A decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes and two thin blue lines. One line starts from the top left and passes through the top-left edge of the largest circle. The other line starts from the top right and passes through the top-right edge of the largest circle. The circles are arranged in a roughly triangular pattern, with the largest one at the top, a medium one in the middle, and a large one at the bottom right.

# **Papel de FAST (Fas-activated serine/threonine phosphoprotein) en la inmunidad innata.**

Proyecto de Fin de Máster.

Dirigido por María Simarro Grande.  
Máster en Investigación Biomédica.  
Curso 2011-2012.  
IBGM-Facultad de Medicina.  
CSIC-Universidad de Valladolid.

**Eva María Antolín Simón.**  
**2 de julio de 2012.**

---

## INDICE

---

### INTRODUCCION

### OBJETIVOS

### MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales
2. Obtención de macrófagos peritoneales
3. Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos
4. Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia
5. Ensayo de fagocitosis
6. Evaluacion por real time PCR del silenciamiento de FAST mediante siRNA
7. Evaluacion por western blot del silenciamiento de FAST mediante siRNA
  - 7.1. Obtención de extractos proteicos
  - 7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE
  - 7.3. Análisis western blot
8. Analisis estadístico y gráficos

### RESULTADOS

1. Análisis de la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones FAST KO y ratones silvestre
2. Silenciamiento de la expresión de FAST en macrófagos humanos derivados de células THP-1
3. Análisis de la capacidad fagocítica frente a Escherichia coli de los macrófagos derivados de células THP-1 en las que se ha silenciado la expresión de FAST

### DISCUSIÓN

### CONCLUSIONES

### AGRADECIMIENTOS

### BIBLIOGRAFÍA

## INTRODUCCIÓN

---

### **RESPUESTA INMUNE INNATA**

La interacción entre las bacterias y el sistema inmune determina el equilibrio entre el estado de salud y enfermedad. La identificación de genes importantes en la respuesta inmune innata mejorará nuestro conocimiento de la respuesta de defensa del huésped frente a las bacterias y ayudará en la identificación de individuos con riesgo aumentado de infecciones potencialmente mortales. Es probable que esto abra nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias de manejo diagnóstico, pronóstico y prevención para luchar contra las enfermedades infecciosas.

El ser humano posee, frente a una invasión de agentes infecciosos, tres principales modos de protección:

- 1) Primera línea de defensa: las barreras naturales que dificultan la entrada de patógenos.
- 2) Segunda línea de defensa: la inmunidad innata, presente en todos los seres vivos en mayor o menor grado desde su nacimiento. Ejerce su acción de forma rápida y local, por lo tanto interviene desde el inicio y durante las primeras fases de la infección (0-5 días). Sus efectores son moléculas como el complemento o algunas citocinas, y células como los fagocitos o linfocitos NK (Regueiro, 2010).
- 3) Tercera línea de defensa: la respuesta inmune adaptativa, específica o adquirida, se produce una vez que se han superado las otras dos defensas y sólo se encuentra presente en vertebrados. Su desarrollo requiere varios días y genera la memoria inmunológica. Es la responsable del reconocimiento específico de los diferentes patógenos. En la respuesta adaptativa intervienen factores solubles como citocinas y anticuerpos, así como elementos celulares, fundamentalmente linfocitos B o T (Regueiro, 2010).

Las células clave en la inmunidad innata son los fagocitos entre los que se incluyen: los granulocitos, los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas. Su función es reconocer patrones moleculares muy conservados en los patógenos, que les permite ingerirlos para destruirlos de diferentes modos. También producen citocinas y otros mediadores de la inflamación después de contactar con los patógenos. Los macrófagos y las células dendríticas, son células presentadoras de antígenos a los linfocitos T para así contribuir a desencadenar la respuesta adaptativa (Regueiro, 2010).

La diferenciación de las células madre mieloides y los monocitos a distintos tipos de macrófagos y células dendríticas se produce gracias a diversas citocinas y al microambiente tisular. (Murray, 2009). Los monocitos permanecen en la sangre durante unos pocos días y luego migran a órganos y tejidos. En ellos ocurre un proceso de maduración, que se acompaña de aumento del tamaño celular, desarrollo de un prominente aparato de Golgi y aumento de su contenido de lisosomas. Una vez residen en los tejidos adquieren morfología, marcadores y funciones especializadas dependiendo de la localización, adquiere capacidad fagocítica, producen enzimas líticas y empiezan a secretar gran variedad de sustancias solubles. Los macrófagos son activados por gran variedad de estímulos durante la respuesta inmune. La fagocitosis de antígenos sirve como estímulo inicial; sin embargo, los macrófagos son habitualmente activados por citocinas secretadas

por linfocitos T colaboradores y productos bacterianos. Uno de los más potentes activadores de macrófagos es el interferón gamma. (Murray, 2009).

## **FAGOCITOSIS**

La respuesta del huésped ante la presencia de los microorganismos comprende mecanismos inespecíficos y específicos. Los macrófagos juegan un papel clave en los mecanismos inmunes de respuesta inespecíficos mediante la fagocitosis y la liberación de citocinas. La fagocitosis es uno de los principales mecanismos de eliminación de las bacterias extracelulares y constituye un fenómeno complejo en el que intervienen múltiples componentes.

Independientemente del tipo de patógeno y del número de contactos previos con él, la respuesta inmunitaria innata se activa eficientemente mediante componentes presentes en el microorganismo. Todos los fagocitos presentan en la superficie los mismos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) con baja afinidad por sus ligandos, que identifican los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Regueiro, 2010).

Los lipopolisacáridos bacterianos son el prototipo de PAMP. Otros PAMPs incluyen al ácido lipoteicoico para las bacterias Gram positivas, y peptidoglucanos, y variantes de ácido nucleico normalmente asociado con virus.

Entre los PRRs de los macrófagos se encuentran los receptores de superficie: Fc- $\gamma$ , RI, Fc- $\gamma$  RII y Fc- $\gamma$  RIII, que se unen con la porción Fc de la IgG. También expresan los receptores de superficie CRI y CR3, que interactúan con el producto C3b de la cascada del complemento; a través de ellos mejoran la fagocitosis de los cuerpos recubiertos por dichas proteínas. Los receptores de tipo *toll* también se encuentran presentes en los macrófagos y se encargan de activar respuestas protectoras (Murray, 2009).

La activación de los fagocitos tiene lugar cuando sus receptores interactúan con determinadas citocinas o molécula derivadas de los microorganismos. Consiste en cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales. Se produce una cascada de señalización que desencadena la endocitosis del siguiente modo (Regueiro, 2010):

- 1) Unión: hace referencia a la fase de fijación entre el fagocito y el microorganismo implicado a través de receptores de carbohidratos bacterianos (lectinas), o de receptores de fibronectina (sobre todo en el caso de *Staphylococcus aureus*) y de receptores de opsoninas (de la proteína de unión a la manosa y Fc de anticuerpos) (Regueiro, 2010).
- 2) Internalización: consiste en la formación de la vacuola fagocítica que envuelve el microorganismo (fagosoma). Este proceso se lleva a cabo mediante extensión de unas proyecciones de la membrana plasmática (pseudópodos), rodeando la partícula hasta que se unen los extremos (Regueiro, 2010).
- 3) Digestión: permite la inactivación y digestión del contenido de la vacuola mediante la fusión con los lisosomas dando lugar a los llamados fagolisosomas. La eliminación del patógeno se lleva a cabo mediante el pH bajo que se alcanza en los fagosomas así como por enzimas microbicidas y otras moléculas que inactivan inespecíficamente gran variedad de microorganismos. Como el proceso se lleva a cabo dentro del fagosoma, esto evita la autodestrucción del fagocito (Regueiro, 2010).

## **BACTERIAS**

Las bacterias extracelulares Gram positivas y Gram negativas producen enfermedad a través de la síntesis de toxinas y de la inducción de respuestas inflamatorias que se acompañan de gran daño tisular local así como de génesis de efectos nosológicos tanto a nivel de determinados órganos como a nivel sistémico. Algunos mecanismos de respuesta del huésped son comunes para ambos tipos de bacterias, otros en cambio son respuestas particulares para cada uno de estos grupos.

Los cocos Gram positivos son un grupo heterogéneo de bacterias de forma esférica y que carecen de endosporas. Según su actividad catalasa, que es muy sencilla de determinar, se pueden subdividir en varios géneros (Murray, 2009). El género *Staphylococcus* presenta 40 especies y 24 subespecies. Son aerobios facultativos, catalasa positivo, sus células se agrupan de manera similar a un racimo de uvas, con cocos de un diámetro de 0,5-1µm, son inmóviles y crecen entre 10 y 40°C y a concentraciones elevadas de sal. Muchas especies se encuentran en la piel y las mucosas del ser humano, algunas en nichos muy específicos, ocasionando patologías como infecciones en la piel, tejidos blandos, huesos y aparato genitourinario además de infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos (Murray, 2009). *Staphylococcus aureus* es la especie más virulenta y mejor conocida. Su nombre deriva del color dorado que adquieren sus colonias debido a los pigmentos carotenoides que producen durante su crecimiento. Es la única especie que se encuentra en humanos y presenta la característica fundamental de producir enzima coagulasa, que se encuentra en la superficie externa de la mayoría de las cepas y es uno de los principales factores de virulencia que actúa como favorecedora de agregación (Murray, 2009).

Dentro de los bacilos Gram negativos se encuentra la familia Enterobacteriaceae que posee 40 géneros y es el grupo más grande y heterogéneo con importancia clínica. Su tamaño es intermedio (0,3 a 1 x 1 a 6µm), pueden ser flagelados o inmóviles, no forman esporas, su localización es ubicua (suelo, agua, vegetación y en general en la flora intestinal de los animales), son anaerobios facultativos, catalasa-positivos y oxidasa-negativos (Murray, 2009). Existen diversos factores de virulencia comunes a todas las enterobacterias y otros son específicos de determinadas cepas. El lipopolisacárido (LPS) es el principal antígeno de la pared bacteriana. Es termoestable y está compuesto por el polisacárido O somático (es el más externo), el lipopolisacárido central (común a todas la enterobacterias) y el lípido A (Murray, 2009).

*Escherichia*, la especie más frecuente e importante es *Escherichia coli*, de la que muchas cepas provocan enfermedades y algunos serotipos presentan mayor virulencia (Murray, 2009).

## **FAST (Fas-activated serine/threonine phosphoprotein)**

Recientemente se ha descrito la importancia de la proteína FAST (Fas-activated serine threonine kinase) en la respuesta inmune innata. Es una molécula de localización nuclear y mitocondrial y regula la función de los macrófagos modulando la secreción de citocinas y su supervivencia frente al estrés. Se han generado ratones modificados genéticamente que carecen de FAST (FAST knockout o FAST KO) y se ha observado en un modelo de daño pulmonar agudo inducido por lipopolisacárido que la inflamación pulmonar es significativamente menor en los ratones deficientes en FAST, con gran reducción en la infiltración de neutrófilos y en las concentraciones de citocinas y quimiocinas en el lavado broncoalveolar. El análisis de quimeras de médula ósea y ensayos in vitro demuestran que los macrófagos alveolares son las células responsables del fenotipo (Simarro, 2010a).

FAST es una proteína multifuncional localizada en núcleo y mitocondria. Se ha observado que la fracción mitocondrial está fosforilada en células Jurkat (línea celular humana que proviene de linfocitos T) en respuesta a señales transmitidas a través del receptor de muerte celular Fas (Tian, 1995) y que la sobreexpresión de FAST produjo inhibición de la apoptosis inducida por ligación de Fas y por radiación UV (Li, 2004). Inesperadamente no se encontró alteración de la apoptosis en varios tipos de células inmunes en los ratones FAST KO. Nuestro trabajo previo (Simarro, 2007) ha demostrado que FAST nuclear participa en el fenómeno de splicing alternativo.

FAST (Fas activated serine threonine phosphoprotein) es el miembro fundador de una nueva familia de proteínas llamada FAST y que incluye además a otras cinco proteínas denominadas FASTKD 1-5, que comparten una secuencia de localización mitocondrial amino terminal y tres dominios carboxilo terminal (FAST\_1, FAST\_2 y RAP) de función desconocida. Aunque todos los miembros de la familia FASTK se expresan de forma ubicua, algunos son particularmente abundantes en tejidos enriquecidos en mitocondrias (por ejemplo, corazón, músculo esquelético y tejido adiposo pardo) (Simarro, 2010b).

El dominio RAP de aproximadamente 60 amino ácidos (dominio de unión a RNA abundante en Apicomplexans) podría unirse a RNA por estar presente en numerosas proteínas involucradas en trans-splicing. Los dominios FAST\_1 (70 amino ácidos) y FAST\_2 (90 amino ácidos) situados en el extremo carboxilo de todos los miembros de la familia FAST, tienen función desconocida. Las proteínas FAST tienen baja homología de secuencia fuera de los dominios mencionados. Los seis miembros de la familia FAST poseen secuencias de localización mitocondrial (Simarro, 2010b).

Los genes ortólogos de FAST se encuentran en el antepasado común de vertebrados. La homología de secuencia entre los ortólogos es de entre un 5 y un 10% mayor en los dominios FAST\_1, FAST\_2 y RAP que la observada en el N terminal. Algunos ortólogos pueden haber evolucionado independientemente lo que sugiere que estos genes pueden tener funciones no redundantes en vertebrados. La restricción de los miembros de la familia FAST a las clases de animales relativamente recientes, sugiere que estas proteínas pueden modular la regulación fina de producción de energía por la mitocondria (Simarro, 2010b).

## **OBJETIVOS**

---

Nuestra propuesta de investigación tiene por objeto estudiar el papel de FAST en una función crucial de la respuesta inmune innata: la capacidad fagocítica de los macrófagos.

Nuestros objetivos concretos fueron:

- 1) Estudio de la fagocitosis en macrófagos peritoneales procedentes de ratones knock-out para FAST y silvestres de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- 2) Puesta a punto y evaluación del silenciamiento de la expresión de FAST mediante el uso de ARNs pequeños de interferencia (siRNA) en macrófagos humanos diferenciados de monocitos THP-1.
- 3) Estudio de la fagocitosis en macrófagos humanos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST y células control, de bacterias Gram positivas y Gram negativas.



---

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **1. ANIMALES**

Los ratones silvestre y ratones deficientes en la proteína FAST (FAST knockout o FAST KO) son alimentados y mantenidos en jaulas estériles (4-5 ratones por jaula) en una habitación del animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid con un ciclo de luz/oscuridad estándar (12 horas luz/12 horas oscuridad). Los ratones utilizados en todos los experimentos fueron de 8 a 12 semanas de edad con un promedio de peso de 18-20 g. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo una campana de flujo laminar usando las precauciones asépticas.

### **2. OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES**

Los animales fueron estimulados con 2,5 ml tioglicolato estéril (3%) por vía intraperitoneal. Cinco días después, fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados por dislocación cervical. Se colectó el exudado de células por lavado de la cavidad peritoneal con 5 ml de medio RPMI 1640 a 4°C. El exudado obtenido se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 minutos; el *pellet* se resuspendió en 20 ml de medio completo: RPMI con Glutamax I (Gibco) con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100U/ml de penicilina G, y 100 µg/ml estreptomina (Gibco). La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripano (Sigma) y las células se contaron con una cámara de Neubauer utilizando un microscopio invertido Leica. La concentración celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  macrófagos/ml. Sembramos los macrófagos a una densidad de  $2 \times 10^6$  macrófagos por pocillo suspendidas en 2 ml de medio completo en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas antes de realizar los experimentos.

### **3. DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A MACRÓFAGOS**

La línea celular THP-1 procede de un paciente con leucemia monocítica aguda y las hemos empleado como modelo de monocitos humanos. Estas células presentan un comportamiento característico al ser activadas con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) en virtud del cual adquieren características similares a los macrófagos: dejan de proliferar para producir citoquinas proinflamatorias, se adhieren a las superficies de plástico de las placas de cultivo y son capaces de fagocitar microorganismos.

Para diferenciar las células THP-1 a macrófagos, sembramos las células a una densidad de 250.000 células por pocillo suspendidas en 2 ml de medio completo con PMA a una concentración de 100 ng/ml (en placas de 6 pocillos). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

### **4. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA**

En los últimos años, el RNA de interferencia se ha convertido en una herramienta altamente específica y de gran potencia para silenciar genes diana. Nosotros hemos utilizado la tecnología de ARN interferente pequeño (small interfering RNA, siRNA) para silenciar la expresión de FAST en macrófagos derivados de células THP-1. Los siRNAs fueron obtenidos de Ambion (actualmente absorbida por Invitrogen) y de tipo Silencer Select.



Los oligo Silencer Select representan una nueva generación de siRNAs diseñados por un nuevo algoritmo generado por Ambion que permite identificar las secuencias más potentes y asegurarse que son específicas para el gen diana. Además introduce modificaciones químicas (modificación lock nucleic acid, también llamada de RNA inaccesible) que reducen los efectos secundarios de los siRNAs.

Los siRNAs usados fueron los siguientes:

Control negativo catálogo 4390843

FAST#1 corresponde a un oligo Silencer Select que ha sido testado con catálogo s21478

FAST#2 corresponde a un oligo Silencer Select que ha sido testado con catálogo s21478

Ambos siRNAs se han obtenido de forma liofilizada y anillada, y se han resuspendido en agua libre de RNasas a una concentración de 10  $\mu$ M.

Para la transfección de los siRNAs usamos Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación detallo el protocolo que hemos seguido:

#### **Material y reactivos:**

- “Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Transfection Reagent” de Invitrogen.
- Medio Opti-MEM de Invitrogen sin antibióticos.
- Suspensión de siRNA.
- Medio de cultivo completo.

#### **Procedimiento:**

1. Transfectamos los macrófagos derivados de células THP-1 tras tratamiento con PMA. Como he mencionado anteriormente, las células THP-1 dejan de proliferar tras tratamiento con PMA por lo que nos las encontraremos a una densidad aproximada de 250.000 células por pocillo (en placas de 6 pocillos). A dicha densidad, las células están entre el 30-50% de confluencia, que es lo recomendado.
2. Lavamos dos veces los pocillos con 2 ml de medio completo para eliminar la PMA y finalmente dejamos 2 ml de medio completo en cada pocillo. El medio completo había sido previamente precalentado a 37° C.
3. Diluimos 1,2  $\mu$ l de cada siRNA con 200  $\mu$ l de Opti-MEM.
4. En otro tubo mezclamos 2,5  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 con 200  $\mu$ l de Opti-MEM. Esperamos 5 minutos.
5. Mezclamos el contenido de ambos tubos, agitamos y esperamos 20 minutos (no más de 30 minutos).
6. Añadimos 400  $\mu$ l de la mezcla a cada pocillo de placa de 6. La concentración del siRNA en cada pocillo en cada pocillo era de 5 nM.
7. Homogeneizamos la suspensión moviendo la placa en cruz.
8. Esperamos 48 horas antes de realizar los experimentos.

### **5. ENSAYO DE FAGOCITOSIS**

Nos propusimos estudiar la capacidad de fagocitar de los macrófagos murinos de ratones silvestre y ratones FAST KO, así como la de los macrófagos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST respecto a las células control. A continuación detallo el protocolo que hemos seguido:

#### **Material y reactivos:**

- Cepas bacterianas Escherichia coli DH5 $\alpha$ , BL21 y Staphylococcus aureus Cowan
- Medio Luria-Bertani (LB)
- Medio RPMI 1640
- Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS)

- Citómetro

### **Procedimiento:**

#### Preparación de la suspensión bacteriana:

1. Se toman colonias individuales de las cepas bacterianas de interés de la placa de agar, pasándolas a 2 ml de medio LB, y se incuban a 37° C en agitación (200 r.p.m.) toda la noche.
2. Se lee la absorbancia a 600 nm de una dilución del cultivo bacteriano. Una densidad óptica de 1 equivale aproximadamente a 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

#### Inactivación y tinción de la cepa bacteriana:

1. Se transfieren el equivalente a 10<sup>9</sup> UFC de la cepa de interés en un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y se centrifuga la suspensión a 1.700 g durante 10 minutos a 4° C. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta dejando el *pellet* lo más seco posible y se resuspenden las células en 1 ml de PBS. Centrifugamos de nuevo a 1.700 g durante 10 minutos a 4° C. Se repite este lavado dos veces y se resuspenden las células nuevamente en 1 ml de PBS.
2. A continuación inactivamos las bacterias sometiéndolas a calor: 60 minutos a 80° C.
3. Centrifugamos la suspensión de bacterias inactivadas a 12.000 g durante 2 minutos y eliminamos el sobrenadante con ayuda de una pipeta.
4. Resuspendemos el *pellet* bacteriano en 1 ml de una solución de fluoresceína (Sigma) a una concentración de 0,1 mg/ml en PBS.
5. Centrifugamos de nuevo a 12.000 g durante 2 minutos y resuspendemos el *pellet* bacteriano en 1 ml de PBS. Se repite este lavado 4 veces y se resuspenden las bacterias inactivadas en RPMI 1640 a la concentración adecuada para el ensayo de fagocitosis.

#### Ensayo de fagocitosis:

1. Agregamos 2 ml de RPMI 1640 de una suspensión de bacterias inactivadas y teñidas con FITC equivalente a 100 bacterias por macrófago, a los cultivos de macrófagos murinos y de macrófagos derivados de THP-1 (la densidad de los cultivos se especifica en las secciones 2 y 3 de Material y Métodos, respectivamente). Los pocillos se han lavado previamente dos veces con RPMI 1640.
2. Se incuban a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 ó 2 horas.
3. Lavamos 5 veces los pocillos con 2 ml de PBS para eliminar las bacterias no ingeridas.
4. A continuación añadimos 1 ml de una solución azul de tripano al 4% (Sigma) durante 1 minuto a cada uno de los pocillos para eliminar la señal de bacterias adheridas al macrófago que no han sido ingeridas.
5. Aspiramos la solución azul de tripano y lavamos 3 veces los pocillos con 2 ml de PBS para eliminar los restos de azul de tripano.
6. Despegamos con un raspador las células adheridas al plástico de los pocillos, las transferimos a un tubo de plástico y las fijamos con paraformaldehído al 4% en PBS.
7. Se realizó la lectura de los macrófagos en suspensión en el citómetro Gallios de Beckman Coulter en el Servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Biología y Genética Molecular cuyo responsable es Alvaro Martín Muñoz.

## **6. EVALUACION POR REAL TIME PCR DEL SILENCIAMIENTO DE FAST MEDIANTE siRNA**

Existen distintos métodos para la cuantificación de la cantidad que se expresa de un determinado RNA mensajero (RNAm) en la célula en un momento concreto. El que hemos usado en este proyecto para comprobar la cantidad de mRNA de FAST es la PCR a tiempo real (*real time* PCR).

Brevemente consiste en amplificar una secuencia específica del RNAm que se quiere valorar y hacer un seguimiento a tiempo real de la amplificación. Esto se consigue, retrotranscribiendo el RNAm de la célula a cDNA previamente a la PCR, y durante ésta, hacer un seguimiento de la reacción midiendo la fluorescencia emitida, ya que en la mezcla de la reacción se incorporan reactivos al unirse específicamente a la secuencia amplificada (sondas) o bien cuando se intercalan en el DNA de doble cadena (SYBR-Green).

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. En la primera se determina el número de copias del RNAm valorado, usando como recta patrón un DNA que contiene el fragmento de DNA amplificado a diferentes concentraciones. En la segunda se determina la expresión del RNA valorado en relación a un RNA constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones experimentales.

En este trabajo, las cuantificaciones que se han realizado son relativas, se han referido a la expresión de los genes 18S y  $\beta$ -actina, y se han realizado usando el sistema SYBR Green. Seleccionamos estos genes normalizadores tras aplicar la función applet de GeNORM a un conjunto extenso de genes constitutivos. El análisis se realizó con el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Material y reactivos:**

- TRIzol (Invitrogen)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Kit de retrotranscripción (BioRad)
- Mezcla SYBR Green (Applied Biosystems)
- Aparato Lighcycler 480 (Roche)

### **Procedimiento:**

#### Extracción de RNA:

1. Usamos TRIzol para la extracción de RNA según las instrucciones del producto.
2. Añadimos 1 ml de TRIzol por cada  $5 \times 10^7$  células y pipeteamos la muestra.
3. Incubamos la muestra homogeneizada durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Añadimos 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol. Agitamos los tubos virgorosamente durante 15 segundos y los incubamos a temperatura ambiente durante 2 o 3 minutos. Centrifugamos las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a 4° C. Después de centrifugar la muestra se separa en dos fases y el RNA se encuentra en la fase superior.
4. Transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitamos el RNA de la fase acuosa mezclándola con isopropanol. Se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugamos a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C. El precipitado de RNA, generalmente invisible, forma un *pellet* en el fondo del tubo.
5. Quitar el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Lavar el *pellet* con etanol al 75% añadiendo al menos 1 ml por cada ml de TRIzol usado. Mezclar la muestra en el vórtex y centrifugar a 7.500 g durante 5 minutos a 4° C.

6. Secar brevemente el *pellet* de RNA (al aire por 5-10 minutos). Disolver las muestras de RNA en agua libre de DNAsas y RNAsas.
7. El RNA se cuantificó utilizando el Nanodrop a una absorbancia de 260 nm. Un valor de OD<sub>260</sub>=1 es equivalente a 40 µg/ml de RNA.

#### Obtención de cDNA a partir de RNA:

Con esta finalidad existen distintos kits comerciales que incluyen todos los reactivos necesarios: enzima retrotranscriptasa y cebadores. Nosotros utilizamos un kit de BioRad que incluye una mezcla de cebadores inespecíficos: oligonucleótidos polidT que hibrida con las secuencias poliA de los RNA mensajeros y oligonucleótidos degenerados que idealmente permiten la retrotranscripción de todo el RNA. Procedimos según las instrucciones del producto:

1. En un tubo de PCR mezclamos:
  - 0,5 µg de RNA total
  - 4 µl de un buffer 5x que incluye los oligonucleótidos cebadores
  - 1 µl de retrotranscriptasa
  - H<sub>2</sub>O hasta completar 10 µl
2. A continuación realizamos la síntesis de cDNA en dos etapas:
  - 5 minutos a 25° C
  - 30 minutos a 42° CFinalmente 5 minutos a 85° C para inactivar la retrotranscriptasa.

#### Amplificación y detección de DNA mediante PCR a tiempo real:

1. El diseño y elección de unos buenos cebadores (oligos/primers) para amplificar los genes que queremos valorar es fundamental para una eficiente cuantificación de su expresión mediante PCR a tiempo real usando el reactivo SYBR Green. En este trabajo para el diseño de cebadores he usado el programa “PrimerQuest” del paquete “SciTools” de “Integrated DNA Technologies”. Estas son las secuencias de los cebadores usados:
  - FAST forward: 5’ CAGCAGCAAGGTGGTACAGA 3’
  - FAST reverse: 5’ CGACGCACAATCAGAGCATG 3’
  - 18S forward: 5’ TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT 3’
  - 18S reverse: 5’ TCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCT 3’
  - β-actina forward: 5’ ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA 3’
  - β-actina reverse: 5’ TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA 3’
2. Usamos la mezcla de SYBR Green siguiendo las instrucciones del producto: las amplificaciones se hicieron en un volumen final de 25 µl por pocillo de placa de 96 pocillos:
  - 5 µl del cDNA a una concentración final en el pocillo de 10 ng de equivalentes de RNA / µl
  - 12,5 µl de una mezcla de SYBR Green (2x)
  - 1 µl de una mezcla de primers forward y reverse (cada uno a una concentración de 10 pmol / µl)
  - H<sub>2</sub>O hasta completar 25 µl
3. La PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones:
  - 1 ciclo 10 minutos a 95° C
  - 40 ciclos:
    - 15 segundos a 95° C
    - 30 segundos a 60° C
    - 40 segundos a 72° C

- Una vez finalizada la amplificación se realizan las curvas de fusión para cada pocillo para descartar amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores.

## **7. EVALUACION POR WESTERN BLOT DEL SILENCIAMIENTO DE FAST MEDIANTE siRNA**

El análisis Western blot permite la identificación de una proteína separada por electroforesis mediante un anticuerpo que la reconoce específicamente.

En primer lugar se obtienen extractos proteicos y los separamos en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Después se transfieren las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa se manera que quedan inmovilizadas. Una vez transferidas, esta membrana se incuba con el anticuerpo primario específico para FAST y su presencia se revela con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa que, en presencia de sustrato, genera un producto luminiscente.

### **7.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS**

#### **Material y reactivos:**

- Tampón de lisis RIPA: NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,4, SDS al 0,1%, ácido deoxicólico al 1%, Nonidet P-40 al 1%, inhibidores de proteasa (cóctel de inhibidores de proteasas de Sigma)

#### **Procedimiento:**

1. Partimos de macrófagos derivados de células THP-1 adheridos al plástico de pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos. Lavamos cada pocillo dos veces con PBS.
2. Recogemos las células con la ayuda de un scrapper y las transferimos a un tubo eppendorf en hielo. Centrifugamos y resuspendemos el *pellet* celular en 100 µl de solución de lisis RIPA por cada  $2,5 \times 10^5$  células.
3. Dejamos que se complete la homogeneización de la muestra, dejando los tubos en hielo durante 30 minutos.
4. Centrifugamos los eppendorf durante 30 minutos a 4° C a máxima velocidad en una centrífuga de mesa.
5. Recogemos el sobrenadante que contiene las proteínas solubilizadas en otro tubo limpio y descartamos la fracción no solubilizada que está en el *pellet*.
6. Congelamos las muestras a -80° C hasta su uso.

### **7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE**

#### **Material y reactivos:**

- Tampón de carga Laemmli x4 (LSB x4): Tris-HCl (pH 6,8) 200 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 4%, ditioneitol 100 mM.
- Solución acrilamida-bisacrilamida (30%-0,8%)
- Gel concentrador o *stacking gel*: acrilamida/bisacrilamida 3,3%, Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM, SDS 0,1%, persulfato amónico (APS) 0,1%, TEMED 6,6 mM.
- Gel separador o *running gel*: acrilamida/bisacrilamida 10%, Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM, SDS 0,1%, APS 0,1%, TEMED 2,2 mM.
- Tampón de electroforesis: Tris-Base 25 mM, Glicina 250 mM, SDS al 0,1%.
- Marcador de tamaño molecular preteñido (Fisher Scientific).
- Miniprotean (BioRad).

#### **Procedimiento:**

1. Polimerización de los geles: Montamos los vidrios del sistema de electroforesis según las instrucciones del fabricante. Preparamos el gel separador y se vierte entre los vidrios. Depositamos una ligera capa de isopropanol para nivelar el gel. Una vez polimerizado el gel, se decanta el isopropanol y se añade el gel concentrador. Inmediatamente se sumerge el peine y se deja que polimerice a temperatura ambiente.
2. Preparación de las muestras: en un tubo eppendorf se depositan 15  $\mu$ l del lisado celular (equivalente a 40.000 células) y 5  $\mu$ l de LSB x4. Se mezcla y se hierven las muestras a 95° C durante 5 minutos y se centrifugan a 12.000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
3. Electroforesis: Cargamos las muestras y los marcadores en el gel. Fijamos el voltaje a 150 V y se corre durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa para análisis por Western blot.

### **7.3. ANÁLISIS WESTERN BLOT**

#### **Material y reactivos:**

- Tampón de transferencia: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol al 10%.
- Membrana de nitrocelulosa (BioRad).
- Papel Whatmann 3MM.
- Mini-Protean TransBlot Cell (BioRad).
- Solución de bloqueo y de incubación para los anticuerpos primario y secundario: Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, suero de caballo normal al 5%.
- Tampón de lavado: Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (pH 7,6).
- Anticuerpo primario: policlonal de cabra contra FAST (Santa Cruz, sc 1820) y anticuerpo monoclonal de ratón frente a  $\beta$  actina (Sigma).
- Anticuerpo secundario: policlonal de burro contra anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa HRP (Santa Cruz).
- Reactivo ECL: este reactivo permite la detección de anticuerpos conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce un sustrato luminiscente (Amersham).
- Películas de revelado.

#### **Procedimiento:**

##### Transferencia:

1. Después de la electroforesis descartamos el gel *stacking* y el gel running se sumerge en el tampón de transferencia.
2. Preparamos una bandeja que contiene 500 ml de tampón de transferencia en la que se hace el montaje. Sobre la parte negra colocamos por este orden esponja, un papel Whatmann, el gel, la membrana de nitrocelulosa, un papel Whatmann y una esponja.
3. Cerramos el soporte y se coloca en una cubeta de transferencia orientando la parte negra del soporte hacia el polo negativo de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia el polo positivo.
4. Llenamos la cubeta de tampón de transferencia y aplicamos una corriente constante de 250 mA durante 1 hora. Una vez acabada la transferencia desmontamos el sistema y se separa la membrana.

##### Inmunodetección:

1. Preincubamos la membrana en solución de bloqueo con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.



2. A continuación incubamos la membrana con el anticuerpo primario diluido (1:1000) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Posteriormente hacemos tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado.
3. Después incubamos la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido (1:5000) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Tras la incubación, hacemos tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado.
4. Se eliminan los restos de tampón de lavado y se añade 4 ml de reactivo de ECL. Después de un minuto se limpian los restos del reactivo ECL y las proteínas se detectan con una exposición a un film autorradiográfico.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y GRÁFICOS**

Los resultados se presentan como medias  $\pm$  error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student utilizando el Software Microsoft Office Excel 2010. También se utilizó Microsoft Office Excel 2010 para analizar los resultados de la PCR a tiempo real. Los valores se consideraron significativos cuando  $p < 0,05$ .

\* valor  $p < 0,05$

\*\* valor  $p < 0,01$

\*\*\* valor  $p < 0,001$

Los gráficos fueron realizados usando el software GraphPad Prisma 5, Adobe Photoshop 6.0 y Adobe Illustrator CS3.



## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES FAST KO Y RATONES SILVESTRE

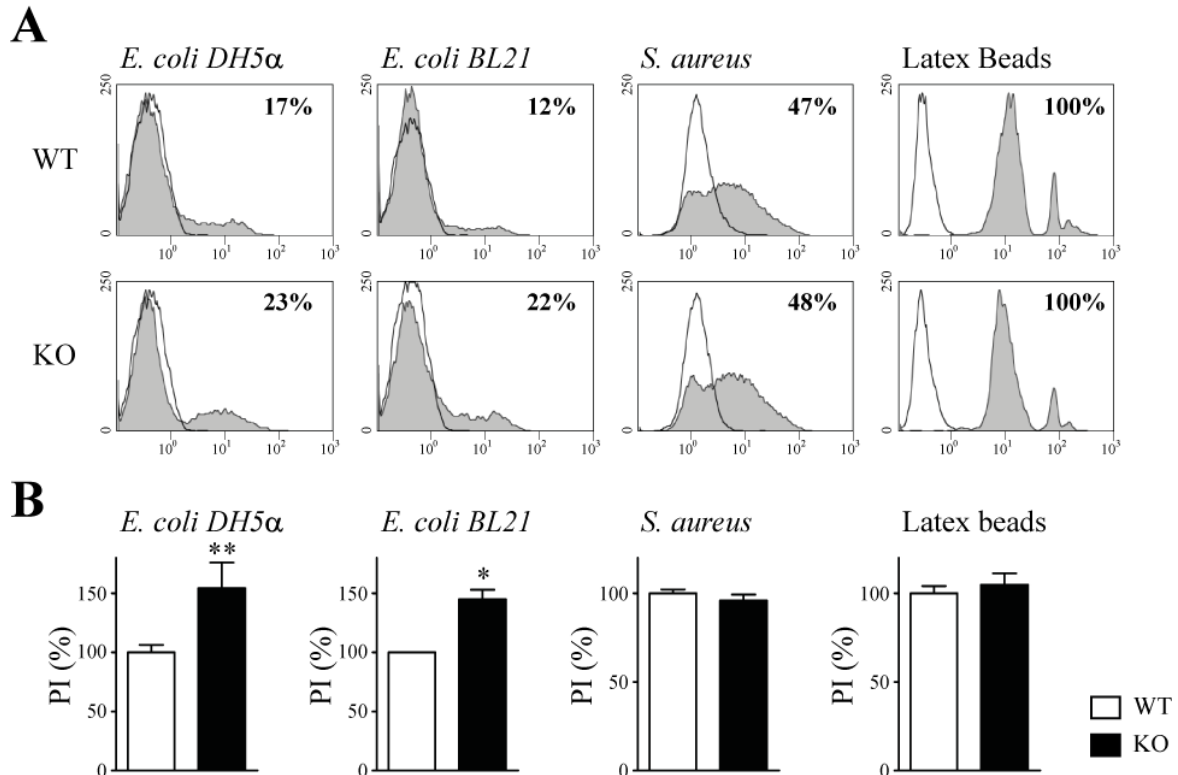
Exploramos la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales inducidos con tioglicolato de ratones FAST KO y silvestre siguiendo el protocolo explicado en detalle en la sección Material y Métodos de este trabajo.

Para estos ensayos usamos bacterias inactivadas y teñidas con fluoresceína: dos cepas de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$  y BL21) y *Staphylococcus aureus* Cowan. Las bolas de látex marcadas con fluoresceína se utilizaron como control de ingesta de partículas inertes. La determinación de la fagocitosis por parte de los macrófagos se realizó en el citómetro de flujo.

En la **Figura 1A** se muestran gráficos de FACS representativos de más de los 6 experimentos de fagocitosis realizados y se indica el porcentaje de células positivas para el canal FL-1, es decir, el porcentaje de macrófagos que han fagocitado. Se indica asimismo qué bacteria o control inerte se ha usado en cada caso.

Se observa que hay un mayor porcentaje de macrófagos que fagocitan *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$  y BL21) en los ratones FAST KO que en los ratones silvestre. Sin embargo, no hay diferencia en la actividad fagocítica contra *Staphylococcus aureus* entre los macrófagos procedentes de ratones FAST KO y los procedentes de ratones silvestre.

**Figura 1**



Para cuantificar con más precisión las posibles diferencias calculamos el índice de fagocitosis (*phagocytic index*, PI) que tiene en cuenta no sólo el porcentaje de células fagocíticas sino la intensidad de fluorescencia de las células positivas para FL-1. La intensidad de fluorescencia estima el número de bacterias fagocitadas.

El PI se calcula con la siguiente fórmula:

PI= % de células positivas x intensidad de fluorescencia de las células positivas

En la gráfica representamos el valor de PI en % respecto al grupo control (ratones silvestre), que se considera 100%.

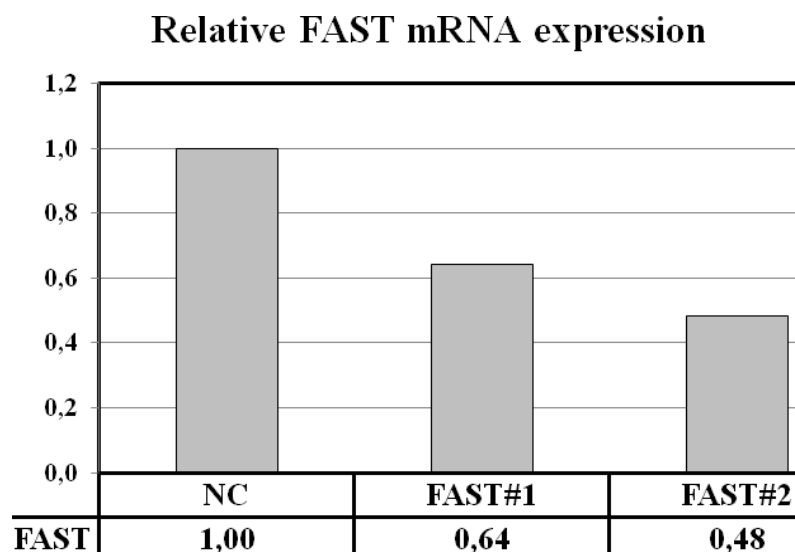
Como se observa en la **Figura 1B**, el PI frente a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  está aumentado de forma significativa en los macrófagos de los ratones FAST KO respecto a los macrófagos wild-type (154 $\pm$ 21% versus 100%, p<0,01). De forma similar, El PI frente a *Escherichia coli* BL21 también está aumentado en los macrófagos de los ratones FAST KO respecto a los macrófagos wild-type (144 $\pm$ 8% versus 100%, p<0,05). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el PI frente a *Staphylococcus aureus* Cowan ni tampoco frente a las bolas de látex.

## **2. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE FAST EN MACRÓFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE CÉLULAS THP-1**

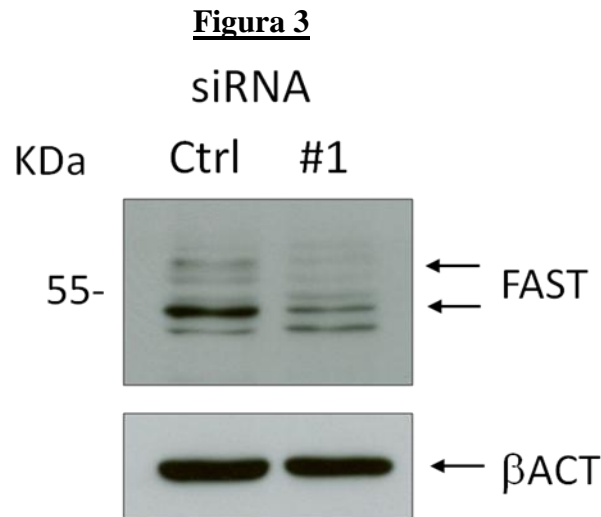
Generamos macrófagos humanos a partir de células THP-1, procedentes de un paciente con leucemia monocítica aguda. Para diferenciar las células THP-1 a macrófagos, incubamos las células con PMA a una concentración de 100 ng/ml durante 72 horas (Park, 2007). A continuación, transfectamos los macrófagos con siRNAs a una concentración en el medio de 5nM con lipofectamina. Usamos 3 siRNAs: un siRNA control y dos siRNAs diferentes frente a FAST. Tras 48 horas, evaluamos la eficiencia del silenciamiento mediante PCR a tiempo real, para cuantificar los niveles de RNAm de FAST y análisis Western blot, para cuantificar los niveles de la proteína FAST.

En la **Figura 2** mostramos los niveles relativos de RNAm de FAST de un experimento representativo de más de tres realizados. Los dos siRNAs usados contra FAST producen una reducción de los niveles de RNAm de FAST del 50%.

**Figura 2**



En la **Figura 3** mostramos los resultados de un análisis Western blot. Se observan dos formas de FAST. La banda superior de 60 KDa se corresponde a la forma extramitocondrial de FAST. La banda inferior de 50 KDa se corresponde a la forma intramitocondrial de FAST. FAST tiene una secuencia de localización mitocondrial que se corta por una peptidasa en el interior de la mitocondria. La  $\beta$  actina es utilizada como control de carga.



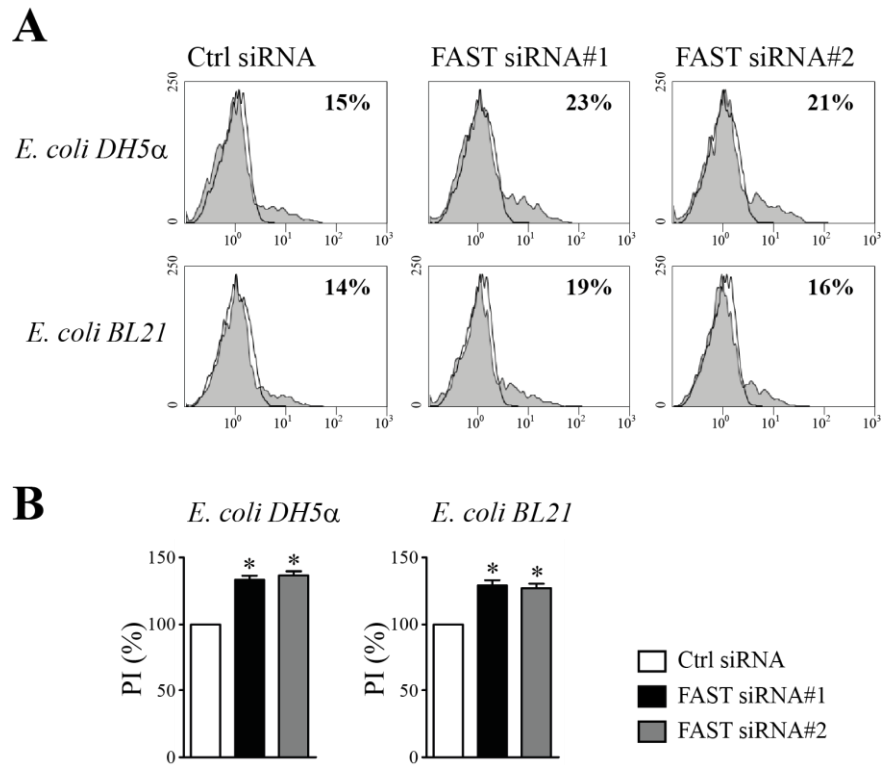
### **3. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA FRENTE A ESCHERICHIA COLI DE LOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE CÉLULAS THP-1 EN LAS QUE SE HA SILENCIADO LA EXPRESIÓN DE FAST**

Tras el silenciamiento de FAST en macrófagos humanos derivado de células THP-1, hemos realizado ensayos de fagocitosis de Escherichia coli DH5 $\alpha$  y BL21.

En la **Figura 4A** se muestran gráficos de FACS representativos de más de los 3 experimentos de fagocitosis realizados y se indica el porcentaje de células positivas para el canal FL-1, es decir, el porcentaje de macrófagos que han fagocitado. Se observa que hay un mayor porcentaje de macrófagos que fagocitan Escherichia coli (DH5 $\alpha$  y BL21) en los macrófagos humanos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST que en las células tratadas con siRNA control.

Como se observa en la **Figura 4B**, el PI frente a Escherichia coli DH5 $\alpha$  está aumentado de forma significativa en los macrófagos humanos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST respecto a los macrófagos transfectados con siRNA control (FAST#1 133 $\pm$ 3% versus 100%,  $p < 0,05$ ; FAST#2 136 $\pm$ 3% versus 100%,  $p < 0,05$ ). De forma similar, el PI frente a Escherichia coli BL21 también está aumentado en los macrófagos humanos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST respecto a los macrófagos transfectados con siRNA control (FAST#1 129 $\pm$ 4% versus 100%,  $p < 0,05$ ; FAST#2 127 $\pm$ 3% versus 100%,  $p < 0,05$ ).

**Figura 4**



## DISCUSIÓN

Las células han desarrollado una variedad de estrategias para internalizar partículas y solutos, incluyendo la pinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis. La fagocitosis, es la captación de partículas grandes ( $> 0,5\mu\text{m}$ ) por la célula, que se produce mediante un mecanismo dependiente de actina y es por lo general independiente de clatrina. La fagocitosis por los macrófagos es crítica para la captación y degradación de agentes infecciosos y células senescentes, también participa en el desarrollo, la remodelación de tejidos, la respuesta inmune y la inflamación (Aderem, 1999).

El trabajo que aquí se presenta se basa en ensayos de fagocitosis en macrófagos humanos y murinos y en la posible influencia de FAST en el proceso, lo que da importancia a esta proteína en la susceptibilidad a infecciones.

Los ratones deficientes para FAST empleados en los experimentos fueron obtenidos por la Dra. María Simarro Grande, como se detalla en la publicación citada en la bibliografía de 2010a. Se han utilizado para la obtención de exudado peritoneal rico en macrófagos. A menudo se utiliza la inyección de tioglicolato intraperitoneal como un agente estimulante de la acumulación de macrófagos en esta localización. Este estímulo tiene la ventaja de reclutar un gran número de células al sitio de la inflamación, pero no aumenta la actividad microbicida de los macrófagos y por lo tanto no los activa. Los macrófagos obtenidos con este método se comportan de forma similar a los residentes en tejido en cuanto a su capacidad de fagocitosis de bacterias opsonizadas. El tamaño de los macrófagos así estimulados aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo 5 días post-inyección. Es a este mismo tiempo cuando su número en el exudado es máximo y la suspensión de macrófagos muestra una mínima contaminación por granulocitos, los cuales podrían obstaculizar los ensayos. (Leijh, 1984). Por todo ello los estudios se han hecho con macrófagos intraperitoneales murinos obtenidos 5 días después de la inyección de tioglicolato. Se utilizó también en ciertos experimentos una línea celular monocítica humana llamada THP-1 que tiene la propiedad de diferenciarse a macrófagos cuando se crece en presencia de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA), 1,25-dihidroxitamina D3 (VD3), ácido retinoico o citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), aunque cada uno de estos estímulos produce células con algunas diferencias fenotípicas. (Park, 2007). En nuestro caso inducimos la diferenciación de los monocitos humanos a macrófagos mediante PMA siguiendo las recomendaciones de cultivo de la American Type Culture Collection (ATCC), agencia depositaria y distribuidora de lotes controlados de esta línea celular. En presencia de  $>5\text{ng/ml}$  de PMA, alrededor del 90% de las células THP-1 se adhieren y adquieren una morfología extendida sobre el plástico, y no se observan diferencias significativas usando PMA a diferentes dosis (entre 5 y  $100\text{ng/ml}$ ). Para la aparición en las células de RNAm de CD14, un marcador de macrófagos se requiere un tiempo mínimo de 48 horas en medio de diferenciación (Park, 2007). Puesto que nuestros experimentos de fagocitosis requieren células ya diferenciadas, decidimos emplear una concentración de  $100\text{ng/ml}$  de PMA durante 72 horas. La transfección de los macrófagos así obtenidos se llevó a cabo con siRNA de Invitrogen siguiendo un protocolo basado en R. Dhiman et al en su publicación de 2008 y optimizado con las recomendaciones del fabricante de lipofectamina. La comprobación de la eficiencia del knockdown se llevó a cabo examinando tanto el RNAm específico como la correspondiente proteína. En los dos casos se demostró una reducción del 50% de los niveles normales presentes en las células tratadas con siRNA-FAST en comparación con un siRNA control negativo.

La respuesta de los macrófagos a bacterias completas se considera fisiológicamente más relevante que la que ocurre a diversos extractos purificados de las mismas (Laroux, 2005). Por ello los experimentos se llevaron a cabo con bacterias enteras teñidas con fluoresceína, que fueron inactivadas por calor. La extinción de la fluorescencia derivada de las bacterias no fagocitadas se llevó a cabo mediante azul tripano, por lo que se analizan sólo las bacterias que han sido internalizadas y que son cuantificadas haciendo uso de citometría de flujo.

El principal desafío del sistema inmune innato es discriminar entre “lo propio” versus un gran número de patógenos potenciales mediante el uso de un restringido número de receptores de fagocitosis. Otro factor que complica la defensa es la gran propensión de los patógenos a experimentar mutaciones. La evolución ha dotado al sistema fagocítico de una variedad de receptores que reconocen motivos conservados en patógenos que no se encuentran en eucariotas. Estos motivos tienen papeles esenciales en la biología de agentes invasores (Aderem, 1999).

La fagocitosis es extremadamente compleja y un único modelo no puede explicar por completo el proceso de internalización de patógenos. Esta complejidad es en parte debida a la diversidad de los receptores capaces de estimular la fagocitosis y en parte debido a la enorme variedad de microorganismos. Es evidente que la fagocitosis en macrófagos es un proceso diverso; las señales que conducen a la polimerización de actina y la internalización de partículas depende de los receptores específicos que median el proceso y señales modificadoras adicionales que pueden ser generadas por partículas complejas. Las partículas complejas, tales como bacterias, pueden activar múltiples receptores cuyas vías de señalización pueden interactuar de forma intrincada e impredecible. Además las bacterias vivas tienen la capacidad de modificar vías de señalización dentro de las células eucariotas (Aderem, 1999).

Dentro de los receptores importantes en el reconocimiento de los patrones moleculares de microorganismos están los de la familia toll. Toll-like receptor 4 (también llamado CD284) es una proteína codificada por el gen TLR4. Detecta lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y es importante en la activación del sistema inmune innato. Toll-like receptor 2 se expresa de forma más abundante en leucocitos de sangre periférica y media las respuestas a bacterias Gram positivas y hongos vía activación de NF- $\kappa$ B. El silenciamiento de FAST en los macrófagos no modifica la fagocitosis de bacterias Gram positivas respecto a los controles pero en bacterias Gram negativas por el contrario produce un aumento remarcable en la fagocitosis. Este hallazgo nos llevó a explorar la expresión de TLR2 y TLR4 en los macrófagos humanos mediante citometría de flujo, y no se apreció una diferencia significativa en ninguno de ellos cuando se compararon células tratadas con siRNA con células control sin tratar.

El proceso de la fagocitosis es como se ha dicho muy complejo y podría haber multitud de mecanismos que explicaran porque el knockdown de FAST produce este fenotipo sólo en bacterias Gram negativas.

Un hallazgo llamativo observado cuando se tratan macrófagos humanos con siRNA frente a FAST o cuando se cultivan macrófagos que provienen del ratón FAST KO es el cambio morfológico de estas células respecto a células control: se observan células de apariencia más grande debido a un incremento de las extensiones citoplásmicas cuando se adhieren al plástico. Este hallazgo nos llevó a examinar el contenido de la cantidad de actina polimerizada mediante tinción con faloidina-TRITC y posterior análisis por FACS. Nuestros resultados preliminares muestran un contenido de F-actin significativamente incrementado tanto en THP-1 tratadas con siRNA contra FAST, como en macrófagos del

2 de julio de 2012.

ratón FAST-KO en comparación con sus respectivos controles. Teniendo en cuenta la importancia de la polimerización de actina en el proceso de internalización de patógenos, hipotetizamos que el incremento en su contenido podría tener relación con el incremento de fagocitosis observado. Sin embargo sigue siendo llamativo que el fenotipo se restrinja solo a bacterias gran-negativas. Seguimos trabajando para explicar estos hallazgos y llevaremos a cabo en un futuro experimentos similares con tranfectantes estables de FAST y otras proteínas homólogas para describir que efecto en la fagocitosis tendría la sobre-expresión de estas nuevas proteínas.



## CONCLUSIONES

---

Las conclusiones que se derivan de nuestro trabajo son:

- 1) Existe un aumento de la fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratones deficientes para FAST (ratones FAST KO) respecto a los silvestres para bacterias Gram negativas *Escherichia coli*.
- 2) La transfección del siRNA en macrófagos derivados de células THP-1 mediante tratamiento con PMA, produce un silenciamiento génico de FAST, lo que provoca un silenciamiento a nivel del RNAm.
- 3) El silenciamiento de la expresión de FAST no sólo es detectable mediante la cuantificación de su RNAm sino también de sus niveles de proteína. Para ello hemos empleado un anticuerpo específico contra la proteína FAST que nos ha permitido determinar una menor presencia en los lisados celulares en células tratadas con siRNA contra FAST.
- 4) Podemos constatar un incremento de la fagocitosis de los macrófagos humanos derivados de células THP-1 deficientes para FAST frente a los macrófagos control, para diferentes cepas de *Escherichia coli*.

Por lo tanto se puede concluir que FAST disminuye la fagocitosis de bacterias por parte de los macrófagos, promoviendo infecciones bacterianas, principalmente de bacterias Gram negativas por parte de los organismos.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

En primer lugar me gustaría dar las gracias a la Dra. María Simarro por darme la oportunidad de estar hoy aquí y dirigirme durante todo este curso, también me gustaría incluir a Alicia Ortega, la técnico de la Unidad de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, el laboratorio donde trabajamos.

Tengo que hacer mención especial a los doctores Andrés Alonso y Miguel Ángel De la Fuente, porque respectivamente nos han cedido las células THP-1 y las bacterias *Escherichia. coli* DH5 $\alpha$  y *Escherichia. coli* BL21, empleadas en el desarrollo de este proyecto. Además, también agradecer a Álvaro Martín su inestimable ayuda en la lectura de muestras por citometría de flujo.

No quiero olvidarme tampoco del Dr. Antonio Orduña y a todo el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Valladolid, en especial a la recién doctorada Fabiola Menegotto. En el animalario de este mismo edificio se encuentran los ratones FAST KO y wild-type con la colaboración del veterinario Ángel Barcia y los técnicos Felix y Juanjo.

Y por último, y no menos importante, al Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM-CSIC). En especial, a los profesores del Máster de Investigación Biomédica, tanto de este edificio como de la Facultad de Medicina de Valladolid, destacando la labor de la directora María Teresa Pérez.

Muchas gracias a todos por vuestras aportaciones y tiempo empleado.

## BIBLIOGRAFÍA

- A. Aderem and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623.
- R. Dhiman, M. Kathania, M. Raje, S. Majumdar. 2008. Inhibition of bf1-1/A1 by siRNA inhibits mycobacterial growth in THP-1 cells by enhancing phagosomal acidification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780(4): 733-742..
- F. S. Laroux, X. Romero, L. Wetzler, P. Engel et al. 2005. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of Gram-negative bacteria. *J. Immunol.* 175; 5596-5600.
- P. C. J. Leijh, T. L. van Zwet, M.N. ter Kuile and R. van Furth. 1984. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infection and Immunity* 46(2): 448-452.
- W. Li, M. Simarro, N. Kedersha, P. Anderson. 2004. FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. *Mol. Cell. Biol.* 24(24):10718-10732.
- P. Mestdagh, P. Van Vlierberghe, A. De Weer, D. Muth, et al. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalización. *Genome biology* 10:R64.
- P. R. Murray, K. S. Rosenthal and M. A. Pfaller. 2009. *Microbiología médica*. 6ª edición. Elsevier Mosby.
- E.K. Park, H. S. Jung, H. I. Yang, M. C. Yoo, et al. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* 56; 45-50.
- J. R. Regueiro González, C. López Larrea, S. González Rodríguez y E. Martínez Naves. 2010. *Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario*. 4ª edición. Editorial médica Panamericana.
- M. Simarro, D. Mauger, K Rhee, M. A. Pujana, N. L. Kedersha, S. Yamasaki, M. E. Cusick, M. Vidal, M. A. Garcia-Blanco, P. Anderson. 2007. Fas-activated serine/threonine phosphoprotein (FAST) is a regulator of alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(27):11370-11375.
- M. Simarro, G. Giannattasio, M. A. De la Fuente, C. Benarafa, et al. 2010a. Fas-activated serine/threonine phosphoprotein promotes immune-mediated pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 184; 5325-5332.
- M. Simarro, A. Gimenez-Cassina, N. Kedersha, J.-B. Lazaro et al. 2010b. Fast kinase domain-containing protein 3 is a mitochondrial protein essential for cellular respiration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401: 440-446.

Q. Tian, J. Taupin, S. Elledge, M. Robertson, P. Anderson. 1995. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 182(3):865-874.

I. Watanabe, M. Ichiki, A. Shiratsuchi and Y. Nakanishi. 2007. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacteria strategy against host innate immunity. *J Immunol*; 178; 4917-4925.

**Recursos on-line:**

1. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
2. [www.atcc.org](http://www.atcc.org)