*, 1991).

En el promotor del colágeno  $\alpha_1(I)$  existe un sitio AP-1, al que se une el complejo fos-jun. Este sitio AP-1 es contiguo, pero no se solapa, con el elemento de respuesta a vitamina D (VDRE). Ambos elementos reguladores se encuentran aproximadamente a -2900bp del origen de transcripción (Owen *et al.*, 1990).

Recientemente se está investigando la posibilidad de otras regiones reguladoras importantes muy alejadas del inicio de la transcripción. Ritzenthaler *et al.* (1991) han descrito elementos activados por el TGF $\beta$  en distintas posiciones del promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata (-1600, -2300, -2900). Estas secuencias se asemejan a las reconocidas por el factor NF-1.

Un hecho frecuente en la regulación de la expresión de muchos de los genes que codifican los distintos colágenos es la presencia de elementos reguladores en el primer intrón.

Distintos estudios realizados mediante mutagénesis insercional han revelado que existe gran semejanza entre la secuencia de bases del primer intrón del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  humano y el murino (Harbers *et al.*, 1984). La inserción del virus Moloney de leucemia murina también ha permitido localizar dos regiones hipersensibles a DNasa I en el gen del colágeno  $\alpha_1(I)$ , una de las cuales está situada en el primer intrón (Breindl *et al.*, 1984; Bornstein & Sage, 1989). La actividad transcripcional alterada con la inserción del virus, sin embargo, podría deberse más bien a una metilación *de novo* del provirus y a 1kb por encima

del lugar de inserción (en el promotor), produciéndose la inhibición de la unión de proteínas a elementos *cis*-activadores específicos (Hartung *et al.*, 1986; Jahner & Jaenisch, 1985; Cedar, 1988). Posteriormente, mediante técnicas de recombinación genética, se han descrito elementos reguladores tanto positivos como negativos en el primer intrón (Bornstein *et al.*, 1987, Bornstein & McKay, 1988). La región central del primer intrón presenta gran capacidad moduladora de la transcripción. En ella aparecen cuatro consensos de 10 nucleótidos capaces de unir el factor de transcripción SP1 de la RNA polimerasa II, varias secuencias ricas en GC (que también podrían unir SP1) y una secuencia intensificadora del core, común a muchos elementos virales y celulares, cuya función es desconocida (Rossow *et al.*, 1987; Bornstein *et al.*, 1987). Bornstein *et al.* (1987) indican que la región de 274bp del intrón que contiene la secuencia intensificadora del core y el decanucleótido situado entre 927 y 937 tiene un efecto inhibitorio en la expresión del gen. Sin embargo, estudios posteriores parecen indicar que la interacción del intrón con elementos de la región 5' dan lugar a un efecto neto estimulante de la transcripción de este gen (Bornstein & McKay, 1988).

#### 1.2.6.2. Control postranscripcional

Además del control transcripcional, existe la posibilidad de que participen mecanismos postranscripcionales en la biosíntesis de colágeno. Esto explicaría que a veces la cantidad de colágeno tipo I sea mucho menor que la que correspondería en función de los niveles de su mRNA. Además, fragmentos de la región aminoterminal (sin triple hélice) de la cadena de procolágeno  $\alpha_1(I)$  inhiben selectivamente la traducción del mRNA de colágeno de fibroblastos en cultivo (Paglia *et al.*, 1979).

Yamada *et al.* (1983) indican que la secuencia de nucleótidos cercanos al inicio de la traducción en el mRNA de tres tipos de colágenos ( $\alpha_1(I)$ ,  $\alpha_1(III)$  y  $\alpha_2(I)$ ) es una región altamente conservada, mientras que secuencias más alejadas del inicio son divergentes. El segmento conservado presenta una secuencia invertida repetida que podría formar un bucle alrededor del sitio de inicio de la traducción. Aunque la estabilidad de este bucle es menor



metilación de ciertas bases.

### **1.2.7. Modulación de la expresión genética del colágeno tipo I por distintos factores**

Los cambios en la síntesis del colágeno tipo I ocurren en el periodo de desarrollo embrionario, durante la regeneración de heridas, y en procesos fibróticos de distintos tejidos. Experimentalmente, la síntesis de colágeno I puede alterarse por numerosos factores, como citoquinas, factores de crecimiento, proteínas codificadas por oncogenes, por segundos mensajeros intracelulares, etc. Sin embargo, los mecanismos concretos de acción por los cuales estos agentes modulan la producción de colágeno son, en la mayoría de los casos, desconocidos.

Entre las citoquinas y factores de crecimiento que tienen un papel importante en la modulación de la síntesis de colágeno I en los lipocitos durante la fibrogénesis hepática se encuentran el TGF $\beta$ , la IL-1, el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ .

El TGF $\beta$  es un factor de crecimiento sintetizado por linfocitos y plaquetas activadas, células de Kupffer, y por otros tipos celulares (Meyer *et al.*, 1990). Recientemente se ha descrito la producción de TGF $\alpha$  y de TGF $\beta$  por miofibroblastos derivados de lipocitos (Bachem *et al.*, 1992). El efecto del TGF $\beta$  sobre el colágeno I se produce mediante el aumento de la transcripción de sus genes (Kahari *et al.*, 1990; Ritzenthaler *et al.*, 1991; Armendariz-Borunda *et al.*, 1992). Este efecto estimulante del TGF $\beta$  desaparece con TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y con IL-1 (Daireaux *et al.*, 1990; Kahari *et al.*, 1990).

La IL-1 es una citoquina con efectos proliferativos capaz de disminuir la producción de colágeno. Esta proteína disminuye los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en fibroblastos humanos (Solís-Herruzo *et al.*, 1988); es posible que esta citoquina también ejerza una regulación postranscripcional (Mauviel *et al.*, 1991; Armendariz-Borunda *et al.*, 1992).

Al igual que la IL-1, el IFN $\gamma$  (citoquina producida por linfocitos activados) inhibe la síntesis de colágeno en numerosos tipos celulares (Smith *et al.*, 1987; Nanes *et al.*, 1989; Scharffetter *et al.*, 1989; Daireaux *et al.*, 1990). Probablemente la inhibición del IFN $\gamma$  tenga

lugar a nivel postranscripcional por desestabilización del mRNA (Kahari *et al.*, 1990).

El TNF $\alpha$ , citoquina producida principalmente por monocitos, disminuye la transcripción genética del colágeno  $\alpha_1(I)$ , los niveles de su mRNA y la producción de colágeno en fibroblastos humanos, en lipocitos, y en otras líneas celulares (Solís-Herruzo *et al.*, 1988; Mauviel *et al.*, 1988; Matsuoka *et al.*, 1989; Scharffetter *et al.*, 1989; Mauviel *et al.*, 1991; Armendariz-Borunda *et al.*, 1992). También se ha descrito una disminución de la actividad del promotor del gen de procolágeno  $\alpha_2(I)$  en fibroblastos tratados con TNF $\alpha$  (Kahari *et al.*, 1990).

Estos efectos frenadores de la transcripción que poseen el TNF $\alpha$ , la IL-1 y el IFN $\gamma$ , al igual que los estimulantes del TGF $\beta$ , están probablemente mediados por segundos mensajeros como el cAMP, o el Ca $^{2+}$  y por proteínas reguladoras de la transcripción. En concreto, la movilización del Ca $^{2+}$  intracelular con ionóforo A23187 en fibroblastos humanos disminuye la producción de colágeno, posiblemente mediante la inhibición de su síntesis (Flaherty & Chojkier, 1986). El cAMP también reduce la producción de esta proteína (Perr *et al.*, 1988).

Sin embargo, el papel que estos, y otros muchos mediadores (PTH, vitamina D, esteroides antiinflamatorios, prostaglandinas, EGF, PDGF, etc.) desempeñan en la síntesis de colágeno está aun por dilucidar (Solís-Herruzo, 1988).

### 1.3. EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ )

Las citoquinas son mediadores peptídicos intercelulares que regulan la homeostasis y las reacciones de defensa del hospedador. Se producen por muchos tipos celulares y tienen un amplio espectro de efectos en procesos inflamatorios y reparadores. Esta pleiotropía se debe al hecho de que una citoquina dada puede tener múltiples efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Por ello, las citoquinas pueden exhibir efectos biológicos que se solapan. Es más, una citoquina pueden presentar efectos biológicos similares mediante la producción de una cascada del resto de ellas. Los beneficios de esta redundancia

y las actividades interdependientes no están todavía claras (Oppenheim *et al.*, 1990).

El TNF $\alpha$  es una citoquina mediadora de distintos procesos beneficiosos (defensa del hospedador, respuesta inmune y homeostasis de los tejidos, por ejemplo) y también de procesos negativos (patogénesis de infecciones, daño tisular, inflamación, etc.) (Camussi *et al.*, 1991).

### 1.3.1. Desarrollo histórico

La primera fase del estudio del TNF $\alpha$  se inició en 1940, cuando fue detectado en el suero de ratones tratados con endotoxina de *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), como proteína productora de necrosis hemorrágica de tumores *in vivo*, y citotóxica para células tumorales *in vitro*, pero no para células normales. El TNF $\alpha$  fue también descubierto independientemente como mediador de la *caquexia* de animales con infecciones parasitarias, y por ello se le denominó caquectina.

Posteriormente, en 1985, distintos grupos clonaron el gen que codifica esta proteína, se estableció su estrecha relación con el gen de la linfotoxina o TNF $\beta$  y aumentaron significativamente los trabajos relativos a la localización cromosómica de su gen y a la localización y caracterización de sus receptores.

En una tercera etapa se establecieron las relaciones existentes entre la caquectina o TNF $\alpha$  y distintos cuadros patológicos y toxicológicos.

Tras este periodo, la atención se ha centrado en el papel del TNF $\alpha$  en el sistema inmune y en las reacciones inflamatorias, descubriéndose numerosas interacciones entre esta citoquina y otros factores (interleuquinas, prostaglandinas, interferones...) tanto *in vitro* como *in vivo*. También se han descrito respuestas en células del sistema inmune (en polimorfonucleares, en células T y B, macrófagos) y en otras muchas líneas celulares, y se están estudiando los efectos del TNF $\alpha$  exógeno.

Finalmente, se están realizando investigaciones sobre los efectos fisiológicos del TNF $\alpha$  mediante la utilización de modelos animales (ratones atómicos y ratones transgénicos).



### 1.3.2. Estructura del TNF $\alpha$

El TNF $\alpha$  es una proteína de 157 aminoácidos (aproximadamente 17,3kDa). La forma activa de esta citoquina es un trímero compacto formado por tres subunidades idénticas de 157aa.

Todas las secuencias de TNF $\alpha$  contienen dos residuos de triptófano, conservados entre especies y también presentes en el TNF $\beta$ . El cambio de estos residuos por fenilalanina da lugar a una reducción en la actividad. El TNF $\alpha$  humano contiene tres residuos de histidina en posición 15, 73 y 78; los residuos en 15 y en 78 están conservados, no sólo entre distintas secuencias de TNF $\alpha$ , sino también en el TNF $\beta$ . La modificación del residuo 15 da lugar a la disminución o incluso a la pérdida de la actividad (Yamamoto *et al.*, 1989). Esto indicaría que este aminoácido está en el sitio de unión a receptor del TNF $\alpha$ , o en una posición muy cercana a este sitio (Fiers, 1991).

En el caso del TNF $\alpha$  se ha descrito una forma de esta proteína, de 26kDa (en vez de los 17kDa de la forma secretada), unida a la membrana celular (Kriegler *et al.*, 1988); corresponde al producto no procesado de la traducción del mRNA. Además, la parte correspondiente al TNF $\alpha$  maduro es la que se encuentra por fuera de la célula. Se piensa que esta forma unida a membrana es activa y responsable de la citotoxicidad celular mediada por monocitos (Philip & Epstein, 1986). Este precursor transmembranal sufre la acción de una proteasa de tipo serina (Scuderi, 1989).

También se ha descrito una forma de 18.5kDa inactiva, que presenta 10 aminoácidos más en el extremo N-terminal que la forma de 17kDa (Cseh & Beutler, 1989). Todavía no está claro si esta forma es intermediaria en el procesamiento, o si es un producto final (Fiers, 1992).

Existe una homología clara entre la estructura primaria del TNF $\alpha$  y la del TNF $\beta$  (son idénticas en un 31% y homólogas en un 51%). Una diferencia es la presencia de catorce aminoácidos en la región aminoterminal del TNF $\beta$  (no presente en el TNF $\alpha$ ). También existen diferencias respecto a la presencia de distintos aminoácidos; por ejemplo, el TNF $\alpha$  tiene dos

cisteínas (el humano, el de conejo y el murino) mientras que la linfoxina carece de ellas, y en su lugar aparece tirosina; otra es que el TNF $\beta$  presenta tres residuos de metionina que no están en el TNF $\alpha$  (Goeddel *et al.*, 1986).

También hay que señalar que el TNF $\beta$  es una glicoproteína, mientras que el TNF $\alpha$  no presenta glicosilaciones (aunque el TNF $\alpha$  murino sí) (Green *et al.*, 1976).

Respecto a la conformación de la molécula de TNF $\alpha$ , la topología predominante a nivel de subunidad es esencialmente una estructura formada por láminas  $\beta$  plegadas antiparalelamente. Mediante estudios realizados con rayos X, parece que cada subunidad presenta siete dominios de estructura  $\beta$  y una región helicoidal (Tomita *et al.*, 1990).

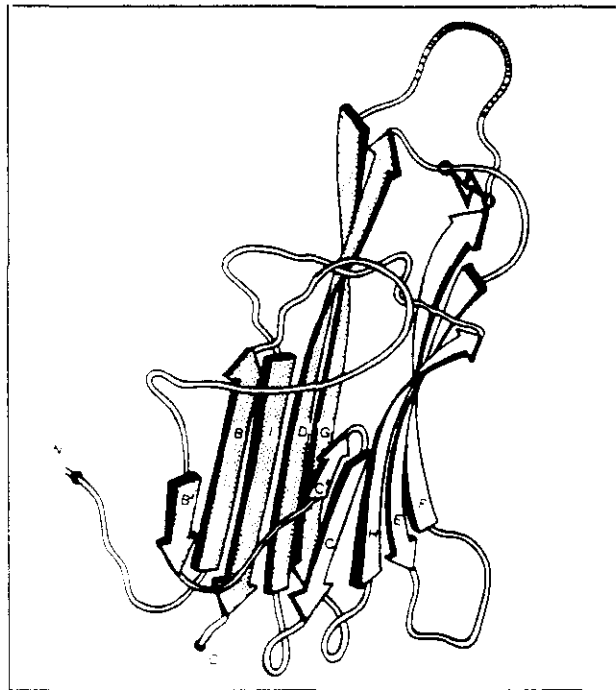
Las regiones N- y C-terminales se encuentran en un extremo de esta forma compacta de plegamiento. La región C-terminal está localizada en una posición fija, como parte integrante de la lámina  $\beta$ ; en cambio, la aminoterminal es más flexible y sólo participa en la estructura secundaria a partir del residuo 10. Por ello, se piensa que deleciones de hasta ocho residuos aminoterminales pueden producirse sin pérdida de actividad. También aparece otra región de gran movilidad entre los residuos 102 y 113.

Existe un puente disulfuro sencillo entre los aminoácidos en posición 69 y 101, quedando de esta forma unidas dos láminas  $\beta$  y formándose un bucle (Jones *et al.*, 1990). Este puente está altamente conservado entre las distintas moléculas de TNF $\alpha$  y, aunque favorece su estabilización, no es esencial para la actividad del TNF $\alpha$  (Mark *et al.*, 1987).

Tres subunidades de 157aa se asocian fuertemente para formar un trímero con forma de cono. La interacción se realiza mediante un empaquetamiento en el que una región con conformación de lámina  $\beta$  situada en un borde del monómero plegado se dispone cerca de otra región en lámina  $\beta$  de la subunidad adyacente. Las regiones de la hoja  $\beta$  no implicadas en la formación del trímero tienen predominantemente residuos apolares, mientras que las que lo están son mayoritariamente polares.

Respecto a la región de la molécula de TNF $\alpha$  que es reconocida por el receptor de membrana de la célula diana, se han descrito varios puntos esenciales. Por ejemplo, el cambio

de la serina en posición 86 por fenilalanina da lugar a una disminución de diez mil veces en la actividad biológica, sin que cambien las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Este residuo está localizado en el bucle anteriormente indicado, en un extremo de la pirámide triangular, cercano a la unión entre subunidades individuales.



Conformación tridimensional de la molécula del TNF $\alpha$  (Jones *et al.*, 1990).

Comparando los residuos que se conservan en la superficie de la molécula de TNF $\alpha$  y del TNF $\beta$ , Eck y Sprang (1989) sugirieron que el sitio de unión a receptor está en una depresión de la base del trímero. Sin embargo, aunque se reconoce que hay al menos tres secuencias implicadas en la unión del TNF $\alpha$  al receptor, existe cierta discrepancia respecto a cuales son exactamente, quizás debido a la utilización de distinta metodología (Fiers, 1991).

### 1.3.3. Determinación genética del TNF $\alpha$

El gen del TNF $\alpha$  (y también el del TNF $\beta$ ) se localiza en el hombre en el cromosoma 6, cercano al centrómero. En esta misma región está el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en el extremo proximal del brazo corto (Nedwin *et al.*, 1985;

Strominger, 1986). En ratón el contexto cromosómico del gen de TNF $\alpha$  es muy parecido, aunque se sitúa en el cromosoma 17. Esta yuxtaposición del TNF $\alpha$  con el MHC sugiere distintas posibilidades de interrelación entre los componentes responsables del reconocimiento y los efectores del sistema inmune, y pone de manifiesto el papel del locus del TNF $\alpha$  en las enfermedades inflamatorias.

Las regiones codificantes constan de 4 exones de aproximadamente 8kb. Más del 80% de la secuencia que codifica para el TNF $\alpha$  maduro está en el cuarto exón, mientras que los exones I y II contienen casi completamente secuencias peptídicas anteriores. Al igual que existe homología respecto a la secuencia de aminoácidos, existen secuencias de nucleótidos altamente conservadas en los extremos 5' y 3', que posiblemente están asociadas con la regulación de la expresión de este gen (Spriggs *et al.*, 1992).

#### 1.3.4. Regulación de la expresión del gen del TNF $\alpha$

##### 1.3.4.1. Control transcripcional

La región de 1.000bp del extremo 5' del gen del TNF $\alpha$  contiene elementos regulatorios importantes que afectan a la transcripción del TNF $\alpha$  en respuesta a varios estímulos. Aproximadamente, 20bp por encima del inicio de la transcripción se encuentra la secuencia TATA; 20bp por encima de ésta aparece una secuencia GC (en orientación invertida), a la que se une el factor SP-1 (Marmenout *et al.*, 1985; Ito *et al.*, 1986; Shakhov *et al.*, 1990).

Adyacente a la región TATA, a 80bp de ésta, existe una secuencia palindrómica de 8 nucleótidos casi idéntica al elemento sensible a cAMP (CRE) encontrado en el promotor del gen de la somatostatina. Difiere de ésta en que el dinucleótido central está invertido (CG en lugar de GC). Esta secuencia normalmente está asociada con genes inducibles por cAMP; sin embargo la transcripción del TNF $\alpha$  está inhibida por agentes que aumenten estos niveles.

Entre la región TATA y el inicio de la transcripción existe una secuencia muy parecida a la secuencia consenso de unión de c-jun/AP-1, un motivo de 7 nucleótidos asociado con los

promotores de genes inducibles por ésteres de forbol. A 40bp por encima de la región TATA existe una secuencia con algo menos de homología aunque también posiblemente funcional respecto a la unión con AP-1. Otro elemento de posible respuesta a ésteres de forbol se encuentra en la región de 90 a 165bp por encima de la secuencia TATA (Hensel *et al.*, 1989). Esta secuencia podría ser la que Economou *et al.* (1989) identificaron como sitio de unión del factor de transcripción AP-2.

Estas secuencias, localizadas 200bp por encima del inicio de la transcripción, están altamente conservados en ratón, conejo y hombre, lo cual indica que estos elementos regulatorios son importantes.

Además de estas secuencias, existen otras cuyo papel todavía se desconoce: en la región entre 230bp y 650bp por encima de la secuencia TATA existen dos motivos (también conservados en las tres especies) que recuerdan el motivo *citoquina-1* presente en los promotores de IL-2, IL-3, G-CSF y GM-CSF, y que parece ser una variante del intensificador  $\kappa$ B: a 24bp de la secuencia TATA aparece un decanucleótido con cierta homología respecto a la secuencia Y de los promotores de MHC clase II, y entre 480 y 820bp por encima de la misma secuencia TATA hay motivos semejantes a los intensificadores  $\kappa$ B de los genes de las inmunoglobulinas (Spriggs *et al.*, 1992).

#### 1.3.4.2. Control traduccional

A nivel traduccional también existe regulación: en la región 3' no traducida Beutler *et al.* (1988) identificaron en los genes de TNF $\alpha$  humano y murino un octanucleótido (TTATTTAT) presente en los genes de otras citoquinas (Caput *et al.*, 1986). La presencia de esta secuencia está asociada con la degradación acelerada de mRNA y con la interferencia en la traducción (Shaw & Kamin, 1986; Wilson & Treisman, 1988; Kruys *et al.*, 1989).

#### 1.3.5. Inducción de la síntesis de TNF $\alpha$ por distintos factores

El control de la producción de TNF $\alpha$  se lleva a cabo de forma específica en cada

tejido. Además, existen una gran variedad de estímulos que inducen la síntesis de TNF $\alpha$ .

Esta producción se ha estudiado fundamentalmente en la línea monocito/macrófago, pero la expresión del TNF $\alpha$  por parte de células no hematopoyéticas también es importante en algunas enfermedades.

En linfocitos, el inductor de la síntesis de TNF $\alpha$  más estudiado es el lipopolisacárido (LPS). En estas células, la regulación de la transcripción de TNF $\alpha$  parece ser un mecanismo de control importante para la expresión de TNF $\alpha$ . Generalmente existe una transcripción basal de esta citoquina, aunque se incrementa mucho cuando el monocito se activa con el LPS.

En la activación de monocitos por LPS están implicadas muchas vías de trasducción de señal: fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), proteinquinasa C (PKC), flujos de Ca<sup>2+</sup>, y nucleótidos cíclicos. Entre éstas, parece que la síntesis de TNF $\alpha$  precisa de la vía de la PKC al menos, y depende del calcio almacenado en la célula (Drysdale *et al.*, 1983). En células HL-60, la inducción de transcritos de TNF $\alpha$  por LPS está asociada con actividad PLA<sub>2</sub> (Mohri *et al.*, 1990), sin que intervenga la vía de la PKC.

Otro grupo de inductores del TNF $\alpha$  son los ésteres de fórbol. Parece que la PLA<sub>2</sub> tiene un papel clave en su efecto, y en algunos casos, este efecto puede ser mediado por PKC (activando NF- $\kappa$ B, que regula la transcripción de TNF $\alpha$ ).

Entre otros inductores descritos, el mismo TNF $\alpha$  es capaz de desencadenar su propia expresión, tanto a nivel de RNA como a nivel de proteínas. Este efecto parece estar mediado por la PLA<sub>2</sub> y por la actividad 5-lipooxigenasa (Spriggs *et al.*, 1987; Niitsu *et al.*, 1988).

Respecto a la producción de TNF $\alpha$  por células no mieloides, actualmente se sabe que muchos tejidos son capaces de expresar TNF $\alpha$  constitutivamente o en respuesta a estímulos. La expresión de TNF $\alpha$  suele correlacionarse en estos tejidos con niveles celulares de mRNA de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Esto indicaría que el TNF $\alpha$  actúa conjuntamente con otras citoquinas para controlar el crecimiento y la funcionalidad de las células de estos tejidos.

### 1.3.6. Mecanismo de acción del TNF $\alpha$

#### 1.3.6.1. Receptores del TNF $\alpha$

El primer paso en la respuesta de una célula al TNF $\alpha$  es la interacción del ligando con los receptores específicos de membrana. Los receptores del TNF $\alpha$  están presentes en casi todos los tipos celulares con algunas excepciones, como los eritrocitos y los linfocitos T no estimulados. El número de receptores oscila entre 200 y 10.000 por célula (Fiers, 1991). El receptor es lábil metabólicamente, y tiene una vida media de 30 minutos a 2 horas (Baglioni *et al.*, 1987; Scheurich *et al.*, 1988). Aunque la presencia del receptor es imprescindible para el efecto biológico, no existe una correlación clara entre el número de receptores y el tipo de respuesta, ni con la magnitud de ésta (Holtmann & Wallach, 1987; Tsujimoto *et al.*, 1986; Fiers, 1991).

Existen, al menos, dos receptores diferentes de TNF $\alpha$  descritos en muchas líneas celulares: uno de ellos de 55kDa (TNF-R55 o R-1) y otro de 75kDa (TNF-R75 o R-2). Ambos están N-glicosilados (Loetscher *et al.*, 1990), pero sólo el último también está O-glicosilado. La constante de unión del TNF $\alpha$  al R-1 es de 0.5nM, y al R-2 de 0.1nM (Fiers, 1991).

El TNF-R1 parece ser una proteína de 455 aminoácidos con una estructura típica común con otros receptores: presenta una secuencia hidrofóbica de 220aa, una región transmembranal sencilla que separa los dominios intra y extracelulares y una región extracelular de 182aa. El TNF-R2 tiene 174aa en la región intracelular y 235aa en la extracelular. Las secuencias extracelulares de ambos receptores están relacionadas: cada una contiene cuatro motivos de, aproximadamente, 40 residuos, y cada uno de ellos presenta seis (algunos cuatro) residuos de cisteína. Respecto a los dominios intracelulares, aparentemente no existen homologías claras entre ambos receptores, ni tampoco respecto a otros receptores. Sin embargo, en ambos aparece un alto contenido en prolinas y serinas en la región citoplasmática (Fiers, 1991).

El TNF-R1 está ampliamente distribuido y aparece en células epiteliales y fibroblastos,

entre otras células. El TNF-R2 tiene una localización más restringida a las células de origen hematopoyético.

El TNF $\alpha$  y el TNF $\beta$  se unen a ambos tipos de receptores, pero este último lo hace con menor afinidad (Locksley *et al.*, 1987). Además, la unión del TNF $\alpha$  a sus receptores no es específica de especies, aunque existe cierta preferencia del TNF $\alpha$  por su especie celular homóloga (Smith *et al.*, 1986). Aunque el TNF $\alpha$  y el TNF $\beta$  se unan a los mismos receptores, la respuesta no es idéntica, ni cualitativa ni cuantitativamente en la mayoría de los casos. Por ello, Fiers (1991) indica que es posible que las moléculas de los receptores de TNF estén asociados a proteínas accesorias y que la interacción con el TNF $\alpha$  genere muchas señales, algunas de las cuales no puedan ser ejercidas por el TNF $\beta$ . Alternativamente, existe la posibilidad de un tercer tipo de receptor.

La unión del TNF a los receptores puede ser inhibida por activadores de la PKC, quizás debido a la fosforilación de éstos o a una disminución en el número de receptores (Holtmann & Wallach, 1987; Johnson & Baglioni, 1988). Por el contrario, el cAMP incrementa la cantidad de R-2, al menos en algunas líneas celulares (Hohmann *et al.*, 1990).

### MECANISMOS POSTERIORES A LA UNION DEL TNF $\alpha$ CON EL RECEPTOR

En el caso de una citoquina pleiotrópica como es el TNF $\alpha$ , hay que considerar varios mecanismos no excluyentes de transducción de señal, para poder explicar la inducción de actividades biológicas muy distintas:

1. Como ya se ha indicado, existen distintos tipos de receptores de membrana, que podrían estar unidos a diferentes sistemas de segundos mensajeros;
2. Los receptores de membrana pueden funcionar no sólo como componentes transmembranales de señalización, sino también como transportadores de la molécula de TNF $\alpha$ , que por sí misma, o unida a su receptor, puede presentar actividad intracelular;
3. La heterogeneidad de respuesta puede deberse a una diversificación de la señal después de la unión de TNF $\alpha$  a sus receptores.



Respecto al primer punto, Tartaglia *et al.* (1991) indican que es posible que el TNF-R2 sólo participe como componente accesorio minoritario del TNF-R1 en la señalización de las respuestas, aunque el TNF-R2 tenga en algunos casos concretos un papel importante. Estos mismos autores indican que en algunas respuestas sólo está implicado uno u otro tipo de receptor; por ejemplo, en la proliferación de timocitos murinos y células T estimulada por el TNF $\alpha$  actuaría el TNF-R2 (aunque admiten que puede no ser así en todos los tipos celulares) y en el caso de la citotoxicidad mediada por el TNF $\alpha$ , y de la inducción de superóxido dismutasa, en células LM, el receptor sería el TNF-R1.

Lewis *et al.* (1991) sugieren que las actividades del TNF $\alpha$  humano descritas en ratón y en células murinas están mediadas por el TNF-R1, mientras que aquellas que se producen con especificidad de especies para TNF $\alpha$  murino deben ser reguladas por TNF-R2. Estos autores apoyan esta hipótesis en un estudio donde el TNF-R2 se une a TNF $\alpha$  murino con elevada especificidad, pero no reconoce al TNF $\alpha$  humano.

Parece que las respuestas mediadas por el TNF-R2 son mucho menos numerosas que las mediadas por el TNF-R1. La mayoría de las actividades del TNF $\alpha$  humano y murino en ratón o en líneas celulares murinas presentan sólo ligeras diferencias, salvo la proliferación en las células T y timocitos. No se sabe porqué el efecto del TNF-R2 es específico en la respuesta en estas líneas celulares, ya que este receptor está presente en otros tipos celulares. Tartaglia *et al.* (1991) admiten la posibilidad de que el TNF-R2 sea preciso en otras respuestas celulares, o que incluso no intervenga en la transmisión de la señal al citoplasma.

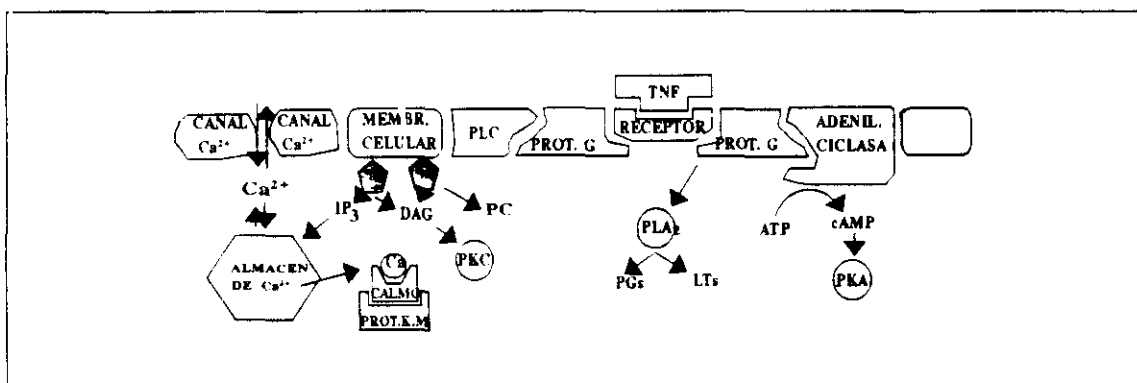
Otra de las explicaciones de la diversidad de las acciones del TNF $\alpha$  se basa en el hecho de que el TNF $\alpha$  unido a su receptor se internaliza rápidamente y posteriormente es degradado en los lisosomas (Mosselmans *et al.*, 1988). Esto ocurre tanto en las células sensibles a la citotoxicidad del TNF $\alpha$  como en las resistentes (Tsujimoto *et al.*, 1986).

Es posible que la molécula de TNF $\alpha$ , por sí misma dentro de la célula sea responsable del efecto citotóxico (Smith *et al.*, 1990). De hecho, la inhibición de la internalización con cloroquina anula la citotoxicidad del TNF $\alpha$  (Ruff & Gifford, 1981).

Yoshimura *et al.* (1990) describen un posible mecanismo de citotoxicidad mediada por TNF $\alpha$ , donde éste, tras su unión a receptor, es internalizado en acidosomas antes de la expresión de sus actividades biológicas. Dado que esta citoquina presenta actividad sobre membrana a pH ácido (estudio realizado en liposomas), estos mismos autores indican que después de la internalización el TNF $\alpha$  se disocia de su receptor y perturba la membrana de estos acidosomas, desencadenando una señal muy potente que da lugar a la citotoxicidad. Es lo que definen como *transducción mediada por endocitosis*, y es el mecanismo que, según estos autores, tiene lugar tras la unión del TNF $\alpha$  al receptor.

Aparte de la citotoxicidad, no se han descrito otras actividades biológicas de esta molécula internalizada. Es más, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducida por el TNF $\alpha$  en algunas líneas celulares sólo requiere la interacción de esta citoquina con el dominio extracelular del TNF-R1 (Hohmann *et al.*, 1990). Quizás sólo en algunos casos los receptores de TNF $\alpha$  podrían servir como transportadores de la molécula al interior celular, además de transmitir la señal en la membrana.

La tercera explicación posible indicada de la diversidad de acción del TNF $\alpha$  se fundamenta en la activación de fosfolipasas por el receptor, mediante proteínas G, que daría lugar a la actividad de otros segundos mensajeros. Hasta el momento, no parece que los receptores de TNF $\alpha$  tengan actividad tirosina-quinasa (Kronke *et al.*, 1992). El mecanismo mediado por proteínas G parece ser el responsable mayoritario de la heterogeneidad de respuesta.



Posibles mecanismos de acción del TNF $\alpha$ .

### 3.6.2. Proteínas G

Las proteínas G son una familia de proteínas heterotrímeras, asociadas a la membrana celular, compuestas por tres polipéptidos: una cadena  $\alpha$  ( $G\alpha$ ) que une e hidroliza GTP, y un complejo  $\beta\gamma$  ( $G\beta\gamma$ ) que ancla la proteína G a la cara citoplásmica de la membrana plasmática. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  están bastante conservadas entre distintas proteínas G, mientras que la subunidad  $\alpha$  es heterogénea estructuralmente, y media distintas actividades. En su forma inactiva la proteína G existe como un trímero que presenta el GDP unido a la subunidad  $\alpha$ . Cuando se activa por unión al complejo agonista-receptor, el sitio de unión al guanilnucleótido en  $G\alpha$  se altera, permitiendo que el GTP desplace el GDP de  $G\alpha$ . La unión del GTP causa la disociación de  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , y  $G\alpha$  inicia las respuestas celulares. En menos de un segundo  $G\alpha$  hidroliza el GTP a GDP y  $P_i$ , y se reasocia con  $G\beta\gamma$  (Alberts *et al.*, 1983).

Inicialmente las proteínas G se clasificaron en cuatro grupos en función de su sensibilidad a enzimas ADP-ribosilantes: sustratos de la toxina colérica sólo, de la toxina pertussis, de ambas, o de ninguna de ellas. Los sustratos de la toxina colérica parecían estimular solamente la adenilato ciclasa, y los de la pertussis la inhibían; por ello se llamaron  $G_s$  y  $G_i$ . Posteriormente se comprobó que estas proteínas tienen un espectro de acción mucho más amplio, que incluye el metabolismo de los fosfolípidos y la regulación del transporte iónico. Sin embargo, la clasificación en función de la sensibilidad a estas dos toxinas se sigue manteniendo, ya que los dos primeros grupos presentan analogías estructurales (Neer & Clapham, 1988).

Brett *et al.* (1989) han descrito dos caminos distintos de transducción de señal del  $TNF\alpha$  en células endoteliales: uno sensible a toxina pertussis, y otro que no se modifica tras la incubación con la toxina. Respecto al primero, estos autores indican que, tras la exposición de las células al  $TNF\alpha$ , existe una serie de cambios tempranos (de 1 a 3 horas) en el citoesqueleto que dan lugar a la formación de uniones intercelulares, y al mismo tiempo se incrementa la permeabilidad celular de forma reversible. Este proceso, que no precisa de síntesis proteica, se bloquea con la preincubación con toxina pertussis. Sin embargo, el efecto

del TNF $\alpha$  sobre las propiedades coagulantes de estas células no es sensible a la toxina.

En otras líneas celulares se han descrito distintos efectos del TNF $\alpha$  que desaparecen con toxinas ADP-ribosilantes (Hepburn *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1988).

Imamura *et al.* (1988) indican que, en células L929 y en la línea de células mieloides HL60, una molécula de TNF $\alpha$  unida a su receptor estimula aproximadamente unas cien proteínas G, y que éstas son sensibles a toxina pertussis. Estos mismos autores indican que el TNF $\alpha$  actúa incrementando la afinidad de la proteína G por GTP, la actividad GTPasa y la ADP-ribosilación de la subunidad G $_i$ .

La subunidad  $\alpha$  parece ser, por tanto, de tipo  $\alpha_1$  o  $\alpha_0$ . Pese a todo, no se descarta la existencia de un nuevo tipo de proteína G sensible a toxina pertussis distinto a los descritos en otros casos.

#### 1.3.6.3. Vía del ácido araquidónico

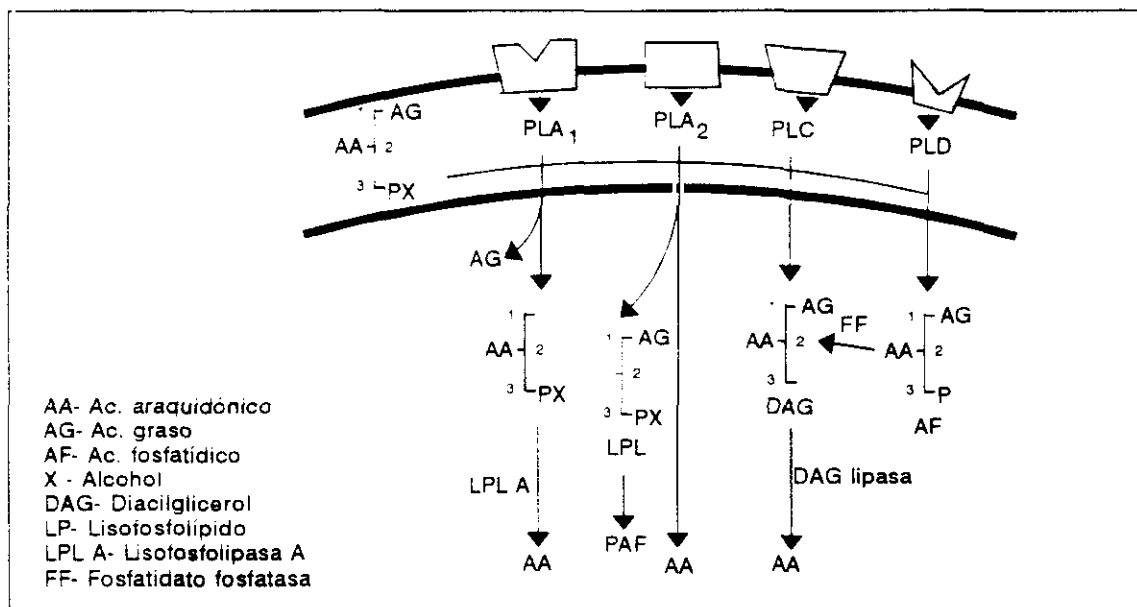
La fosfolipasa A $_2$  (PLA $_2$ ) es una enzima acoplada a los distintos receptores de membrana mediante proteínas G (Silk *et al.*, 1989). Además de ser activada por proteínas G directamente, también puede estimularse en algunos casos como resultado de un aumento en el intercambio Na $^+$ /H $^+$  (posiblemente por modificación del pH intracelular) o por un aumento en los niveles de Ca $^{2+}$  (se trata de una enzima dependiente de calcio) (Sweatt *et al.*, 1986b). El inhibidor fisiológico de la PLA $_2$  es un grupo de proteínas denominadas lipocortinas o calpactinas (Davidson *et al.*, 1987).

Después de su activación, la PLA $_2$  hidroliza los fosfolípidos de membrana, liberándose el ácido graso (generalmente insaturado) unido al C $_2$ . El otro producto de la reacción, el lisofosfolípido, está determinado por la especificidad de la PLA $_2$  intracelular por la cabeza hidrofílica del fosfolípido, siendo la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina los fosfolípidos metabolizados mayoritariamente por esta enzima (Rustembeck y Lenzen, 1989).

Los lisofosfolípidos son detergentes biológicos de las membranas celulares. La lisofosfatidilcolina también puede ser acetilada, produciéndose el factor activador de plaquetas

(PAF), que es un potente mediador celular (Dennis *et al.*, 1991). Además, tanto los ácidos grasos libres como los lisofosfolípidos son, en principio, capaces de actuar sobre el potencial de membrana mitocondrial, alterando la actividad de las enzimas integrales de esta membrana y el transporte de calcio a través de ella (Rustembeck & Lenzen, 1989).

El ácido graso insaturado más importante en la transducción de señal, y también el más estudiado, es el ácido araquidónico (AA). El AA es liberado mayoritariamente por la acción de la PLA<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de membrana, pero también puede generarse por la acción secuencial de distintas enzimas, por ejemplo por la fosfolipasa C (PLC), la diacilglicerol lipasa (DAG lipasa) y la monoacilglicerol lipasa (Irvine, 1982; Mauco *et al.*, 1984; Chau & Tai, 1988; Nakashima *et al.*, 1988), o por otras reacciones enzimáticas en las que interviene la fosfolipasa D (PLD) (Billah *et al.*, 1981; Dennis *et al.*, 1991).



Formación de ácido araquidónico (Dennis *et al.*, 1991).

El AA puede interactuar directamente con distintas enzimas, como la PKC, y también es capaz de incrementar el flujo intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Guaragna *et al.*, 1992).

La metabolización del AA puede producirse por varias vías:

1. La vía de la cicloxigenasa (CO), dando lugar a las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y prostaciclina. Entre las acciones de las PGs y de los TXs se encuentran el incremento en

los niveles de cAMP y la activación de la PLC (Banga *et al.*, 1986; Sweatt *et al.*, 1986a; Baud *et al.*, 1988).

2. La vía de la lipoxigenasa (LO), cuyos productos son los leucotrienos, lipoxinas y epoxilinas (Irvine, 1982).

3. La vía del citocromo P-450, originándose epóxidos y alcoholes de ácidos grasos. Estos metabolitos tienen consecuencias importantes en la permeabilidad iónica de las membranas, y en la actividad de enzimas localizadas en estas membranas (Capdevilla *et al.*, 1992).

La implicación de la vía del AA en la transducción de señal del TNF $\alpha$  ha sido ampliamente estudiada. Inicialmente, en células sensibles a la citotoxicidad de esta citoquina, se describió que el primer orgánulo dañado era la mitocondria (Matthews, 1983). Este hecho hizo pensar en un mecanismo de citolisis mediado por radicales libres que podían originarse a partir de la activación de la PLA<sub>2</sub>. Posteriormente se observó que la inhibición de esta enzima (con dexametasona y quinacrina) reduce la citolisis y que existe un incremento en la liberación de AA antes de producirse la muerte celular. Sin embargo, los bloqueantes de la CO, de la LO y del citocromo P-450 en la mayoría de los casos son inefectivos (Matthews *et al.*, 1987; Suffys *et al.*, 1987; Neale *et al.*, 1988; Beyaert *et al.*, 1989). Esto sugiere que no es el AA, sino más bien los lisofosfolípidos o sus metabolitos las moléculas responsables de la citotoxicidad del TNF $\alpha$  (Neale *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1992; Kronke *et al.*, 1992). También es posible que los productos de la acción de la PLA<sub>2</sub> actúen directamente sobre el metabolismo del calcio o sobre la cadena respiratoria mitocondrial. En algunas líneas celulares resistentes a la toxicidad del TNF $\alpha$  también se ha observado la activación de la PLA<sub>2</sub> y la estimulación de la producción de prostaglandinas (Clark *et al.*, 1988; Baud *et al.*, 1988).

Tanto en las células sensibles como en las resistentes parece que la activación de esta vía no media la transducción de la señal iniciada por el TNF $\alpha$ , sino que es más bien una inducción posterior a la llegada de la señal al núcleo: los efectos anteriormente descritos son tardíos (después de 6 horas de incubación con la citoquina), o precisan de la síntesis proteica inducida por el TNF $\alpha$ .

En células de origen hematopoyético y en células endoteliales (responden a determinados estímulos mediante la liberación de AA y de PAF) es posible que la vía de la PLA<sub>2</sub> participe como mediadora de la señal iniciada por el TNF $\alpha$  (Camussi *et al.*, 1987; Spriggs *et al.*, 1990).

#### 1.3.6.4. Vía de la fosfolipasa C

Otra posibilidad en la señalización desencadenada por la unión del TNF $\alpha$  al receptor es que éste esté acoplado a una proteína G que active a una fosfolipasa C (Alberts *et al.*, 1983). Esta enzima es la encargada de degradar los fosfolípidos de membrana, y ha sido implicada en el control de numerosas funciones celulares. La PLC hidroliza los fosfatidilinositoles (PI-PLC) y la fosfatidilcolina (PC-PLC) de la membrana celular (Martin *et al.*, 1987).

La PI-PLC es una familia de isoenzimas dependientes del calcio citosólico. La hidrólisis del inositol 1,3-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) es la más importante aunque es el fosfoinosítido menos frecuente (Rhee, 1991).

Cuando la proteína G activa la PI-PLC, ésta rompe el PIP<sub>2</sub> en menos de un segundo, y genera dos productos: el inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG) (Berridge, 1987). Esta liberación de DAG se produce durante un corto periodo de tiempo (Dennis *et al.*, 1991). En este paso la ruta señalizadora se bifurca en dos ramas, debido a que ambas moléculas son capaces de activar otros procesos.

Esta enzima se ve inhibida con neomicina, gentamicina y con quinacrina (las dos últimas inhiben también la PLA<sub>2</sub>) (Rittenhouse-Simmons, 1979; Hofmann & Majerus, 1982; Hofmann *et al.*, 1982. Billah & Anthes, 1990; Floru *et al.*, 1991).

La PC-PLC es una enzima que causa la hidrólisis de la PC, y es responsable, junto con la PLD, de la formación sostenida de DAG. El requerimiento de Ca<sup>2+</sup> respecto a la hidrólisis de PC mediada por receptor puede variar entre distintos tipos celulares. En cualquier caso, el metabolismo de este ion parece ser necesario para la hidrólisis correcta de la PC

(Billah & Anthes, 1990).

La acción de la PC-PLC da lugar a la producción de DAG y a fosfocolina.

La PC-PLC es sensible a la inhibición con gentamicina (inhibidor de la PLA<sub>1</sub>, de la PLA<sub>2</sub>, y de la PLC)(Floru *et al.*, 1991). El BPB (también inhibidor de la PLA<sub>2</sub>) parece que es capaz de inhibir la PC-PLC independiente de calcio (Martin *et al.*, 1987).

La activación de las distintas fosfolipasas C puede deberse a la interacción directa por proteínas G, o a la estimulación por otros segundos mensajeros como la PKC o Ca<sup>2+</sup> citosólico libre (Besterman *et al.*, 1986; Billah & Anthes, 1990; Exton, 1990).

Otra enzima capaz de hidrolizar los fosfolípidos de membrana es la fosfolipasa D (PLD). Su actividad depende fundamentalmente del tipo de sustrato (Huang & Cabot, 1992), pero no parece ser dependiente del calcio (Billah & Anthes, 1990).

Esta enzima genera ácido fosfatídico (y colina, generalmente), que puede ser una fuente importante de DAG al sufrir la acción de una fosfohidrolasa. Además se ha descrito que este ácido es capaz de movilizar calcio intracelular, de abrir canales de calcio, de inhibir la adenilato ciclasa, o incluso de activar la PLA<sub>2</sub> y la PLC (Moolenaar *et al.*, 1986; Exton, 1990; Billah & Anthes, 1990).

La activación de la PLD puede detectarse tempranamente después de la estimulación específica de algunas células (Billah & Anthes, 1990), o ser secundaria a la acción de la PKC (Conricode *et al.*, 1992).

Cuando se estudia el efecto citotóxico del TNF $\alpha$  sobre algunas líneas celulares no hay indicios de que la PI-PLC esté activada: no existe liberación de IP<sub>3</sub>, y sus inhibidores (amikacina y neomicina) no disminuyen la muerte celular; mas aún, el cloruro de litio, inhibidor de enzimas que hidrolizan los inositoles fosfato, potencia este efecto (Kobayashi *et al.*, 1987; Suffys *et al.*, 1987; Beyaert *et al.*, 1989). Larrick y Wright (1990), por ello, indican que la ruta de los fosfatidilinositoles es necesaria para que las células sean resistentes a la toxicidad del TNF $\alpha$ .

Recientemente, Schutze *et al.* (1991), en estudios realizados con células histiocíticas



U937 tratadas con  $\text{TNF}\alpha$ . han observado un incremento rápido y transitorio en  $1',2'\text{DAG}$ , sin existir paralelamente un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico. Estos autores indican que, en este modelo experimental, el  $\text{TNF}\alpha$  induce la activación de la PC-PLC, y que la liberación del DAG no se produce en presencia de BPB.

#### 1.3.6.4.1. Calcio

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre es un segundo mensajero utilizado por numerosos agonistas.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma puede incrementarse bien mediante su liberación desde sus almacenes intracelulares o por un flujo desde el espacio extracelular a través de membrana plasmática (England, 1986). Los niveles de calcio intracelular son bajos (del orden de  $10^{-7}\text{M}$ ) comparados con la concentración en el fluido extracelular (alrededor de  $10^{-3}\text{M}$ ). Sin embargo, el calcio total dentro de la célula es mucho mayor que  $10^{-7}\text{M}$ , debido a que existe mucho  $\text{Ca}^{2+}$  unido a proteínas, membranas u otros componentes celulares, como son el retículo endoplásmico, la mitocondria, el aparato de Golgi, y el núcleo, siendo los dos primeros orgánulos los implicados en los cambios agudos en la distribución de calcio intracelular.

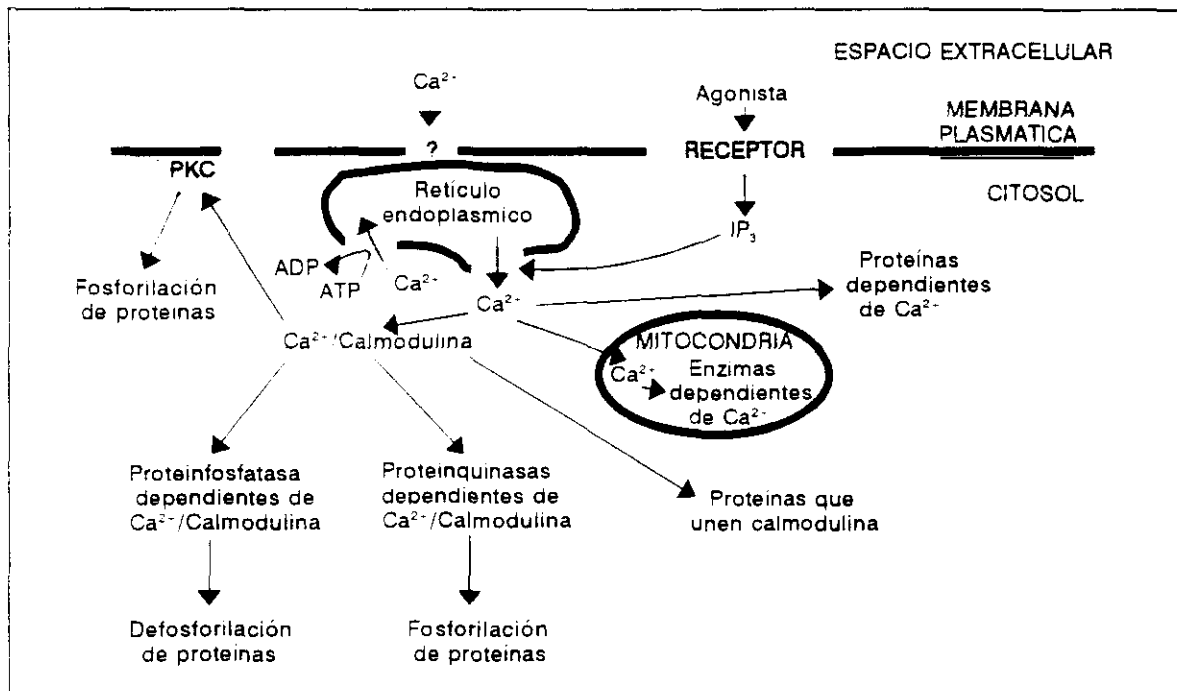
Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden incrementarse en respuesta al  $\text{IP}_3$ , que se une a una proteína receptora en la superficie citoplásmica del compartimento intracelular (retículo endoplásmico, fundamentalmente) y abre canales de calcio en esta membrana (Irvine, 1986).

La respuesta del calcio al  $\text{IP}_3$  es transitoria porque el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en el citosol es bombeado rápidamente principalmente fuera de la célula, y porque gran parte del  $\text{IP}_3$  es defosforilado rápidamente (y por tanto, inactivado) por una fosfatasa específica.

Los niveles de calcio citoplasmático libre también pueden estar regulados por otras moléculas señalizadoras. Por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede incrementarse por vía canales de calcio unidos a receptor y canales de calcio sensibles a voltaje (MacNicol & Schulman, 1992), por la acción del ácido fosfatídico y del ácido araquidónico (Moolenaar *et al.*, 1986; Billah & Anthes, 1990; Guaragna *et al.*, 1992), mediante la activación de canales de calcio

dependientes de voltaje por la PKC (Kato *et al.*, 1992) o por incrementos en los niveles de cAMP (Miyamoto *et al.*, 1992). También se han descrito oscilaciones espontáneas o inducidas por diferentes agonistas en células adherentes (Richter *et al.*, 1989; 1990; Curry, 1992; Pinzani *et al.*, 1992). Por otra parte, la movilización de calcio desde los almacenes intracelulares y la entrada de calcio por los canales sensibles a voltaje también pueden estar inhibidos por la PKC (MacNicol & Schulman, 1992).

El calcio liberado en el citoplasma puede activar procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, y también puede ser captado por la mitocondria, elevándose el calcio intramitocondrial y produciéndose una activación de enzimas mitocondriales (Irvine, 1986).



Metabolismo del calcio (Irvine, 1986).

Muchas de las acciones intracelulares del calcio ocurren por su unión a la calmodulina, una proteína presente en todas las células eucariotas, y cuya secuencia aminoacídica está altamente conservada a lo largo de la evolución. Esta proteína presenta cuatro regiones de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , y los cuatro iones de calcio se unen de forma no cooperativa. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina existen cambios conformacionales en su estructura proteica. Existe un gran número de procesos controlados por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Entre las enzimas

reguladas por este complejo están la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, la adenilato ciclasa, la fosforilasa quinasa y numerosas proteinquinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En todas estas enzimas existe una interacción con la calmodulina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En algunos de los casos existe sinergismo con otro segundo mensajero, el cAMP. Esto ocurre por ejemplo con la fosforilasa quinasa. Esta enzima presenta varias subunidades distintas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . La subunidad  $\gamma$  es la que tiene actividad catalítica; la  $\delta$  corresponde a la calmodulina, y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son fosforiladas por una proteinquinasa dependiente de cAMP. Sin embargo, drogas que se unen a la calmodulina e inhiben su función no afectan a la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  de la fosforilasa quinasa, aunque la adición de calmodulina exógena incrementa hasta seis veces su actividad (Cohen, 1980). La actividad de esta enzima también está regulada por la fosforilación mediada por una proteinkinasa A (PKA). La fosforilación tiene lugar sobre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y el resultado es el aumento de la afinidad de la subunidad  $\delta$  (calmodulina) por el calcio (England, 1986).

Otro ejemplo de interrelación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el cAMP se presenta en la fosfoproteínfosfatasa dependiente de calmodulina. Esta enzima defosforila la subunidad  $\beta$  de la fosforilasa quinasa, y otros sustratos de la PKA. Se ha sugerido que esta enzima modula el efecto del cAMP en función de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula estimulada. Cuando se incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se contrarrestaría la acción del cAMP estimulando la defosforilación de los sustratos de la PKA.

Otras proteínas que se unen a  $\text{Ca}^{2+}$  son la troponina, parvaalbúminas y calcimedinas en músculo, las proteínas S-100 en células gliales, y la protein quinasa C. Esta última quinasa está presente de forma inactiva soluble en citoplasma. Su activación implica la interacción con PS, DAG y  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie interna de la membrana plasmática. En principio, no es preciso un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aunque en muchos casos existe un incremento debido a su liberación mediada por el  $\text{IP}_3$ . Este enzima no parece tener una subunidad de calmodulina, sino que la región de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  es parte intrínseca del enzima.

Además de todas estas proteínas reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$ , que unen calcio con gran afinidad

y posteriormente, en la mayoría de los casos, activan enzimas o proteínas contráctiles, se han descrito más tarde otras proteínas que también unen calcio. Este grupo comprende proteínas ampliamente distribuidas, y que están unidas a membranas y a fosfolípidos. Se trata de la calpactina I, II (o lipocortina I), endonexina, calcimedinas, sinexina I y II, calelectrina y la proteína p70. Las calpactinas son las mejor caracterizadas y se encuentran en la mayoría de los tejidos. Su unión a fosfolípidos incrementa su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Klee, 1988). Estas enzimas son responsables de la regulación de la  $\text{PLA}_2$ , inhibiendo esta vía, pero no está claro hasta el momento si es mediante el secuestro del sustrato, o mediante inhibición directa del enzima (Davidson *et al.*, 1987).

La acción citotóxica del  $\text{TNF}\alpha$  no parece estar mediada por los iones de calcio, o al menos no lo está de manera esencial. En estudios realizados con la línea histiocítica de linfoma U937, la deplección de calcio extracelular y el bloqueo de la movilización de calcio de los almacenes intracelulares no inhibieron la lisis inducida por el  $\text{TNF}\alpha$  (Hasewaga & Bonavida, 1989), aunque mediante técnicas de fluorescencia con Fura-2 se ha descrito un ligero aumento en el calcio intracelular en la misma línea celular (Lynn *et al.*, 1989).

En el estudio de otros efectos del  $\text{TNF}\alpha$  algunos autores no detectan ninguna variación en la concentración intracelular de calcio inducida por esta citoquina (Richter *et al.*, 1989; Yamato *et al.*, 1989; Yuo *et al.*, 1989; Laudanna *et al.*, 1990). Sin embargo, la activación de polimorfonucleares por el  $\text{TNF}\alpha$  no se produce en presencia de Quin-2 (bloqueante del calcio intracelular), y algunos autores apuntan que el  $\text{TNF}\alpha$  produce oscilaciones espontáneas locales del calcio citosólico (Richter *et al.*, 1989, 1990). Corkey *et al.* (1991), estudiando la acción del  $\text{TNF}\alpha$  sobre fibroblastos cultivados procedentes de enfermos con el síndrome de Reye, describen un aumento temprano, rápido y transitorio en el calcio libre citosólico originado por su movilización desde los almacenes intracelulares, tanto en los fibroblastos procedentes de pacientes como en los controles. Además indican que es una elevación dependiente de la concentración de  $\text{TNF}\alpha$ . Existen varias explicaciones que, según estos autores, justificarían esta división de opiniones a cerca del papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en células tratadas con  $\text{TNF}\alpha$ : es una

respuesta que depende de la concentración y puede no ser tan clara a determinadas dosis; otra posibilidad es que sea una respuesta específica de especie o de línea celular, y por último, que las condiciones de cultivo no son idénticas en todos los casos.

El papel que juega la calmodulina en las acciones del TNF $\alpha$  no ha sido muy estudiado hasta el momento. Parece que la inducción de radicales libres por esta citoquina en leucocitos humanos es un proceso dependiente de calmodulina (Das *et al.*, 1990), y además las fenotiacinas (inhibidores de calmodulina) anulan la lisis inducida por TNF $\alpha$  (Larrick & Wright, 1990).

#### 1.3.6.4.2. Diacilglicerol

El DAG es un segundo mensajero que puede generarse por la acción de las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC sobre los fosfolípidos de membrana directamente. Además de este origen, el DAG puede ser producido por otras rutas diferentes:

- por hidrólisis de glicerofosfolípidos de colina por la fosfolipasa D y la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico (Martin *et al.*, 1987; Exton, 1990; Billah & Anthes, 1990; Dennis *et al.*, 1991);
- por el intercambio ceramida/PC (Dennis *et al.*, 1991);
- por la síntesis *de novo* (Rossi *et al.*, 1991).

El DAG puede ser fosforilado por la DAG quinasa (DAG + ATP  $\rightarrow$  ácido fosfatídico + ADP), reiniciándose la síntesis de los fosfatidilinositoles rotos por la PLC, y controlándose la concentración del DAG. De esta forma se regularía la PKC (Kanoh *et al.*, 1990). Además, el DAG puede sufrir la acción secuencial de la 1-DAG-lipasa y de la 2-monoacilglicerol lipasa, liberándose AA (Mauco *et al.*, 1984). Sin embargo, parece que la liberación de AA a partir de DAG es una ruta minoritaria.

El DAG también puede activar directamente la PLA<sub>2</sub> (Exton, 1990).

Otra vía que puede iniciar el DAG, la más importante en transducción de señal, es la activación de una proteinquinasa específica que es capaz de fosforilar numerosas proteínas

con múltiples funciones en la célula. El enzima activado por el DAG es la proteinquinasa C (PKC) (Nishizuka, 1984, 1988; Bell, 1986; Bell & Burns, 1991). Hasta el momento se han identificado nueve miembros de la familia de la PKC. En la región reguladora presentan una estructura aminoacídica que se asemeja al sustrato proteico y una o dos regiones ricas en cisteína que recuerda la estructura de "dedo de zinc". Esta región contiene el sitio de unión a los ésteres de forbol y a DAG, y segmentos que interaccionan con los fosfolípidos. También es la región que confiere la dependencia al calcio en los subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La región catalítica presenta los sitios de unión al ATP y a la proteína; los inhibidores de la PKC estaurosporina y H-7 interaccionan con esta región (Bell & Burns, 1991).

El DAG producido, junto con el fosfolípido fosfatidilserina de la membrana plasmática, se unen a la PKC, incrementando así su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , y haciendo que la PKC se active a las concentraciones normalmente bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. En muchas células, sin embargo, parece que la PKC se activa por el efecto cooperativo del DAG y un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. La activación de la quinasa C es transitoria, ya que en unos segundos el DAG es defosforilado para formar fosfatidato. Cuando se activa la PKC por el DAG y el  $\text{Ca}^{2+}$ , esta enzima transfiere el grupo fosfato terminal desde el ATP a un residuo específico de serina o de treonina en las proteínas diana, que varían dependiendo de la célula. Por ejemplo, en algunas células animales, se piensa que la PKC fosforila, y posteriormente activa, el antiportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática que controla el pH intracelular (Sweatt *et al.*, 1986b; Banga *et al.*, 1986); el incremento de pH resultante puede ayudar a estimular la proliferación celular. Existen niveles elevados de PKC en cerebro donde, entre otras cosas, fosforila canales iónicos en células nerviosas. La PKC también está implicada en la regulación de otras rutas señalizadoras, como son la del calcio y la del cAMP, en el control negativo de varios receptores, y en la transcripción de genes específicos. Los promotores de algunos de estos genes presentan un intensificador transcripcional común que está reconocido por una proteína reguladora del gen cuya actividad está estimulada por la activación de la PKC. No se sabe, sin embargo, si la proteína es directamente fosforilada (y por ello, activada)

por la PKC, o si es activada indirectamente por una cascada de proteinkininas (Farago y Nishizuka, 1990).

El hecho más significativo y temprano que ocurre en muchas líneas celulares tratadas con TNF $\alpha$  es un incremento de la fosforilación en residuos de serina y treonina de numerosas proteínas, tanto citosólicas como de membrana (Kirstein & Baglioni, 1986; Kaur & Saklatvala, 1988). La fosforilación es rápida y transitoria (comienza a los pocos segundos y al cabo de una hora vuelve al nivel basal) (Schutze *et al.*, 1989).

Esta fosforilación en los residuos de serina y treonina de distintas proteínas descrita por numerosos autores hizo pensar en la participación de la PKC como mediador de la señal inducida por el TNF $\alpha$ .

En algunas líneas celulares se ha observado la translocación de la PKC del citosol a la membrana, lo cual indica que existe una activación de esta enzima (Meichle *et al.*, 1990). Schutze *et al.* (1990) han descrito distintos perfiles de translocación de la PKC en varias líneas de leucemia humana incubadas con TNF $\alpha$ : en células U937, la PKC se transloca a la membrana y desaparece del citosol en 15 minutos, produciéndose una depresión en su actividad durante bastante tiempo; sin embargo, en células Jurkat y en la línea K562 la PKC se transloca de forma reversible, de manera que puede volver a ser activada rápidamente. Estas formas distintas de activación de la PKC pueden indicar que el TNF $\alpha$  activa distintas isoenzimas de la PKC, o bien que sólo se active una forma de esta enzima pero que este acoplada a distintas rutas de señalización.

En fibroblastos humanos y en células endoteliales no se observa esta translocación (Schutze *et al.*, 1990; Ritchie *et al.*, 1991).

Cuando se inhibe la PKC con H-7 y estaurosporina algunos efectos del TNF $\alpha$ , como la inducción de IFN $\beta_2$  en fibroblastos humanos y del inhibidor del activador del plasminógeno en melanoma humano, se anulan (Sehgal *et al.*, 1987; Pytel *et al.*, 1990). Hamamoto *et al.* (1990), en experimentos realizados con células infectadas con el virus HIV, observan que la estaurosporina potencia la citotoxicidad del TNF $\alpha$ , mientras que el efecto sobre la replicación

del virus no se ve afectado. Estos autores indican que es posible que el TNF $\alpha$  induzca por la vía de la PKC la síntesis o la fosforilación de una proteína que proteja a la célula de la muerte.

Otros efectos del TNF $\alpha$ , como la inducción de antígenos de superficie en células endoteliales, la transmodulación del receptor de EGF en fibroblastos o la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células de leucemia, no se modifican en presencia de inhibidores clásicos de la PKC (Bird & Saklatvala, 1990; Meichle *et al.*, 1990; Ritchie *et al.*, 1991)

Recientemente, Schutze *et al.* (1992) han propuesto un nuevo modelo de transducción de señal utilizado por el TNF $\alpha$  en células U937. En este modelo, existe una PC-PLC activada que produce DAG, y a su vez este DAG activa una esfingomielinasa ácida que hidroliza la esfingomielina para producir ceramida. Estos mismos autores indican que la ceramida es un segundo mensajero capaz de inducir NF- $\kappa$ B. De esta forma explican que la PKC no sea requerida para activar este factor de transcripción, hecho descrito por numerosos autores (Meichle *et al.*, 1990; Hohmann *et al.*, 1991).

#### 1.3.6.5. Vía de la adenilato ciclasa

Como ya se ha indicado, en un gran número de sistemas, y en respuesta a diferentes agonistas, las proteínas G transmiten la señal que se inicia tras la unión del agonista a su receptor activando una enzima situada en la membrana plasmática, la adenilato ciclasa (AC). Esta enzima sintetiza cAMP a partir de ATP. El cAMP se degrada a adenosín-5'-monofosfato (5'-AMP) continúa y rápidamente por una o más fosfodiesteras de cAMP.

Dado que la proteína G en este caso está implicada en la activación enzimática, se denomina proteína G estimuladora ( $G_s$ ). Cuando la proteína  $G_s$  está activada por el complejo agonista-receptor une una molécula de GTP, y activa la AC. La  $G_s$  mantiene la AC activa tanto tiempo como el GTP está intacto. Cuando la proteína  $G_s$  hidroliza el GTP a GDP finaliza la activación de la ciclasa.

$G_s$  permite dos tipos de amplificación de la señal:



- una proteína receptora sencilla activada puede, en principio, activar muchas moléculas de proteínas G colindantes, activando así numerosas moléculas de AC;
- en algunos casos, sin embargo, el ligando extracelular puede no mantenerse unido a su receptor bastante tiempo para permitir que tenga lugar este mecanismo de amplificación. Algunos ligandos por ejemplo pueden disociarse de su receptor en menos de un segundo.  $G_s$ , por sí misma, es capaz de mantenerse activa hasta 10 o 15 segundos antes de hidrolizar el GTP unido. En este caso puede estar activando la AC después de que el ligando extracelular se haya disociado.

Además de la amplificación, las proteínas G permiten una regulación del proceso de activación. En principio la eficacia del acoplamiento entre los receptores y el enzima puede alterarse por modificación covalente de la proteína G o por cambio de su concentración en la membrana plasmática. La toxina del cólera es una enzima que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el  $NAD^+$  intracelular a la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_s$  impidiendo que esta proteína G hidrolice su GTP unido. Esta proteína  $G_s$  permanece alterada indefinidamente.

$G_s$  es sólo un miembro de una gran familia de proteínas G que acoplan receptores a varios enzimas y canales iónicos en membranas celulares eucariotas.

La misma molécula señalizadora puede incrementar o disminuir la concentración de cAMP intracelular, dependiendo del tipo de receptor al que se una. La diferencia se debe a que las proteínas G que acoplan estos receptores a la ciclasa presentan idéntico complejo  $G\beta\gamma$  pero una subunidad  $G\alpha$  inhibitoria ( $G_i\alpha$ ). Cuando se activan los receptores acoplados a estas proteínas G inhibitorias, se disocian las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , y la  $G_i\alpha$  inhibe la AC directamente, mientras que  $G\beta\gamma$  actúa indirectamente por su unión con subunidades  $G_s$  libres, previniendo así su unión a moléculas de ciclasa (Alberts *et al.*, 1983).

La proteinquinasa A (PKA) media la acción del cAMP. La PKA presenta una región catalítica con la que interacciona el H-8, inhibidor de esta enzima. La PKA es capaz de fosforilar numerosas proteínas, y presenta interacciones con otras rutas de segundos mensajeros. Por ejemplo, en algunas ocasiones aumenta la sensibilidad del receptor de  $IP_3$  de

los almacenes intracelulares de calcio, y de esta forma potencia la liberación de calcio intracelular inducida por distintos agonistas (Burgess *et al.*, 1991).

En algunas líneas celulares se ha descrito un incremento en los niveles de cAMP tras la estimulación con TNF $\alpha$ . Este hecho aparece en fibroblastos humanos FS-4 y en células mesangiales de rata tratados con TNF $\alpha$  (Zhang *et al.*, 1988; Baud *et al.*, 1988), y se debe probablemente a un incremento en la actividad AC, mas que a la inhibición de las fosfodiesterasas. Aunque se han descrito actividades del TNF $\alpha$  que también se producen como respuesta a análogos del cAMP, a activadores de la AC o a inhibidores de la fosfodiesterasa, cuando se estudian los efectos del TNF $\alpha$  junto con estos agentes se obtiene una respuesta sinérgica (Lee *et al.*, 1987; Scholz & Altman, 1989). Esto parece indicar que el TNF $\alpha$  presenta un mecanismo de transducción de señal distinto. Scholz y Altman (1989) sugieren que el TNF $\alpha$  tendría una acción indirecta sobre los niveles de cAMP: por ejemplo, activando la subunidad catalítica de la AC por su fosforilación mediada por PKC. Esta hipótesis estaría en concordancia con estudios realizados en células estimuladas con TNF $\alpha$  en presencia de inhibidores de la PKA, donde no se observa inhibición de los efectos del TNF $\alpha$  (Sehgal *et al.*, 1987), o sólo es una inhibición parcial (Zhang *et al.*, 1988; Pytel *et al.*, 1990).

#### 1.3.6.6. FACTORES DE TRANSCRIPCION

La acción del TNF $\alpha$  sobre distintos tipos celulares es compleja y pleiotrópica. Este hecho sugiere que esta citoquina puede, en última instancia, inducir la expresión de una gran variedad de genes celulares y de controlar la actividad de los productos de estos genes. Estos genes son de dos clases distintas:

- los genes que constituyen la respuesta primaria, o genes tempranos, cuyos productos se activan sin precisar de síntesis proteica. Dentro de este grupo aparecen factores de transcripción capaces de transmitir la señal de transducción citoplásmica al núcleo. Son auténticos *terceros mensajeros*.
- genes que precisan de síntesis proteica para su expresión.

Un factor de transcripción cuyo gen pertenece al primer tipo es NF- $\kappa$ B. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B representa el paso más importante en la señalización del TNF $\alpha$  de citoplasma a núcleo (Kruppa *et al.*, 1992). Esta citoquina y la IL-1 representan los activadores fisiológicos específicos de NF- $\kappa$ B y del intensificador de HIV (Osborn *et al.*, 1989).

NF- $\kappa$ B es un heterodímero que presenta un polipéptido de 50kDa (subunidad de unión a DNA) y otro de 65kDa (subunidad requerida para la inactivación). En células no estimuladas la mayoría del NF- $\kappa$ B está en el citoplasma, y no puede unirse al DNA porque está completamente bloqueado por el inhibidor proteico I $\kappa$ B. Un estímulo externo puede activar numerosas proteinquinasas e inducir la fosforilación de I $\kappa$ B, produciéndose la disociación del complejo, o alterándose la conformación. Esto da lugar al desenmascaramiento de la región de unión a DNA de la señal y la translocación del dímero hacia el núcleo (Bauerle & Baltimore, 1988; Lenardo & Baltimore, 1989; Kerr *et al.*, 1992).

Aunque NF- $\kappa$ B puede ser activo constitutivamente en algunas células (linfocitos B maduros, monocitos y macrófagos), la actividad NF- $\kappa$ B no es intrínsecamente específica de tejido (Lenardo & Baltimore, 1989; Hohmann *et al.*, 1991).

La inducción en distintos tipos celulares de la actividad NF- $\kappa$ B por el TNF $\alpha$  precisa de la unión de la citoquina al receptor de 55kDa (Kruppa *et al.*, 1992). Posteriormente, y dependiendo de la línea celular, el TNF $\alpha$  puede estimular distintas proteinquinasas, o un sistema distinto, que eventualmente produce la activación de este factor de transcripción (Meichle *et al.*, 1990; Schutze *et al.*, 1992).

En la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  se distinguen dos estadios: la activación rápida (unos minutos después de estimular las células) es independiente de la síntesis proteica y se consigue por la disociación de la proteína inhibidora (I $\kappa$ B) del complejo preformado e inactivo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B activo desaparece rápidamente, y el *pool* de NF- $\kappa$ B inactivo se agota cuando se inhibe la síntesis proteica. Para mantener constantes los niveles de NF- $\kappa$ B activo es precisa, por tanto, la síntesis proteica *de novo*, y también es necesaria la estimulación continuada de las células con TNF $\alpha$  (Hohmann *et al.*, 1991).

Sin embargo, muchos de los genes inducibles por TNF $\alpha$  no presentan sitios de reconocimiento por NF- $\kappa$ B. Por tanto, la inducción de la transcripción de genes celulares por esta citoquina requiere la activación de otras proteína de unión a DNA, al mismo tiempo o como consecuencia de la activación de NF- $\kappa$ B (Duh *et al.*, 1989). NF- $\kappa$ B puede intervenir en la expresión de distintos genes, como genes de citoquinas, de proteínas plasmáticas en el hígado, en la estimulación de otros transactivadores como *c-fos* y *c-myc* e incluso en su propia estimulación (Sen & Baltimore, 1986; Lenardo & Baltimore, 1989; Lowenthal *et al.*, 1989; Osborn *et al.*, 1989).

Existe un gran número de factores de transcripción que se ha descrito que son inducidos por el TNF $\alpha$ . Entre estos se encuentran *c-myc*, *c-fos*, *egr-1* y *AP-1/c-jun* en fibroblastos (Yarden & Kimchi, 1986; Tobler *et al.*, 1987; Brenner *et al.*, 1989; Cao *et al.*, 1992) y *AP-1/c-jun* en células endoteliales (Dixit *et al.*, 1988). También se ha descrito una posible desestabilización del mRNA de C/EBP producida por el TNF $\alpha$  (Ron *et al.*, 1992).

## 2. OBJETIVOS

En las enfermedades activas del hígado, las células inflamatorias infiltradas en este órgano liberan citoquinas que pueden contribuir a la fibrogénesis. Entre estas citoquinas están la IL-1 e IL-6, TGF $\beta$ , PDGF y TNF $\alpha$ . Esta última es sintetizada por los macrófagos y neutrófilos fundamentalmente y juega un papel importante en la modulación de numerosas actividades celulares. Por ello, los objetivos planteados en esta tesis son:

1. Estudiar los efectos del TNF $\alpha$  sobre la producción de colágeno en lipocitos;
2. Definir los mecanismos intracelulares implicados en la transducción de señal desencadenada por la unión del TNF $\alpha$  a su receptor;
3. Comprobar si el efecto del TNF $\alpha$  se produce modulando la expresión del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$ . En este caso, localizar las regiones del promotor de este gen responsables de los efectos del TNF $\alpha$  sobre la síntesis del mRNA.

### 3. MATERIAL Y METODOS

### 3.1. **MATERIAL**

Los estudios se realizaron en células de Ito (lipocitos) obtenidos por el Dr. M. Rojkind (Nueva York, E.E.U.U.) de ratas cirróticas, tras la intoxicación crónica con  $\text{CCl}_4$ , y cedidas amablemente por él (Greenwel *et al.*, 1991).

El medio de cultivo H-MEM, suero fetal bovino, L-glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales se obtuvieron de Flow (Irvine, Escocia, Reino Unido); los frascos de Roux y las placas multipocillos de Nunc (Roskilde, Dinamarca); el material de plástico de Costar (Cambridge, MA, E.E.U.U.), y los filtros de Millipore (Bedford, MA, E.E.U.U.).

El factor necrosante tumoral  $\alpha$  humano recombinante fue de Genzyme (Boston, MA, E.E.U.U.). Este producto tiene una pureza superior al 99%, determinada en gel de SDS-PAGE. El procedimiento de purificación incluye la precipitación con sulfato amónico y la cromatografía de intercambio catiónico. Una unidad se define como la cantidad de TNF $\alpha$  requerida para conseguir la mitad de la citotoxicidad máxima de las células L929. 10 $\mu\text{g}$  de este producto se diluyeron con 9ml de PBS, se alicuotaron y se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  inmediatamente. Se evitó la descongelación/congelación múltiple.

Los siguientes compuestos fueron obtenidos de Amersham International (Amersham, Inglaterra, Reino Unido): D-threo-(dichloroacetyl-1- $^{14}\text{C}$ )Chloranfenicol (actividad específica= 57mCi/mmol); Deoxicitidina-5'-[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]trifosfato (actividad específica= 3000Ci/mmol); L-[ $^{14}\text{C}$ ]Prolina (actividad específica= 264mCi/mmol); L-[5- $^3\text{H}$ ]Prolina (actividad específica= 43Ci/mmol); Multiprime DNA labelling system y membrana de nylon Hybond<sup>TM</sup>-N. La [Methyl- $^3\text{H}$ ]Thymidine (actividad específica= 78,5Ci/mmol), la L-[4- $^3\text{H}$ ]Prolina (actividad específica=23,2Ci/mmol) y el [ $^{125}\text{I}$ ]TNF $\alpha$  humano recombinante (actividad específica= 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) fueron de Du Pont-New England Nuclear (Boston, MA, E.E.U.U.).

La agarosa y el reactivo para la determinación de proteínas por el método de Bradford se obtuvieron de Bio-Rad (Richmond, CA, E.E.U.U.), las columnas de Sephadex G-50 y el poly dI-dC de Pharmacia (Piscataway, NJ, E.E.U.U.), las películas de autorradiografía XAR-5 de Kodak (Rochester, NY, E.E.U.U.), el kit de purificación de DNA Gene Clean de BIO 101



Inc. (La Jolla, CA, E.E.U.U.), el fenol saturado de Appligene (Illkirch, Francia), el kit de determinación de LDH de Knickerbocker (Barcelona), la D-Luciferina de Promega, los oligonucleótidos de Clontech y el líquido de centelleo empleado para el contaje de muestras radiactivas fue Pico-Flúor 40 (Packard Instruments, Downers Grove, IL, E.E.U.U.).

Las enzimas de restricción utilizadas, la cloranfenicol aciltransferasa y el acetil coenzima A fueron de Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, E.E.U.U.).

El agar, la triptona y el extracto de levaduras utilizados para el crecimiento de las bacterias transformadas se obtuvieron de Difco (Detroit, MI, E.E.U.U.).

Los solventes orgánicos (de grado analítico) y las placas de cromatografía en capa fina de gel de sílice fueron de E. Merck (Darmstadt, Alemania) y Scharlau (Barcelona).

El resto de los reactivos utilizados fueron de Sigma (Alcobendas, Madrid), excepto las toxinas de pertussis y del cólera, el inhibidor de nucleótidos cíclicos H-8 y el quelante de calcio intracelular Quin-2/AM, que se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA, E.E.U.U.).

El plásmido COLCAT1 utilizado en los ensayos de transfección, y que contiene el promotor del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$  de ratón fusionado con el gen de la cloranfenicol aciltransferasa fue cedido generosamente por el Dr. D.A. Brenner (San Diego, CA, E.E.U.U.).

El clon bacteriano HB 101 transformado con el plásmido pBR322 vector del cDNA del procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata fue cortesía del Dr. D. Rowe (Connecticut, E.E.U.U.) (Lichter *et al.*, 1989).

### **3.2. CULTIVO DE LOS LIPOCITOS**

Las células se cultivaron a 37°C en H-MEM con HEPES suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado, 2mM glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, y 100UI/ml de penicilina y estreptomycin.

#### **Tratamiento de las células**

Para los ensayos de unión a receptor, de transfección y de cuantificación de mRNA,

los mediadores se añadieron a las concentraciones indicadas al medio de cultivo. En los experimentos con los inhibidores, el TNF $\alpha$  se añadió después de al menos una hora de preincubación con el inhibidor sólo, y los inhibidores estuvieron presentes durante la incubación. Las incubaciones fueron de 24 horas.

### **3.3. PRODUCCION DE COLAGENO**

El efecto del TNF $\alpha$  en el metabolismo del colágeno se examinó adicionando el factor al cultivo celular en confluencia (en frascos Roux de 80cm<sup>2</sup> con 10 ml de H-MEM suplementado como ya se ha indicado), durante el tiempo de preincubación (16-20 horas). Después de este tiempo, se añadieron 0.2mM de ácido ascórbico (como cofactor de prolil y lisiloxidasas) y 10 $\mu$ Ci de L-[5-<sup>3</sup>H]prolina, y se incubó durante 4 horas (Holt *et al.*, 1984). El marcaje de las células terminó enfriando las placas a 4<sup>0</sup>C.

Las proteínas colágenas y no colágenas se determinaron por el método de la colagenasa (Peterkofsky & Diegelmann, 1971), con algunas modificaciones posteriores (Chojkier *et al.*, 1980; Peterkofsky *et al.*, 1982; Flaherty & Chojkier, 1986). La radiactividad de las proteínas sensibles a la colagenasa VII y de las no sensibles sirvió para calcular el porcentaje relativo de la producción de colágeno. Esta radiactividad se midió en un contador de emisión  $\beta$ .

### **3.4. PROLIFERACION Y CITOTOXICIDAD**

#### **3.4.1. Proliferación de los lipocitos**

La proliferación de las células se determinó cuantificando la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]Timidina en el DNA. Los lipocitos se incubaron durante 24h con el TNF $\alpha$  a las dosis indicadas y 0.5 $\mu$ Ci/ml de [6-<sup>3</sup>H]Timidina. Posteriormente se retiró el medio, se lavó la monocapa dos veces con PBS frío, y se rasparon las células. Las células se lisaron por sonicación y el DNA se precipitó con ácido tricloroacético (concentración final= 10%). Después de su centrifugación, los precipitados de DNA se lavaron cuatro veces con ácido

tricloroacético al 10% y se disolvieron en NaOH 0.2N. La radiactividad en esta fracción insoluble en ácido tricloroacético se utilizó como índice de la incorporación de [6-<sup>3</sup>H]timidina en el DNA.

#### **3.4.2. Evaluación de la citotoxicidad**

El efecto citotóxico se estudió por dos técnicas diferentes: mediante el recuento del número de lipocitos antes y tras las 24h de incubación con el TNF $\alpha$  por la técnica de exclusión con azul tripán al 0.1% (p/v), y determinando los niveles de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH), liberada por las células al medio de cultivo celular, utilizando un ensayo comercial.

#### **3.5. MEDICION DE LA PROLINA INTRACELULAR**

Este estudio se realizó siguiendo a Flaherty y Chojkier (1986). Las células fueron incubadas en las mismas condiciones indicadas anteriormente y expuestas al TNF $\alpha$  durante 24h. La síntesis de proteínas se marcó con [<sup>3</sup>H]prolina, como se especificó en la determinación de la producción de colágeno. Pasadas las 4h de incubación se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron repetidas veces con PBS hasta eliminar la prolina no incorporada a las células. Tras ello se recogieron las células, se rompieron mediante ultrasonido y se precipitaron sus proteínas con ácido tricloroacético al 10%. Las proteínas se centrifugaron a 3000rpm durante 10 minutos. En el sobrenadante se determinó la radiactividad de la [<sup>3</sup>H]prolina intracelular.

#### **3.6. DETERMINACION DE LA SECRECION DEL COLAGENO**

Esta medición se realizó mediante el marcaje de los cultivos celulares en las mismas condiciones indicadas para la determinación de la producción de colágeno. Tras las 4h de incubación se determinó por separado el colágeno existente fuera y dentro de las células, por el método de la colagenasa. La secreción fue expresada en forma del porcentaje del colágeno

total que se encuentra fuera de las células.

### 3.7. DETERMINACION DE LA HIDROXILACION DE LA PROLINA

Este estudio se realizó siguiendo el método dual de Chojkier *et al.* (1980), que se basa en el marcaje del colágeno sintetizado con [<sup>3</sup>H]prolina y [<sup>14</sup>C]prolina, en proporción 4:1. Ambos isótopos son incorporados al colágeno recién sintetizado en la misma proporción 4:1. La hidroxilación de la [<sup>3</sup>H]prolina supone la sustitución del tritio situado en posición 4-trans por el radical hidroxilo, perdiéndose la radiactividad dependiente del tritio proporcionalmente al grado de hidroxilación. La hidroxilación de la [<sup>14</sup>C]prolina no repercute sobre la radiactividad debida a este isótopo, ya que los átomos de carbono no sufren movilización por la hidroxilación. La determinación del cociente <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C en el colágeno refleja el grado de hidroxilación sufrido por esta proteína.

El cálculo del grado de hidroxilación se realiza a partir de la fórmula:

$$\% \text{ Hidroxilación} = \frac{1 - \frac{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C en colágeno}}{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C inicial en medio}}}{0.69} * 100$$

### 3.8. TECNICA DEL "NORTHERN BLOT"

#### 3.8.1. Extracción del RNA

El RNA citoplásmico total se aisló de las células de Ito esencialmente como describen White y Bancroft (1982), usando un tampón de lisis con NP-40. Posteriormente se realizaron extracciones con fenol:clorofórmio para eliminar las proteínas del lisado. El RNA citoplásmico se recupera mediante precipitación con etanol (Maniatis *et al.*, 1982).

### 3.8.2. Preparación de las sondas de cDNA

El clon bacteriano HB101 transformado con el plásmido pBR322 vector del cDNA del procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata se creció en medio *LB broth*. Las bacterias se recogieron por centrifugación, se lisaron y se obtuvo el plásmido amplificado mediante la precipitación con isopropanol (ver amplificación de COLCAT1, punto 3.11.1.). La sonda se obtuvo mediante la digestión del plásmido amplificado con la enzima de restricción Pst I, y se purificó con *Gene Clean*.

La sonda se marcó isotópicamente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  con la técnica del *random primer* (Feinber & Vogelstein, 1983). Los nucleótidos no incorporados se eliminaron purificando la sonda marcada por cromatografía en columna de Sephadex G-50. La actividad específica fue aproximadamente de  $1.10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$  de DNA.

### 3.8.3. Northern blot

10 $\mu\text{g}$  del RNA citoplásmico se corrieron en un gel de agarosa al 1% según describe Thomas (1980). Las muestras de RNA se transfirieron por capilaridad con 20xSSC a filtros de nylon (*Hybond N*) durante toda la noche. El ácido nucleico se fijó a la membrana exponiendo ésta 5 minutos a la luz ultravioleta. Posteriormente se realizó una prehibridación de 2h a 65 $^{\circ}\text{C}$  en 7%SDS, 0.5M buffer fosfato (pH 7.0) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA de esperma de salmón sonicado y hervido. Los filtros de nylon se hibridaron durante toda la noche a 65 $^{\circ}\text{C}$  en la misma solución con  $10^6$  cpm/ml de la sonda marcada. Finalmente los filtros se lavaron tres veces durante 10 minutos con 2xSSC, 0.1%SDS (pH 7.0) a temperatura ambiente, y una vez (20 minutos) con 0.1xSSC, 0.1%SDS (pH 7.0) a 60 $^{\circ}\text{C}$  y se expusieron a película de rayos X a -70 $^{\circ}\text{C}$  con pantalla intensificadora. La cuantificación se realizó por densitometría.

## 3.9. ENSAYOS DE UNION DEL TNF $\alpha$ A SU RECEPTOR

Estos ensayos se realizaron en cultivos en confluencia. Después de retirar el medio de crecimiento, las células se incubaron con varias concentraciones de  $[\text{}^{125}\text{I}]\text{TNF}\alpha$  humano en H-

MEM completo. Cuando fue preciso se añadieron distintas concentraciones de TNF $\alpha$  no marcado simultáneamente con el [ $^{125}$ I]TNF $\alpha$ . Después de 24h de incubación a 4 $^{\circ}$ C, las células se lavaron cuatro veces con H-MEM completo frío y se solubilizaron en 0.1% de SDS. La radiactividad se determinó en un contador gamma. La unión específica es la diferencia entre la unión total y la no específica en presencia de un exceso de 100 veces del TNF $\alpha$  no marcado.

En el estudio del efecto de los inhibidores sobre la unión del TNF $\alpha$  a su receptor, las células se preincubaron 2h con el inhibidor, y se incubaron con [ $^{125}$ I]TNF $\alpha$  (400nM) durante 24h a 4 $^{\circ}$ C. El procesamiento fue el ya indicado.

### 3.10. TECNICA DEL RETARDO EN GEL (*Mobility shift assay*)

#### 3.10.1. Preparación de los extractos nucleares

Las células se incubaron como se indica en el punto 3.2. Transcurridas las 24 horas, las células se rasparon a 4 $^{\circ}$ C, se lavaron con PBS dos veces, y se resuspendieron en el tampón A (10mM HEPES pH=8; 50mM NaCl; 0.5mM sacarosa; 1mM EDTA pH=8; 0.5mM espermidina; 0.15mM espermina; 0.5% Tritón X-100; 1mM PMSF; 0.5 $\mu$ g/ml leupeptina; 0.5 $\mu$ g/ml pepstatina; 0.2U/ml apoprotina; 7mM mercaptoetanol), donde se incubaron 5 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Posteriormente se centrifugaron, y el precipitado nuclear se recuperó en tampón B (10mM HEPES pH=8; 50mM NaCl; 0.1mM EDTA pH=8; 0.5mM espermidina; 0.15mM espermina; 25% glicerol; 1mM PMSF; 0.5 $\mu$ g/ml leupeptina; 0.5 $\mu$ g/ml pepstatina; 0.2U/ml apoprotina; 7mM mercaptoetanol), y se centrifugó inmediatamente, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se secó bien el precipitado. Este precipitado se resuspendió en tampón C (10mM HEPES pH=8; 350mM NaCl; 0.1mM EDTA pH=8; 0.5mM espermidina; 0.15mM espermina; 25% glicerol; 1mM PMSF; 0.5 $\mu$ g/ml leupeptina; 0.5 $\mu$ g/ml pepstatina; 0.2U/ml apoprotina; 7mM mercaptoetanol), y se extrajo durante 30 minutos a 4 $^{\circ}$ C por rotación. Transcurrido este tiempo se centrifugó la muestra, y en el sobrenadante se determinaron las proteínas (punto 3.12).

### 3.10.2. Ensayo de retardo en gel

El oligonucleótido específico de NF- $\kappa$ B, que contenía las dos secuencias consenso localizadas en el intensificador de HIV-1 (Israel *et al.*, 1989), fué sintetizado por Promega. Este oligonucleótido tenía la siguiente secuencia:

5'AGCTTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGA  
ATGTTCCCTGAAAGGCGACCCCTGAAAGGTCCCTCGA5'

Esta sonda se marcó isotópicamente con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP con la técnica del *random primer* (Feinber & Vogelstein, 1983).

Para determinar la unión de proteínas nucleares a esta sonda. 3 $\mu$ g de proteínas de extracto nuclear se incubaron con 1ng (5.10<sup>4</sup>c.p.m.) de sonda, en presencia de dI-dC (2 $\mu$ g) y de albúmina de suero bovino (3 $\mu$ g), en 20 $\mu$ l de tampón de reacción (7.1mM HEPES pH=8; 35mM NaCl; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5mM DTT; 50 $\mu$ M EDTA; 7.1% glicerol) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para comprobar la especificidad de la unión, se realizaron las reacciones de competición paralelas, con un exceso de sonda fría (10ng).

Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida (5%) en 0.5% TBE a 15V/cm. Posteriormente el gel se secó a vacío, y se expuso a autorradiografía.

## 3.11. TECNICA DE LA CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA

### 3.11.1. Amplificación y purificación del plásmido COLCAT 1

El plásmido empleado pertenece a la línea pUC, de 5.4Kb, y es resistente a la ampicilina. Entre las secuencias del locus "Lac Z" y las del locus "O" existe un punto "Xba I", sensible a esta enzima de restricción, que es donde están insertas las secuencias del promotor del procolágeno  $\alpha_1$ (I), seguidas del gen de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa.

Las bacterias transformadas con este plásmido se encontraban conservadas en glicerol a -80°C. Estas bacterias se crecieron inicialmente en 2ml de caldo de cultivo universal. Posteriormente se vertieron en un matraz de 2000ml conteniendo 1000ml de medio de cultivo *LB broth* con ampicilina (50 $\mu$ g/ml) y se dejaron unas 4 horas a 37°C en agitación a 250rpm,

hasta que la densidad óptica a 550nm se situó entre 0.4 y 0.5. En este momento se frenó el crecimiento bacteriano mediante la adición de cloranfenicol (85µg/ml) y se mantuvo el cultivo en las mismas condiciones durante otras 24h. En este tiempo el plásmido se multiplica dentro de las bacterias, pero no lo hacen éstas. Pasado este tiempo, se centrifugaron las bacterias a 5000rpm, durante 20 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano se sometió a lisis alcalina (0.2M NaOH, 0.1% SDS) y enzimática (2mg/ml lisozima), y se expuso a 3M acetato sódico (pH 4.6) durante 20 minutos. Los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación a 12500rpm, 30 minutos y 4°C. El sobrenadante (con el plásmido, el DNA bacteriano, el RNA y proteínas bacterianas) se digirió con RNAasa (1µg/ml) durante 1h. Tras ello, se extrajo con fenol/cloroformo (1:1; v/v), eliminándose las proteínas bacterianas y el RNA. El DNA plasmídico del extracto (que contenía DNA plasmídico y cromosómico) se precipitó con 1 volumen de isopropanol (1h, -20°C), recuperándose por centrifugación durante 20 minutos a 12000rpm y 4°C. El precipitado se disolvió en agua y se sometió a purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Se añadió 1g de CsCl por ml de extracto. Una vez disuelto el CsCl se añadió a la mezcla 0.8ml de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml). Se centrifugó a 3000rpm, durante 15 minutos a 20°C. El sobrenadante con el DNA plasmídico se ultracentrifugó a 44krpm durante 48h a 20°C. Tras esto, aparecieron tres capas teñidas con el bromuro de etidio: la superior corresponde al DNA cromosómico bacteriano, la intermedia al DNA plasmídico, y otra en el fondo del tubo que es el RNA. Tras pegar un celofán sobre el tubo de ultracentrifugación se clavaron tres agujas en el tubo: la superior se destinó al paso del aire, y otra por debajo de la capa de DNA bacteriano por la que se retiró el DNA cromosómico. Una vez que se retiró la totalidad de este DNA, se colocó una aguja inferior, ligeramente por debajo de la capa que contiene el DNA plasmídico, recogiendo por ella este DNA.

El DNA plasmídico contenía bromuro de etidio y CsCl. El colorante se eliminó mediante extracciones con un volumen de alcohol isoamílico y el CsCl por diálisis con Tris-EDTA a pH 8.0, y a 4°C. El DNA así obtenido se precipitó con 1/10 de volumen de acetato



sódico 3M y 2.5 volúmenes de etanol. Se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante unas horas, se centrifugó, y el precipitado se disolvió en agua. La concentración se determinó mediante la lectura de densidad óptica a 260nm y 280nm.

Este plásmido, así obtenido, se sometió a la digestión por diferentes enzimas de restricción (Hind III y Pst I), con lo que se obtuvieron varios DNA quiméricos, linearizados. Todos ellos tiene en común que su extremo 3' porta la totalidad de las secuencias de la CAT. Sin embargo, el extremo 5' es diferente de unos a otros, ya que la región promotora del colágeno tiene una longitud variable dependiendo del lugar donde haya actuado la enzima de restricción empleada.

### 3.11.2. Transfección de los lipocitos

Las células empleadas para la transfección se deben hallar en fase de crecimiento activo, tras haber sido tripsinizadas y sembradas 24h antes.

Estos lipocitos en fase de crecimiento exponencial se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y se resuspendieron nuevamente en medio completo. El conteo de las células se realizó por la técnica de exclusión con azul tripán al 0.1%. (p/v). Por cada condición experimental se utilizaron:

- 1.- Células de Ito en crecimiento:  $5 \times 10^6$  células;
- 2.- DNA sonicado de esperma de salmón:  $20 \mu\text{g}$  por cada  $5 \times 10^6$  células;
- 3.-  $9 \mu\text{g}$  de plásmido COLCAT1, COLCAT2 o COLCAT7 (los dos últimos, en los casos de corte del plásmido COLCAT1 con las enzimas de restricción Hind III y Pst I, respectivamente), por cada 5 millones de células.

La transfección se realizó mediante electroporación con el equipo de electroporación automática *CELLJECT ELECTROPORATION SYSTEM S.* de Eurogentec S.A.. La suspensión celular, en medio completo y a  $4^{\circ}\text{C}$ , se sometió a doble pulso eléctrico:

- el primer pulso se realizó a 700 voltios, una resistencia de  $282 \Omega$  y capacitancia de  $40 \mu\text{F}$ .
- Es importante que el tiempo de la descarga no sea menor de 1.3 mseg para que la eficacia

de la transfección sea óptima:

- el segundo pulso lo realizamos fijando el voltaje en 150 V, 1200 $\mu$ F de capacitancia, siendo la resistencia  $\infty$ .

Las células procedentes de cubetas transfectadas con el mismo plásmido se reunieron en un único tubo y se sembraron en los diferentes frascos Roux. Tras 24h de cultivo a 37<sup>o</sup>C en condiciones estándar, se procedió a retirar el medio, y a añadir medio fresco; en el caso del estudio con inhibidores, se preincubaron las células transfectadas con el inhibidor una hora antes de la adición del TNF $\alpha$ .

En el ensayo de la actividad de distintas regiones del promotor se realizó cotransfección de las construcciones CAT con 9 $\mu$ g de plásmido LTR-LUC por cada 5.10<sup>6</sup> células en las mismas condiciones expuestas anteriormente.

La actividad luciferasa se determinó en una alícuota de la suspensión celular. Las células se resuspendieron en 100 $\mu$ l de tampón de lisis pH 7.8 (25mM Tris base; 8mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM DTT; 1% Tritón X-100; 1% BSA; 15% glicerol) y se determinó la actividad con un luminómetro *LUMAT LB 9501* (Berthold), que inyecta 100 $\mu$ l de tampón de reacción (1mM Luciferina; 20mM ATP).

### 3.11.3. Medición de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT assay)

Tras la incubación de 24h, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se rasparon y se centrifugaron a 12Krpm, 20 segundos, 20<sup>o</sup>C. El precipitado celular se resuspendió en Tris-ClH 0.25M (pH 7.5). Tras ello, se rompieron las células por sonicación en hielo. Con la rotura de las células se logró que se liberase la enzima cloranfenicol acetiltransferasa que hubieran podido sintetizar.

Para medir la actividad de esta enzima se tomaron 103.25 $\mu$ l del lisado celular y se combinaron con 5 $\mu$ l de <sup>14</sup>C-cloranfenicol, 20 $\mu$ l de acetil coenzima A 4mM y 21.75 $\mu$ l de Tris 2M (pH 7.4). Esta mezcla se incubó a 37<sup>o</sup>C durante 2 horas para que la enzima existente pudiera acetilar al <sup>14</sup>C-cloranfenicol. Este y sus derivados acetilados se extrajeron con 1ml de

acetato de etilo y centrifugación durante 2 minutos a 12000g y 20°C. Tras ello, se tomaron 900µl del sobrenadante de acetato de etilo y se evaporaron a vacío. El sedimento seco, donde permanecen los derivados del cloranfenicol, se redisolviéron en 10µl de acetato de etilo y se aplicaron sobre una lámina de cromatografía en capa fina de silicagel. El cromatograma se desarrolló utilizando como líquido de elución 200ml de cloroformo/metanol (190:10, v/v), durante 2h. Tras este tiempo se secó la cromatografía y se expuso a autoradiografía durante 24h. a temperatura ambiente. Las marcas resultantes se leyeron por densitometría.

La actividad cloranfenicol acetiltransferasa se expresa en porcentaje de cloranfenicol total que se encuentra en forma acetilada por  $5 \cdot 10^6$  células.

### 3.12. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (fracción V) como patrón.

### 3.13. TRATAMIENTO ESTADISTICO

Los resultados se analizaron mediante el test de la *t* de Student, aceptando como significativas las diferencias con  $p < 0.05$  (Colton, 1974).

#### 4. RESULTADOS

#### **4.1. EFECTOS DEL TNF $\alpha$ SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEINAS COLAGENAS Y NO COLAGENAS**

##### **4.1.1. Producción de colágeno**

El TNF $\alpha$  (0.6nM) provoca en cultivos de lipocitos un significativo descenso en la producción porcentual de colágeno respecto al total de proteínas sintetizadas por esas células (5.0 $\pm$ 1.1 vs. 3.7 $\pm$ 0.9%; p<0.001). Este efecto inhibitorio lo detectamos también en otras líneas celulares (fibroblastos humanos y células de la línea 3T3) (Fig. 1). La inhibición fue más evidente y significativa cuando la concentración de TNF $\alpha$  en el medio fue mayor (1.2nM) (5.0 $\pm$ 1.1 vs. 3.0 $\pm$ 0.5%; p<0.001) (Fig. 2).

##### **4.1.2. Producción de proteínas no colágenas**

En teoría, un descenso en el porcentaje de colágeno producido puede deberse tanto a una disminución en la producción de colágeno como a un ascenso en la de proteínas no colágenas. Sin embargo, la incorporación absoluta de [ $^3$ H]prolina a estas últimas proteínas no se modificó significativamente (con 0.6nM de TNF $\alpha$ , 719 $\pm$ 212 vs. 748 $\pm$ 5 dpm x 10<sup>3</sup>/placa; n.s.) (Fig. 3), mientras que al mismo tiempo se comprobaba un descenso de la incorporación de la [ $^3$ H]prolina al colágeno del 26% (36 $\pm$ 6 vs. 27 $\pm$ 5 dpm x 10<sup>3</sup>/placa, p<0.01).

#### **4.2. EFECTOS PROLIFERATIVOS Y CITOTOXICOS**

##### **4.2.1. Proliferación**

Uno de los efectos biológicos, bien conocido, del TNF $\alpha$  es el de inducir la proliferación celular en cultivos. Existía por ello la posibilidad teórica de que la inhibición de la producción de colágeno no fuera más que la consecuencia de la desviación de la síntesis proteica desde el colágeno, proteína funcional de exportación, hacia otras estructurales intracelulares, necesarias para la proliferación celular. Por esta razón, medimos los efectos que tiene el TNF $\alpha$  sobre la incorporación de la [6- $^3$ H]timidina a las células en las condiciones en que estabamos realizando los estudios. Este experimento nos mostró que el TNF $\alpha$ , en las

condiciones en que se desarrollan estos estudios, no influye sobre la proliferación celular. La incorporación de [6-<sup>3</sup>H]timidina a las células fue idéntica en las expuestas al TNF $\alpha$  que en las utilizadas como control (Fig. 4).

#### 4.2.2. Citotoxicidad

También es bien sabido que el TNF $\alpha$  se comporta como citotóxico sobre algunas líneas celulares. Por ello, existía la posibilidad de que el descenso de la producción de colágeno expresase la reducción de la viabilidad de esas células expuestas al TNF $\alpha$ . Con este fin realizamos dos tipos de mediciones para detectar ese presunto daño celular: el recuento de células antes y tras 24h de exposición al TNF $\alpha$  y el cálculo del porcentaje de LDH celular que se había liberado al medio.

\* El descenso del número de células tras 24h de exposición al TNF $\alpha$  no se diferencia significativamente del que se observó en las células controles en ese mismo tiempo (Fig. 5). Tampoco se observó una alteración en su morfología característica.

\* El porcentaje de LDH en el medio de cultivo de las células expuestas durante 24h al TNF $\alpha$  no se diferenció significativamente del de las células controles (Fig. 6).

#### 4.3. NIVELES INTRACELULARES DE PROLINA

La cuantía de colágeno producida por una célula puede estar limitada por la de aminoácidos disponibles. De éstos, el más representativo de esta proteína, y uno de los más abundantes, es la prolina. Una ausencia de este aminoácido en el medio o un trastorno en su transporte al interior de las células puede traducirse en una menor producción de colágeno. Por esta razón determinamos el efecto del TNF $\alpha$  sobre el transporte de este aminoácido a las células. Para ello medimos la [<sup>3</sup>H]prolina (DPM) intracelular tras 24h de exposición a las células. La metodología seguida para ello es la expuesta en el punto 3.5.

Como muestra la figura 7 no existían diferencias significativas en el *pool* intracelular de prolina entre ambos grupos de células.

#### **4.4. SECRECIÓN DE COLÁGENO E HIDROXILACIÓN DE LA PROLINA INTRACELULAR**

El colágeno, una vez sintetizado en los ribosomas, sufre una serie de cambios postraduccionales que son imprescindibles para su secreción. Entre estos cambios destaca la hidroxilación de la prolina y de la glicina. Si la primera de estas hidroxilaciones no se produce, los péptidos de colágeno no se unen entre sí y el colágeno no puede ser secretado. Por ello, un posible mecanismo para la inhibición de la producción de colágeno pudiera ser a través del bloqueo de la hidroxilación de la prolina. Para explorar este mecanismo realizamos dos tipos de experimentos: (4.4.1.) Efecto del TNF $\alpha$  sobre la secreción del colágeno. Esta medición detecta cualquier defecto postraduccionales, incluido el de la hidroxilación de la prolina, que pudiera ser crítico para la secreción de colágeno; (4.4.2) Efecto sobre la hidroxilación de la prolina.

4.4.1. El efecto del TNF $\alpha$  sobre la **secreción del colágeno** se estudió determinando por separado el colágeno existente fuera y dentro de las células. Como muestra la Fig. 8, el TNF $\alpha$  no interfiere con los mecanismos necesarios para la secreción del procolágeno. La tasa de secreción de procolágeno en las células tratadas con TNF $\alpha$  fue idéntica a la de las células controles.

4.4.2. La determinación de la **hidroxilación de la prolina** por el método dual (Chojkier *et al.*, 1980) mostró que las células expuestas al TNF $\alpha$  no sufren modificación significativa en la hidroxilación del colágeno (Fig. 9).

#### **4.5. NIVELES DE mRNA DE PROCOLÁGENO $\alpha_1(I)$**

Dado que el TNF $\alpha$  no modifica los mecanismos que sufre la molécula de procolágeno, se procedió a comprobar si la disminución en la producción de colágeno se debe a un descenso en su síntesis o a un aumento en su degradación. Para ello se determinó la cuantía de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , al ser éste el transcrito de colágeno producido mayoritariamente por los lipocitos en cultivo (Greenwel *et al.*, 1991).

Los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de los lipocitos incubados durante 24h con 0.6nM de TNF $\alpha$  se redujeron en un 37% respecto a los controles ( $100 \pm 0$  vs.  $64 \pm 15$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 10). Además, el efecto inhibitorio es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al TNF $\alpha$  (Fig. 11 y Fig. 12, respectivamente). El mayor efecto inhibitorio se obtuvo tras 24h de incubación de los lipocitos con una concentración de TNF $\alpha$  de 0.6nM (Fig. 12). El descenso en los niveles de mRNA de procolágeno inducido por el TNF $\alpha$  requiere incubaciones prolongadas, aunque revierte paulatinamente (posiblemente por la degradación de la citoquina).

La disminución de la producción de colágeno en lipocitos de cultivo tratados con TNF $\alpha$  está, por tanto, asociada con un descenso en el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , lo cual indica que esta citoquina ejerce su efecto inhibitorio, al menos, a nivel pretranscripcional.

Cuando bloqueamos la síntesis proteica con cicloheximida (0.1mM) se observa que desaparece el efecto inhibitorio del TNF $\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  (Fig. 13). Esto podría indicar que es precisa la síntesis *de novo* de una proteína para que se produzca el efecto completo del TNF $\alpha$ .

#### 4.6. MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑAL DEL TNF $\alpha$

Una vez que se comprobó la disminución de mRNA, se investigaron los mecanismos utilizados por el TNF $\alpha$  para producir este efecto.

##### 4.6.1. Unión del TNF $\alpha$ a su receptor

La respuesta celular al TNF $\alpha$  se inicia con la unión de esta citoquina a receptores de alta afinidad situados en la membrana (Old, 1985; Beutler & Cerami, 1986; Scheurich *et al.*, 1986).

La unión del [ $^{125}I$ ]TNF $\alpha$  a sus receptores sigue una cinética sigmoidea, alcanzándose la saturación a la concentración de 400pM, que se corresponde con  $10900 \pm 690$ cpm (Fig. 14).



#### 4.6.2. Internalización

Algunos autores indican que el  $\text{TNF}\alpha$ , antes de desencadenar sus actividades biológicas, se internaliza en *acidisomas* (Ruff & Gifford, 1981; Tsujimoto *et al.*, 1986; Mosselmans *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990; Yoshimura *et al.*, 1990). Por ello procedimos a inhibir la internalización del complejo receptor- $\text{TNF}\alpha$  con cloroquina ( $100\mu\text{M}$ ). Sin embargo, no se modificó el efecto estudiado del  $\text{TNF}\alpha$ , lo cual indica que este proceso no es imprescindible para que se desencadene la inhibición de la síntesis de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$  (Fig. 15).

#### 4.6.3. Proteínas G

Posteriormente estudiamos el papel de las proteínas G, ya que se han descrito efectos del  $\text{TNF}\alpha$  en los que estas proteínas parecen estar implicadas (Hepburn *et al.*, 1987; Yamato *et al.*, 1989). La inhibición de la proteína G acoplada al receptor del  $\text{TNF}\alpha$  mostró que se trata de una proteína G sensible a toxina pertussis. Existe un bloqueo del efecto inhibitorio del  $\text{TNF}\alpha$  sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$  cuando las células han sido preincubadas con 10ng/ml de toxina pertussis 24h antes de tratarlas con  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 16).

También se estudió la sensibilidad de la proteína G a la toxina colérica ( $0.4\mu\text{g/ml}$ ). La activación de esta proteína eleva los niveles de cAMP, cuyos efectos sobre la síntesis de colágeno son claramente inhibitorios (Perr *et al.*, 1988), de forma similar a la del  $\text{TNF}\alpha$ . Sin embargo, el efecto de esta toxina era aditivo con el efecto del  $\text{TNF}\alpha$ , lo cual indicaría que la proteína G estudiada, en principio, no activa la adenilato ciclasa, sino que son dos vías independientes (Fig. 16).

Ninguna de las dos toxinas modificó la afinidad del  $\text{TNF}\alpha$  por sus receptores.

#### 4.6.4. Vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y del ácido araquidónico

Las proteínas G pueden estar acopladas a la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Numerosos autores han observado que el  $\text{TNF}\alpha$  induce la activación de esta enzima y que su citotoxicidad desaparece

al inhibirla (Matthews *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1988; Neale *et al.*, 1988; Spriggs *et al.*, 1990). Algunos productos de la acción secuencial de la PLA<sub>2</sub> y de la ciclooxygenasa, las prostaglandinas, además de ser mediadores de distintos efectos biológicos del TNF $\alpha$  (Dayer *et al.*, 1985), pueden inhibir la síntesis de colágeno (Varga *et al.*, 1987). Por esto estudiamos la capacidad del TNF $\alpha$  de inducir la activación de la PLA<sub>2</sub>. Para ello utilizamos como inhibidores directos de esta enzima el BPB (20 $\mu$ M) y la quinacrina (2 $\mu$ M), y como inhibidor indirecto la dexametasona (0.8 $\mu$ M). La diferencia entre ellos es que la última depende de la síntesis proteica para ejercer sus efectos, ya que los corticosteroides inducen la síntesis de proteínas como las lipocortinas, capaces de inhibir la PLA<sub>2</sub> (Davidson *et al.*, 1987).

Con ninguno de los tres inhibidores utilizados observamos el bloqueo del efecto inhibitorio del TNF $\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1$ (I) (Fig. 17).

La síntesis de ácido araquidónico, en la mayoría de las células, depende de la actividad PLA<sub>2</sub>. Sin embargo, este metabolito puede originarse a partir del diacilglicerol (Mauco *et al.*, 1984), y aunque la PLA<sub>2</sub> no esté implicada, puede existir una activación de la lipoxigenasa o de la ciclooxygenasa por acción del TNF $\alpha$ . De hecho, se ha descrito que en células quiescentes adipogénicas el TNF $\alpha$  causa la inducción de los protooncogenes *c-fos* y *c-jun* mediante los metabolitos generados por la lipoxigenasa (Chang *et al.*, 1992).

La inhibición de la lipoxigenasa se realizó con NDGA (24 $\mu$ M) y la de la ciclooxygenasa con indometacina (100 $\mu$ M). En ninguno de los dos casos encontramos evidencias de la implicación de estas vías en la transducción de señal del TNF $\alpha$ . En el caso de la preincubación con indometacina se observa un ligero aumento en los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1$ (I); sin embargo, este inhibidor, por sí mismo, es capaz de aumentar de forma considerable los niveles del transcrito estudiado respecto al nivel basal (produce un incremento del 66%), probablemente por inhibición de la síntesis endógena de prostaglandinas. Tomando como controles los niveles de mRNA de procolágeno de las células tratadas con indometacina, el porcentaje de mRNA de las células tratadas con TNF $\alpha$  e indometacina sigue disminuido (57% de inhibición con TNF $\alpha$  respecto a los controles sin

tratar vs. 59% de inhibición con  $\text{TNF}\alpha$  e indometacina respecto a los controles de indometacina) (Fig. 18). Además, la indometacina disminuyó en un 38.9% la unión del  $\text{TNF}\alpha$  a su receptor. Aunque no se ha comprobado la relación entre el número de receptores y el efecto de la citoquina, no se puede descartar que un descenso en la unión sea responsable de la menor respuesta al  $\text{TNF}\alpha$  obtenida en células preincubadas con este inhibidor.

#### 4.6.5. Vía de la fosfolipasa C

La proteína G sensible a toxina pertussis también puede activar una fosfolipasa C. El bloqueo de la PI-PLC con neomicina ( $250\mu\text{M}$ ) no alteró el efecto del  $\text{TNF}\alpha$  sobre los niveles de mRNA de procolágeno (Fig. 19).

La fosfolipasa C también puede actuar hidrolizando la fosfatidilcolina de la membrana celular. Sin embargo, el BPB (inhibidor de la  $\text{PLA}_2$  que también es capaz de bloquear la PC-PLC insensible al calcio) no modificó el efecto estudiado del  $\text{TNF}\alpha$ , como ya se ha indicado (Fig. 17).

Otro inhibidor de distintas fosfolipasas es la gentamicina (Floru *et al.*, 1991). La gentamicina ( $5\mu\text{g/ml}$ ) anuló completamente la disminución producida por el  $\text{TNF}\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno (Fig. 19).

Estos resultados indican que la proteína G activada por el TNF está acoplada a una fosfolipasa. Esta enzima no parece pertenecer al grupo de la  $\text{PLA}_2$ , ni al de la PI-PLC, ni ser una PC-PLC independiente de calcio, ya que no es sensible ni a la neomicina ni al BPB, pero sí a la gentamicina.

Dos segundos mensajeros implicados en la transducción de señal de muchos agonistas son el diacilglicerol (DAG), activador fisiológico de la PKC, que trasloca esta enzima del citosol a la membrana, y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre.

##### 4.6.5.1. Calcio intracelular libre

Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre pueden incrementarse mediante la movilización

de este ion desde los almacenes intracelulares, o mediante su entrada a través de canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la membrana plasmática.

Por otra parte, el calcio disminuye la síntesis de colágeno en fibroblastos humanos (Flaherty & Chojkier, 1986), siendo por ello un posible efector de la inhibición del mRNA estudiado.

El tratamiento de los lipocitos con el ionóforo A23187 ( $10\mu\text{M}$ ), que libera  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, produce un descenso en los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$ . Este efecto es sinérgico con el producido por el  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 20).

Un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  también podía deberse a que el  $\text{TNF}\alpha$  activase los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y permitiera la entrada de este ion. Para investigar esta posibilidad, procedimos a bloquear los canales de calcio de la membrana celular con verapamil ( $10\text{mM}$ ). Este tratamiento dió lugar, en las células controles, a un aumento de la síntesis de mRNA de procolágeno, como cabía esperar. Sin embargo, cuando se adicionó  $\text{TNF}\alpha$  a las células tratadas con este agente, se observó que el efecto inhibitorio de la citoquina no sólo no desaparecía, sino que es mucho mayor (Fig. 20). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio del  $\text{TNF}\alpha$  no depende del calcio extracelular.

Por ello procedimos a eliminar en lo posible el efecto del calcio intracelular. Aunque generalmente se realiza quelando el calcio extracelular con EGTA e impidiendo la movilización del intracelular con Quin-2 o TMB-8 (hidrocloruro de 8-(dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato) (Hasegawa & Bonavida, 1989), en cultivos de células adherentes este sistema da lugar a una mortalidad elevada, debido fundamentalmente a la eliminación del calcio extracelular. Para evitar este efecto tóxico modificamos esta técnica, impidiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular con verapamil. Los lipocitos se preincubaron 2h con Quin-2/AM ( $40\mu\text{M}$ ) y verapamil ( $10\text{mM}$ ). La efectividad del sistema se estudió adicionando a las células tratadas con estos dos inhibidores melitin ( $1\mu\text{g/ml}$ ); este agente incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Mix *et al.*, 1984; Hasegawa & Bonavida, 1989). El incremento inducido por el melitin fue anulado por el efecto dual del Quin-2/AM y del verapamil (Fig. 21a).

Una vez comprobado el funcionamiento de la inhibición, adicionamos TNF $\alpha$  a las células preincubadas con Quin-2/AM y verapamil. La inhibición de los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  producida por la citoquina se redujo, alcanzándose el nivel que presentan las células tratadas solamente con los inhibidores (Fig. 21b).

Hay que indicar que ninguno de los agentes utilizados (ionóforo A23187, verapamil, Quin-2/AM) modificó la unión del TNF $\alpha$  al receptor.

#### 4.6.5.2. Calmodulina

Muchas de las acciones intracelulares del calcio tienen lugar por su unión a la calmodulina (England, 1986). Además, el efecto citotóxico del TNF $\alpha$  ha sido relacionado con esta proteína ampliamente distribuida y con gran afinidad por el calcio (Das *et al.*, 1990).

Por ello, al observar una posible implicación del calcio en la disminución del mRNA de colágeno, comprobamos el efecto de distintos inhibidores de la calmodulina. El calmidazolium (10 $\mu$ M), el TFP (10 $\mu$ M) y el W-7 (10 $\mu$ M), todos ellos inhibidores de esta proteína, presentan un efecto estimulante de la síntesis de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . La respuesta al TNF $\alpha$  en las células tratadas con estos inhibidores, en todos los casos fue un incremento en los niveles de este mRNA, aunque no se anuló el efecto de esta citoquina (Fig. 22). El aumento observado no es atribuible a una modificación en el número de receptores de TNF.

#### 4.6.5.3. Proteínquinasa C

Otras proteínas dependientes del Ca<sup>2+</sup> intracelular son varias isoformas de la PKC. Como ya se ha indicado, el activador fisiológico de la PKC es el DAG. La activación de la PKC en nuestro estudio era bastante probable, ya que el DAG es un segundo mensajero generado por la acción de distintos tipos de fosfolipasas.

Aunque el papel de la PKC en la transducción de señal del TNF $\alpha$  es actualmente motivo de controversia, algunos efectos de esta citoquina sobre la regulación de distintos

genes no se producen en presencia de inhibidores de esta enzima (Sehgal *et al.*, 1987; Hamamoto *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1992). La adición de dos inhibidores clásicos de esta enzima, el H-7 (50 $\mu$ M) y la estaurosporina (0.5 $\mu$ M), no evitó el efecto del TNF $\alpha$  sobre el mRNA estudiado. Es más, estos inhibidores disminuyen los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  por sí mismos, y las células preincubadas con los inhibidores responden al TNF $\alpha$  con un descenso mayor en los niveles de este transcrito (Fig. 23). La unión de la citoquina a su receptor no se alteró con ninguno de los dos inhibidores utilizados.

Estos resultados indicarían que la PKC no es mediadora de los efectos inhibidores de la síntesis de este mRNA.

Ya que no fue posible descartar la activación de una PKC por el DAG, también se estudió la posible metabolización de DAG a AA, inhibiendo la DAG lipasa con RHC80267 (50 $\mu$ M); sin embargo, como era de esperar por los resultados obtenidos con los inhibidores de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa, esta vía metabólica no está implicada en el efecto estudiado (Fig. 24).

#### 4.6.6. Vía de la adenilato ciclasa

Como ya se ha indicado, la proteína G estudiada no es sensible a toxina colérica, ya que el efecto de esta toxina es aditivo al inducido por el TNF $\alpha$ . Sin embargo, no se puede descartar una activación indirecta de la adenilato ciclasa ni un aumento en los niveles de cAMP. De hecho, es posible que la adenilato ciclasa se active por la acción de una calmodulina (England, 1986).

La producción de colágeno en fibroblastos humanos disminuye en relación con niveles elevados de cAMP (Baum *et al.*, 1978), y el TNF $\alpha$  en algunos casos eleva estos niveles (Zhang *et al.*, 1988).

Por ello, procedimos a comprobar que acción tenía este segundo mensajero sobre el mRNA de procolágeno. La activación de la adenilato ciclasa con forskolina (100 $\mu$ M) y la adición de un análogo del cAMP, el 8-bromo-cAMP (1mM) dan lugar a una disminución en

el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . El efecto de estos compuestos es sinérgico con el del TNF $\alpha$  (Fig. 25). Esto indicaría que la activación de la adenilato ciclasa es una vía paralela a la utilizada por el TNF $\alpha$ .

Hay que reseñar que en los lipocitos utilizados en este estudio los niveles elevados de cAMP inducidos por la forskolina y por el 8-bromo-cAMP no aumentan el número de receptores. Dado que sólo el receptor de TNF de 75kD (TNF-R2) es sensible al cAMP (Hohmann *et al.*, 1990), es bastante probable que la mayor población de receptores (si no la única) en estas células sea de 55kD (TNF-R1).

La inhibición de proteinquinas dependientes de cAMP mediante H-8 (50 $\mu$ M) da lugar a un aumento en los niveles basales del mRNA estudiado, como era de esperar, y revierte en parte los efectos del TNF $\alpha$  sobre este transcrito (Fig. 26). Esto indicaría que es posible que exista una activación ligera de una PKA, aunque esta enzima no sea la responsable directa del efecto inhibitorio del TNF $\alpha$ .

#### 4.6.7. Implicación de NF- $\kappa$ B en la señal inducida por el TNF $\alpha$ sobre los lipocitos en cultivo

El TNF $\alpha$  es uno de los pocos inductores fisiológicos del NF- $\kappa$ B, factor de transcripción pleiotrópico implicado en muchas de las acciones de esta citoquina sobre tipos celulares muy diversos.

Existen numerosos genes que presentan sitios de unión a NF- $\kappa$ B. Por ello se ha sugerido que este factor de transcripción representa el sistema de "terceros mensajeros" más importante utilizado por las señales regulatorias de genes desencadenadas por el TNF $\alpha$  (Meichle *et al.*, 1990).

Como ya se ha indicado en la introducción, el mantenimiento de la actividad NF- $\kappa$ B requiere la síntesis proteica continuada de este factor de transcripción. Además de la síntesis proteica, su expresión también requiere de la presencia continuada del TNF $\alpha$  (Hohmann *et al.*, 1991). Estas dos características también son precisas en la regulación de la expresión del

gen del colágeno  $\alpha_1(I)$ .

Por estas razones estudiamos la posible activación de NF- $\kappa$ B inducida por el TNF $\alpha$  en los lipocitos en cultivo, mediante su incubación durante 24h con y sin la citoquina.

El ensayo de retardo en gel mostró que los lipocitos en condiciones basales no presentan NF- $\kappa$ B activado, como cabía esperar. Sin embargo, el tratamiento prolongado de las células con TNF $\alpha$  (0.6nM) induce la expresión de este factor de transcripción (Fig. 27).

Existen numerosos segundos mensajeros que son inductores de NF- $\kappa$ B. Dado que los efectos del TNF $\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  parecían estar mediados por el Ca<sup>2+</sup> libre intracelular liberado de los almacenes intracelulares, procedimos a comprobar si este mismo mediador estaba implicado en la expresión de NF- $\kappa$ B.

Para ello bloqueamos la entrada de calcio extracelular con verapamil (10mM) y quelamos el calcio libre intracelular con Quin-2/AM (40 $\mu$ M). Este tratamiento, en las células controles, no induce la activación del factor de transcripción estudiado, pero en las células tratadas con TNF $\alpha$  (0.6nM) elimina casi totalmente la banda correspondiente a NF- $\kappa$ B (Fig. 27).

Estos resultados confirmarían el importante papel que juega el Ca<sup>2+</sup> procedente de los almacenes intracelulares en la señal desencadenada por el TNF $\alpha$  en los lipocitos en cultivo y, aunque no hemos estudiado si existe una relación directa entre NF- $\kappa$ B y el promotor del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , no se puede descartar la implicación de este factor de transcripción en el efecto estudiado.

#### **4.7. EFECTOS DEL TNF $\alpha$ SOBRE EL PROMOTOR DEL GEN DEL PROCOLAGENO $\alpha_1(I)$ MURINO**

El descenso en la producción de colágeno, como se ha visto en el punto 4.5., está asociado con la disminución en el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Esto indica que el TNF $\alpha$  tiene un efecto inhibitorio pretraduccional sobre la síntesis de colágeno.

La regulación de la expresión de los genes de los distintos colágenos se produce



fundamentalmente a nivel transcripcional (Bornstein & Sage, 1989).

La acción del TNF $\alpha$  sobre el promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se estudió transfectando los lipocitos con el plásmido circular COLCAT1. Este plásmido contiene un fragmento de, aproximadamente, 3.6kb que corresponde al promotor íntegro del gen del procolágeno  $\alpha_1(I)$ . El tratamiento con TNF $\alpha$  durante 24h de las células transfectadas con el plásmido COLCAT1 produjo una marcada inhibición de la actividad cloranfenicol aciltransferasa (Fig. 28). Estos resultados confirman la hipótesis de que la citoquina estudiada ejerce una modulación de la síntesis de colágeno a nivel transcripcional mediante la inhibición del promotor del gen de procolágeno.

#### 4.8. **REGIONES DEL PROMOTOR SOBRE LAS QUE ACTUA EL TNF $\alpha$**

El estudio de la región, o regiones, del promotor implicadas en la inhibición de la transcripción del gen estudiado se realizó cortando este promotor por dos puntos sensibles a enzimas de restricción.

La enzima de restricción Hind III corta el promotor a 2300bp por encima del origen de transcripción, perdiéndose las 1400bp distales, aproximadamente, y linearizándose el plásmido. A la secuencia obtenida por la digestión del COLCAT1 con esta enzima se le denomina COLCAT2.

El corte del plásmido COLCAT1 con la enzima de restricción Pst I elimina aproximadamente la región del promotor localizada por encima de -1700, perdiéndose unas 2000bp distales. A este DNA lineal obtenido por digestión de COLCAT1 con Pst I se le denomina COLCAT7.

Para analizar la base molecular de la inhibición inducida por el TNF $\alpha$  es importante identificar los mecanismos que modulan normalmente el gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Por ello, se procedió a determinar el efecto de cada una de las tres regiones del promotor de este gen sobre la expresión de la cloranfenicol acil transferasa en los lipocitos en cultivo. Con este fin, se realizó la cotransfección de cada uno de los DNA quiméricos (COLCAT1, COLCAT2 y

COLCAT7) junto con plásmido LTR-LUC. En el lisado celular obtenido según se especifica en "Material y Métodos" se determinó la actividad CAT, y en una alícuota se cuantificó la actividad luciferasa. Esta última se utilizó para normalizar la actividad CAT en función de la eficacia de la transfección. Como se observa en la figura 29, las 1400 pares de bases eliminadas con el corte con Hind III apenas modifican la expresión de la CAT (porcentaje de acetilación: 32% con COLCAT1 vs. 29.3% con COLCAT2). Sin embargo, la secuencia de 600 pares de bases entre los puntos Hind III y Pst I es una región inhibidora de la transcripción del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , ya que el grado de acetilación obtenido en las células transfectadas con COLCAT7 era muy superior al de las transfectadas con COLCAT2 (29.3% con COLCAT2 vs. 44.5% con COLCAT7).

Posteriormente estudiamos el efecto del TNF $\alpha$  sobre estas tres regiones del promotor. Cuando los lipocitos fueron transfectados con COLCAT2, el efecto inhibitorio del TNF $\alpha$  descrito sobre COLCAT1 no sólo no desaparecía, sino que era mucho más potente. Sin embargo, en las células transfectadas con COLCAT7 el TNF $\alpha$  incrementó el porcentaje de acetilación respecto a su control (Fig. 30).

Estos resultados indican que, aunque el efecto resultante de la acción de esta citoquina sobre la transcripción del gen estudiado sea inhibidor, el TNF $\alpha$  ejerce una estimulación potente de la región del promotor comprendida entre el origen de transcripción y 1700bp por encima de éste.

#### **4.9. VIAS MODULADORAS DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE PROCOLAGENO $\alpha_1(I)$ MURINO**

El estudio de la inhibición de la transcripción del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se realizó sobre células transfectadas con COLCAT2, ya que los resultados expuestos anteriormente indicaban que era esta región del promotor la más directamente implicada en la respuesta inhibitoria de la síntesis de colágeno inducida por TNF $\alpha$ .

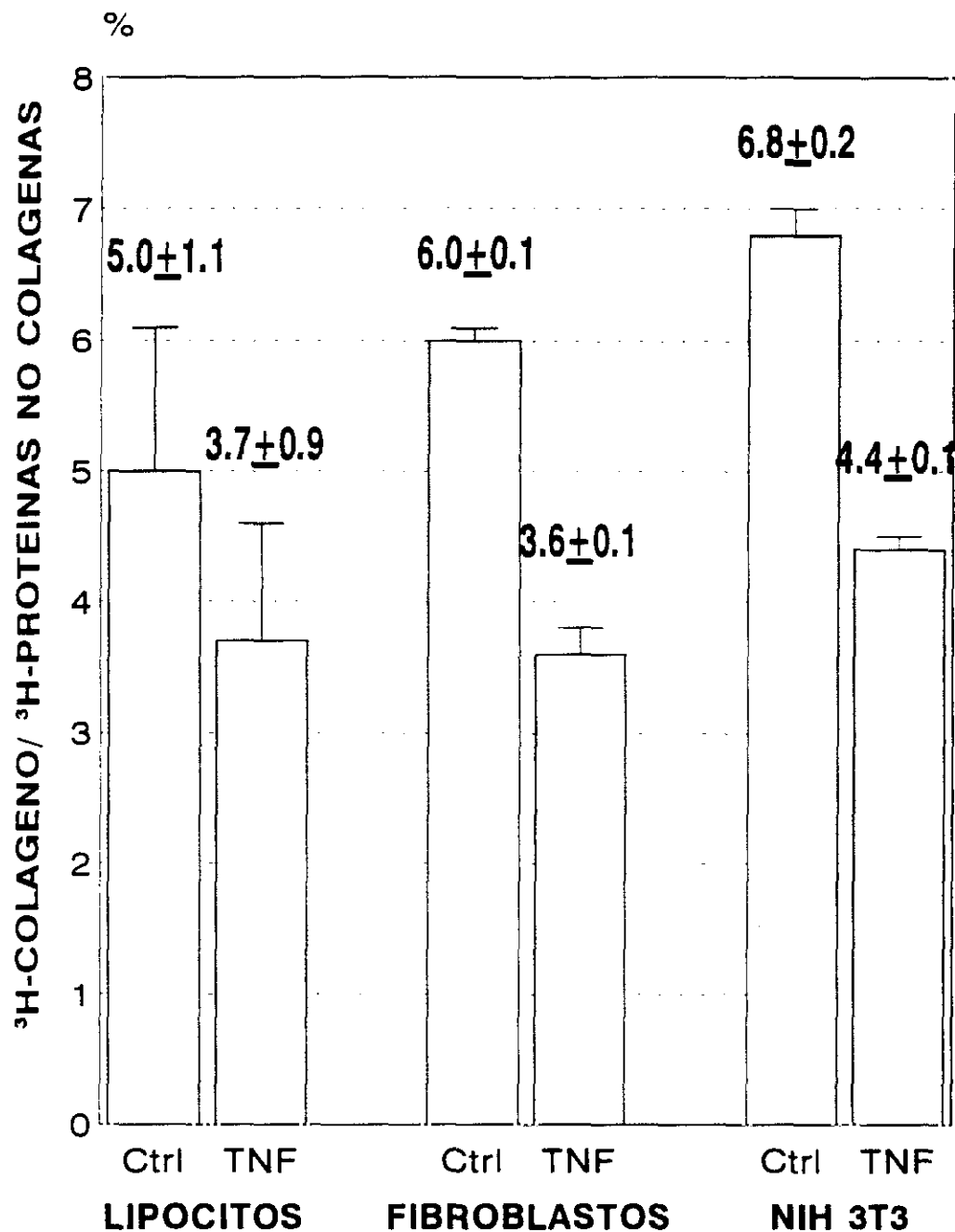
En los lipocitos transfectados con COLCAT2 se estudiaron las vías del calcio y del

cAMP, dado que los resultados obtenidos por la técnica del *Northern blot* apuntaron la posibilidad de que ambas vías estuvieran implicadas en el efecto inhibitorio estudiado.

El tratamiento de los lipocitos transfectados con COLCAT2 con 8-bromo-cAMP produjo un incremento en el grado de acetilación del cloranfenicol, mientras que el H-8 (inhibidor de PKA) potenciaba aun más el efecto inhibitorio del TNF $\alpha$  (Fig. 31). Estos resultados indicarían que el cAMP, y la proteinquinasa dependiente de cAMP, si son mediadores del efecto del TNF $\alpha$  sobre la síntesis de colágeno, no actúan en esta región del promotor.

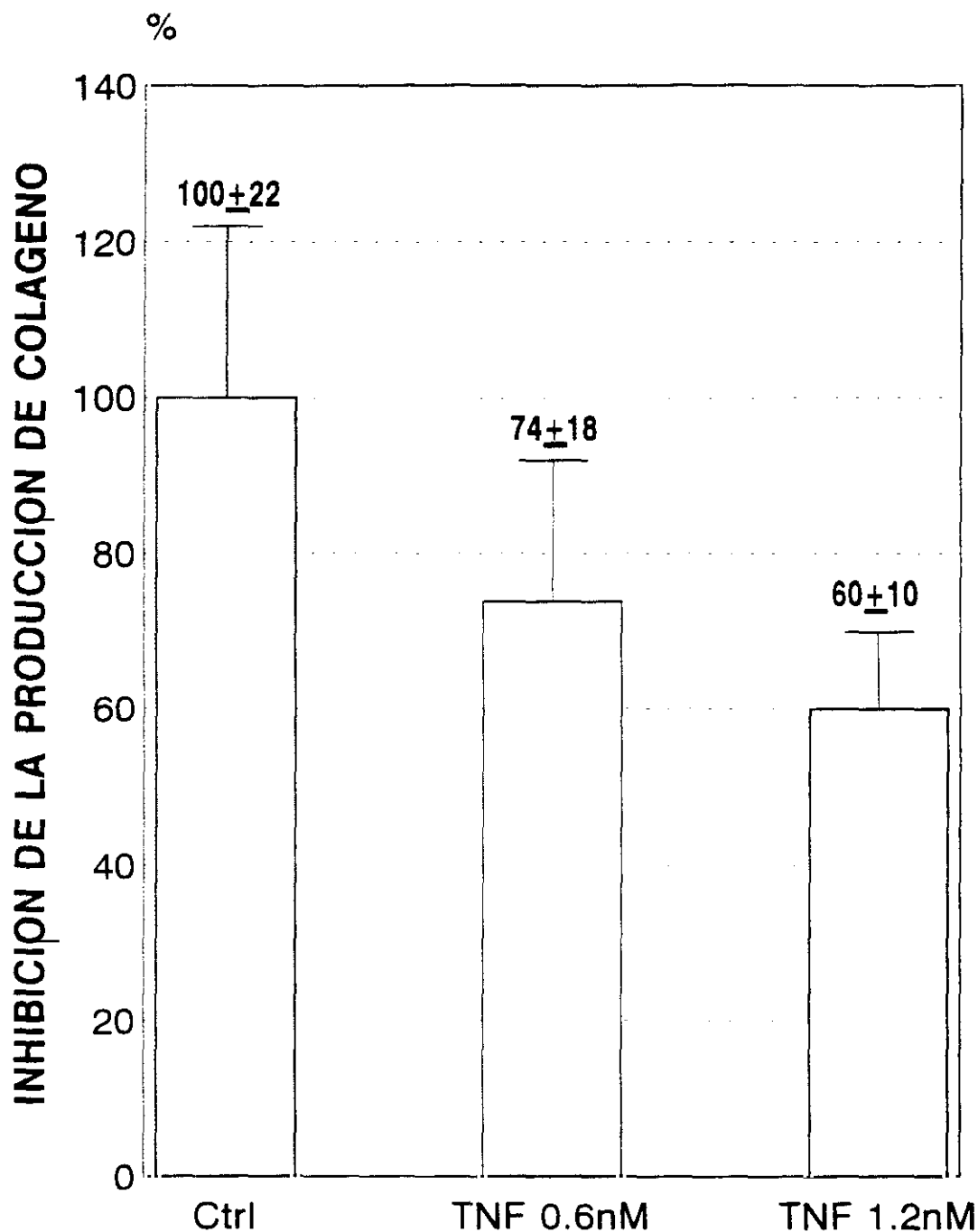
Sin embargo, al añadir ionóforo de calcio A23187 a las células transfectadas se observó que el calcio tenía la capacidad de inhibir la transcripción del gen de procolágeno actuando sobre esta región (Fig. 31). Estos resultados apoyan claramente la implicación del calcio en la inhibición de la síntesis de procolágeno  $\alpha_1(I)$  inducida por TNF $\alpha$ .

Como ya se ha indicado, cuando las células se transfectaron con COLCAT7 y se trataron con TNF $\alpha$  existía una estimulación de la acetilación del cloranfenicol marcado. Este efecto estimulante desapareció cuando los lipocitos trasfectados habían sido preincubados con H-7 (inhibidor de la PKC). Además, el PMA también es capaz, como el TNF $\alpha$ , de estimular la transcripción en esta región del promotor (Fig. 32). Parece claro, por ello, que la PKC es un segundo mensajero activado por el TNF $\alpha$  en nuestras células, aunque su papel más bien sería estimulante de la síntesis de colágeno. Este papel activador de la PKC explicaría que los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  disminuyan cuando el TNF $\alpha$  actúa en lipocitos preincubados con los inhibidores de PKC, ya que éstos estarían anulando una vía de estimulación de síntesis de colágeno utilizada también por el TNF $\alpha$ . De esta forma, sólo estaría presente la vía o las vías inhibitorias de esta síntesis activadas por el TNF $\alpha$ .



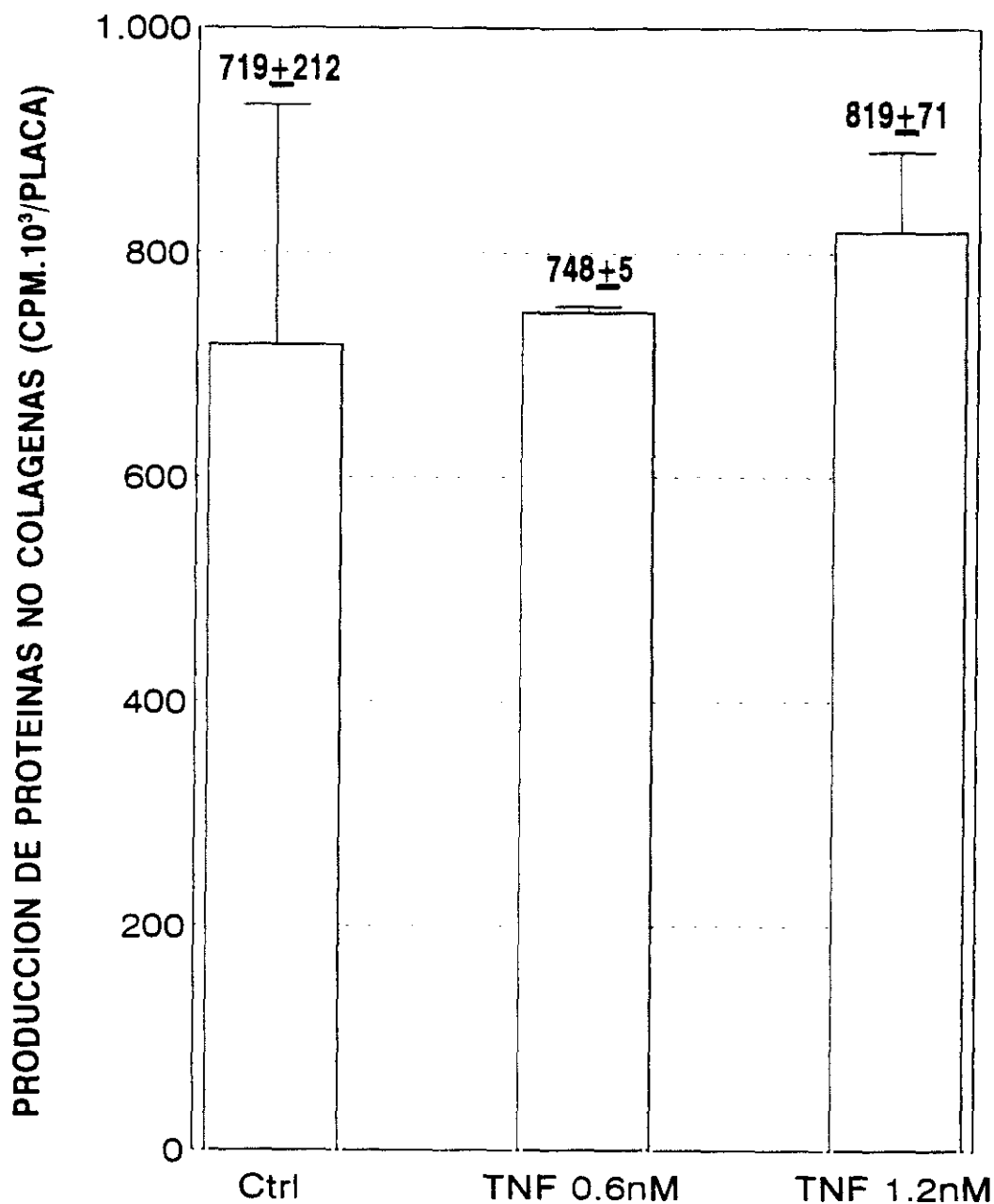
**Fig. 1. Efecto del  $\text{TNF}\alpha$  sobre la producción de colágeno en lipocitos, fibroblastos humanos y en células 3T3.**

Los cultivos celulares se incubaron durante 24 sin y con  $\text{TNF}\alpha$  (0.6nM), y se marcaron con  $10\mu\text{Ci}$  de L-[ $^3\text{H}$ ]prolina durante 4 horas en presencia de ácido ascórbico (0.2mM). La producción de proteínas colágenas y no colágenas se calculó a partir de la radiactividad presente en las fracciones sensibles y no sensibles a la colagenasa. Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes ( $p < 0.001$ ).



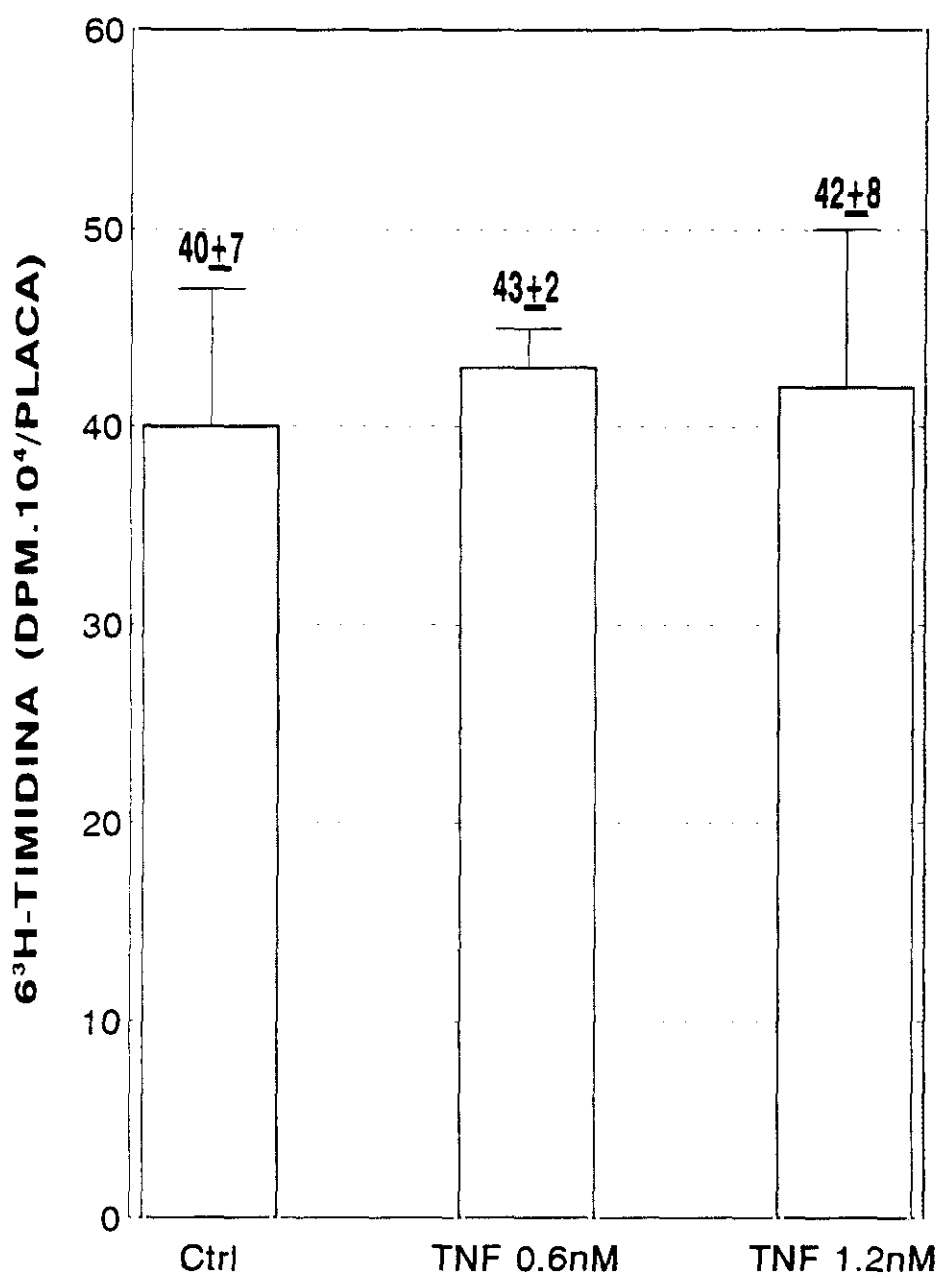
**Fig. 2. Inhibición de la producción de colágeno por los lipocitos tras su exposición a distintas concentraciones de  $TNF\alpha$  durante 24 horas.**

Los lipocitos en cultivo se incubaron como se indica en la Fig. 1. El grado de producción de colágeno se calculó a partir de la radiactividad de las fracciones sensibles y no sensibles a la colagenasa. Los resultados son la media±desviación estándar de tres experimentos diferentes ( $p<0.001$ ).



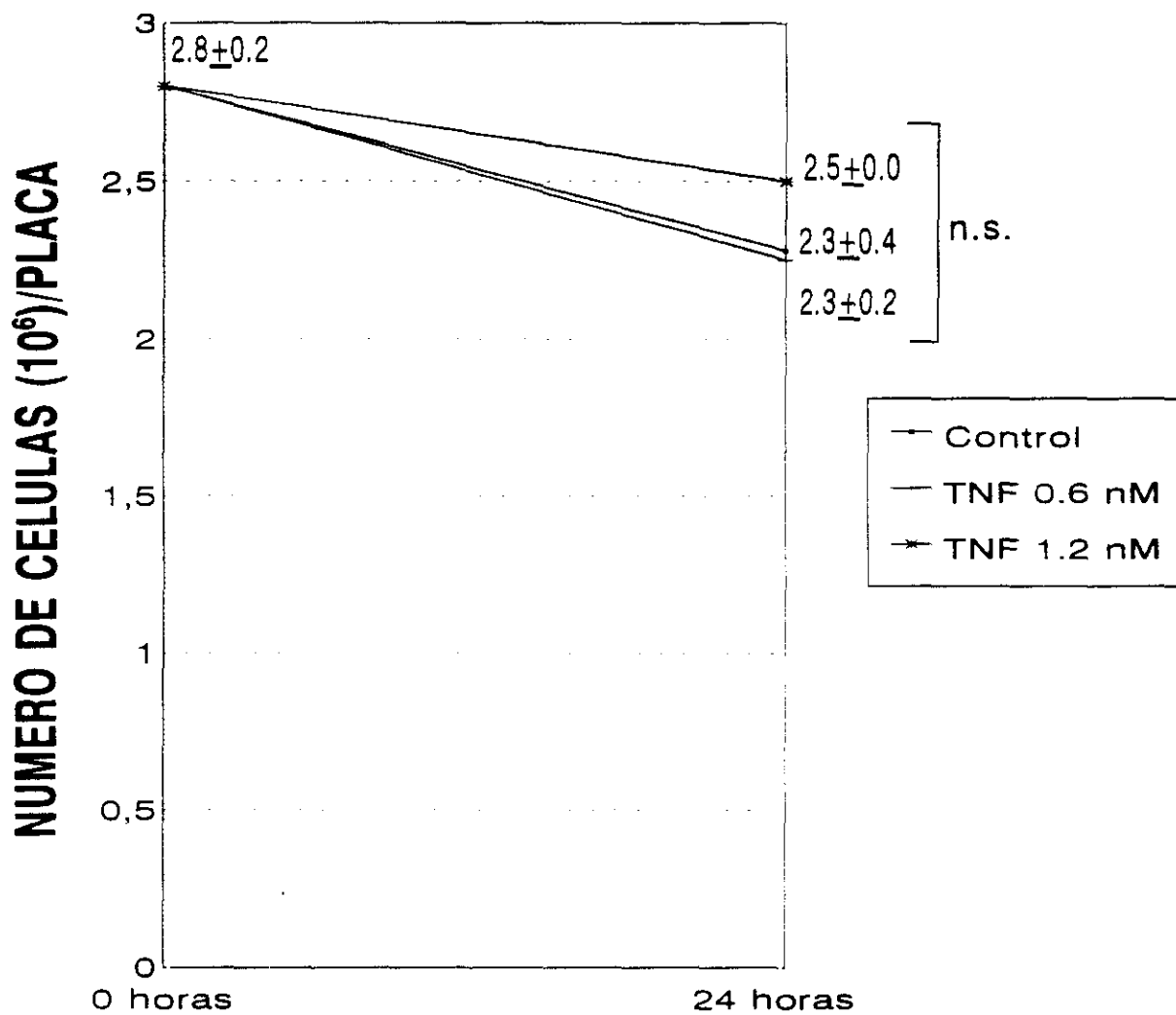
**Fig. 3. Efecto de distintas concentraciones de TNF $\alpha$  sobre la producción de proteínas no colágenas por los lipocitos en cultivo.**

Las células se trataron como se indica en la Fig. 1. La producción de proteínas no colágenas se determinó midiendo la radiactividad de la fracción no sensible a la colagenasa. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes (n.s.).



**Fig. 4. Efecto del TNF $\alpha$  sobre la proliferación celular.**

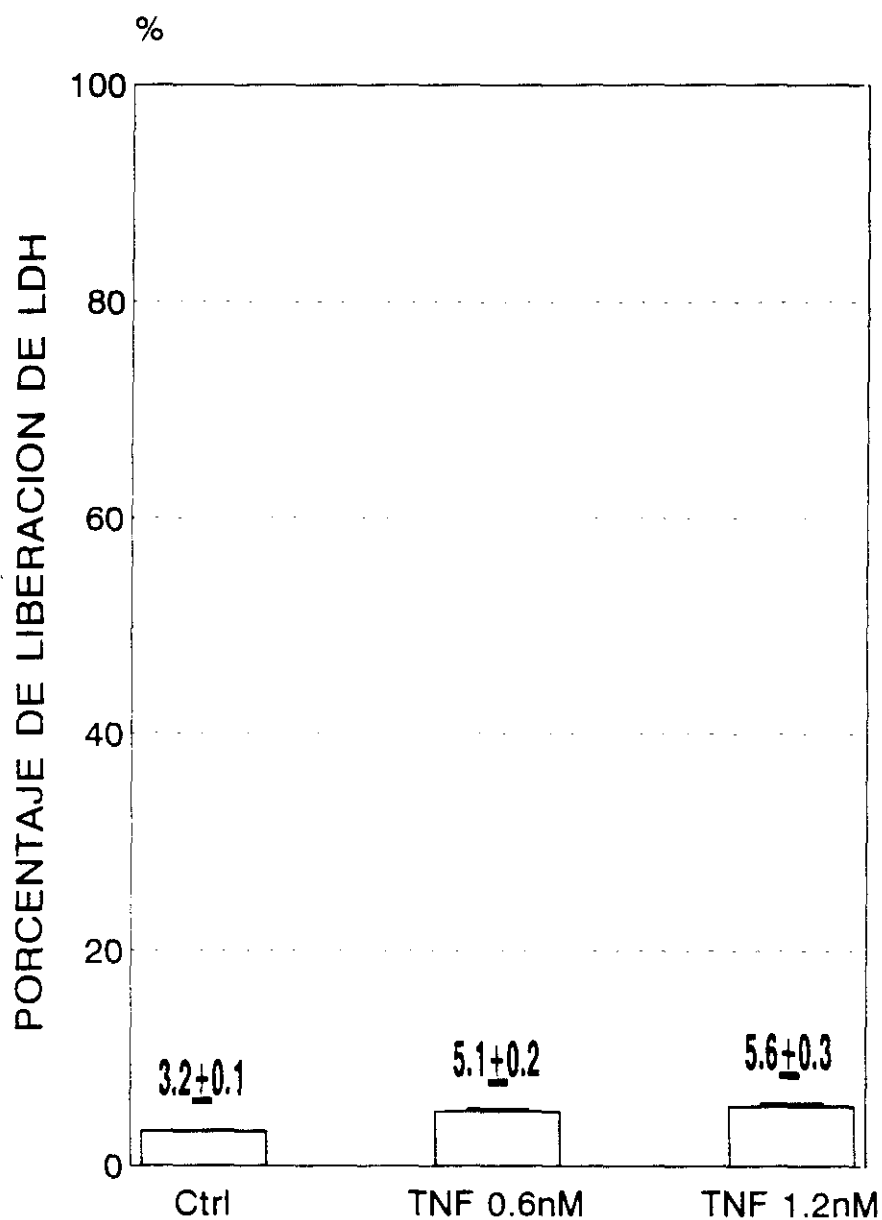
Los cultivos celulares se incubaron durante 24 horas sin y con las concentraciones indicadas de TNF $\alpha$  en presencia de 0.5 $\mu$ Ci/ml de [6-<sup>3</sup>H]timidina. La síntesis de DNA se calculó a partir de la radiactividad presente en la fracción insoluble en ácido tricloroacético (10%). Los valores son la media $\pm$ desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.



**Fig. 5. Efecto del  $TNF\alpha$  sobre la viabilidad celular.**

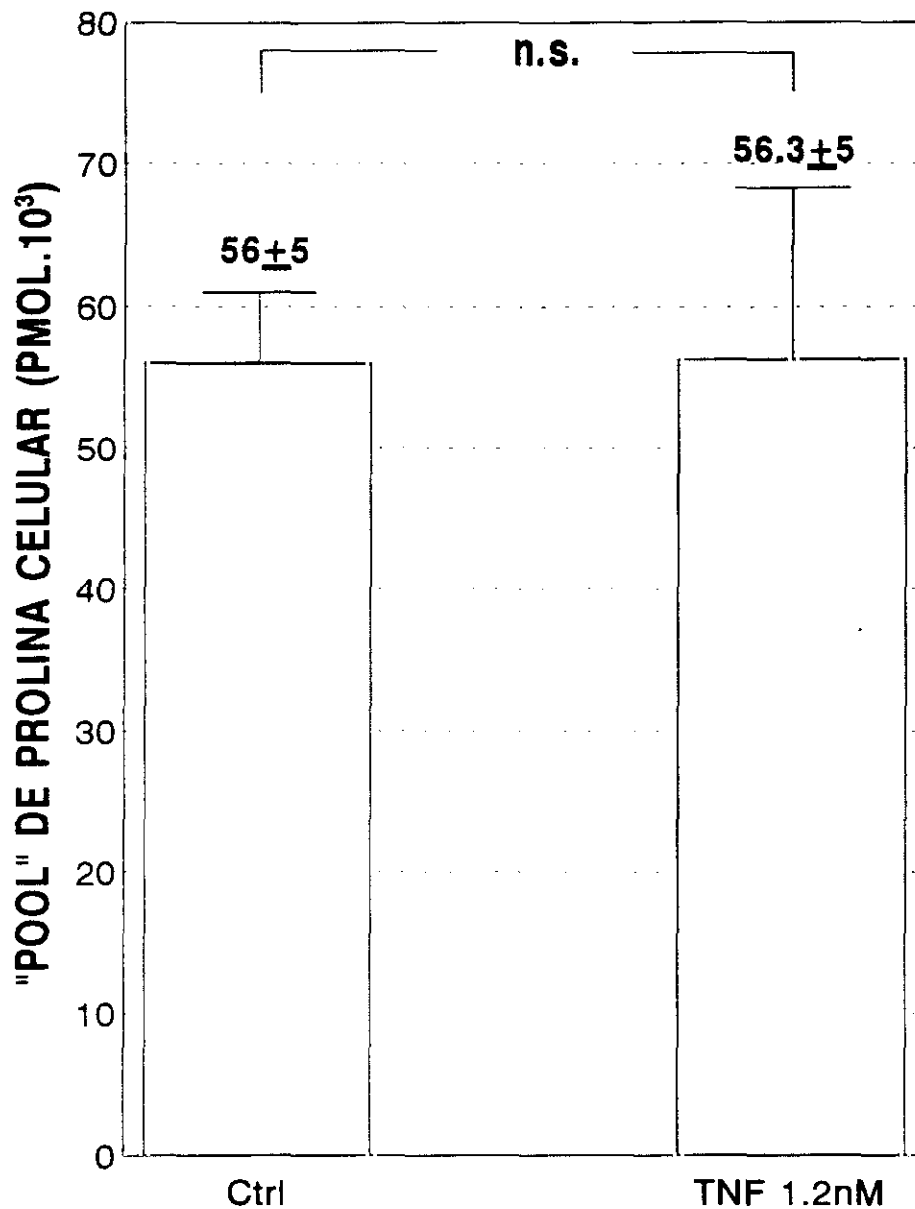
Las células se incubaron durante 24 horas con las dosis de  $TNF\alpha$  indicadas. El recuento de células viables se realizó por la técnica del azul tripán (0.1%). Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento realizado por triplicado.





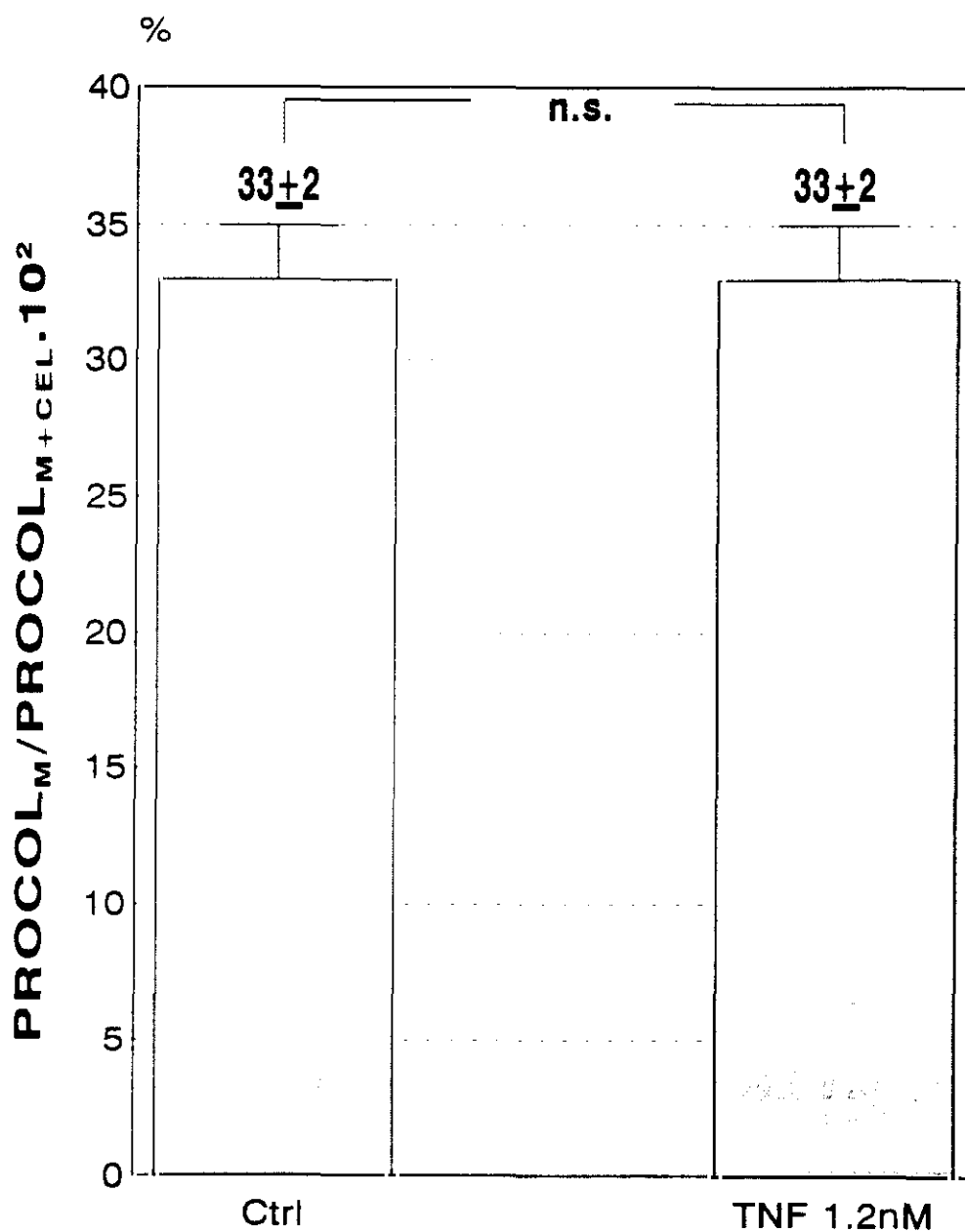
**Fig. 6. Efecto del  $\text{TNF}\alpha$  sobre la liberación de LDH al medio de cultivo.**

Las células se incubaron 24 horas con el  $\text{TNF}\alpha$ . Posteriormente se recogió el medio, y las células se rasparon y se sonicaron. La determinación de la LDH en las células y en el medio de cultivo se realizó utilizando un ensayo comercial. Los resultados expresan el porcentaje de la LDH liberada, y corresponden al valor medio±desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.



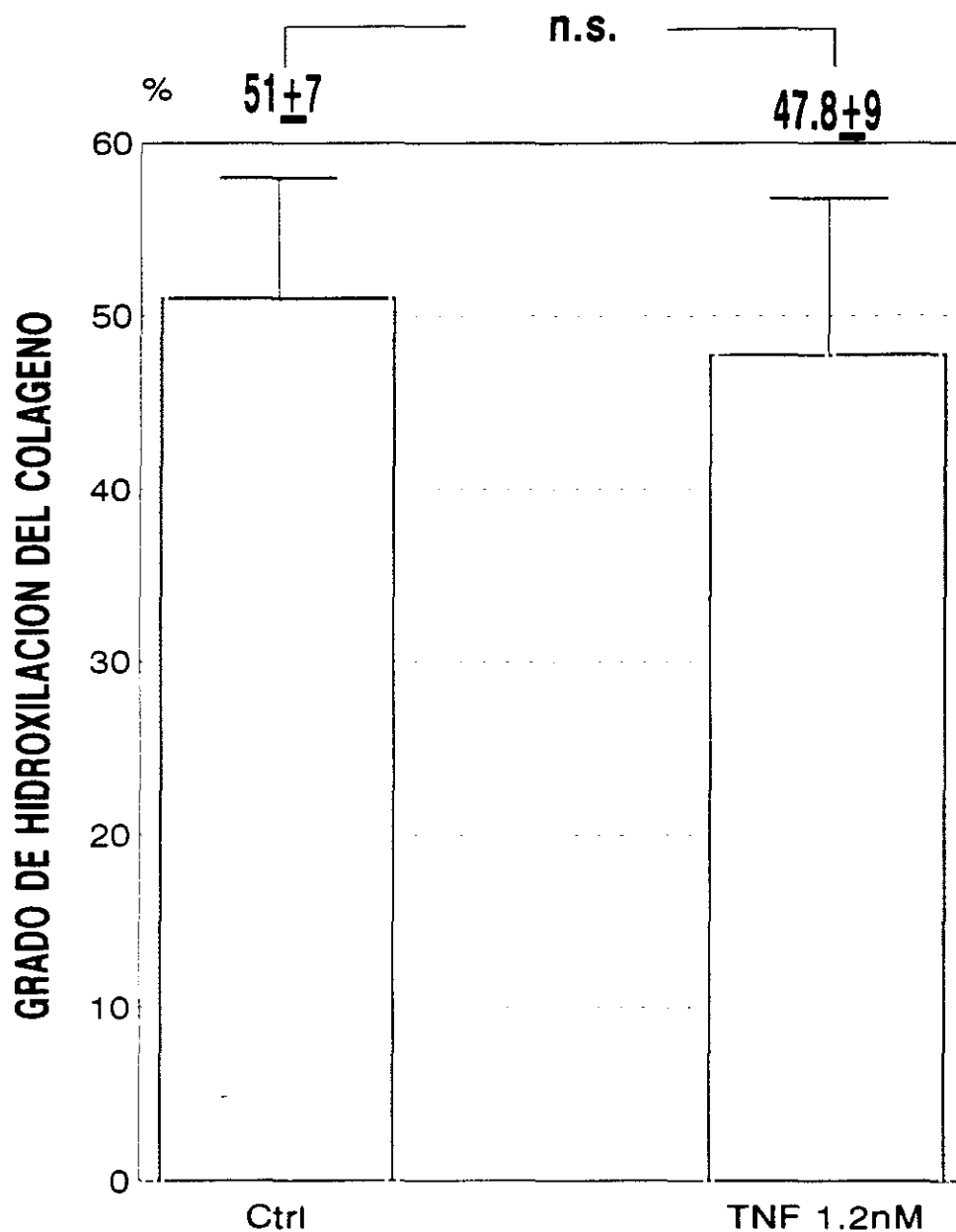
**Fig. 7. Niveles de prolina intracelular en células tratadas con TNF $\alpha$ .**

Las células de Ito se marcaron con L[5-<sup>3</sup>H]prolina como se indica en la Fig. 1. Tras ello, se recogieron y se lavaron con PBS. La cantidad de prolina intracelular se determinó a partir de la radiactividad del sobrenadante obtenido en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético (10%).



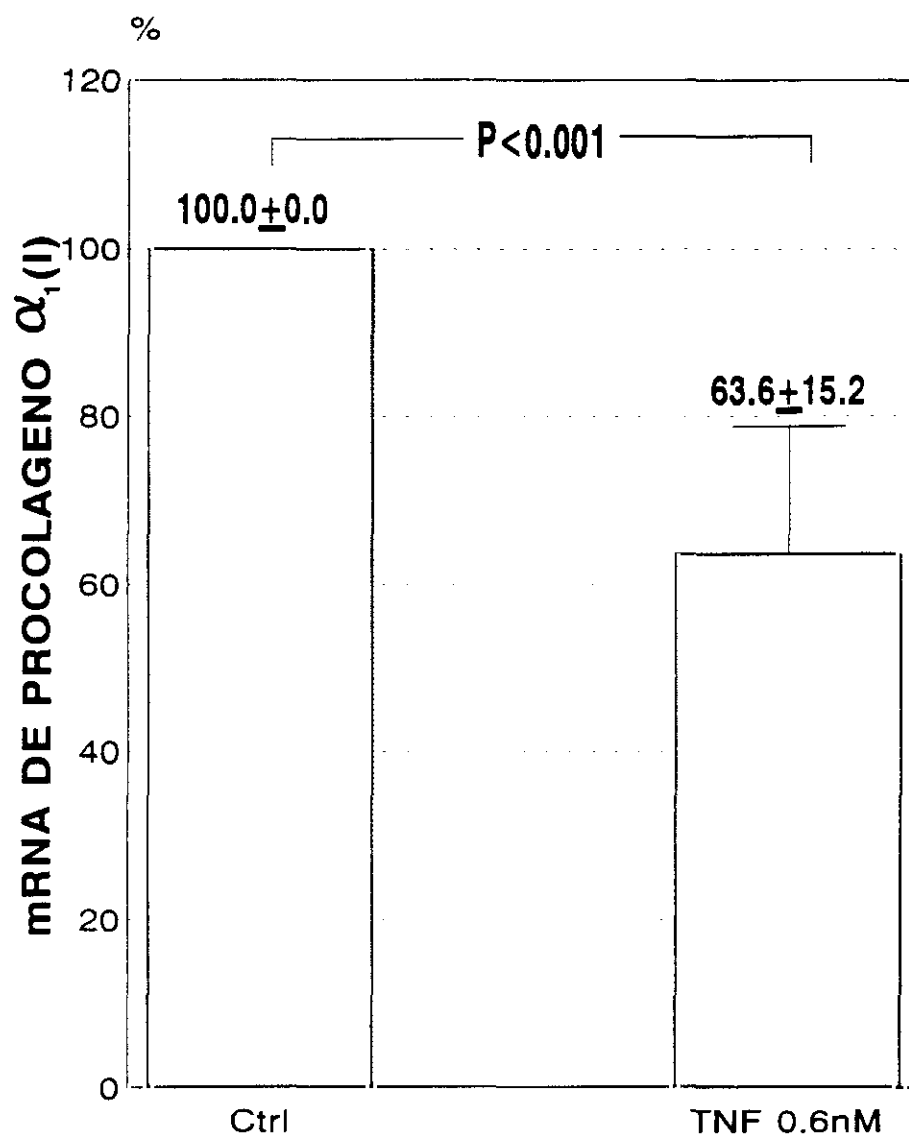
**Fig. 8. Efecto del  $\text{TNF}\alpha$  sobre la secreción del colágeno.**

Los cultivos celulares se incubaron 24 horas sin y con  $\text{TNF}\alpha$  (1.2nM), y se marcaron en las mismas condiciones indicadas en la Fig. 1. Tras ello, se determinaron por separado el colágeno secretado al medio de cultivo y el colágeno celular, por el método de la colagenasa. Los resultados expresan el porcentaje de colágeno secretado.



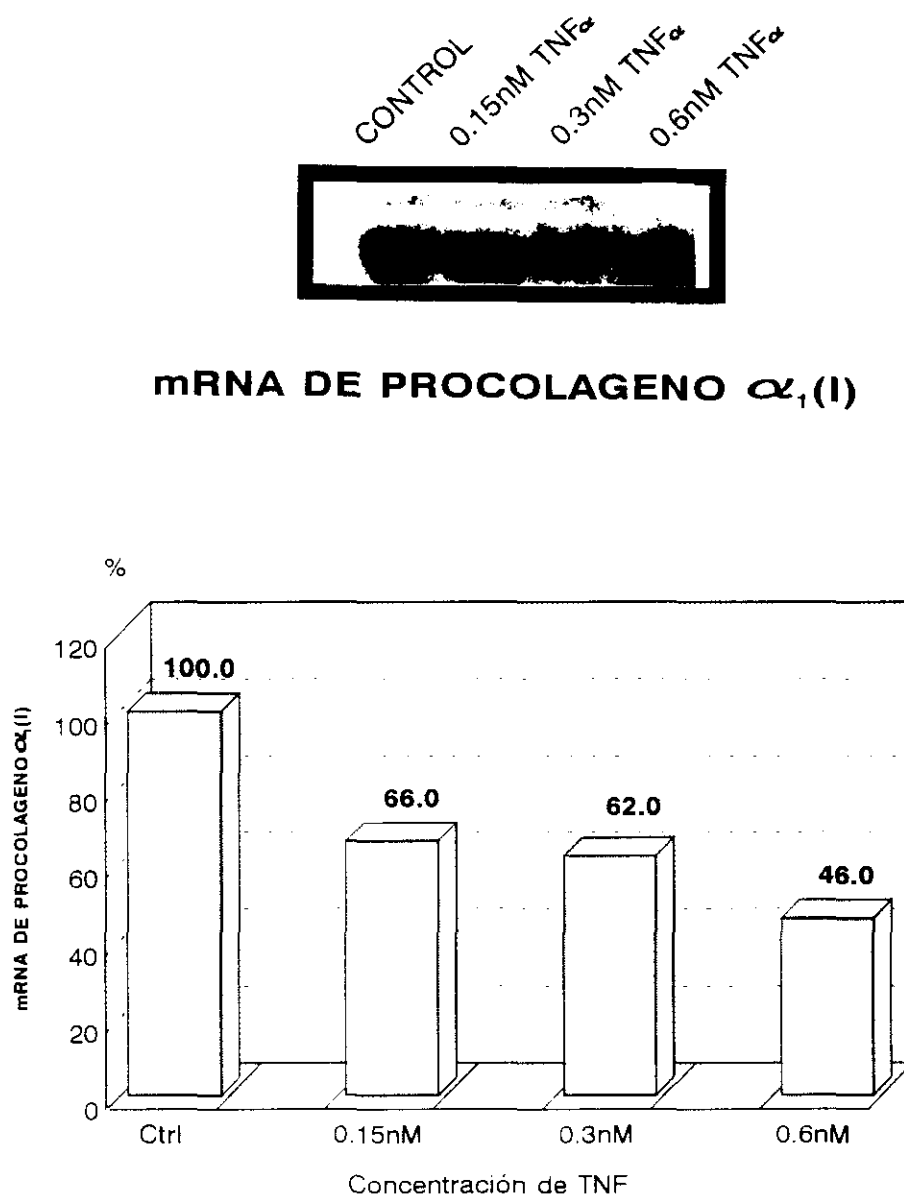
**Fig. 9. Efecto del  $\text{TNF}\alpha$  sobre la hidroxilación de la prolina.**

Las células se incubaron 24 horas sin y con  $\text{TNF}\alpha$  (1.2nM), y se marcaron durante 4 horas con  $10\mu\text{Ci}$  de  $\text{L}-[5\text{-}^3\text{H}]$  prolina y  $2\mu\text{Ci}$  de  $\text{L}-[^{14}\text{C}]$  prolina, en presencia de 0.2mM de ácido ascórbico. El grado de hidroxilación se calculó a partir de la radiactividad presente en la fracción sensible a la colagenasa, aplicando la fórmula indicada en el punto 3.7. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes.



**Fig. 10. Efecto del  $TNF\alpha$  sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en las células.**

Los cultivos de lipocitos se trataron sin y con  $TNF\alpha$  (0.6nM) durante 24 horas.  $10\mu g$  del RNA citoplásmico se corrieron en gel de agarosa/formaldehído (1%) y se transfirieron por capilaridad a un filtro de nylon. Los filtros se hibridaron con la sonda de procolágeno  $\alpha_1(I)$  marcada. Los filtros se expusieron a película de rayos X a  $-70^\circ C$ . Resultados obtenidos de, al menos, tres experimentos independientes ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 11. Efecto de distintas concentraciones de TNF $\alpha$  sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en las células.**

Las células se trataron sin y con distintas concentraciones de TNF $\alpha$  durante 24 horas. La técnica empleada en el experimento es la indicada en la Fig. 10.

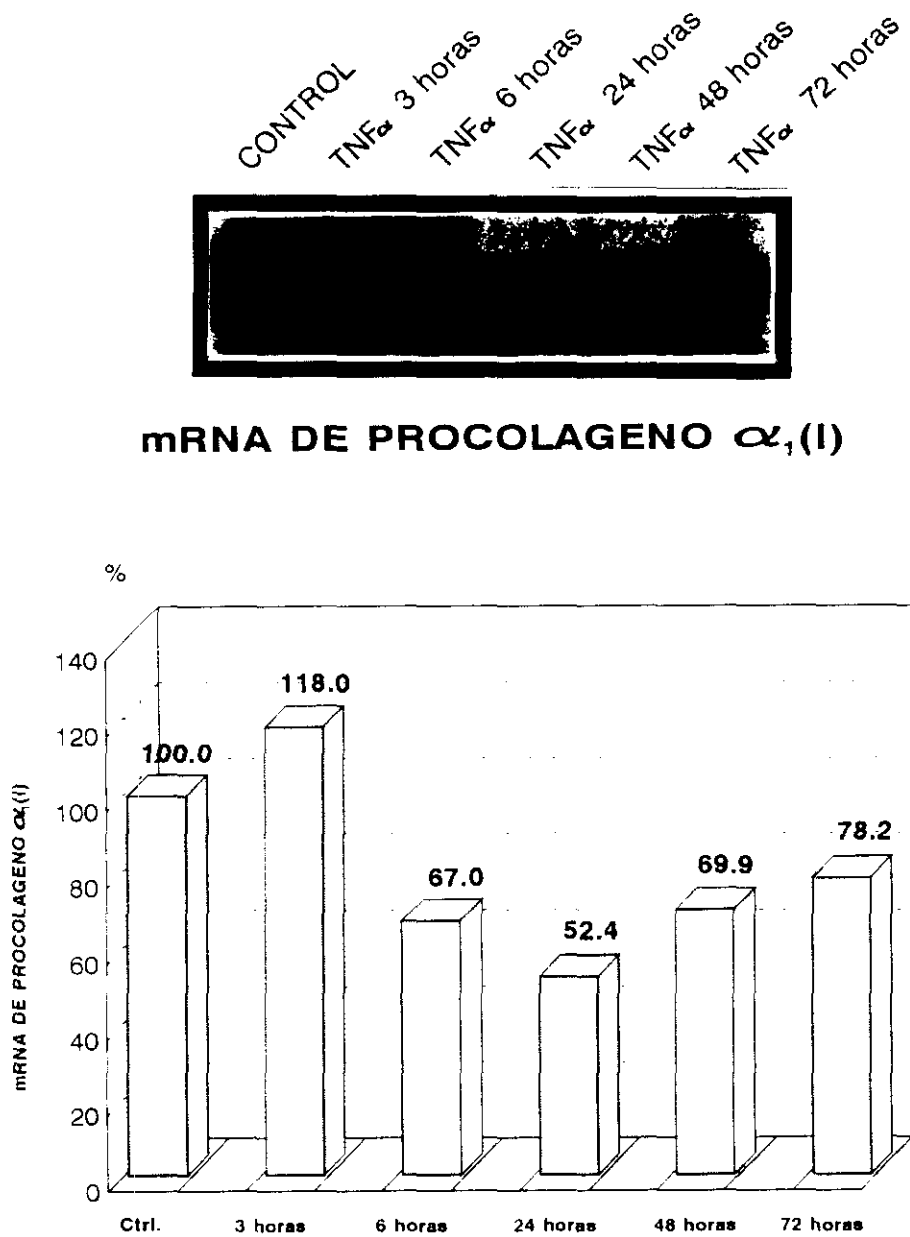
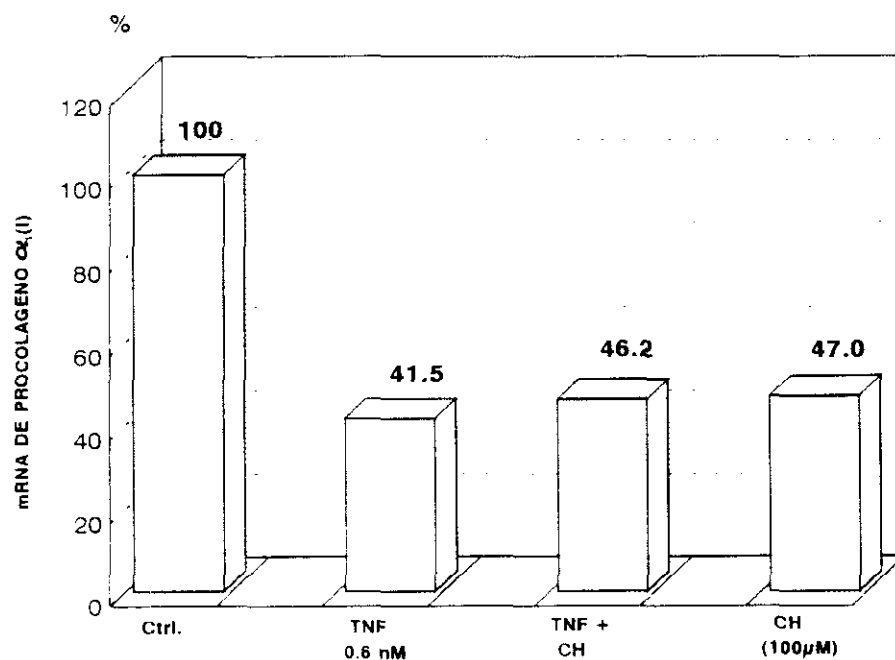
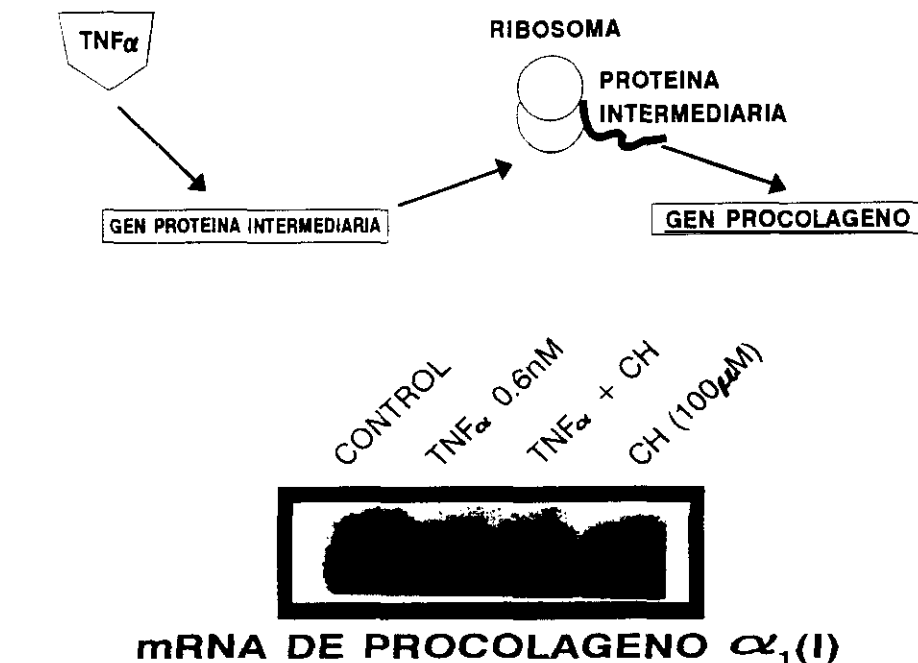


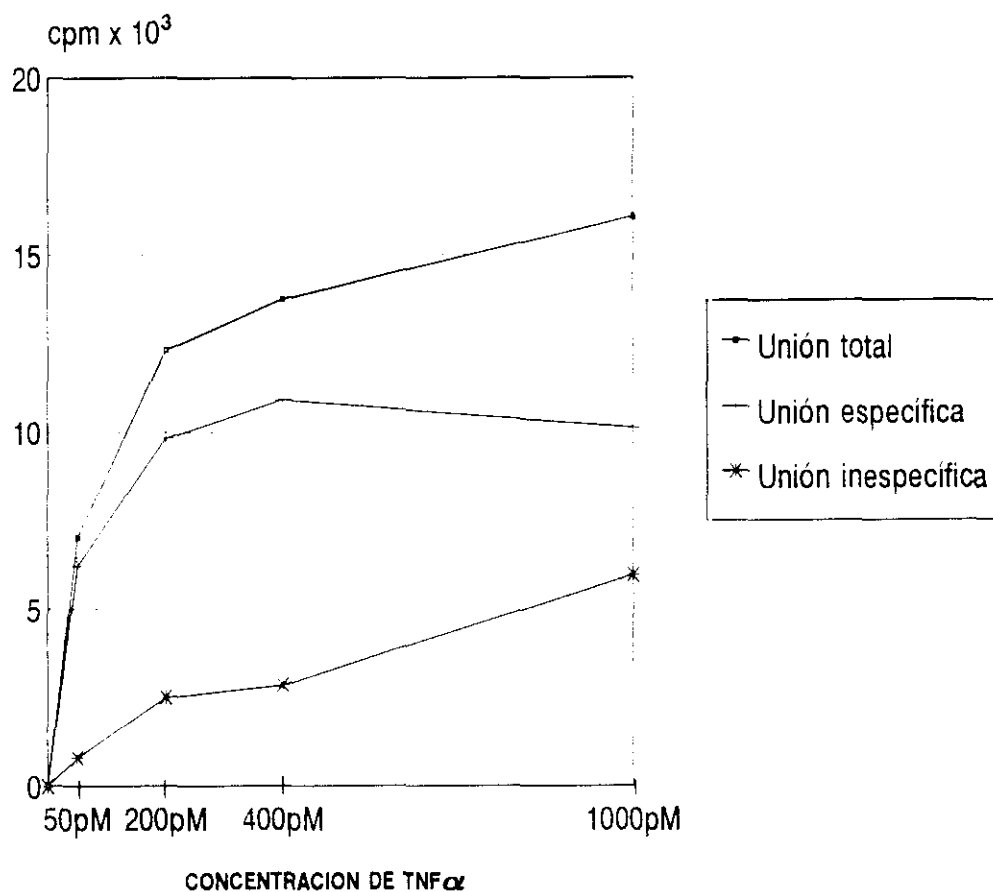
Fig. 12. Modificación de los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en células de Ito tras su exposición al TNF $\alpha$  (0.6nM) durante distintos tiempos.



**Fig. 13. Análisis del mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de lipocitos tratados con TNF $\alpha$  y cicloheximida.**

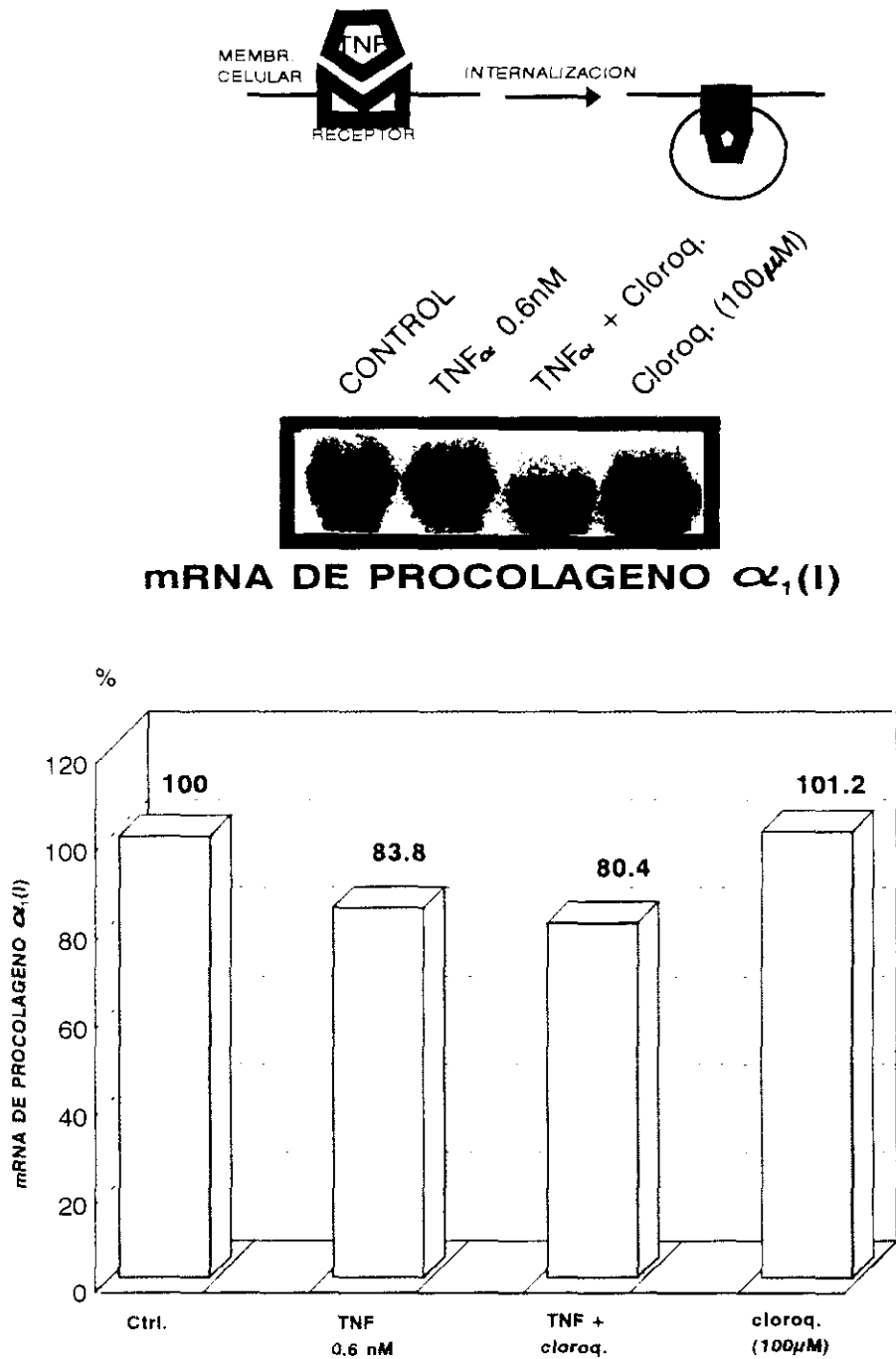
Los lipocitos se incubaron 24 horas con H-MEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal, glutamina y aminoácidos no esenciales, con TNF $\alpha$  (0.6nM), con TNF $\alpha$  (0.6nM) y cicloheximida (100 $\mu$ M), y con cicloheximida (100 $\mu$ M).





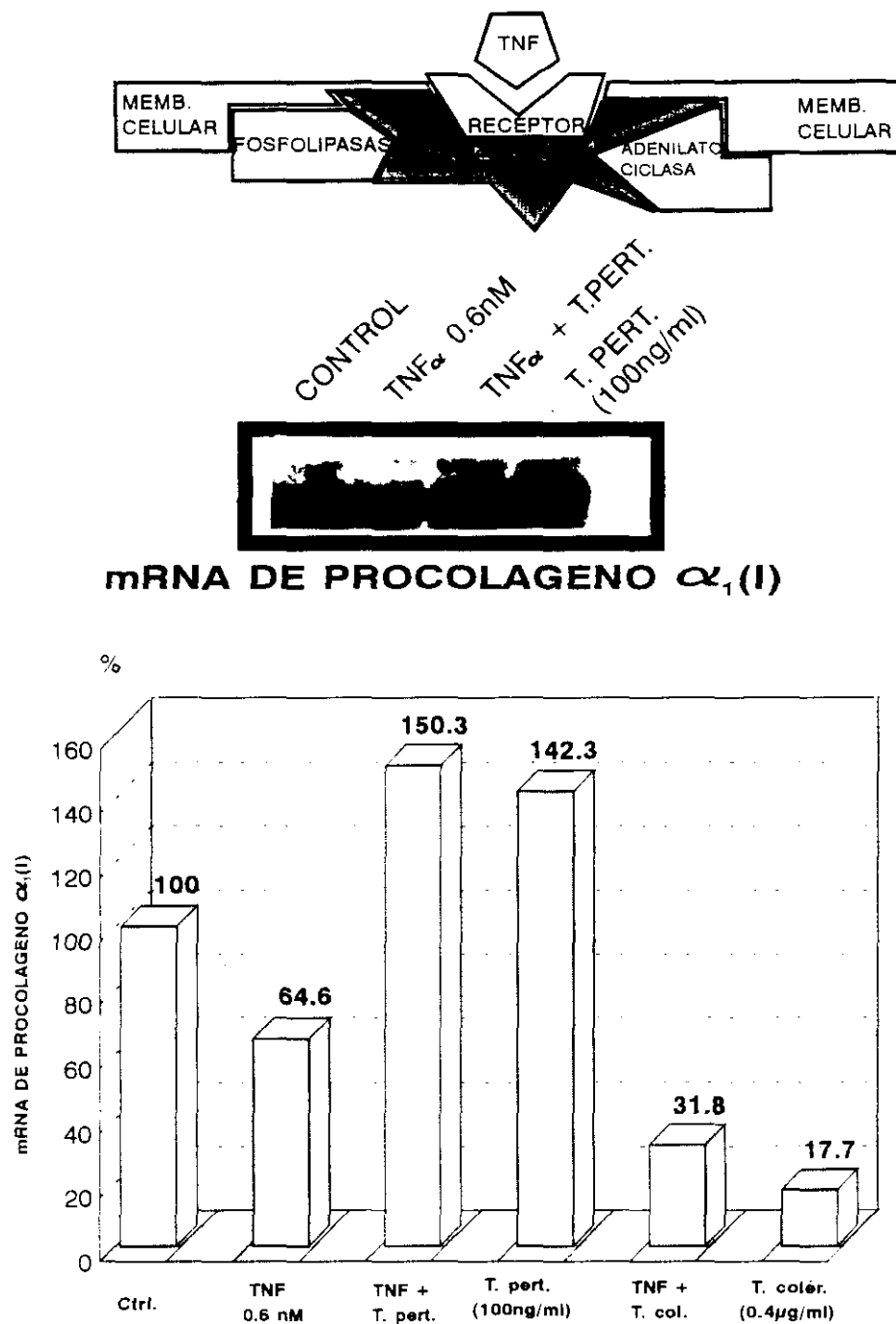
**Fig. 14. Unión del TNF $\alpha$  a sus receptores de membrana.**

Los lipocitos confluentes se incubaron con distintas concentraciones de [<sup>125</sup>I]TNF $\alpha$  y un exceso de 100 veces de TNF $\alpha$  durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron las células con H-MEM completo frío, y se lisaron con SDS (0.1%). La radiactividad se determinó en un contador gamma. Resultados obtenidos de un experimento realizado por duplicado.



**Fig. 15. Inhibición de la internalización del TNF $\alpha$  con cloroquina.**

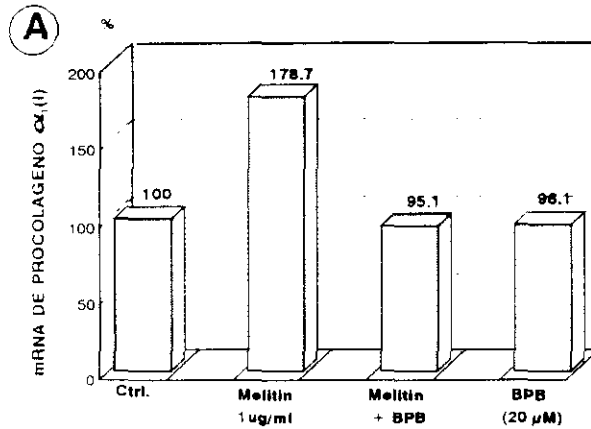
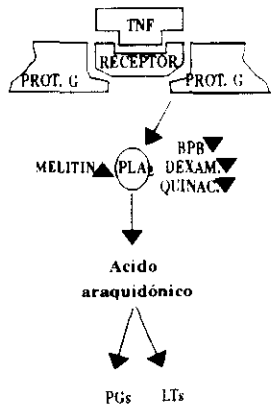
Los lipocitos en confluencia se preincubaron 2 horas con cloroquina (100 $\mu$ M), y se incubaron 24 horas con medio completo, y con TNF $\alpha$  (0.6nM).



**Fig. 16. Efecto de las toxinas ADP-ribosilantes sobre las proteínas G.**

Los cultivos celulares se preincubaron 24 horas con toxina pertussis (100ng/ml), y 2 horas con toxina colérica (0.4 $\mu$ g/ml), y se incubaron 24 horas con medio completo, y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

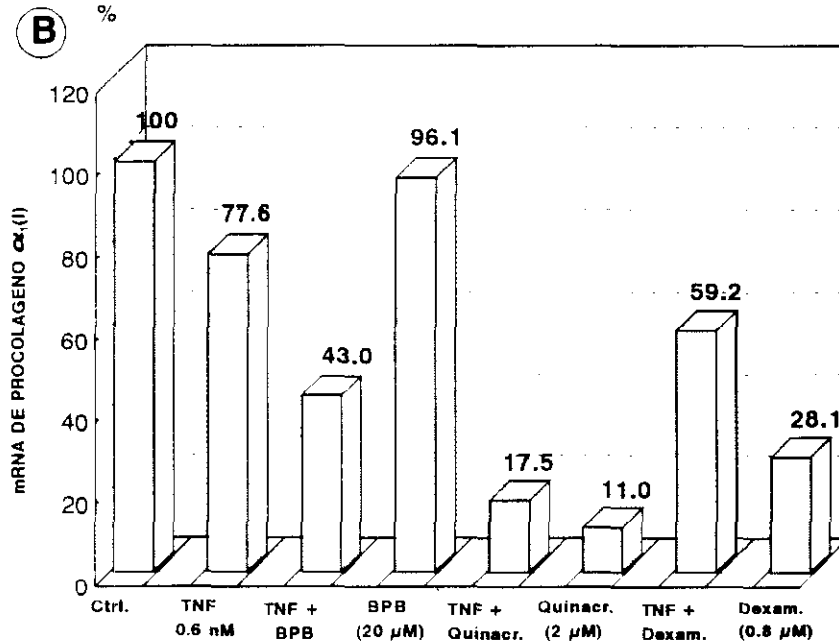
**INHIBICION**



CONTROL  
 TNF $\alpha$  0.6nM  
 TNF $\alpha$  + BPB  
 BPB (20 $\mu$ M)  
 TNF $\alpha$  + Quinac.  
 Quinac. (2 $\mu$ M)  
 TNF $\alpha$  + Dexam.  
 Dexam. (0.8 $\mu$ M)



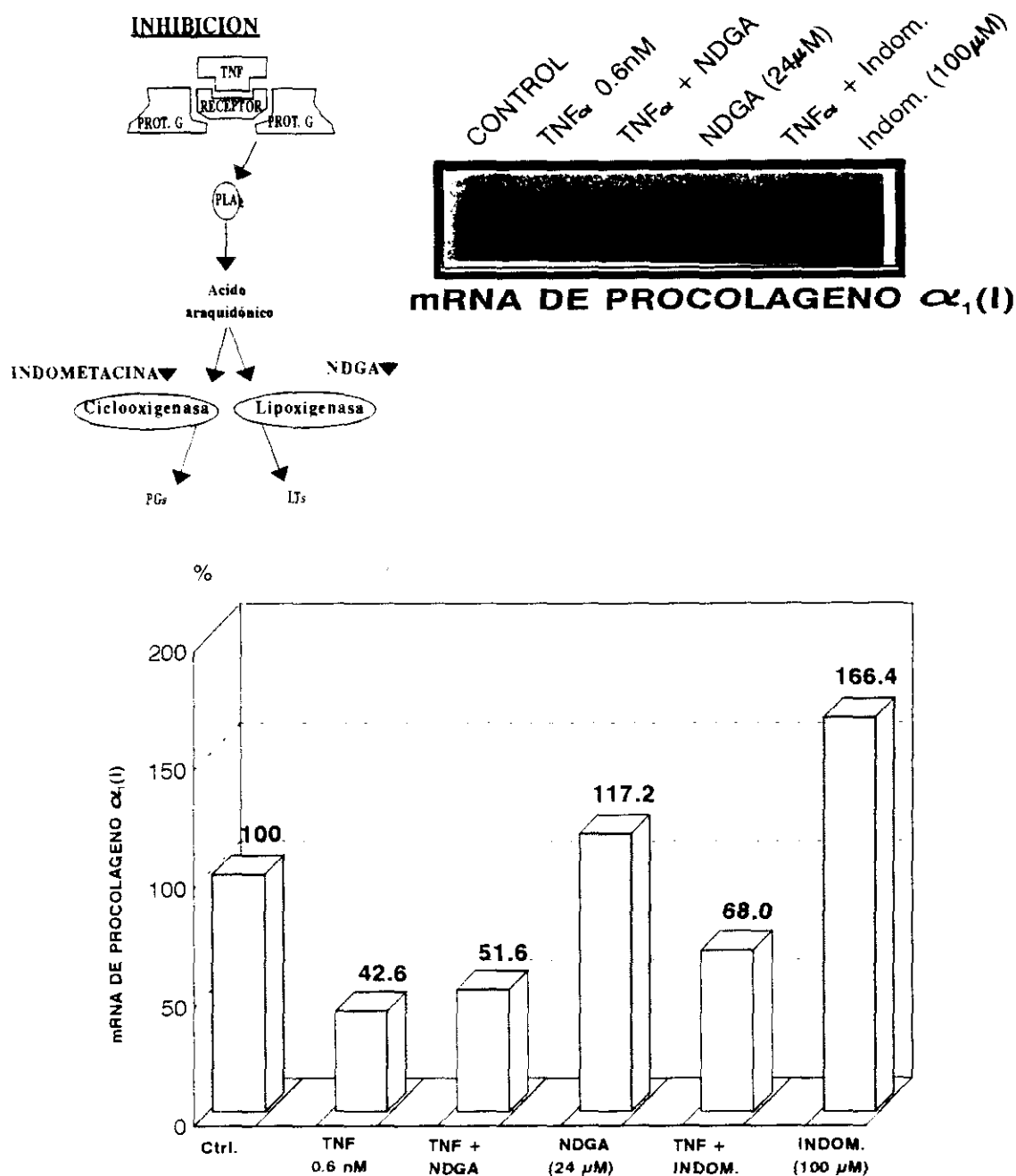
**mRNA DE PROCOLAGENO  $\alpha_1(I)$**



**Fig. 17. Efecto de distintos inhibidores de la fosfolipasa  $A_2$ .**

a. Control de la inhibición ejercida por el BPB, utilizando el melitin (1 $\mu$ g/ml) como estimulante de la PLA $_2$ .

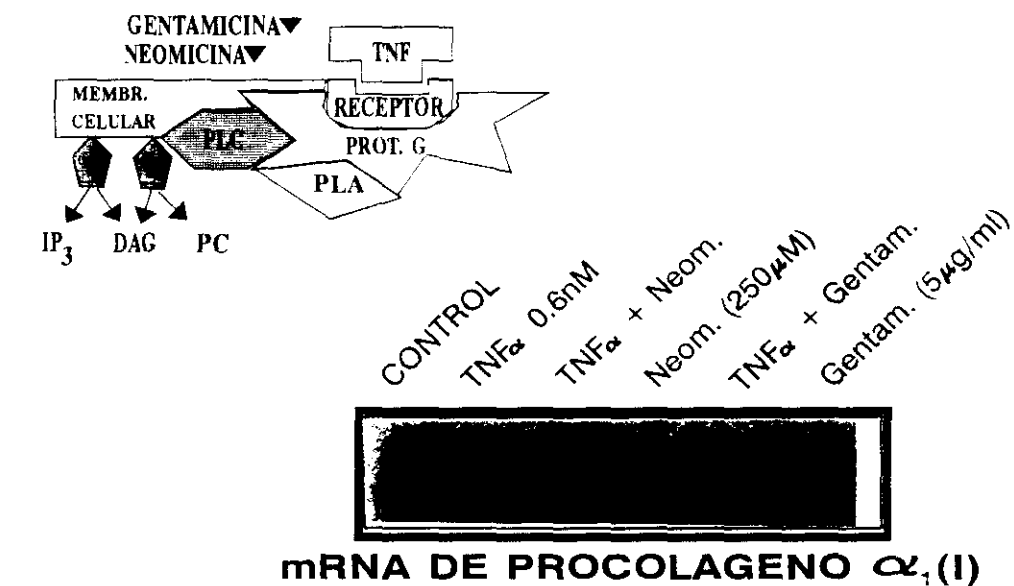
b. Los lipocitos confluentes se preincubaron con BPB (20 $\mu$ M), quinacrina (2 $\mu$ M) y dexametasona (0.8 $\mu$ M) durante 2 horas. Transcurrida la preincubación, las células se incubaron 24 horas con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).



**Fig. 18. Inhibición de la lipoxigenasa y de la ciclooxigenasa.**

Efecto de la preincubación de los cultivos durante 2 horas con NDGA (24 $\mu$ M) y con indometacina (100 $\mu$ M). Posteriormente los lipocitos se incubaron 24 horas con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

## INHIBICION



mRNA DE PROCOLAGENO  $\alpha_1(I)$

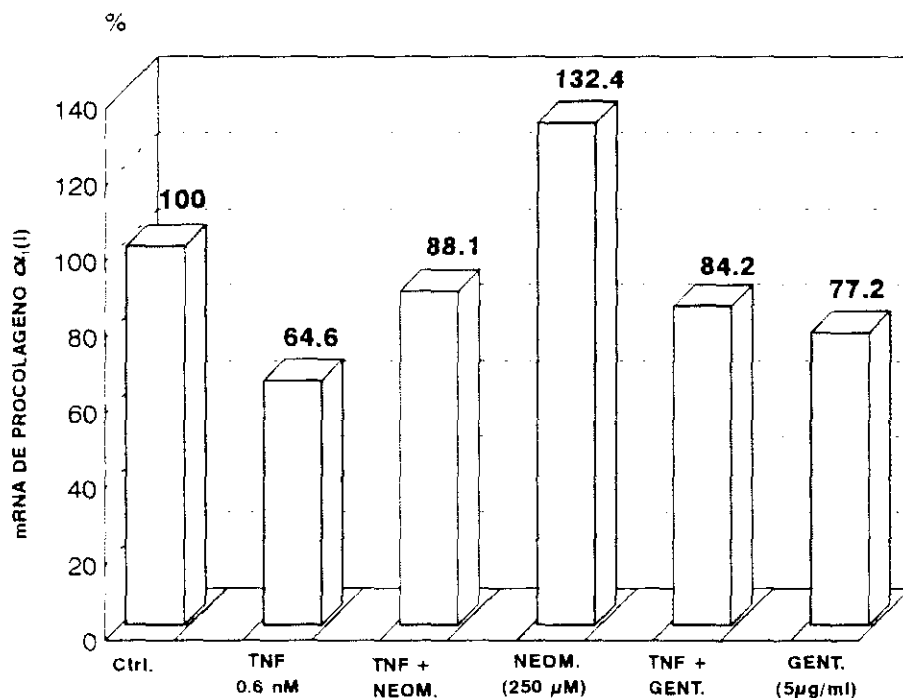


Fig. 19. Inhibición de la fosfolipasa C.

Los lipocitos se preincubaron 2 horas con neomicina (250 $\mu$ M) y con gentamicina (5 $\mu$ g/ml), y se incubaron 24 horas en medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

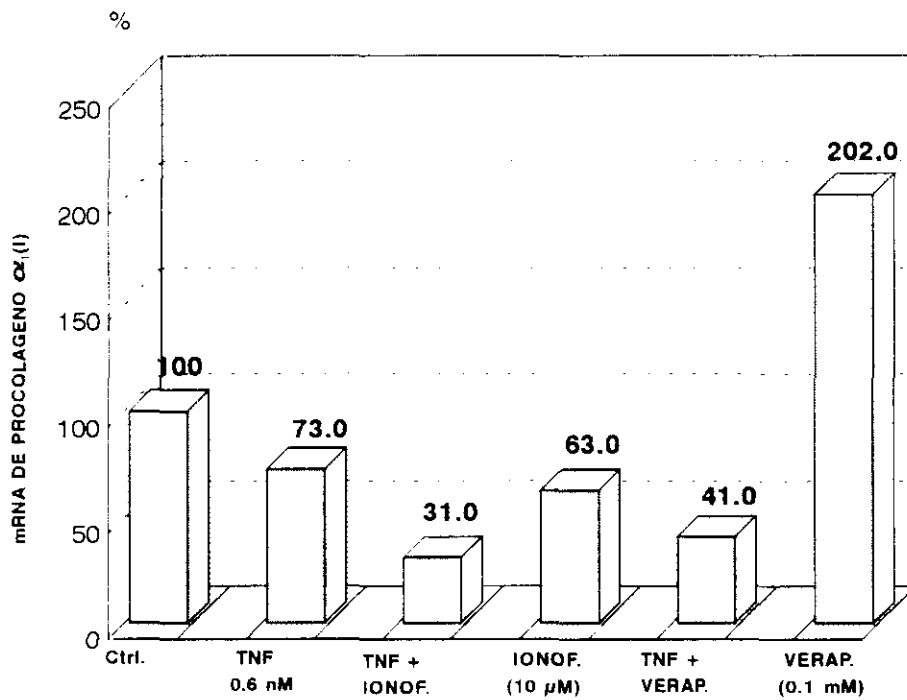
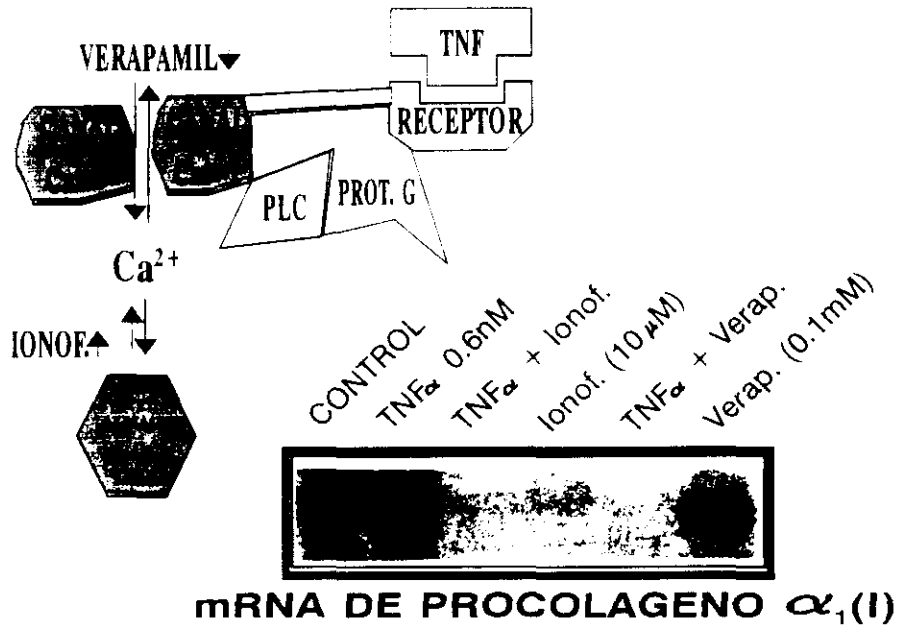
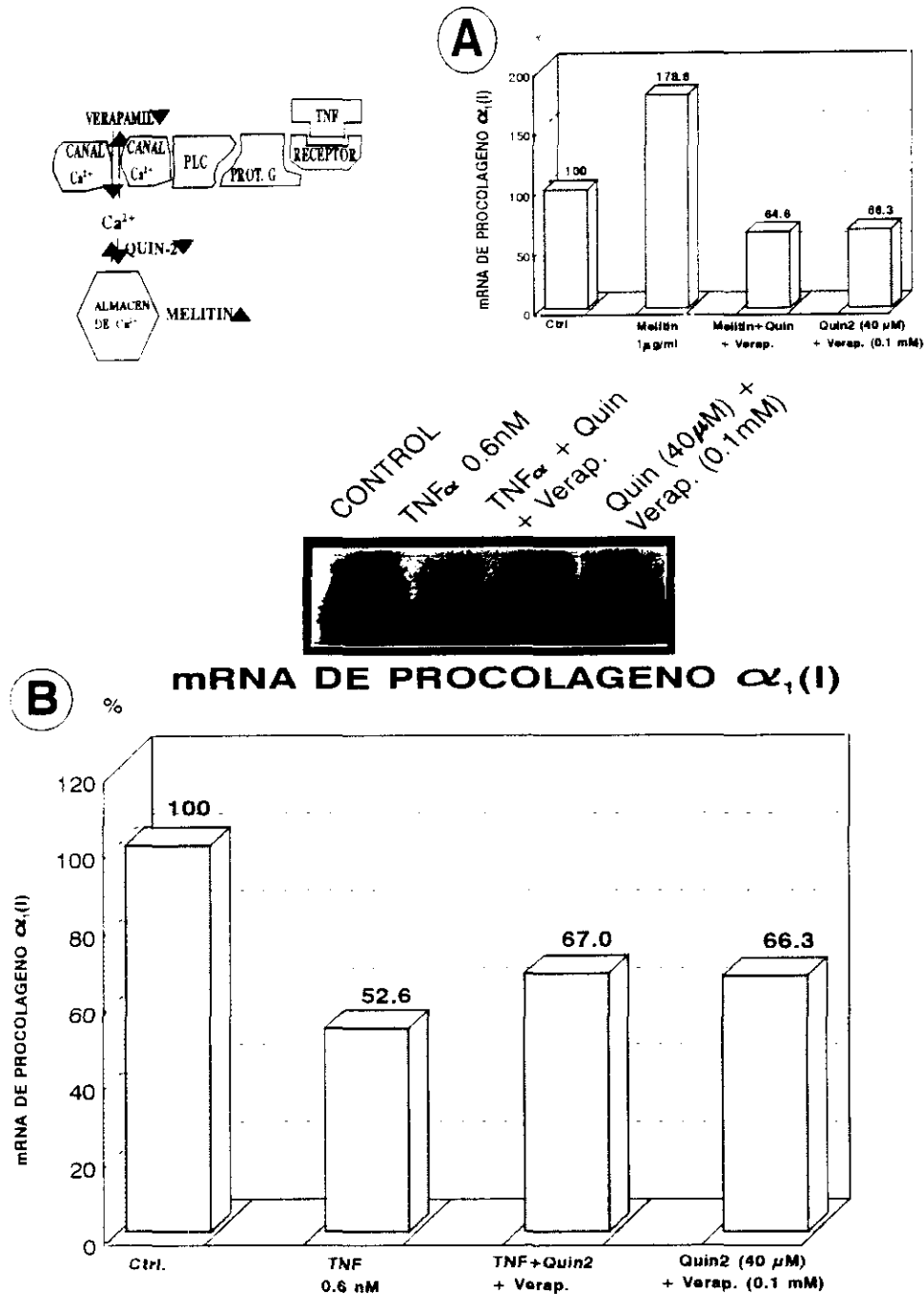


Fig. 20. Efecto del calcio citosólico sobre el mRNA de procolágeno α<sub>1</sub>(I).

Los lipocitos confluentes se preincubaron 2 horas con verapamil (10mM) y se incubaron 24 horas con medio completo sin y con TNFα (0.6nM) y con ionóforo A23187 (10μM).



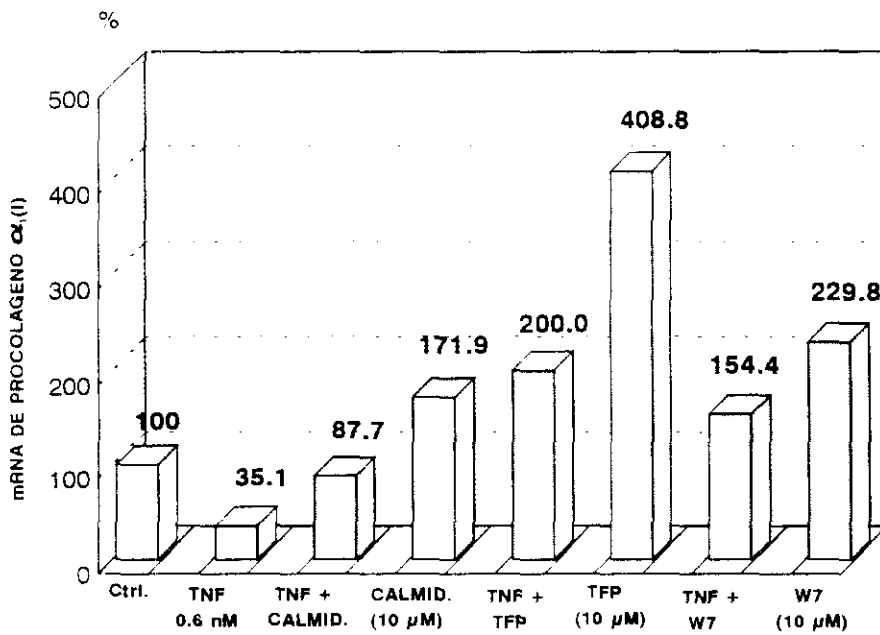
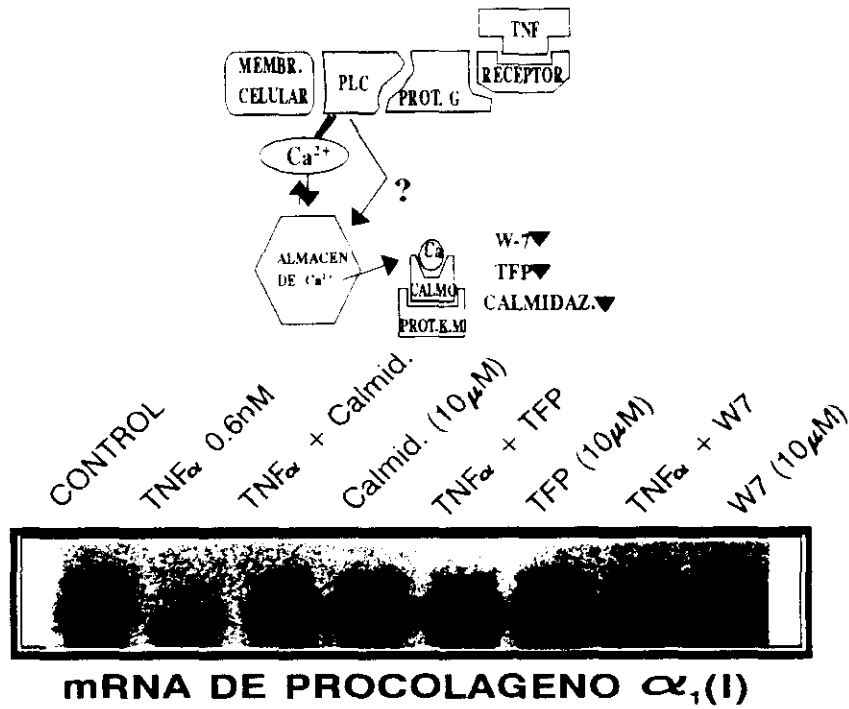
**Fig. 21. Efecto del TNF $\alpha$  sobre la movilización del calcio.**

a. Control de la inhibición ejercida por el verapamil y el Quin-2/AM, utilizando el melitin (1  $\mu$ g/ml) como inductor de la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los almacenes intracelulares.

b. Los lipocitos se preincubaron 2 horas con Quin-2/AM (40  $\mu$ M) para evitar la movilización del calcio intracelular, y con verapamil (0.1mM) para impedir la entrada y la salida de calcio en la célula. La incubación de 24 horas se realizó en medio completo sin TNF $\alpha$  y con TNF $\alpha$  (0.6nM).



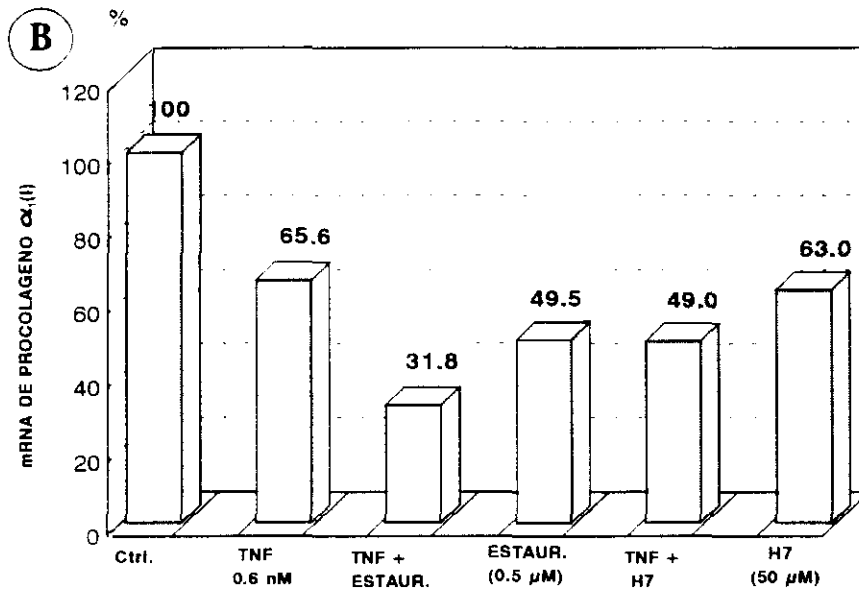
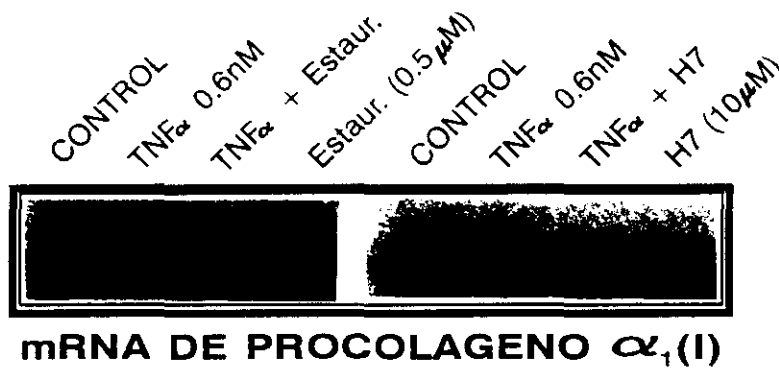
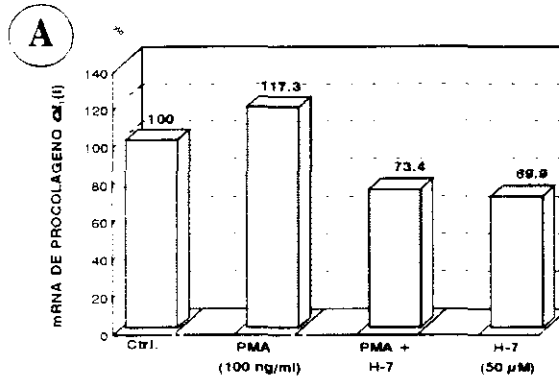
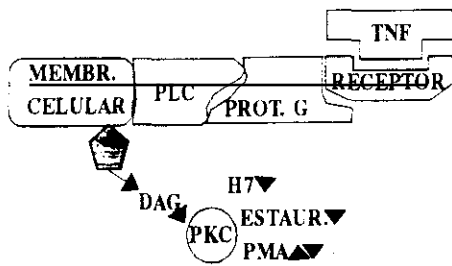
**INHIBICION**



**Fig. 22. Inhibición de la calmodulina.**

La preincubación con el calmidazolium (10 $\mu$ M), con TFP (10 $\mu$ M) y con W-7 (10 $\mu$ M) se realizó durante 2 horas. Tras ella, las células se incubaron 24 horas con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

**INHIBICION**

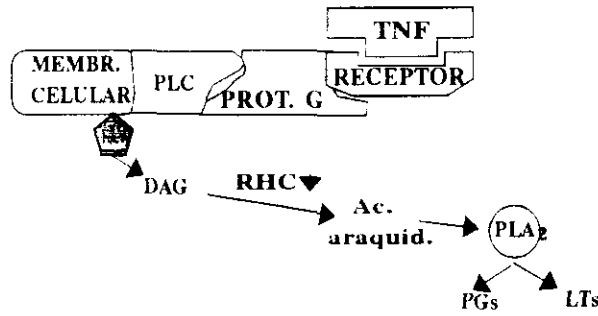


**Fig. 23. Inhibición de la proteinquinasa C.**

a. Control de la inhibición ejercida por el H-7, siendo el PMA (100ng/ml) el estimulante de la PKC.

b. Los lipocitos en confluencia se preincubaron 2 horas con estaurosporina (0.5 $\mu$ M) y con H-7 (50 $\mu$ M). Transcurrido este tiempo, se mantuvo una incubación de 24 horas con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

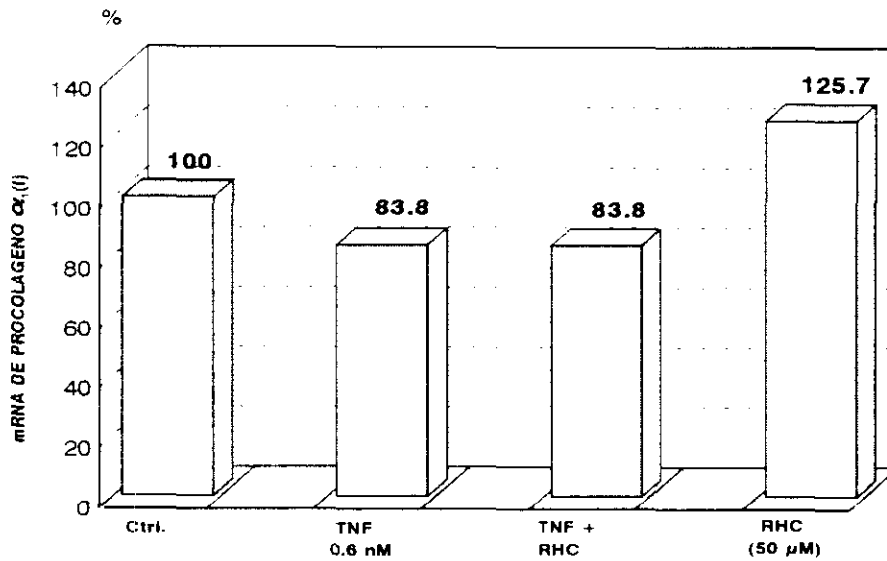
**INHIBICION**



CONTROL  
 TNF $\alpha$  0.6nM  
 TNF $\alpha$  + RHC  
 RHC (50 $\mu$ M)



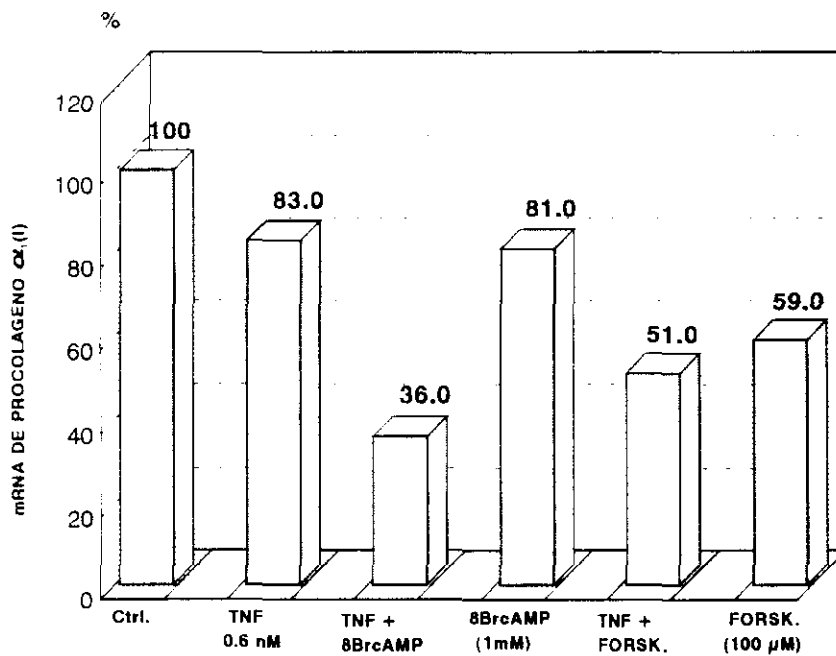
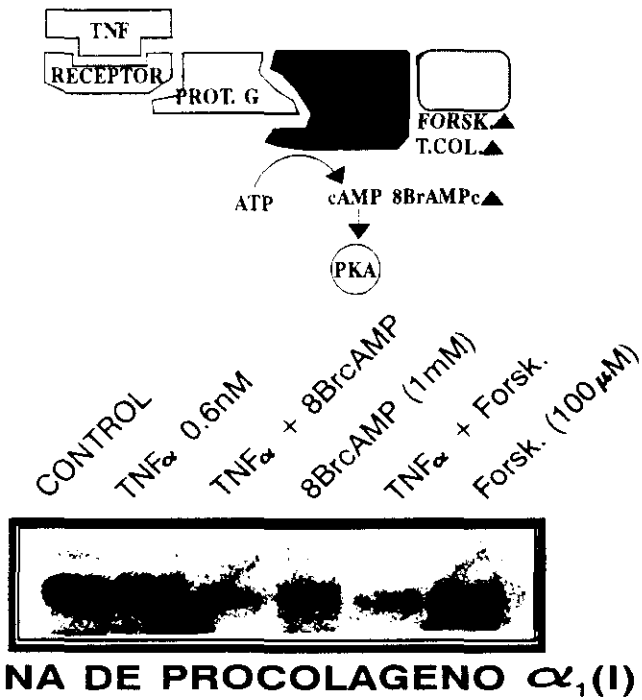
**mRNA DE PROCOLAGENO  $\alpha_1(I)$**



**Fig. 24. Inhibición de la diacilglicerol lipasa.**

El cultivo celular se preincubó 2 horas con RHC80267 (50 $\mu$ M), y se incubó 24 horas en medio completo, sin y con TNF $\alpha$  (0.6nM).

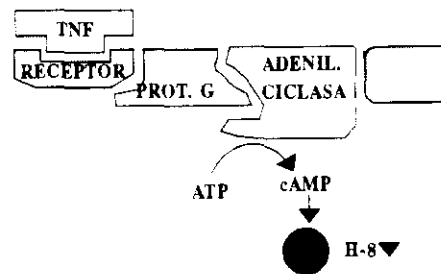
**ESTIMULACION**



**Fig. 25. Efecto del cAMP sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .**

Los cultivos celulares se incubaron durante 24 horas en medio completo, con TNF $\alpha$  (0.6nM), con 8Br-cAMP (1mM) y con forskolina (100 $\mu$ M).

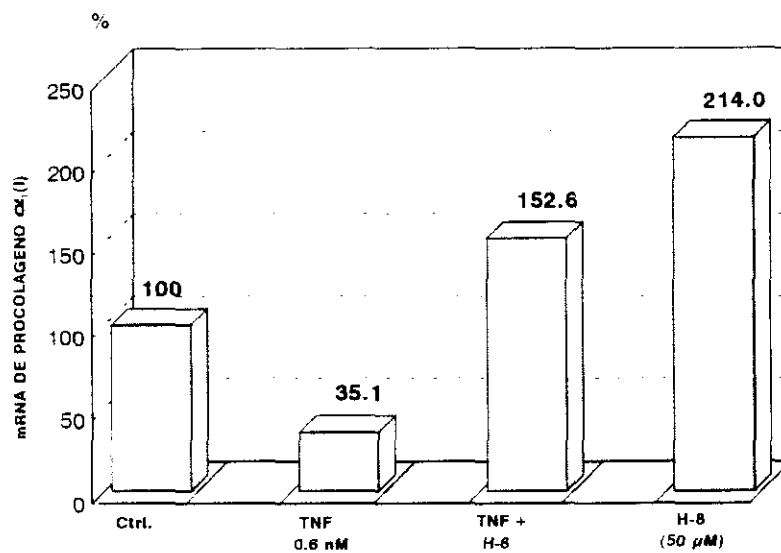
**INHIBICION**



CONTROL  
 TNF $\alpha$  0.6nM  
 TNF $\alpha$  + H8  
 H8 (50 $\mu$ M)

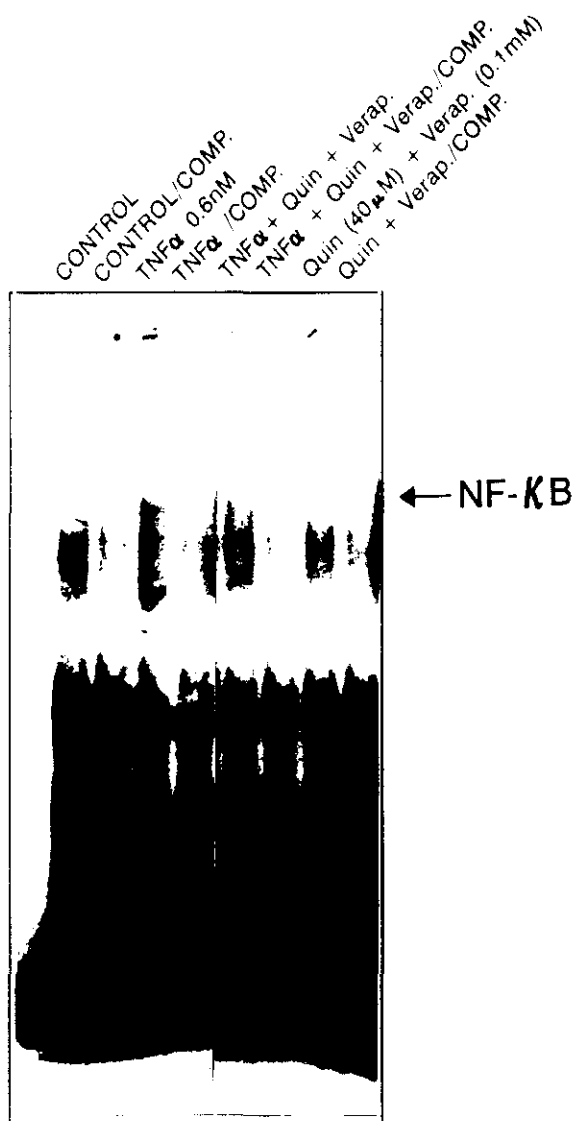


**mRNA DE PROCOLAGENO  $\alpha_1(I)$**



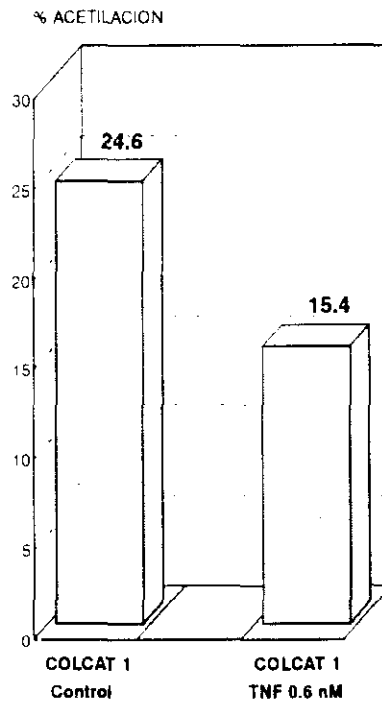
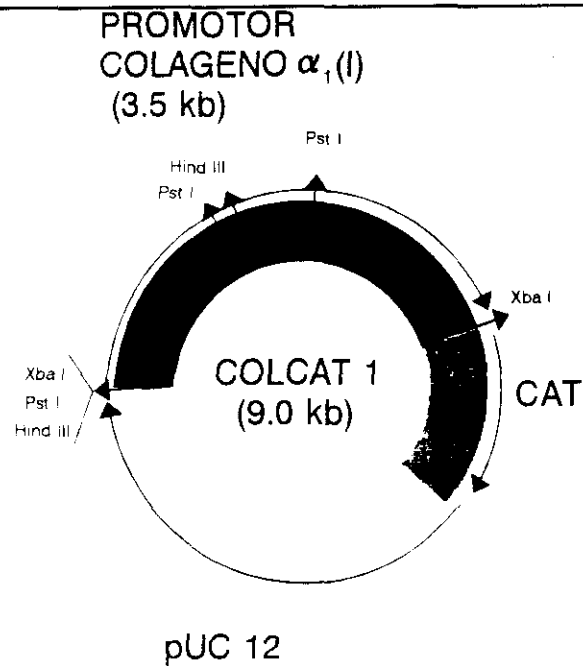
**Fig. 26. Inhibición de la proteinquinasa A.**

Los lipocitos se preincubaron durante 2 horas con H-8 (50 $\mu$ M), y se incubaron 24 horas en medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM).



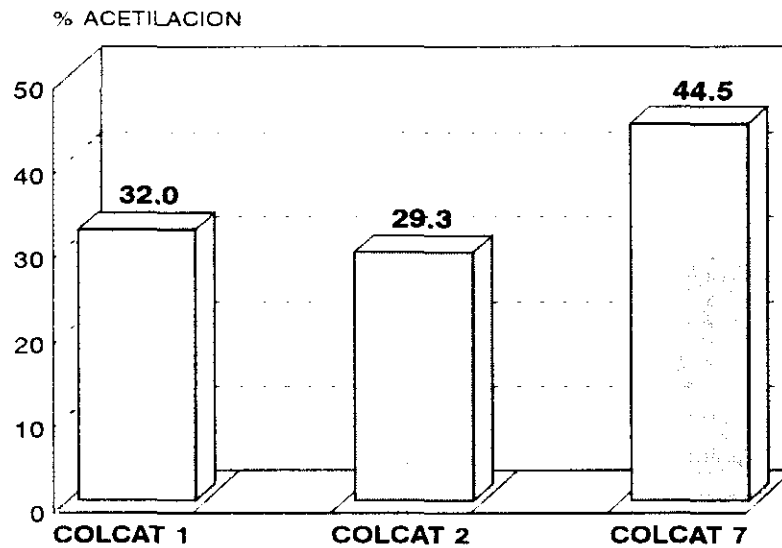
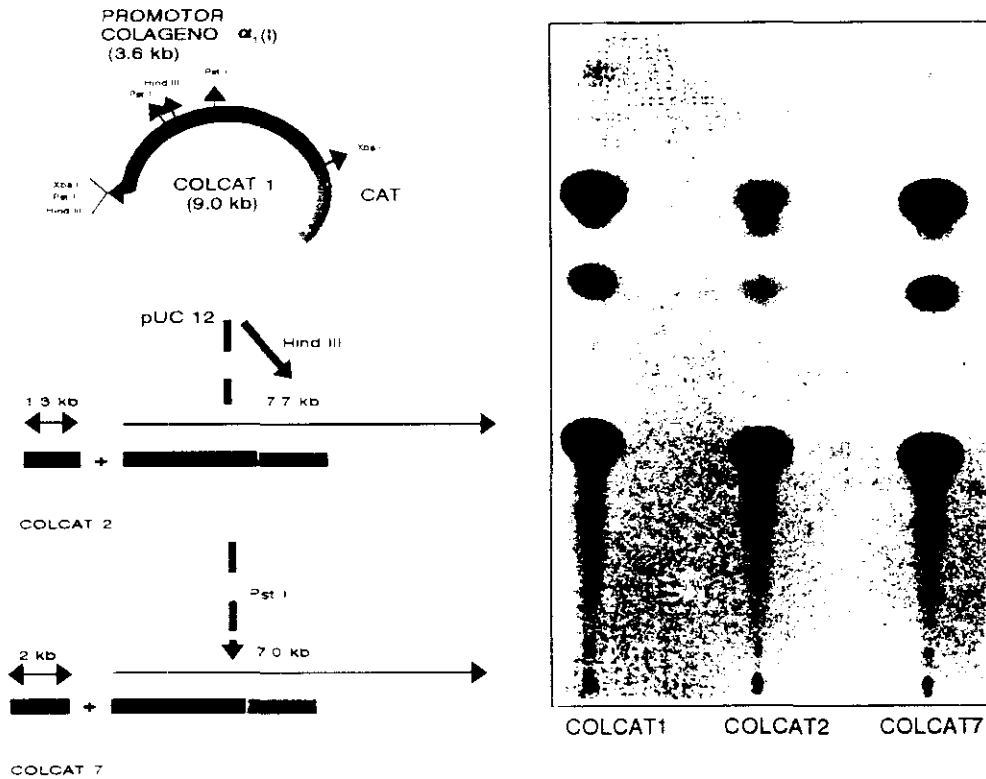
**Fig. 27. Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en los lipocitos en cultivo.**

El cultivo celular de células de Ito en confluencia se preincubó 2h con Quin-2/AM (40 $\mu$ M) y verapamil (0.1mM) y posteriormente se incubó 24h con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM). Los extractos nucleares se obtuvieron como se indica en el punto 3.10.1., y la especificidad de la unión se comprobó realizando reacciones de competición paralelas con un exceso de sonda fría.



**Fig. 28. Efecto del TNF $\alpha$  sobre el promotor del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata.**

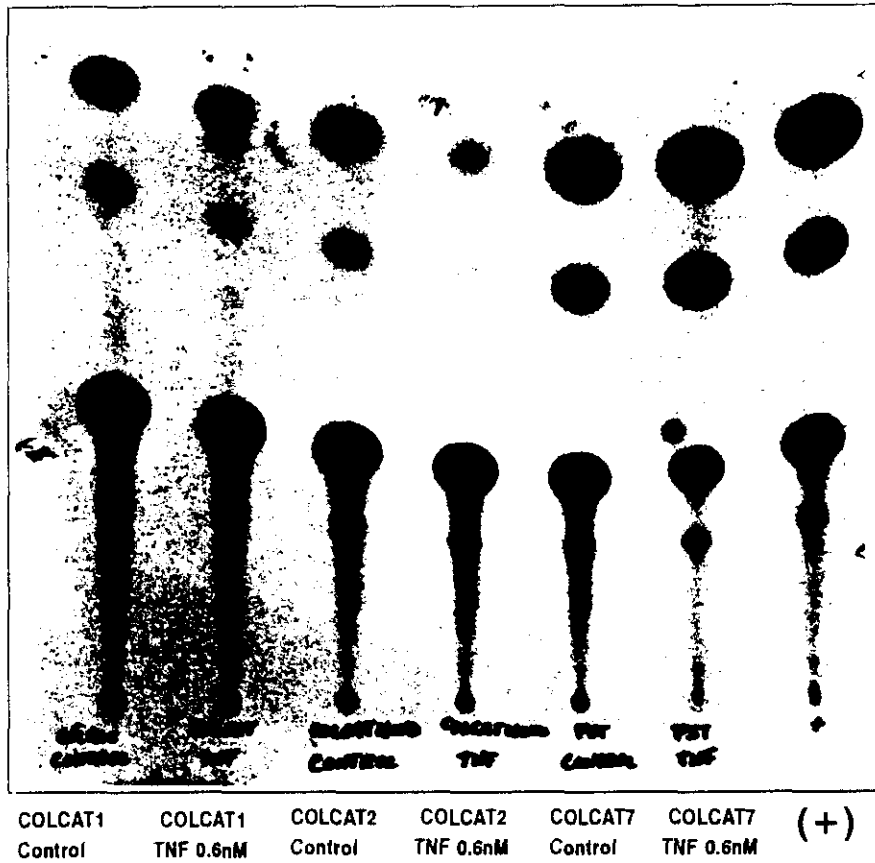
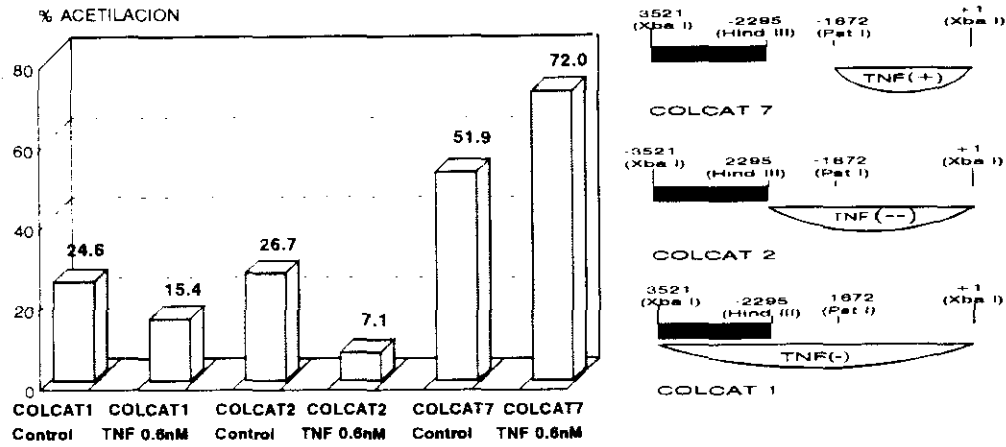
10.10<sup>6</sup> células se transfectaron por electroporación con 18 $\mu$ g de plásmido COLCAT1 y se dividieron en dos frascos Roux (Ver punto 3.10.2). Tras 24 horas a 37<sup>o</sup>C en medio completo, se incubaron otras 24 horas con medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM). Posteriormente, se recogieron las células y se determinó la actividad cloranfenicol acetiltransferasa en el lisado celular. Los valores son los porcentajes de cloranfenicol acetilado por cada 5.10<sup>6</sup> células.



**Fig. 29. Actividad de las distintas regiones del promotor de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .**

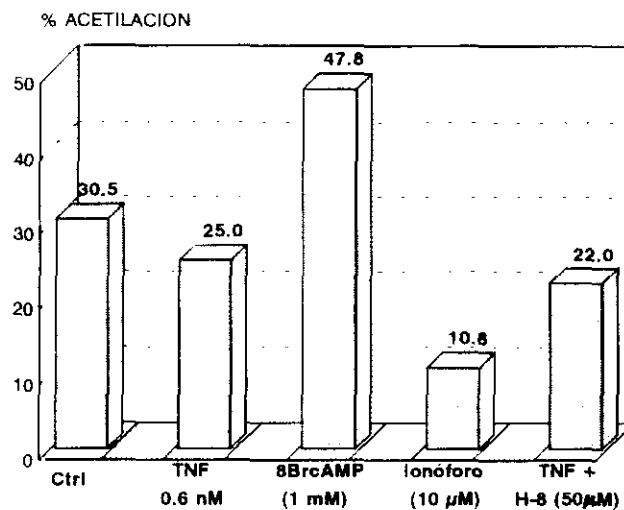
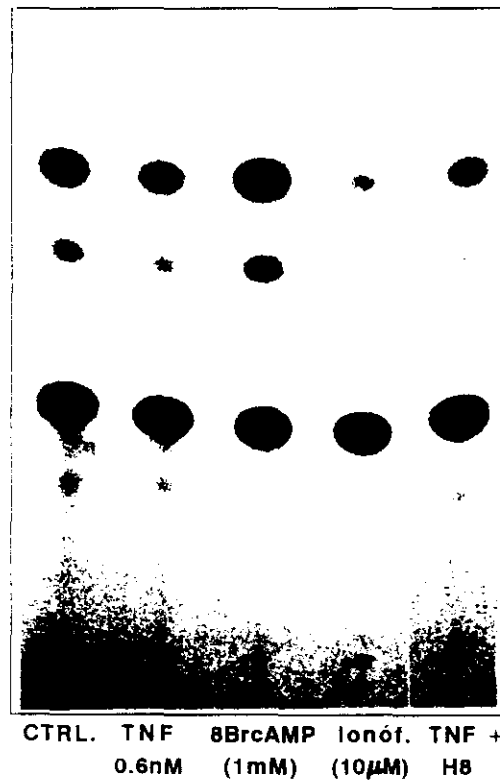
$5 \cdot 10^6$  células se transfectaron por electroporación con  $9 \mu\text{g}$  de LTR-LUC junto con  $9 \mu\text{g}$  de COLCAT 1, de COLCAT 2 y de COLCAT 7. Tras 48 horas de incubación, se recogieron las células, y en una alícuota se determinó la actividad luciferasa, y en otra la actividad clorantfenicol acetiltransferasa. Esta última actividad se normalizó respecto a la primera. Los porcentajes representan el clorantfenicol acetilado por  $5 \cdot 10^6$  células.





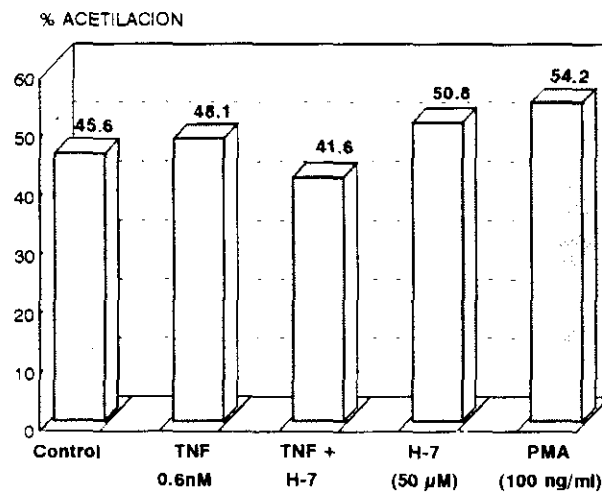
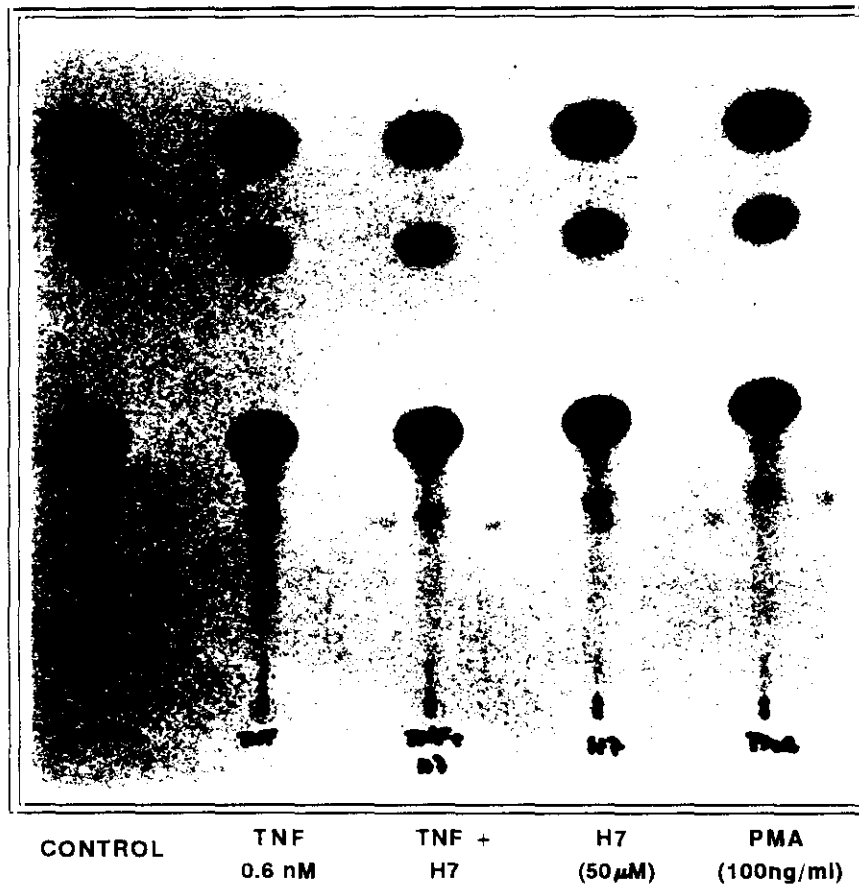
**Fig. 30. Efecto del TNF $\alpha$  sobre distintas regiones del promotor.**

10.10<sup>6</sup> células se transfectaron con COLCAT 1 (18 $\mu$ g), con COLCAT 2 (18 $\mu$ g) y con COLCAT 7 (18 $\mu$ g). Las células transfectadas con el mismo DNA se dividieron en dos frascos Roux, y se incubaron 24 horas. Posteriormente se realizó la incubación de 24 horas en medio completo y con TNF $\alpha$  (0.6nM), y se determinó la actividad cloranfenicol acetiltransferasa. Los resultados son el porcentaje de cloranfenicol acetilado por 5.10<sup>6</sup> células.



**Fig. 31. Vías efectoras de la acción del  $\text{TNF}\alpha$  sobre COLCAT 2.**

$20 \cdot 10^6$  lipocitos se transfectaron por electroporación con COLCAT 2 ( $45 \mu\text{g}$ ), y se repartieron en cinco frascos Roux. Tras 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , las células se incubaron 24 horas con medio completo, con  $\text{TNF}\alpha$  ( $0.6 \text{ nM}$ ), con 8Br-cAMP ( $1 \text{ mM}$ ), con ionóforo A23187 ( $10 \mu\text{M}$ ), y con  $\text{TNF}\alpha$  y H8 (preincubación de 2h,  $50 \mu\text{M}$ ). Los resultados expresan los porcentajes de cloranfenicol acetilado por  $5 \cdot 10^6$  células.



**Fig. 32. Vías efectoras de la acción del  $\text{TNF}\alpha$  sobre COLCAT 7.**

$20 \cdot 10^6$  lipocitos se transfectaron por electroporación con COLCAT 7 ( $45 \mu\text{g}$ ) y se repartieron en cinco frascos Roux. Tras 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , las células se incubaron con medio completo, con  $\text{TNF}\alpha$  (0.6nM), con  $\text{TNF}\alpha$  y H-7 (preincubación de 2h), con H7 ( $50 \mu\text{M}$ ) y con PMA (100ng/ml). Los resultados son los porcentajes de cloranfenicol acetilado por  $5 \cdot 10^6$  células.

## 5. DISCUSSION

En la fibrosis hepática el hecho más importante es la deposición excesiva de colágeno. En este proceso los lipocitos liberan distintos factores de crecimiento y citoquinas, y responden a estos y a otros factores y citoquinas producidos por otras células alterando su morfología y/o la síntesis de distintos componentes de matriz extracelular, principalmente de colágeno.

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto del TNF $\alpha$  (citoquina liberada principalmente por el sistema monocito-macrófago) sobre la síntesis de colágeno por los lipocitos hepáticos de rata en cultivo.

El TNF $\alpha$  tiene un efecto claramente inhibitorio sobre la producción de colágeno, tanto en los lipocitos como en otras líneas celulares ensayadas (fibroblastos humanos y células NIH 3T3). Este descenso era selectivo del colágeno, ya que no existía variación en la incorporación de radiactividad a la fracción de proteínas totales, y dependiente de la dosis de TNF $\alpha$ , siendo mayor la inhibición a la concentración de 1.2nM. Otros autores han descrito este mismo efecto del TNF $\alpha$  en células de osteosarcoma, en distintas líneas de fibroblastos, en el cultivo de hueso fetal de rata, y también en lipocitos (Bertolini *et al.*, 1986; Solís-Herruzo *et al.*, 1988; Mauviel *et al.*, 1988; Matsuoka *et al.*, 1989; Armendariz-Borunda *et al.*, 1992). Duncan y Berman (1989) y Elias *et al.* (1990), sin embargo, observaron un incremento en la síntesis de colágeno inducido por la misma citoquina. Una posible explicación de esta discrepancia sería la utilización de distintas líneas celulares, o que las condiciones de los ensayos no son las mismas.

En muchos casos, la proliferación de las células da lugar a una disminución generalizada de la síntesis de proteínas de matriz extracelular, y en concreto de colágeno. Sin embargo, la disminución observada no era debida a los posibles efectos proliferativos de la citoquina. Aunque el TNF $\alpha$  induce la proliferación celular, en nuestro trabajo sólo utilizamos cultivos confluentes, en los cuales no es posible este efecto. Por ello, los valores de timidina tritiada incorporada al DNA en las células tratadas con TNF $\alpha$  fueron similares a los de los controles.

También han sido ampliamente descritos los efectos citotóxicos de esta citoquina en muchas líneas celulares, que podrían explicar una disminución en la producción de colágeno. Sin embargo, la liberación de la enzima citoplasmática LDH y el número de células viables fueron similares a los que presentaron las células control.

Una disminución en la producción de colágeno puede deberse a una alteración en alguno de los procesos que sufre la molécula de procolágeno, o en la disponibilidad de algún aminoácido indispensable para su formación (Peters *et al.*, 1989). En este estudio, la inhibición de la producción de colágeno inducida por el TNF $\alpha$  no era debida a la ausencia de prolina en las células, ni a una alteración en los mecanismos de hidroxilación o de secreción del procolágeno, ya que los valores de estos tres parámetros en las células tratadas no diferían de los obtenidos en las controles.

Aunque se ha descrito que el TNF $\alpha$  induce la síntesis de colagenasa en fibroblastos (Dayer *et al.*, 1985; Brenner *et al.*, 1989), y esto explicaría el descenso en la producción de colágeno, esta citoquina también reduce la cuantía de los mRNA de distintos procolágenos (Solís-Herruzo *et al.*, 1988; Centrella *et al.*, 1988; Scharffetter *et al.*, 1989; Weiner *et al.*, 1989). Este hecho se comprobó en nuestro trabajo, donde observamos que la disminución de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  era dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al TNF $\alpha$ , siendo máximo el descenso en las células tratadas con 0.6nM de TNF $\alpha$  durante 24 horas. Por lo tanto, el TNF $\alpha$  disminuye los niveles de procolágeno  $\alpha_1(I)$  actuando, al menos, a nivel pretraduccional.

El bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida produjo en las células tratadas una anulación del efecto inhibitor del TNF $\alpha$ . El TNF $\alpha$  precisa, por tanto, de la síntesis *de novo* de una proteína para ejercer su efecto inhibitor sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Esta mediación de otra u otras proteínas explicaría la aparición tardía del efecto estudiado (máximo a las 24 horas), y está en concordancia con el descrito por Solís-Herruzo *et al.* (1988) en fibroblastos tratados con TNF $\alpha$  y cicloheximida.

El TNF $\alpha$  inicia su acción mediante su unión a receptores específicos situados en la

membrana celular. Probablemente el tipo de receptor mayoritario activado por el TNF $\alpha$  en las condiciones en que se ha desarrollado este trabajo es el de 55kDa, ya que este receptor es indispensable y suficiente para mediar la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  (Kruppa *et al.*, 1992), y porque no es sensible a la modulación por cAMP (Hohmann *et al.*, 1990). Además, no parece ser precisa la internalización del complejo TNF $\alpha$ -receptor para desarrollar el efecto sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

El estudio de la naturaleza de la proteína G asociada al receptor del TNF $\alpha$  mostró que se trata de una proteína sensible a toxina pertussis, ya que la preincubación de las células con este inhibidor previene el efecto de la citoquina sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . La implicación de este tipo de proteína G sensible a toxina pertussis ha sido descrita en otras acciones desencadenadas por el TNF $\alpha$  (Hepburn *et al.*, 1987; Yamato *et al.*, 1989), pero en nuestro conocimiento no existe ninguna publicación respecto a la proteína G relacionada con el efecto de esta citoquina sobre la producción de colágeno.

Una posible vía activada por la proteína G es la ruta del ácido araquidónico. Mientras que la inhibición de la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> con BPB no modificó los niveles basales de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , tanto la quinacrina como la dexametasona produjeron un potente descenso en estos niveles. Este efecto de la dexametasona, y en general de los esteroides, sobre la síntesis de colágeno ya ha sido descrito previamente por numerosos autores (Raghow *et al.*, 1986; Weiner *et al.*, 1987; Oikarinen *et al.*, 1988), y probablemente sea debido a su capacidad de incrementar la entrada de calcio en la célula (Kato *et al.*, 1992).

La inhibición de la PLA<sub>2</sub> mediante el BPB en las células tratadas con TNF $\alpha$  produjo un descenso mucho más acusado en los niveles de mRNA de procolágeno, mientras que la inhibición ejercida por la dexametasona sobre la misma vía dió lugar a un efecto aditivo. Ambos resultados indicaron que es improbable que la PLA<sub>2</sub> sea mediadora de la inhibición inducida por el TNF $\alpha$ .

Las vías principales de metabolización del ácido araquidónico, la vía de la lipooxigenasa y la vía de la ciclooxigenasa, inhibidas con NDGA y con indometacina respectivamente, tampoco parecen estar implicadas de forma importante en el efecto provocado por el TNF $\alpha$ . Aunque se ha descrito un aumento de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos tratados con TNF $\alpha$ , la indometacina no previene la inhibición de la síntesis de distintos tipos de colágenos desencadenada por la citoquina (Dayer *et al.*, 1985; Lefevre *et al.*, 1990; Mauviel

*et al.*, 1991). Hay que destacar que la indometacina anula una vía negativa en la síntesis de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ ; posiblemente la síntesis endógena de prostaglandinas sea un mecanismo utilizado por la célula para controlar la síntesis excesiva de colágeno. El efecto de las prostaglandinas podría estar mediado por el cAMP (Hakeda *et al.*, 1986).

Los resultados referentes a la modulación del colágeno por las prostaglandinas y la inhibición ejercida por la indometacina están en clara contradicción con los descritos por Nagai (1989) en preosteoblastos, posiblemente por ser células poco diferenciadas, y presentar una regulación de la síntesis de colágeno distinta.

El efecto del  $TNF\alpha$  es sensible a la inhibición ejercida por la gentamicina (inhibidora de las fosfolipasas  $A_1$ ,  $A_2$  y C), pero no a la de la neomicina (inhibidora de la fosfolipasa C de fosfatidilinositoles) (Carney *et al.*, 1985; Larrick & Wright, 1990; Floru *et al.*, 1991). Además el BPB, inhibidor de la  $PLA_2$  anteriormente reseñado, también inhibe la fosfolipasa C de fosfatidilcolina independiente del calcio (Martin *et al.*, 1987). Como ya se ha indicado, el BPB no eliminó el efecto inhibitorio del  $TNF\alpha$  sobre el transcrito estudiado.

Todos estos resultados indicarían que existe una fosfolipasa sensible a gentamicina acoplada a la proteína G activada por el receptor del  $TNF\alpha$ . Esta fosfolipasa podría ser una PC-PLC dependiente de calcio (el requerimiento de  $Ca^{2+}$  respecto a la hidrólisis de PC mediada por receptor es variable según el tipo celular, Billah & Anthes, 1990), o incluso una PLD. En cualquier caso, no se trataría de una PLC que actuase sobre los PI, ni como ya se ha indicado, de una  $PLA_2$ .

Estos resultados están en contradicción con los descritos por Schutze *et al.* (1991), que observaron que el BPB inhibe la producción de DAG estimulada por  $TNF\alpha$  en membranas lipídicas de células de linfoma histiocítico humano. Estos mismos autores indicaron más tarde que el  $TNF\alpha$ , en células U937, induce PC-PLC pero no activa ni a la PI-PLC ni a una PLD. Probablemente, la PC-PLC activada por el  $TNF\alpha$  en una línea de linfoma (cultivo en suspensión) no tenga el mismo requerimiento de calcio que una posible PC-PLC activada por la misma citoquina en un cultivo de lipocitos (células adherentes).

Por otra parte, no se puede descartar la acción de una PLD que actúe bien sobre los fosfolípidos de membrana directamente activada por la proteína G, o bien sobre el DAG generado por una PC-PLC. De hecho, aunque en una línea celular no se presente una marcada actividad PLD, no se puede descartar su activación en otros tipos celulares, ya que la



actividad PLD depende más del tipo de PC sustrato que de la fuente del enzima (Huang & Cabot, 1992). Recientemente se ha descrito esta actividad enzimática PLD en cultivos de miofibroblastos inducidos a lipocitos (Guaragna *et al.*, 1992), y anteriormente ya había sido detectada en muchos tejidos de rata (Exton, 1990). Además, los productos de la PC-PLC (DAG y fosfocolina) y los de la PLD (ácido fosfatídico y colina) son rápidamente interconvertibles mediante quinasas y fosfatasas altamente activas y selectivas, que también podrían estar activadas durante la estimulación celular (Billah & Anthes, 1990).

La capacidad de los lipocitos de responder a ciertos agonistas induciendo una liberación transitoria de calcio ha sido puesta de manifiesto recientemente (Pinzani *et al.*, 1992). El perfil de liberación de calcio en estas células cuando se estimulan con distintos agonistas es un pico inicial correspondiente a la salida de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes citosólicos, y una fase sostenida debida a la apertura de canales de calcio transmembranales.

El aumento de calcio citosólico libre con ionóforo A23187 (que libera calcio del retículo endoplásmico) indicó que este ion divalente tiene un fuerte efecto inhibitor de los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Este hecho concuerda con los descritos por Flaherty y Chojkier (1986) en fibroblastos, miofibroblastos y hepatocitos.

El tratamiento conjunto de los lipocitos con el  $TNF\alpha$  y el ionóforo indicó que si el  $TNF\alpha$  inducía la liberación de calcio, esta liberación no se producía con la misma cinética con la que se producía la liberación inducida por el ionóforo, ya que el efecto observado era sinérgico. Este efecto sinérgico también podría deberse a una entrada pasiva de calcio a la célula cuando los almacenes intracelulares están sustancialmente descargados por el efecto del ionóforo (Curry, 1992), mientras que con los agonistas fisiológicos pueden movilizarse cantidades muy pequeñas de calcio que no dan lugar a ese influjo posterior (Irvine, 1986).

La evidencia del papel del calcio en la transducción de señal del  $TNF\alpha$  se obtuvo mediante la inhibición de la entrada de calcio desde el exterior y quelando al mismo tiempo el calcio intracelular. En estas condiciones los niveles de mRNA de procolágeno en las células tratadas con  $TNF\alpha$  alcanzaron los obtenidos en las células tratadas sólo con los inhibidores.

Existen distintos mediadores que son capaces de liberar calcio de los almacenes intracelulares. Entre ellos están el  $IP_3$ , el ácido araquidónico y el ácido fosfatídico. Respecto al primero, su implicación en el efecto del  $TNF\alpha$  estudiado en este trabajo es improbable, ya que es el producto de la de una PI-PLC y, como ya se ha indicado, la fosfolipasa C activada

no es sensible a neomicina. El ácido araquidónico tampoco parece ser la causa de la liberación del calcio inducida por el  $\text{TNF}\alpha$ , dado que no ha observado activación de la  $\text{PLA}_2$ . Respecto al tercero, sólo se ha comprobado hasta el momento que el ácido fosfatídico exógeno puede causar entrada de calcio a través de membrana plasmática en células intactas (Moolenaar *et al.*, 1986; Billah & Anthes, 1990; Exton, 1990). Además, parece que la capacidad ionófora del ácido fosfatídico está mediada por una PLC de fosfatidilinositol, y sin embargo, la inhibición de la PI-PLC con neomicina no tuvo ningún efecto.

Entre los numerosos trabajos donde se ha estudiado la implicación del calcio intracelular en la transducción de señal del  $\text{TNF}\alpha$ , se pueden diferenciar dos grupos: en los que se utilizan células no adherentes (fundamentalmente líneas linfocíticas y monocíticas) generalmente no se detecta movilización del calcio (Hasegawa & Bonavida, 1989). Sin embargo, en distintos trabajos realizados con líneas de células adherentes tratadas con  $\text{TNF}\alpha$  se detectan oscilaciones de este ion (Richter *et al.*, 1989; 1990) o incluso se han descrito incrementos en el calcio citosólico procedente de los almacenes intracelulares inducidos por la citoquina (Corkey *et al.*, 1991). Es posible que estas alteraciones muy tempranas del  $\text{Ca}^{2+}$  sean necesarias para permitir al receptor del  $\text{TNF}\alpha$  señalar después de unirse al ligando o, lo que es más probable, que la señal del calcio sea precisa además de las señales generadas por el complejo  $\text{TNF}\alpha$ -receptor en las células adherentes fundamentalmente. Esta última posibilidad apoyaría la hipótesis de que una PC-PLC dependiente de calcio interviniese en el caso de células adherentes (insensible al BPB), mientras que la PC-PLC implicada en la transducción de señal del  $\text{TNF}\alpha$  en cultivos de células en suspensión no precise de ese requerimiento (sensible a la inhibición por BPB).

La implicación del calcio en la transducción de señal del  $\text{TNF}\alpha$  en los lipocitos en cualquier caso es clara, ya que el bloqueo de la movilización del calcio intracelular elimina la expresión de otra proteína inducida por la citoquina en estas mismas células, el factor de transcripción  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .

El estudio de la posible unión del calcio a la calmodulina no proporcionó resultados que permitan afirmar que estas proteínas estén implicadas. Los mismos inhibidores elevan de forma muy potente los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(\text{I})$ . Por ello, cuando se estudió el efecto conjunto del  $\text{TNF}\alpha$  y del inhibidor, y aunque los niveles del mRNA se elevaron sustancialmente, no se pudo descartar un efecto aditivo, que indicaría mecanismos de acción

paralelos.

La inhibición de la proteinquinasa C con H-7 y estaurosporina mostró que esta vía es activadora de la síntesis de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , ya que al cortar esta vía estos niveles disminuyeron. Este hecho también se puso de manifiesto cuando los lipocitos fueron tratados con PMA, activador de la PKC; este agente produjo el aumento en los niveles del mRNA de procolágeno. El efecto del PMA sobre los niveles de procolágeno  $\alpha_1(I)$  ya había sido descritos por Finer *et al.* (1985) y por Gerstenfeld *et al.* (1985). Sin embargo, está en contradicción con los resultados obtenidos por otros autores (Delclos & Blumberg, 1979; Dion *et al.*, 1982; Feyen *et al.*, 1988), probablemente porque en todos estos modelos experimentales el PMA indujese proliferación celular. Además, hay que tener en cuenta que los ésteres de forbol tienen un efecto bifásico: inicialmente inducen la translocación de la PKC, activándola, y posteriormente inician su degradación, inhibiéndola (Nishizuka, 1988). Este hecho podría explicar los resultados divergentes obtenidos en el estudio de la acción de los ésteres de forbol sobre la síntesis de colágeno.

La inhibición de la PKC en las células tratadas con TNF $\alpha$  mediante el H-7 y la estaurosporina (Hidaka *et al.*, 1984; Bell & Burns, 1991) mostró que el efecto inhibitor de la citoquina era mucho más potente. Es posible que la PKC activada sea una señal positiva inducida por el TNF $\alpha$ , y que al eliminar esta vía el efecto inhibitor de la citoquina sea mucho más claro y potente, o bien que se trate de una PKC que inhiba la movilización de los almacenes intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (MacNicol & Schulman, 1992).

Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente por otros autores, que observaron que la estaurosporina y el H-7 bloqueaban la actividad PKC inducida por el TNF $\alpha$  en células Jurkat, pero no la inducción de NF- $\kappa$ B (Meichle *et al.*, 1990).

Por otra parte, el DAG no era metabolizado a ácido araquidónico, ya que la inhibición de la diacilglicerol lipasa (enzima implicada en esta ruta) no modificó el efecto del TNF $\alpha$ .

Otra posible vía implicada en el efecto negativo era la del cAMP; los agentes que elevan estos niveles, como la toxina colérica, el 8-Bromo-cAMP y la forskolina produjeron una potente disminución de los niveles de mRNA de procolágeno. Estos resultados son coincidentes con los descritos abundantemente en la bibliografía (Baum *et al.*, 1978; Berg *et al.*, 1981; Perr *et al.*, 1988; Pun, 1989). Sin embargo, es poco probable que el TNF $\alpha$  tenga un efecto directo sobre los niveles de cAMP, ya que los estimulantes de estos niveles

presentan un efecto sinérgico con el desarrollado por el TNF $\alpha$ . Pese a esto, no se puede descartar la implicación de una proteinquinasa dependiente de nucleótidos cíclicos, ya que el H-8, que por si mismo produce un notable incremento en los niveles del mRNA estudiado, anula en parte el efecto de la citoquina. Una posible explicación de este hecho sería que alguno de los segundos mensajeros implicados en el efecto negativo del TNF $\alpha$  activase o actuara conjuntamente con una PKA que en principio no hubiese sido activada por la citoquina.

Como ya se ha indicado, el TNF $\alpha$  ejerce su acción inhibitoria sobre la producción de colágeno al menos a nivel pretraduccional, disminuyendo la cuantía de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Este efecto podría deberse a una alteración a nivel transcripcional, disminuyendo la expresión del mRNA, o a nivel postranscripcional, aumentando su inestabilidad.

Mediante la transfección de los lipocitos con el plásmido que contenía el promotor completo del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  comprobamos que el TNF $\alpha$  inhibía la expresión de este gen, lo cual indicaba una regulación transcripcional. Este resultado coincide con el descrito por Kahari *et al.* (1990) respecto a la expresión del gen de procolágeno  $\alpha_2(I)$  en células transfectadas con el plásmido portador del promotor de ese gen, y tratadas con TNF $\alpha$ , y confirma la hipótesis de la regulación coordinada de la síntesis de las distintas cadenas del colágeno I (Rossow *et al.*, 1987; Boast *et al.*, 1990; Karsenty & de Crombrugge, 1991).

Mediante la técnica de la transcripción *run-off*, Armendariz-Borunda *et al.* (1992) han comprobado recientemente que el efecto del TNF $\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en lipocitos en cultivo no se produce por inestabilización de este transcrito.

Los resultados obtenidos tras la transfección de las células con COLCAT2 y COLCAT7 mostraron que esta citoquina ejerce una potente disminución de la expresión genética actuando sobre la región del promotor localizada entre los nucleótidos -1672 y -2295, mientras que la región comprendida entre el origen de transcripción y -1672 está activada por el TNF $\alpha$ , pero sometida a la inhibición de las regiones del promotor más alejadas del origen.

La implicación de distintos elementos del promotor del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en respuesta a un único factor de crecimiento (TGF $\beta$ ) ya ha sido descrita anteriormente por Ritzenthaler *et al.* (1991). Este efecto podría ser el resultado de la activación de una vía de transducción que activase, mediante un factor de transcripción, múltiples elementos distribuidos a lo largo del promotor, o lo que es más probable en nuestro caso, que varias

rutas de segundos mensajeros inducidos por el TNF $\alpha$  modifiquen la expresión genética induciendo o activando varios factores de transcripción que interaccionarían con múltiples elementos del promotor.

El mediador responsable de la potente inhibición del TNF $\alpha$  sobre el COLCAT2 es, posiblemente, el Ca<sup>2+</sup> intracelular, ya que aunque el cAMP disminuye los niveles de mRNA, esta inhibición no se produce actuando sobre la región localizada entre -1672 y -2295. Además, el H-8 no eliminó el efecto del TNF $\alpha$  sobre la expresión del COLCAT2. Sin embargo, el tratamiento de los lipocitos transfectados con este DNA quimérico con ionóforo A23817 permitió comprobar que el Ca<sup>2+</sup> presenta un efecto inhibitor análogo al del TNF $\alpha$  sobre esta región.

Mediante la transfección de las células con COLCAT7 comprobamos que los ésteres de forbol (PMA) ejercen una potente estimulación de la región localizada entre el origen de transcripción y -1672, de forma similar al TNF $\alpha$ , y que el efecto de esta citoquina sobre esta región se anula mediante un inhibidor de la PKC.

Estos dos resultados, la inhibición ejercida por el Ca<sup>2+</sup> y el posible incremento de los niveles de mRNA de procolágeno por la PKC, afirmarían la implicación de estas dos vías en la transducción citoplásmica de la señal del TNF $\alpha$  observada anteriormente.

Por último, hay que indicar que en los lipocitos no existieron diferencias significativas entre los niveles transcripcionales obtenidos en las células transfectadas con COLCAT1 y con COLCAT2, lo cual indicaría que las secuencias localizadas por encima de -1672 no son utilizadas por estas células en condiciones basales, sino que tienen un papel potencial en la modulación del gen de procolágeno en respuesta a estímulos fisiológicos o farmacológicos. Esta regulación de la expresión del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  en los lipocitos coincide con la descrita en distintas líneas celulares no osteoblásticas por otros autores (Boast *et al.*, 1990; Pavlin *et al.*, 1992; Simkevich *et al.*, 1992).

## 6. RESUMEN

En las enfermedades activas del hígado, las células inflamatorias liberan citoquinas que pueden contribuir a la fibrogénesis. Entre estas citoquinas figura el TNF $\alpha$ . Esta citoquina es sintetizada por los macrófagos y neutrófilos fundamentalmente, y modula muchas actividades celulares.

Los objetivos de este trabajo han sido estudiar el efecto del TNF $\alpha$  sobre la producción de colágeno en lipocitos, determinar los mecanismos intracelulares implicados y comprobar si este efecto se producía modulando la expresión del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

Para ello, se utilizaron cultivos confluentes de lipocitos tratados con TNF $\alpha$ . En estos cultivos se determinaron la producción de colágeno, la cuantía de la prolina intracelular, la secreción de colágeno y la hidroxilación de la prolina, todo ello mediante la incorporación a las células de prolina marcada.

Para el estudio del efecto del TNF $\alpha$  sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , se aislaron y purificaron los RNAs citoplásmicos de los lipocitos tratados con distintas condiciones experimentales, se realizó la electroforesis de estos RNAs, se transfirieron a una membrana de nylon mediante la técnica del "Northern blot", se hibridaron con una sonda de procolágeno  $\alpha_1(I)$  de rata, y se cuantificaron por densitometría. También con esta misma técnica se investigaron los segundos mensajeros utilizados por el TNF $\alpha$  para producir la disminución de los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , mediante el uso de inhibidores de las distintas rutas de transducción de señal.

Finalmente, el efecto del TNF $\alpha$  sobre la expresión del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se estudió transfectando los lipocitos en crecimiento con el plásmido COLCAT1, que presenta el promotor del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  murino unido al gen de la enzima cloranfenicol acetil transferasa, cuantificándose posteriormente esta actividad. Para delimitar más las regiones sobre las que actúan los segundos mensajeros activados por el TNF $\alpha$ , los lipocitos se transfectaron con los plásmidos linearizados COLCAT2 y COLCAT7, que sólo presentan los 2300bp y los 1700bp más cercanos al origen de transcripción, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que el TNF $\alpha$  provoca en cultivos de lipocitos un

significativo descenso en la producción porcentual de colágeno respecto al total de proteínas sintetizadas por estas células ( $5.0 \pm 1.1$  vs.  $3.7 \pm 0.9$ ;  $p < 0.001$ ), siendo este un efecto dosis-dependiente. La disminución no era debida a efectos proliferativos ni citotóxicos, y tampoco se apreciaron alteraciones en la incorporación e hidroxilación de la prolina, ni en la secreción del colágeno.

El descenso en la producción de colágeno está asociado con una disminución en los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  ( $100 \pm 0$  vs.  $64 \pm 15$ ;  $p < 0.001$ ), lo cual indica que el  $TNF\alpha$  ejerce su efecto, al menos, a nivel pretraduccional. Además, es precisa la síntesis *de novo* de una proteína para que se produzca el efecto completo del  $TNF\alpha$ , ya que la cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica) anula los efectos de la citoquina.

El estudio de las vías utilizadas por el  $TNF\alpha$  para producir este efecto en lipocitos indicó que el  $TNF\alpha$  se une a un receptor acoplado a una proteína G sensible a toxina pertussis. Esta proteína G activa una fosfolipasa sensible a gentamicina pero insensible a neomicina y a BPB. Por ello, esta enzima no parece ser ni  $PLA_2$  ni PI-PLC, pudiendo tratarse de una PC-PLC dependiente de calcio (o incluso de una PLD).

En esta inducción, el papel del calcio es importante. El calcio libre intracelular parece ser esencial para la activación inicial de la fosfolipasa, puesto que si se elimina el calcio libre intracelular mediante Quin-2/AM y verapamil el efecto de la citoquina sobre el mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$  se anula completamente. Este ion no actúa mediante la formación de un complejo calcio-calmodulina, ya que la inhibición de la calmodulina con W-7, calmidazolium y TFP no anula el efecto del  $TNF\alpha$ .

Posteriormente a la fosfolipasa existe una activación de la PKC; cuando se bloquea esta vía con H-7 y estaurosporina el efecto inhibitorio es todavía más potente. Por esta razón, la PKC no es responsable de la disminución de los niveles del mRNA de procolágeno, sino que presenta una acción contraria al efecto observado.

Otra vía que da lugar a una inhibición de la expresión del gen de procolágeno es la del cAMP. Los resultados obtenidos con inductores de esta vía indicaron que no se trata de



---

una ruta utilizada primariamente por el  $\text{TNF}\alpha$ , ya que presenta efectos sinérgicos con los agentes que aumentan los niveles de cAMP. Sin embargo, es posible que la PKA esté activada por un segundo mensajero inducido por el  $\text{TNF}\alpha$ , dado que la inhibición de esta enzima revierte en parte el efecto de la citoquina.

El  $\text{TNF}\alpha$  ejerce estos efectos actuando sobre el promotor del gen del colágeno, en una región localizada entre -1672 y -2295bp, ya que la eliminación de esta región se sigue de la pérdida de los efectos inhibitorios del  $\text{TNF}\alpha$ . Este experimento pone en evidencia que el  $\text{TNF}\alpha$  induce no sólo la inhibición de la expresión genética del colágeno, sino otros efectos estimulantes de la misma, normalmente no reconocidos por quedar ocultos tras los inhibidores más potentes. Así lo sugiere el que tras la exclusión de las secuencias 5' proximales a -1672 se aprecie un aumento de la actividad CAT. Es decir, el  $\text{TNF}\alpha$  induce también la expresión genética del colágeno activando una región situada entre -1672 y +1. Mientras que los efectos inhibitorios, dominantes, sobre la región -2295 a -1672 son dependientes del calcio, los activadores, más débiles, sobre la región -1672 y el origen de transcripción, están mediados por la PKC y son sensibles a la inhibición de esta enzima.

Son necesarios nuevos experimentos para caracterizar exactamente las regiones *cis-activadoras* de ambos efectos y para identificar los mediadores proteicos (proteínas *trans-activadoras*), si es que participan.

## **7. CONCLUSIONES**

1. El TNF $\alpha$  provoca en los lipocitos en cultivo un descenso significativo en la producción porcentual de colágeno. Este efecto inhibitorio también se produce en otras líneas celulares.
2. El descenso en las proteínas colágenas es específico, sin modificarse significativamente la producción de proteínas no colágenas.
3. La disminución de la producción porcentual de colágeno es dependiente tanto de la dosis de TNF $\alpha$  como del tiempo de exposición a la citoquina.
4. El descenso de la producción de colágeno no es debido a efectos proliferativos o citotóxicos, ya que se produce en cultivos confluentes de células no sensibles a la toxicidad del TNF $\alpha$ .
5. El TNF $\alpha$  no disminuye la incorporación de prolina a las células. El nivel de este aminoácido no es, por tanto, limitante ni responsable del descenso de la producción de colágeno.
6. El TNF $\alpha$  no afecta los mecanismos postraduccionales que sufre el colágeno imprescindibles para su secreción. La secreción de esta proteína no se encuentra alterada, ni tampoco existe modificación en la hidroxilación de la prolina por efecto de la citoquina.
7. La disminución de la producción de colágeno está asociada con un descenso en los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ . Este efecto sobre el mRNA es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al TNF $\alpha$ .
8. El TNF $\alpha$  precisa de la síntesis *de novo* de una proteína para producir la disminución en los niveles de mRNA de procolágeno.

9. En los lipocitos en cultivo el TNF $\alpha$  se une a un receptor de membrana acoplado a una proteina G sensible a la toxina pertussis, no siendo precisa la internalización del receptor para que se produzca el efecto.

10. La fosfolipasa activada no es la PLA<sub>2</sub>. Las vías de metabolización del ácido araquidónico, la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, tampoco son responsables del efecto del TNF $\alpha$  sobre los niveles de mRNA de procolágeno  $\alpha_1(I)$ .

11. En los cultivos confluentes de lipocitos, la enzima activada por la proteina G acoplada al receptor del TNF $\alpha$  depende del calcio libre intracelular, induce la acción de la PKC y es sensible a gentamicina. Todo esto indica que se trata de una PLC.

12. La enzima activada por la proteina G es una fosfolipasa C no sensible a la inhibición por neomicina. Por lo tanto, no se trata de la PI-PLC.

13. Posteriormente existe una activación de la PKC, pero esta enzima no es mediadora del efecto inhibitorio estudiado del TNF $\alpha$ . Dicha activación atenúa el efecto inhibitorio del TNF $\alpha$  sobre los niveles de procolágeno  $\alpha_1(I)$ , siendo una vía positiva en la regulación de estos niveles.

14. La vía del cAMP no es una vía inducida inicialmente por el TNF $\alpha$  en los lipocitos en cultivo. Sin embargo, es posible que la PKA esté implicada posteriormente en el efecto inhibitorio estudiado.

15. El TNF $\alpha$  disminuye la transcripción del gen de procolágeno  $\alpha_1(I)$  mediante la inhibición de su promotor.

16. La inhibición del promotor del gen de procolágeno es más acusada sobre la región localizada entre -1872 y -2300bp. Un mediador de dicho efecto podría ser el calcio libre intracelular.

17. El  $\text{TNF}\alpha$  estimula la región cercana al origen de transcripción (entre -1872 y +1), posiblemente como consecuencia de la activación de la PKC.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 
- \* Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1983) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. NY.
- \* Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. (1987) 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13 acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2256-2266.
- \* Armendariz-Borunda, J., Katayama, & Seyer, J.M. (1992) Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ . and transforming growth factor  $\beta$  in Ito cells. *J. Biol. Chem.* 267, 14316-14321.
- \* Bachem, M.G., Meyer, D., Melchior, R., Sell, K.M. & Gressner, A.M. (1992) Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast like cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 89, 19-27.
- \* Baglioni, C., Ruggiero, V., Latham, K. & Johnson, S.E. (1987) in *Tumor Necrosis Factor and Related Cytotoxins* (Bock, G., and Marsh, J. eds.) 52-63, John Wiley & Sons, Chichester.
- \* Banga, H.S., Simons, E.R., Brass, L.F. & Rittenhouse, S.E. (1986) Activation of phospholipases A and C in human platelets exposed to epinephrine: role of glycoproteins IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9197-9201.
- \* Baud, L., Perez, J., Friedlander, G. & Ardaillou, R. (1988) Tumor necrosis factor stimulates prostaglandin production and cyclic AMP levels in rat cultured mesangial cells. *FEBS Lett.* 239, 50-54.

- 
- \* Bauer, E.A., Cooper, T.W., Huang, J.S., *et al.* (1985) Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 4132-4136.
- \* Bauerle, P.A. & Baltimore, D. (1988) I $\kappa$ B: A specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Science* 242, 540-546.
- \* Baum, B.J., Moss, J., Bruel, S.D. & Crystal, R.G. (1978) Association in normal fibroblasts of elevated levels of adenosine 3'-5' monophosphate with a selective decrease in collagen production. *J. Biol. Chem.* 253. 3391-3394.
- \* Baum, B.J., Moss, J., Bruel, S.D. & Crystal, R.G. (1980) Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 255. 2843-2847.
- \* Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45. 631-632.
- \* Bell, R.M. & Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266, 4661-4664.
- \* Berg, R.A., Moss, J., Baum, B.J. & Crystal, R.G. (1981) Regulation of collagen production by the  $\beta$ -adrenergic system. *J. Clin. Invest.* 67, 1457-1462.
- \* Berman, M. D. & Duncan, M. R. (1989) Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *J. Invest. Dermatol.* 92, 605-610.



- 
- \* Berridge, M.J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 159-193.
- \* Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D. & Mundy, G.R. (1986) Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature* 319, 516-518.
- \* Besterman, J.M., Duronio, V. & Cuatrecasas, P. (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6785-6789.
- \* Beutler, B. & Cerami, A. (1986) Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320, 584-588.
- \* Beutler, B., Thompson, P., Keyes, J., Hagerty, K. & Crawford, D. (1988) Assay of a ribonuclease that preferentially hydrolyses mRNAs containing cytokine-derived UA-rich instability sequences. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152, 973-980.
- \* Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Suffys, P., Van Roy, F. & Fiers, W. (1989) Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9494-9498.
- \* Bienkowski, R.S., Cowan, M.J., McDonald, J. & Crystal, R.G. (1978) Degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 253, 4356-4361.
- \* Billah, M.M. & Anthes, J.C. (1990) The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J.* 269, 281-291.

- 
- \* Billah, M.M., Lapetina, E.G. & Cuatrecasas, P. (1981) Phospholipase A<sub>2</sub> activity specific for phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 256, 5399-5403.
- \* Bird, T.A. & Saklatvala, J. (1990) Down-modulation of epidermal growth factor receptor affinity in fibroblasts treated with interleukin 1 or tumor necrosis factor is associated with phosphorylation at a site other than threonine 654. *J. Biol. Chem.* 265, 235-240.
- \* Blomhoff, R. & Wake, K. (1991) Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 5, 271-277.
- \* Boast, S. Su, M.W., Ramirez, F., Sanchez, M. & Avvedimento, E.V. (1990) Functional analysis of cis-acting DNA sequences controlling transcription of the human type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 265, 13351-13356.
- \* Bornstein, P. & McKay, J. (1988) The first intron of the  $\alpha_1(I)$  collagen gene contains several transcriptional regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 263, 1603-1606.
- \* Bornstein, P., McKay, J., Devarayalu, S. & Cook, S.C. (1988) A highly conserved, 5' untranslated, inverted repeat sequence is ineffective in translational control of the  $\alpha_1(I)$  collagen gene. *Nucl. Acid Res.* 16, 9721-9736.
- \* Bornstein, P., McKay, J., Morishima, J.K., Devarayalu, S. & Gelinas, R.E. (1987) Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human  $\alpha_1(I)$  collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8869-8873.
- \* Bornstein, P. & Sage, H. (1989) Regulation of collagen gene expression. *Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 37, 67-106.

- 
- \* Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- \* Breindl, M., Harbers, K. & Jaenisch, R. (1984) Retrovirus-induced lethal mutation in collagen I gene of mice is associated with an altered chromatin structure. *Cell* 38, 9-16.
- \* Brenner, D.A., Alcorn, J.M., Feitelberg, S.P., Leffert, H.L. & Chojkier, M. (1990) Expression of collagen genes in the liver. *Mol. Biol. Med.* 7, 105-115.
- \* Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. & Karin, M. (1989) Prolonged activation of *jun* and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 337, 661-663.
- \* Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G. & Stern, D. (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J. Exp. Med.* 169, 1977-1991.
- \* Burgess, G. M., Bird, G. S. J., Obie, J.F. & Putney, J. W. Jr. (1991) The mechanism for synergism between phospholipase C- and adenylycyclase-linked hormones in the liver. *J. Biol. Chem.* 266, 4772-4781.
- \* Camussi, G., Albano, E., Tetta, C. & Bussolino, F. (1991) The molecular action of TNF- $\alpha$ . *FEBS Lett.* 3-14.
- \* Camussi, G., Bussolino, F., Salvidio, G. & Baglioni, C. (1987) Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 166,

---

1390-1404.

\* Cao, X., Guy, G.R., Sukhatme, V.P. & Tan, Y.H. (1992) Regulation of the egr-1' gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267, 1345-1349.

\* Capdevilla, J.H., Flack, J.R. & Estabrook, R.W. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* 6, 731-736.

\* Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown, S.S. & Cerami, A. (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1670-1674.

\* Carney, D.H., Scott, D.L., Gordon, E.A. & Labelle, E.F. (1985) Phosphoinositides in mitogenesis: neomycin inhibits thrombin-stimulated phosphoinositide turnover and initiation of cell proliferation. *Cell* 42, 479.

\* Cedar, H. (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53, 3-4.

\* Centrella, M., McCarthy, T.L. & Canalis, E. (1988) Tumor necrosis factor $\alpha$  inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 123, 1442-1448.

\* Chang, J.D., Ringold, G.M. & Heller, R.A. (1992) Cell killing and induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by lipoygenase metabolites of arachidonic acid. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 188 (2) 538-546.

- 
- \* Chau, L.Y. & Tai, H.H. (1988) Monoglyceride and diglyceride lipases from human platelet microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 963, 436-444.
- \* Chojkier, M. & Filip, M. (1986) Hepatocyte collagen production in vivo in normal rats. *J. Clin. Invest.* 78, 333-339.
- \* Chojkier, M., Lyche, K.D. & Filip, M. (1988) Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and non-parenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 8, 808-814.
- \* Chojkier, M. Peterkofsky, B. & Bateman, J. (1980) A new method for determining the extent of proline hydroxylation by measuring changes in the ratio of (4-<sup>3</sup>H):(14C)proline in collagenase digests. *Anal. Biochem.* 108, 385-393.
- \* Chu, M. L., de Wet, W., Bernard, M. & Ramirez, F. (1985) Fine structural analysis of the human pro $\alpha_1$ (I) collagen gene, promoter structure, Alu I repeats, and polymorphic transcripts. *J. Biol. Chem.* 260, 2315-2320.
- \* Clark, M.A., Chen, M.J., Crooke, S.T. & Bomalaski, J.S. (1988) Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A<sub>2</sub> activity and synthesis of a phospholipase A<sub>2</sub>-activating protein in endothelial cells. *Biochem. J.* 250, 125-132.
- \* Cohen, P. (1980) The role of calmodulin and troponin in the regulation of phosphorylase kinase from mammalian skeletal muscle. En Cheung WY, ed. Calcium and cell function. Vol.1. Calmodulin. New York: Academic Press, 183-199.
- \* Colton, T. (1974) Statistics in Medicine. Little Brown and Co. Boston.

- 
- \* Conricode, K.M., Brewer, K.A. & Exton, J.H. (1992) Activation of phospholipase D by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267. 7199-7202.
- \* Corkey, B.E., Geschwind, J.F., Deeney, J.T., Hale, D.E., Douglas, S.D. & Kilpatrick, L. (1991) Ca<sup>2+</sup> responses to IL-1 and TNF in cultured human skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 87, 778-786.
- \* Cseh, K. & Beutler, B. (1989) Alternative cleavage of the cachectin/tumor necrosis factor propeptide results in a larger inactive form of secreted protein. *J. Biol. Chem.* 264. 16256-16260.
- \* Curry, F.E. (1992) Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J.* 6. 2456-2466.
- \* Daireaux, M., Redini, F., Loyau, G. & Pujol, J.P. (1990) Effects of associated cytokines (IL-1, TNF-alpha, IFN-gamma and TGF-beta) on collagen and glycosaminoglycan production by cultured human synovial cells. *Int. J. Tissue React.* 12, 21-31.
- \* Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1986) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, NY. 973-977.
- \* Das, U.N., Padman, M., Sagar, P.S., Ramesh, G. & Koratkar, R. (1990) Stimulation of free radical generation in human leukocytes by various agents including tumor necrosis factor is a calmodulin dependent process. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 167, 1030-1036.
- \* Davidson, F.F., Dennis, E.A., Powell, M. & Glenney, J.R.Jr. (1987) Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by "lipocortins" and calpactins. *J. Biol. Chem.* 262, 1698-1705.

- 
- \* Dayer, J.M., Beutler, B. & Cerami, A. (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub>-production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 162, 2136-2168.
- \* Delclos, B. & Blumberg, P.M. (1979) Decrease in collagen production in normal and rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts induced by phorbol myristate acetate. *Cancer Res.* 39, 1667-1672.
- \* Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M. & Hannun, Y.A. (1991) Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 5, 2068-2077.
- \* Diegelman, R.F., Kim, J.C., Lindblad, W.J., Smith, T.C., Harris, T.M. & Cohen, I.K. (1987) Collection of leukocytes, fibroblasts and collagen within an implantable reservoir tube during tissue repair. *J. Leuk. Biol.* 42, 667-672.
- \* Dion, L.D., Bear, J., Bateman, J., DeLuca, L.M. & Colburn, N.H. (1982) Tumor promoting phorbol ester inhibits procollagen synthesis in promotable JB-6 mouse epidermal cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 1147-1154.
- \* Dixit, V.M., Marks, R.M., Sarma, V. & Prochownik, E.V. (1988) The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription. *J. Biol. Chem.* 264, 16905-16909.
- \* Drysdale, B., Zacharchuk, C.M. & Shin, H.S. (1983) Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J. Immunol.* 131, 2362-2367.

- 
- \* Duh, E., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S. & Rabson, A.B. (1989) Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- $\kappa$ B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5974-5978.
- \* Duncan, M.R. & Berman, B. (1989) Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. *J. Invest. Dermatol.* 92, 699-706.
- \* Eck, M.J. & Sprang, S.R. (1989) The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6Å resolution: implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 264, 17595-17605.
- \* Economou, J.S., Rhoades, K., Essner, R., McBride, W.H., Gasson, J.C. & Morton, D.L. (1989) Genetic analysis of the human tumor necrosis factor alpha/cachectin promoter region in a macrophage cell line. *J. Exp. Med.* 170, 321-326.
- \* Elias, J.A., Freundlich, B., Adams, S. & Rosenbloom, J. (1990) Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580, 233-244.
- \* England, P.J. (1986) Intracellular calcium receptor mechanisms. *British Medical Bulletin* 42, 375-383.
- \* Exton, J.H. (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265, 1-4.



- 
- \* Farago, A. & Nishizuka, Y. (1990) Proteinkinase C in transmembrane signaling. *FEBS Lett.* 268, 350-354.
- \* Feinber, A.P., & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- \* Feyen, J.H.M., Petersen, D.N., Kream, B.E. (1988) Inhibition of bone collagen synthesis by the tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Bone and Min. Res.* 3, 173-179.
- \* Fiers, W. (1991) Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* 285, 199-212.
- \* Fiers, W. (1992) Precursor structures and structure-function analysis of TNF and lymphotoxin. En Tumor Necrosis Factors. Structure, Function, and Mechanism of Action. Marcel Dekker, Inc. 79-92.
- \* Finer, M.H., Gerstenfeld, L.C., Young, D., Doty, P. & Doedtker, H. (1985) Collagen expression in embryonic chicken chondrocytes treated with phorbol myristate acetate. *Mol. Cell Biol.* 5, 1415-1424.
- \* Flaherty, M., & Chojkier, M. (1986) Selective inhibition of collagen synthesis by the Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 12060-12065.
- \* Floru, S., Gelvan, A., Maran, R., Kadouri, A. & Cohen, A.M. (1991) Modulation of tissue plasminogen activator biosynthesis by phosphatidylinositol liposomes in human fetal lung fibroblasts. *Am. J. Hematol.* 36, 100-104.

- 
- \* Friedman, S.L. & Arthur, M.J. (1989) Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* 84, 1780-1785.
- \* Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., Arenson, D.M. & Bissell, D.M. (1989) Maintenance of differential phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J. Biol. Chem.* 264, 10756-10762.
- \* Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J. & Bissell, M. (1985) Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8681-8685.
- \* Gerstenfeld, L.C., Finer, M.H. & Doedker, H. (1985) Altered beta-actin gene expression in phorbol myristate acetate-treated chondrocytes and fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1425-1433.
- \* Goeddel, D.V., Aggarwal, B.B., Gray, P.W., Leung, D.W., Nedwin, G.E., Palladino, M.A., Patton, J.S., Pennica, D., Shepard, H.M., Sugarman, B.J. & Wong, G.H.W. (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Molecular Biology of Homo sapiens*, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Bio. 51, 597.
- \* Gordon, S. & Werb, Z. (1976) Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 872-876.
- \* Green, S., Dobrjansky, A., Carswell, E.A., Kassel, R.L., Old, L.J., Fiore, N. & Schwartz, M.K. (1976) Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 381-385.

- 
- \* Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J.A. & Rojkind, M. (1991) Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. *Lab. Invest.* 65, 644-653.
- \* Gressner, A.M. (1991) Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29, 293-311.
- \* Gross, J. & Nagai, Y. (1965) Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1197-1204.
- \* Guaragna, R.M., Trugo, L. & Borojevic, R. (1992) Phospholipid modifications during conversion of hepatic myofibroblasts into lipocytes (Ito-cells). *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 237-243.
- \* Hakeda, Y., Yoshino, T., Nakatani, Y., Kurihava, N., Maeda, N. & Kumegawa, M. (1986) Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *J. Cell Physiol.* 28, 155-161.
- \* Hamamoto, Y., Matsuyama, T., Yamamoto, N. & Kobayashi, N. (1990) Augmentation of cytotoxic effect of tumor necrosis factor on human immunodeficiency virus-infected cells by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Res.* 50, 5287-5290.
- \* Harbers, K., Kuehn, M., Delius, H. & Jaenisch, R. (1984) Insertion of retrovirus into the first intron of  $\alpha_1(I)$  collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1504-1508.
- \* Harper, E. (1980) Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1063-1078.

- 
- \* Harris, E.D. & Krane, S.M. (1974) Collagenases. *N. Engl. J. Med.* 291, 557-563.
- \* Hartung, S., Jaenish, R. & Breindl, M. (1986) Retrovirus insertion inactivates mouse  $\alpha_1(I)$  collagen gene by blocking initiation of transcription. *Nature* 320, 365-367.
- \* Hasegawa, Y. & Bonavida, B. (1989) Calcium-independent pathway of tumor necrosis factor-mediated lysis of target cells. *J. Immunol.* 142, 2670-2676.
- \* Hassan, G., Stefanini, S., Bargali, A.M. & Autuori, F. (1989) Proline-incorporating cells in chronic active liver diseases. *Hepatology* 9, 37-49.
- \* Hensel, G., Meichle, A., Pfizenmaier, K. & Kronke, M. (1989) PMA-responsive 5' flanking sequences of the human TNF gene. *Lymphokine Res.* 8, 347.
- \* Hepburn, A., Boeynaems, J.M., Fiers, W. & Dumont, J. E. (1987) Modulation of tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in L929 cells by bacterial toxins, hydrocortisone and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 815-822.
- \* Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. & Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23, 5036-5041.
- \* Highberger, J.H., Corbett, C., Kang, A.H. & Gross, J. (1978) The amino acid sequence of chick skin collagen 1-cb7. The presence of a previously unrecognized triplet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 84-88.
- \* Hofmann, S.L. & Majerus, P.W. (1982) Identification and properties of two distinct

---

phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes from sheep seminal vesicular glands. *J. Biol. Chem.* 257, 6461-6469.

\* Hofmann, S.L., Prescott, S.M. & Majerus, P.W. (1982) The effects of mepacrine and p-bromophenacyl bromide on arachidonic acid release in human platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 237-244.

\* Hohmann, H.P., Brockhaus, M., Bauerle, P.A., Remy, R., Kolbeck, R. & van Loon, A.P.G.M. (1990) Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 265, 22409-22417.

\* Hohmann, H.P., Remy, R., Scheidereit, C. & Van Loon, A.P.G.M. (1991) Maintenance of NF- $\kappa$ B activity is dependent on protein synthesis and the continuous presence of external stimuli. *Mol. Cell. Biol.* 11, 259-266.

\* Holt, K., Bennett, M. & Chojkier, M. (1984) Acetaldehyde stimulates collagen and noncollagen protein production by human fibroblasts. *Hepatology* 4, 843-848.

\* Holtmann, H. & Wallach, D. (1987) Down regulation of the receptors for TNF by IL-1 and 4 $\beta$ -phorbol-12-myristate-13-acetate. *J. Immunol.* 139, 1161-1167.

\* Huang, C. & Cabot, M.C. (1992) Phospholipase D activity in nontransformed and transformed fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1127, 242-248.

\* Huerre, C., Junien, C., Weil, D. *et al.* (1982) Human type I procollagen genes are located on different chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6627-6630.

- 
- \* Imamura, K., Sherman, M.L., Spriggs, D. & Kufe, D. (1988) Effect of TNF on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cell. *J. Biol. Chem.* 263, 10247-10253.
- \* Irvine, R.F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?. *Biochem. J.* 204, 3-16.
- \* Irvine, R.F. (1986) Calcium transients: mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$ . *British Medical Bulletin* 42, 369-374.
- \* Israel, N., Hazan, U., Alcamí, J., Munier, A., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Israel, A. & Virelizier, J.L. (1989) Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T-lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J. Immunol.* 143, 3956-3960.
- \* Ito, H., Shirai, T., Yamamoto, S., Akira, M., Kawahara, S., Todd, C.W. & Wallace, R.B. (1986). Molecular cloning of the gene encoding rabbit tumor necrosis factor. *DNA* 5, 157.
- \* Jahner, D. & Jaenisch, R. (1985) Retrovirus-induced *de novo* methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature* 315, 594-597.
- \* Johnson, S.E. & Baglioni, C. (1988) Tumor necrosis factor receptors and cytotoxic activity are down-regulated by activators of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 5686-5692.
- \* Jones, E.Y., Stuart, D.I. & Walker, N.P.C. (1990) The three-dimensional structure of TNF at 2.9Å resolution. In *Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy*. Basel, Karger. 31-37.
- \* Junien, C., Weil, D., Myers, J.C. *et al.* (1982) Assignment of the human pro  $\alpha_2(I)$  collagen

---

structural gene to chromosome 7 by molecular hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* 34, 381-387.

\* Kahari, V.M., Chen, Y.Q., Su, M.W., Ramirez, F. & Uitto, J. (1990) Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  suppress the activation of human type I collagen gene expression by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. Clin. Invest.* 86, 1489-1495.

\* Kanoh, H., Yamada, K. & Sakane, F. (1990) Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction?. *Trends in Biol. Sci.* 15, 47-50.

\* Karsenty, G. & de Crombrugge, B. (1990) Two different negative and one positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the  $\alpha_1(I)$  collagen gene. *J. Biol. Chem.* 265, 9934-9942.

\* Karsenty, G. & de Crombrugge, B. (1991) Conservation of binding sites for regulatory factors in the coordinately expressed  $\alpha_1(I)$  and  $\alpha_2(I)$  collagen promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 538-544.

\* Kato, H., Hayashi, T., Koshino, Y., Kutsumi, Y., Nagai, T. & Miyabo, S. (1992) Glucocorticoids increase  $Ca^{2+}$  influx through dihydropyridine-sensitive channels linked to activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 188 (2) 934-941.

\* Kaur, P. & Saklatvala, J. (1988) IL-1 and TNF increase phosphorylation of fibroblast proteins. *FEBS Lett.* 241, 6-10.

\* Kerr, L.D., Inoue, J. & Verma, I.M. (1992) Signal transduction: the nuclear target. *Curr. Op. Cell Biol.* 4, 496-501.

- 
- \* KIRSTEIN, M. & BAGLIONI, C. (1986) TNF induces synthesis of two proteins in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 9565-9567.
- \* KITTELBERGER, R., DAVIS, P.F., FLYNN, D.W. & GREENHILL, N.S. (1990) Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connective Tissue Res.* 24, 303-318.
- \* KLEE, C.B. (1988) Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins. *Biochemistry* 27, 6645-6652.
- \* KLEINMAN, H.K., WILKES, C.M. & MARTIN, G.R. (1981) Interaction of fibronectin with collagen fibrils. *Biochemistry* 20, 2325-2330.
- \* KOBAYASHI, Y., UTSUNOMIYA, N., NAKANISHI, M. & OSAWA, T. (1987) Early transmembrane events in tumor necrosis factor and lymphotoxin-induced cytotoxicity. *Immunol. Lett.* 15, 53-57.
- \* KRIEGLER, M., PEREZ, C., DEFAY, K., ALBERT, I. & LU, S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53.
- \* KRONKE, M., SCHUTZE, S., SCHEURICH, P. & PFIZENMAIER, K. (1992) TNF signal transduction and TNF-responsive genes. In *Tumor Necrosis Factors. Structure, Function, and Mechanism of Action*. Marcel Dekker, Inc. NY. 189-216.
- \* KRUPPA, G., THOMA, B., MACHLEIDT, T., WIEGMANN, K. & KRONKE, M. (1992) Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF- $\kappa$ B activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor. *J. Immunol.* 148, 3152-3157.



- 
- \* Kruijs, V., Marinx, O., Shaw, G., Deschamps, J. & Huez, G. (1989) Translational blockade imposed by cytokine derived UA-rich sequences. *Science* 245, 852-855.
- \* Larrick, J.W. & Wright, S.C. (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FASEB J.* 4, 3215-3222.
- \* Laudanna, C., Miron, S., Berton, G. & Rossi, F. (1990) Tumor necrosis factor/cachectin activates the O<sub>2</sub><sup>-</sup> generating system of human neutrophils independently of the hydrolysis of phosphoinositides and the release of arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 308-315.
- \* Lee, J.C., Truneh, A., Smith, M.F.Jr. & Tsang, K.Y. (1987) Induction of interleukin 2 receptor (TAC) by tumor necrosis factor in YT cells. *J. Immunol.* 139, 1935-1938.
- \* Lefevre, V., Peeters-Joris, C. & Vaes, G. (1990) Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 366-378.
- \* Lenardo, M.J. & Baltimore, D. (1989) NF- $\kappa$ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58, 227-229.
- \* Lewis, M., Tartaglia, L.A., Lee, A., Bennet, G.L., Rice, G.L., Wong, G.H.W., Chen, E.Y. & Goeddel, D.V. (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2830-2834.

- 
- \* Liao, G., Mudryj, M. & de Crombrugge, B. (1985) Identification of the promoter and first exon of the mouse  $\alpha_1$ (III) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 260, 3773-3777.
- \* Lichter, A., Stover, M.L., Angilly, J., Kream, B. & Rowe, D.W. (1989) Isolation and characterization of the rat alpha 1(I) collagen promoter. Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Biol. Chem.* 264, 3072-3077.
- \* Locksley, R.M., Heinzl, F.P., Shepard, H.M., Agosti, J., Eessalu, T.E., Aggarwal, B.B. & Harlan, J.M. (1987) Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J. Immunol.* 139, 1891-1895.
- \* Loetscher, H., Pan, Y. C. E., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. & Lesslauer, W. (1990) Molecular cloning and expression of the human 55kD tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61, 351-359.
- \* Lowenthal, J.W., Ballard, D.W., Bohnleinm E. & Greene, W.C. (1989) Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces proteins that bind specifically to  $\kappa$ B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor  $\alpha$ -chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2331-2335.
- \* Lynn, W.S., Matthews, D., Cloyd, M., Wallwork, J.C., Thompson, A. & Sachs, C.Jr. (1989) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and cytotoxicity. *Arch. Environ. Health* 44, 323-330.
- \* MacNicol, M. & Schulman, H. (1992) Cross-talk between protein kinase C and multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267 (17) 12197-12201.

- 
- \* Mak, K.M., Leo, M.A. & Lieber, C.S. (1984) Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology* 87, 188-200.
- \* Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, a Laboratory manual. NY. Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
- \* Mark, D.F., Wang, A. & Levenson, C. (1987) Site-specific mutagenesis to modify the human tumor necrosis factor gene. *Methods Enzymol.* 154, 403.
- \* Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M.J., Semon, D., Muller, R., Ruyschaert, M.R., Van Vliet, A. & Fiers, W. (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.* 152, 515-522.
- \* Martin, T.W., Wysolmerski, R.B. & Lagunoff, D. (1987) Phosphatidylcholine metabolism in endothelial cells: evidence for phospholipase A and a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase C. *Bioch. Bioph. Acta* 917, 296-307.
- \* Martínez-Hernández, A. (1985) The hepatic extracellular matrix. II: Electron immunohistochemical studies in rats with  $\text{CCl}_4$  induced cirrhosis. *Lab. Invest.* 53, 166-186.
- \* Matsuoka, M., Phan, N.T. & Tsukamoto, H. (1989) Differential effects of interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ 1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* 9, 71-78.
- \* Matthews, N. (1983) Anti-tumor cytotoxine produced by human monocytes: studies on its mode of action. *Br. J. Cancer* 48, 405-413.

- 
- \* Matthews, N., Neale, M.L., Jackson, S.K. & Stark, J.M. (1987) Tumour cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 62, 153-155.
- \* Mauco, G., Fauvel, J., Chap, H. & Douste-Blaqy, L. (1984) Studies on enzymes related to diacylglycerol production in activated platelets. II. Subcellular distribution, enzymatic properties and positional specificity of diacylglycerol- and monoacylglycerol-lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 796, 169-177.
- \* Mauviel, A., Daireaux, M., Rédini, F., Galera, P., Loyau, G. & Pujol, J.P. (1988) Tumor necrosis inhibits collagen and fibronectin synthesis in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 236, 47-52.
- \* Mauviel, A., Heino, J., Kahari, V.M., Hartmann, D.J., Loyau, G., Pujol, J.P. & Vuorio, E. (1991) Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 96, 243-249.
- \* Meichle, A., Schutze, S., Hensel, G., Brunsing, D. & Kronke, M. (1990) Protein kinase C-independent activation of nuclear factor  $\kappa$ B by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 265, 8339-8343.
- \* Meyer, D.H., Bachem, M.G. & Gressner, A.M. (1990) Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by kupffer cell-derived transforming growth factors type  $\beta$ 1 and type  $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1122-1129.

- 
- \* Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Hahn, E.G. & Stein, H. (1989a) In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 10, 84-92.
- \* Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Kim, K.Y., Riecken, E.O. & Stein, H. (1990) Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology* 98, 175-184.
- \* Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Riecken, E.O. & Stein, H. (1989b) Cellular localization of laminin gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* 134, 1175-1182.
- \* Mix, L.L., Dinerstein, R.J. & Villareal, M.L. (1984) Mitogens and melittin stimulate an increase in intracellular free calcium concentration in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 69-75.
- \* Miyamoto, T., Itoh, M., Noguchi, Y. & Yokochi, K. (1992) Role of intracellular Ca<sup>2+</sup> and the calmodulin messenger system in pepsinogen secretion from isolated rabbit gastric mucosa. *Gut* 33, 21-25.
- \* Mohri, M., Spriggs, D.R., & Kufe, D. (1990) Effects of lipopolysaccharide on phospholipase A<sub>2</sub> activity and tumor necrosis factor expression in HL-60 cells. *J. Immunol.* 144, 2678-2682.
- \* Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. & de Laat, S.W. (1986) Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323, 171-173.

- 
- \* Mosselmans, R., Hepburn, A., Dumont, J.E., Fiers, W. & Galand, P. (1988) Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J. Immunol.* 141, 3096-3100.
- \* Nagai, M. (1989) The effects of a prostaglandin E<sub>2</sub> on DNA and collagen synthesis in osteoblasts *in vitro*. *Calcif. Tissue Int.* 44, 411-420.
- \* Nakamura, N., Fusamoto, H. & Koizumi, T. (1975) The effects of aminoacetonitrile and its derivative on components of hepatic connective tissue in rat with chronic hepatic injury. *Acta Hepatogastroenterol.* 22, 78-84.
- \* Nakashima, S., Nagata, K.I., Veeda, K. & Nozawa, Y. (1988) Stimulation of arachidonic acid releas by guanine nucleotide in saponin-permeabilized neutrophils: evidence for involvement of GTP-binding protein in phospholipase A<sub>2</sub> activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 375-383.
- \* Nanes, M.S., McKoy, W.M. & Marx, S.J. (1989) Inhibitory effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon  $\gamma$  on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* 124, 339-345.
- \* Neale, M.L., Fiera, R.A. & Matthews, N. (1988) Involvement of phospholipase A<sub>2</sub> activation in tumour cell killing by TNF. *Immunol.* 64, 81-85.
- \* Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarret, N.J., Pennica, D., Goeddel, D.V. & Gray, P.W. (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucl. Acid. Res.* 13, 6361-6373.

- 
- \* Neer, E.J. & Clapham, D.E. (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333, 129-134.
- \* Nehls, M.C., Grapilon, M.L. & Brenner, D.A. (1992) NF-1/Sp1 switch elements regulate collagen  $\alpha_1(I)$  gene expression. *DNA and Cell Biol.* 11, 443-452.
- \* Nehls, M.C., Rippe, R.A., Veloz, L. & Brenner, D.A. (1991) Transcription factors Nuclear Factor I and Sp1 interact with the murine collagen  $\alpha_1(I)$  promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4065-4073.
- \* Niitsu, Y., Watanabe, N., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M., Sone, H. & Kuriyama, H. (1988) Induction of synthesis of tumor necrosis factor in human and murine cell lines by exogenous recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 48, 5407-5410.
- \* Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.
- \* Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- \* Oikarinen, A.I., Vuorio, E.I., Zaragoza, E.J., Palotie, A., Chu, M.L. & Uitto, J. (1988) Modulation of collagen metabolism by glucocorticoids. Receptor mediated effects of dexamethasone on collagen biosynthesis in chick embryo fibroblasts and chondrocytes. *Bioch. Pharmacol.* 37, 1451-1462.
- \* Old, L.J. (1985) Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230, 630-632.

- 
- \* Oppenheim, J.J., Dubois, C.M., Ruscetti, F.W. & Keller, J.R. (1990) Regulation of the production and receptors for interleukin, and tumor necrosis factor. En Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation. Wiley-Liss Inc. NY. 183-194.
- \* Osborn, L., Kunkel, S. & Nabel, G.J. (1989) Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor  $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2336-2340.
- \* Owen, T.A., Bortell, R., Yocum, S.A., Smock, S.L., Zhang, M., Abate, C., Shalhoub, V., Atonin, N., Wright, K.L., Van-Wijnen, A.L. et al. (1990) Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by fos-jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9990-9994.
- \* Paglia, L., Wilczek, J., de Leon, L.D., Martin, G.R., Horlein, D. & Muller, P. (1979) Inhibition of procollagen cell-free synthesis by aminoterminal extension peptides. *Biochemistry* 18, 5030-5033.
- \* Pavlin, D., Lichtler, A.C., Bedalov, A., Kream, B.E., Harrison, J.R., Thomas, H.F., Gronowicz, G.A., Clark, S.H., Woody, C.O. & Rowe, D.W. (1992) Differential utilization of regulatory domains within the  $\alpha_1(I)$  collagen promoter in osseous and fibroblastic cells. *J. Cell Biol.* 116, 227-236.
- \* Perr, H.A., Graham, M.F., Diegelman, R.F. & Downs, R.W. (1988) Cyclic nucleotides regulate collagen production by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 96, 1521-1528.



- 
- \* Peterkofsky, B., Chojkier, M. & Bateman, J. (1982) en *Immunochemistry of the Extracellular Matrix* (Furthmayr, H., ed) Vol. 2, pp. 19-47, CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL.
- \* Peterkofsky, B. & Diegelmann, R. (1971) Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 10, 988-994.
- \* Peters, K.M., Snyder, K.F., Rush, B.D., Ruwart, M.J. & Henley, K.S. (1989) 16, 16 dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> decreases the formation of collagen in fibrotic rat liver slices. *Prostaglandins* 37, 445-456.
- \* Philip, R. & Epstein, L.B. (1986) Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself,  $\gamma$ -interferon and interleukin-1. *Nature* 323, 86-89.
- \* Pierce, R.A., Glaug, M.R., Greco, R.S., Mackenzie, J.W., Boyd, C.D. & Deak, S.B. (1987) Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J. Biol. Chem.* 262, 1652-1658.
- \* Pinzani, M., Failli, P., Ruocco, C., Casini, A., Milani, S., Baldi, E., Giotti, A. & Gentilini, P. (1992) Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J. Clin. Invest.* 90, 642-646.
- \* Popper, H. & Udenfriend, S. (1970) Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am. J. Med.* 49, 707-721.
- \* Pun, K.K. (1989) The importance of parathyroid hormone in inhibition of collagen synthesis and mitogenesis of osteoblastic cell. *J. Biochem.* 106, 1090-1093.

- 
- \* Pytel, B.A., Johnson, S.E. & Baglioni, C. (1990) Plasminogen activator inhibitor type-2 is induced by tumor necrosis factor and protein kinase C activity is required for its induction. In Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy. Basel, Karger. 31-37.
- \* Raghov, R., Gossage, D. & Kang, A.H. (1986) Pretranslational regulation of a type I procollagen, fibronectin and a 50 kilodalton noncollagenous extracellular matrix protein by dexamethasone in rat fibroblast. *J. Biol. Chem.* 261, 4677-4684.
- \* Ravazzolo, R., Karsenty, G. & de Crombrughe, B. (1991) A fibroblast-specific factor binds to an upstream negative control element in the promoter of the mouse alpha 1(I) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 266, 7382-7387.
- \* Rhee, S.G. (1991) Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the  $\gamma_1$  isoform with tyrosine kinase. *Trends in Biol. Sci.* 16, 297-301.
- \* Richter, J., Andersson, T. & Olsson, I. (1989). Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J. Immunol.* 142, 3199-3205.
- \* Richter, J., Ng-Sikorsky, J., Olsson, I. & Andersson, T. (1990) Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is independent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free  $Ca^{2+}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9472-9476.
- \* Ritchie, A.J., Johnson, D.R., Ewenstein, B.M. & Pober, J.S. (1991) Tumor necrosis factor induction of endothelial cell surface antigens is independent of protein kinase C activation or inactivation. *J. Immunol.* 146, 3056-3062.

- 
- \* Rittenhouse-Simmons, S. (1979) Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets. *J. Clin. Invest.* 63, 580-587.
- \* Ritzenthaler, J.D., Goldstein, R.H., Fine, A., Lichtler, A., Rowe, D.W. & Smith, B.D. (1991) Transforming-growth-factor- $\beta$  activation elements in the distal promoter regions of the rat  $\alpha_1$  type I collagen gene. *Biochem. J.* 280, 157-162.
- \* Rojkind, M. (1982) Fibrogenesis. en *The Liver: Biology and Pathobiology*. Arias, I., Popper, H., Schachter, D. & Shafritz, D.A., eds. Raven Press, NY.
- \* Rojkind, M. & Dunn, M.A. (1979) Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 76, 849-863.
- \* Ron, D., Brasier, A.R., McGehee, R.E.Jr. & Habener, J.F. (1992) Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J. Clin. Invest.* 89, 223-233.
- \* Rossi, P. & de Crombrughe, B. (1987) Formation of a type I collagen RNA dimer by intramolecular base-pairing of a conserved sequence around the translation initiation site. *Nucl. Acid Res.* 15, 8935-8956.
- \* Rossi, F., Grzeskowiak, M., Della Bianca, V. & Sbarbati, A. (1991) De novo synthesis of diacylglycerol from glucose. A new pathway of signal transduction in human neutrophils stimulated during phagocytosis of  $\beta$ -glucan particles. *J. Biol. Chem.* 266, 8034-8038.
- \* Rossow, C.M.S., Vergeer, W.P., du Plooy, S.J., Bernard, M.P., Ramirez, F. & de Wet, J. (1987) DNA sequences in the first intron of the pro- $\alpha_1$ (I) collagen gene enhance transcription. *J. Biol. Chem.* 262, 15151-15157.

- 
- \* Ruff, M.R. & Gifford, G.E. (1981) Tumor necrosis factor. En *Lymphokines*, Vol. 2. E.Pick, ed.. Academic Press, N.Y., 235.
- \* Rustembeck, I. & Lenzen, S. (1989) Regulation of transmembrane ion transport by a reaction products of phospholipase A<sub>2</sub>. II. Effects of arachidonic acid and other fatty acids on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 147-155.
- \* Scharffetter, K., Heckmann, M., Hatamochi, A., Mauch, C., Stein, B., Riethmuller, G., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. & Krieg, T. (1989) Synergistic effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* 181, 409-419.
- \* Scheurich, P., Thoma, B., Unglaub, R. & Pfizenmaier, K. (1988) en *Tumor Necrosis Factor/Cachectin and Related Cytokines* (Bonavida, B., Gifford, G.E., Kirchner, H., & Old, L.J. eds.) pp. 38-44, Karger, Basel.
- \* Scheurich, P., Kronke, M., Schluter, C., Ucer, U & Pfizenmaier, K. (1986) Noncytotoxic mechanism of action of tumor necrosis factor- $\alpha$  on human tumor cells: enhancement of HLA gene expression synergistic with interferon- $\gamma$ . *Immunobiol.* 172, 291-300.
- \* Scholz, W. & Altman, A. (1989) Synergistic induction of interleukin 2 receptor (TAC) expression on YT cells by interleukin 1 or tumor necrosis factor  $\alpha$  in combination with cAMP inducing agents. *Cell. Signal.* 1, 367-375.
- \* Schutze, S., Berkovic, D., Tomsing, O., Unger, C. & Kronke, M. (1991) TNF induces rapid production of 1'2'diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* 174, 975-988.

- 
- \* Schutze, S., Nottrott, S., Pfizemaier, K. & Kronke, M. (1990) TNF signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of PKC. *J. Immunol.* 144, 2604-2608.
- \* Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. & Kronke, M. (1992) TNF activates NF- $\kappa$ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765-776.
- \* Schutze, S., Scheurich, P., Pfizenmaier, K. & Kronke, M. (1989) TNF signal transduction. *J. Biol. Chem.* 264, 3562-3567.
- \* Scuderi, P. (1989) Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME). *J. Immunol.* 143, 168-173.
- \* Sehgal, P.B., Walther, Z. & Tamm, I. (1987) Rapid enhancement of  $\beta_2$ -interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3663-3667.
- \* Sen, R. & Baltimore, D. (1986) Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- \* Shakhov, A.N., Collart, M.A., Vassalli, P., Nedospasov, S.A. & Jongeneel, C.V. (1990)  $\kappa$ B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.* 171, 35-47.
- \* Shaw, G. & Kamin, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667.

- 
- \* Shiratori, Y., Ichida, T., Kawasase, T. & Wisse, E. (1986) Effect of acetaldehyde on collagen synthesis by fat-storing cells isolated from rats treated with carbon tetrachloride. *Liver* 6, 246-251.
- \* Silk, S.T., Clejan, S. & Witkom, K. (1989) Evidence of GTP-binding protein regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity in isolated human platelet membranes. *J. Biol. Chem.* 264, 21466-21469.
- \* Simkevich, C.P., Thompson, J.P., Poppleton, H. & Raghov, R. (1992) The transcriptional tissue specificity of the human pro $\alpha$ 1(I) collagen gene is determined by a negative *cis*-regulatory element in the promoter. *Biochem. J.* 286, 179-185.
- \* Siegel, R.C. & Fu, J.C. (1976) Collagen crosslinking purification and substrate specificity of lxyloxidase. *J. Biol. Chem.* 251, 5779-5785.
- \* Smith, R.A., Kirstein, M., Fiers, W. & Baglioni, C. (1986) Species specificity of human and murine tumor necrosis factor: a comparative study of tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* 261, 14871-14874.
- \* Smith, D.D., Gowen, M. & Mundy, G.R. (1987) Effects of interferon- $\gamma$  and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 120, 2494-2499.
- \* Smith, M.R., Munger, W.E., Kung, H.F., Takacs, L. & Durum, S.K. (1990) Direct evidence for an intracellular role for TNF $\alpha$ . *J. Immunol.* 144, 162-169.
- \* Solís-Herruzo, J.A. (1988) Bases moleculares de la fibrosis hepática. *Gastroent. y Hepatol.* 11, 463-483.

- 
- \* Solís-Herruzo, J.A., Brenner, D.A. & Chojkier, M. (1988) Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263, 5841-5845.
- \* Spriggs, D.R., Deutsch, S. & Kufe, D.W. (1992) Genomic structure, induction, and production of TNF- $\alpha$ . En Tumor Necrosis Factors. Structure, Function, and Mechanism of Action. Marcel Dekker, Inc. NY.
- \* Spriggs, D.R., Imamura, K., Rodriguez, C., Horiguchi, J. & Kufe, D.W. (1987) Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6563-6566.
- \* Spriggs, D.R., Sherman, M.L., Imamura, K., Mohri, M., Rodriguez, C., Robbins, G. & Kufe, D.W. (1990) Phospholipase A<sub>2</sub> activation and autoinduction of tumor necrosis factor gene expression by tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 50, 7101-7107.
- \* Steinmann, B.U., Martin, G.R., Baum, B.I. & Crystal, R.G. (1979) Synthesis and degradation of collagen by skin fibroblasts from controls and patients with osteogenesis imperfecta. *FEBS Lett.* 101, 269-272.
- \* Stephenson, M.L., Goldring, M.B., Birkhead, J.R. et al. (1987) Stimulation of procollagenase synthesis parallels increases in cellular procollagenase mRNA in human articular chondrocytes exposed to recombinant interleukin 1 or phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 144, 583-590.
- \* Strominger, J.L. (1986) Human major histocompatibility complex genes: class I antigens and tumor necrosis factor. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1, 63.

- 
- \* Suffys, P., Beyaert, R., Van Roy, F. & Fiers, W. (1987) Reduced tumour necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 149, 735-743.
- \* Sweatt, J.D., Blair, I.A., Cragoe, E.J. & Limbird, L.E. (1986a) Inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange block epinephrine- and ADP-induced stimulation of human platelet phospholipase C by blockade of arachidonic acid release at a prior step. *J. Biol. Chem.* 261, 8660-8666.
- \* Sweatt, J.D., Connolly, T.M., Cragoe, E.J.Jr. & Limbird, L.E. (1986b) Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulates receptor-mediated phospholipase A<sub>2</sub> activation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261, 8667-8673.
- \* Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., Reynolds, C., Palladino, M.A.Jr. & Goeddel, D.V. (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9292-9296.
- \* Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5201-5205.
- \* Tobler, A., Johnston, D. & Koeffler, H.P. (1987) Recombinant human tumor necrosis factor<sub>α</sub> regulates *c-myc* expression in HL-60 cells at the level of transcription. *Blood* 70, 200-205.
- \* Tomita, K., Shirai, H. & Hakoshima, T. (1990) X-Ray structural studies of tumor necrosis factor. En Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy. Basel. Karger. 38-42.



- 
- \* Tsujimoto, M., Yip, Y.K. & Vilcek, J. (1986) Interferon- $\gamma$  enhances expression of cellular receptors for TNF. *J. Immunol.* 136, 2441-2444.
- \* Van der Rest, M. & Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823.
- \* Van Zantenn, R.A.A., van Leeuwen, R.E. & Wilson, J.H.P. (1988) Serum procollagen III N-terminal peptide and laminin P1 fragment concentrations in alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* 177, 141-146.
- \* Varga, J., Diaz-Perez, A., Rosenbloom, J. & Jimenez, S. (1987) PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 147, 1282-1288.
- \* Weiner, F.R., Czaja, M.J., Giambrone, M.A., Takahashi, S., Biempica, L. & Zern, M.A. (1987) Transcriptional and posttranscriptional effects of dexamethasone on albumin and procollagen messenger RNAs in murine schistosomiasis. *Biochemistry* 26, 1557-1562.
- \* Weiner, F.R., Shah, A., Smith, P.J., Rubin, C.S. (1989) Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Biochemistry* 28, 4094-4099.
- \* Wet, W., Bernard, M., Benon-Chanda, V., Chu, M.L., Dickson, L., Weil, D. & Ramirez, F. (1987) Organization of the human pro  $\alpha_2(I)$  collagen gene. *J. Biol. Chem.* 262, 16032-16036.

- 
- \* White, B.A. & Bancroft, F.C. (1982) Cytoplasmic dot hybridization. Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J. Biol. Chem.* 257, 8569-8572.
- \* Wilson, T. & Treisman, R. (1988) Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3'AU-rich sequences. *Nature* 336, 396-399.
- \* Woessner, J.F.Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2154.
- \* Yamada, Y., Mudryij, M. & De Crombrugge, B. (1983) A uniquely conserved regulatory signal is found around the translation initiation site in three different collagen genes. *J. Biol. Chem.* 258, 14914-14919.
- \* Yamamoto, R., Wang, A., Vitt, C.R. & Lin, L.S. (1989). Histidine-15: an important role in the cytotoxic activity of human tumor necrosis factor. *Protein Eng.* 2, 553.
- \* Yamato, K., El-Hajjaoui, Z., Kuo, J.F. & Koeffler, H.P. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Signals for its mRNA accumulation. *Blood* 74, 1314-1320.
- \* Yarden, A. & Kimchi, A. (1986) Tumor necrosis factor reduces *c-myc* expression and cooperates with interferon- $\gamma$  in HeLa cells. *Science* 234, 1419-1421.
- \* Yoshimura, T., Sone, S. & Ogura, T. (1990) Membrane perturbation as a possible cytotoxic mechanism of TNF and interferons. En *Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy*. Basel, Karger. 70-76.

- \* Yuo, A., Kitagawa, S., Suzuki, I., Urabe, A., Okabe, T., Saito, M. & Takaku, F. (1989) Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. *J. Immunol.* 142, 1678-1684.
- \* Zhang, Y., Lin, J.L., Yip, Y.K. & Vilcek, J. (1988) Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by TNF and IL-1 in human fibroblasts: role in the induction of IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6802-6805.

Presidentes:

Dr. M. Ruiz Amil

Vocales:

Dr. J. Arenas Barbero

Dr. M. Ugarte

Dr. R. Garesse Merin

Secretario:

Dr. E. Palacio Alariz

Reunida en el día de hoy, el Tribunal que  
adogan se expresa, para juzgar esta tesis de  
acordó por unanimidad de votos

de Apto cum Laude

Madrid, 22 de Junio de 1943

El Secretario del Tribunal

*E. Palacio Alariz*