



TESI DOCTORAL

LA VIA JAK/STAT COM A MEDIADORA DE RESPOSTES A L'ESTRÈS OXIDATIU, LA INFLAMACIÓ I LA IMMUNITAT INNATA EN ASTRÒCITS

ROSER GORINA MENDIZ

DECEMBRE 2007

DISCUSSIÓ GENERAL

DISCUSSIÓ GENERAL

LES CITOQUINES EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

La resposta inflamatòria associada a la isquèmia cerebral està dirigida per les citoquines. Les neurones i la glia, juntament amb les cèl·lules immunitàries produeixen citoquines en el cervell isquèmic (Liu et al., 1994; Sairanen et al., 2001). Les citoquines poden contribuir a la neurotoxicitat o a la neuroprotecció tant a nivell local, com sortint del teixit lesionat i entrant al torrent sanguini. En pacient d'ictus, els nivells plasmàtics de citoquines podrien tenir valor pronòstic.

Les citoquines secretades en resposta a la isquèmia són pro i antiinflamatòries. Les citoquines proinflamatòries estan relacionades amb la citotoxicitat cerebral, mentre que les citoquines antiinflamatòries poden tenir efectes neuroprotectors. Després de la isquèmia augmenten els nivells de moltes citoquines, les més estudiades han estat IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β (Han i Yenari, 2003). IL-1 i TNF- α són citoquines proinflamatòries que participen en el dany isquèmic, mentre que IL-10 i TGF- β tenen un paper neuroprotector.

En aquesta tesi s'ha estudiat la resposta dels astròcits a aquelles citoquines, pro o antiinflamatòries, que modulen la resposta a la isquèmia/reperfusió i que activen la via de senyalització JAK/STAT. IFN- γ , IL-6 i IL-10 compleixen aquestes dues premisses.

El paper de l'IFN- γ en la isquèmia/reperfusió és controvertit. L'IFN- γ és una citoquina proinflamatòria que té un paper clau en la regulació de la resposta immune i inflamatòria i que és gairebé indetectable en el parènquima cerebral en condicions normals. En processos inflamatoris en el SNC, s'ha descrit que l'IFN- γ és produït per les cèl·lules T i NK infiltrades. En un treball es demostra que el mARN d'IFN- γ augmenta en el model de OACM permanent en rata (Li et al., 2001) però hi ha un altre estudi que no corrobora aquest resultat (Lambertsen et al., 2004). El treball de Yilmaz et al. (2006) evidencia que l'IFN- γ participa en la disfunció microvascular i en el desenvolupament de la necrosis tissular després de la isquèmia. L'IFN- γ podria iniciar diferents vies inflamatòries implicades en el dany produït per la isquèmia/reperfusió, com són l'expressió de molècules d'adhesió, estimulació de la NADH oxidasa i activació de la microglia (Chung et al., 2002; Pawate et al., 2004).

IL-6 està àmpliament considerada una citoquina proinflamatòria, però el seu paper en la isquèmia cerebral no està clar. Concentracions elevades d'IL-6 en plasma s'associen amb un ràpid empitjorament neurològic (Vila et al., 2000). En canvi, altres resultats mostren una correlació inversa entre els nivells plasmàtics d'IL-6 i la discapacitat neurològica (Sotgiu et al., 2006) suggerint que l'IL-6 plasmàtica pot ser un

senyal neuroprotector. Així doncs, les citokines proinflamàtores també poden tenir propietats beneficioses en el cervell isquèmic. En treballs experimentals, els ratolins deficientes en IL-6 presenten el mateix volum d'infart cerebral, d'on s'extrau que IL-6 no participa en la patogènesis en resposta a la isquèmia (Clark et al., 2000). Tot i així, alguns estudis li atribueixen un efecte beneficiós (Herrmann et al., 2003) mentre que altres li atribueixen una acció perjudicial (Smith et al., 2004).

IL-10 és una citocina antiinflamatòria que actua inhibint la senyalització d'IL-1 i TNF- α mitjançant la supressió de l'expressió i l'activació dels seus receptors (Strle et al., 2001). IL-10 és sintetitzada en el SNC i augmenta en resposta a la isquèmia (Strle et al., 2001). A IL-10 se li atribueixen efectes neuroprotectors, doncs, tant l'administració exògena (Spera et al., 1998) com l'inducció gènica d'IL-10 (Ooboshi et al., 2005), redueixen el volum d'infart i la inflamació en models d'isquèmia cerebral en rata. En canvi, els ratolins KO per IL-10 presenten majors infarts que els ratolins *wild type* en el model d'isquèmia focal permanent (Grilli et al., 2000). Estudis clínics mostren que els pacients amb ictus isquèmic presenten un elevat nombre de monòcits secretant IL-10 en sang perifèrica (Pelidou et al., 1999) i elevades concentracions d'IL-10 en el líquid cerebroespinal (Tarkowski et al., 1997). En la clínica, nivells baixos d'IL-10 plasmàtica en pacients d'ictus correlacionen amb un mal pronòstic i empitjorament neurològic (Vila et al., 2003).

Concentracions excessives d'IL-10 s'associen a una major susceptibilitat a patir infeccions, ja que IL-10 atenua la capacitat dels macròfags mononuclears d'iniciar la resposta inflamatòria i adaptativa (Weiss et al., 2005). Resultats recents suggereixen que l'activitat antiinflamatòria i immunosupressora d'IL-10 està modulada durant tot el curs de la resposta inflamatòria i immunitària, i aquesta modulació participa ajustant el balanç entre la resposta pro i antiinflamatòria (Avdiushko et al., 2001; Pajkrt et al., 1997). La pèrdua d'equilibri cap a un excés de senyals antiinflamatòries, com IL-10, produeix el desplaçament de la resposta immune Th1 a Th2 (Fiorentino et al., 1991), incrementant el risc d'infeccions. En resposta a la isquèmia cerebral té lloc una immunosupressió que facilita l'infecció (Prass et al., 2003; Meisel et al., 2005; Chamorro et al., 2007). La relació entre pacients que han patit infecció després de la isquèmia i el seu patró d'expressió de citokines pro i antiinflamatòries mostra que IL-10 està incrementada i el ratio entre TNF- α i IL-10 disminuït en els pacients infectats (Chamorro et al., 2006), de manera que un excés de resposta antiinflamatòria comporta un major risc d'infecció.

STAT1 I LA MORT CEL·LULAR

Les citoquines activen cascades de senyalització basades en la fosforilació de les proteïnes efectores. Aquestes vies de senyalització permeten una ràpida resposta a nivell transcripcional. Una de les principals vies de senyalització utilitzades per les citoquines és la via JAK/STAT. La via JAK/STAT s'activa en resposta a citoquines pro i antiinflamatòries, de manera que és capaç de modular els dos tipus de respostes.

En el primer treball, s'ha estudiat l'activació de la via JAK/STAT en resposta a citoquines pro i antiinflamatòries que incrementen la seva expressió després de la isquèmia cerebral i que podrien modular la resposta dels astròcits al dany. Els nostres resultats mostren que el tractament perllongat amb les citoquines IFN- γ i IL-6 induïx mort en els astròcits, mentre que el tractament amb la citoquina antiinflamatòria IL-10 no afecta la viabilitat cel·lular. El pretractament amb l'inhibidor de Jak2, AG490 (Meydan et al., 1996), protegeix de la mort induïda per IFN- γ i IL-6.

En paral·lel s'ha volgut estudiar l'activació de la via JAK/STAT en resposta a l'estrès oxidatiu. En l'introducció d'aquesta tesi s'ha explicat extensament com l'estrès oxidatiu pot modular les vies de senyalització intracel·lular. Treballs previs demostren que Stat1 i Stat3 s'activen després del tractament amb H₂O₂, i que aquesta inducció està relacionada amb un augment de l'activació de les quinases Jak2 i Tyk2 (Simon et al., 1998). L'activació de Stat1 i Stat3 en cèl·lules musculars tractades amb H₂O₂ és dependent de Jak2 (Madamanchi et al., 2001). La fosforilació i entrada al nucli de Stat3 en resposta a peròxid d'hidrogen també s'ha descrit en limfòcits humans en el treball de Carballo et al. (1999), i es proposa que aquesta activació està facilitada per l'inhibició de tirosina fosfatases intracel·lulars.

L'exposició transitòria a peròxid d'hidrogen, de la mateixa manera que l'exposició perllongada a les citoquines inflamatòries IFN- γ i IL-6, induïx mort cel·lular en cultius d'astròcits i l'inhibidor de Jak2, AG490, recupera la viabilitat el que suggereix que l'activació de la via Jak2/STAT participa en la mort.

En cultius d'astròcits, l'H₂O₂ fosforila en tirosina a Stat1 i Stat3, i aquesta activació s'inhibeix per efecte de l'AG490, aquest resultat reforça l'idea prèviament descrita per Madamanchi que l'activació de Stat1 i Stat3 per H₂O₂ és dependent de Jak2.

En els cultius d'astròcits, IFN- γ induïx la fosforilació de la tirosina 701 de Stat1, mentre que IL-6 fosforila en tirosina a Stat3 i Stat1 en acord amb el treball previ de Heinrich et al. (1998). IL-10 fosforila a Stat3 però no a Stat1, i sembla que les propietats antiinflamatòries d'IL-10 depenen de la senyalització de Stat3 (Williams et al., 2004).

Com ja s'ha descrit àmpliament en l'introducció, l'activació de les proteïnes STAT pot dependre de diferents JAK quinases. Jak2 indueix la fosforilació de Stat1 en resposta d'IFN- γ i LPS en cultius d'astròcits (Dell'Albani et al., 2001) i també pot activar Stat3 en cèl·lules de mieloma (De Vos et al., 2000). En el nostre treball s'utilitza l'inhibidor de Jak2 per determinar si la fosforilació de les STATs en resposta al estímul emprats depèn o no de la quinasa Jak2. AG490 inhibeix la fosforilació en tirosina de Stat1 després del tractament amb IFN- γ , IL-6 i H₂O₂, i la fosforilació en tirosina de Stat3 induïda per IL-6 i H₂O₂, en canvi no té efecte sobre l'activació de Stat3 per IL-10. IL-10 activa Stat3 mitjançant la quinasa Jak1 (Donnelly et al., 1999).

En resum, Stat3 es fosforila en astròcits després de l'exposició a H₂O₂, IL-6 i IL-10 mentre que Stat1 s'activa en aquelles condicions on més tard s'induirà mort cel·lular: H₂O₂, IFN- γ i IL-6. En canvi, no es fosforila en resposta a la citoquina antiinflamatòria IL-10. El grau de fosforilació de Stat1 en tirosina correlaciona negativament amb la reducció de la viabilitat cel·lular. És a dir, a major fosforilació de Stat1, major mort cel·lular. Aquests resultats indirectament fan pensar que és Stat1, i no Stat3, la proteïna STAT relacionada amb la mort cel·lular. L'activació de Stat1 per Jak2 és un senyal important en la mort cel·lular astrocitària. Un treball previ del nostre laboratori demostra que caspasa 3 s'activa després del tractament amb H₂O₂ (Fauconneau et al., 2002), en el present treball s'observa que l'activació de caspasa 3 no té lloc quan els astròcits es pretracten amb l'inhibidor de Jak2, suggerint que la via Jak2/Stat1 té propietats proapoptòtiques. S'ha descrit que Stat1 inhibeix el creixement cel·lular i té propietats proapoptòtiques. Per exemple, en cèl·lules d'adenocarcinoma (Kristof et al., 2003) i en astròcits fetals (Lee et al., 2003) Stat1 activa la transcripció de gens proapoptòtics i proinflamatoris.

Stat1 és el mediador més important de la senyalització dels interferons. La capacitat de l'IFN- γ per inhibir el creixement cel·lular depèn de l'activitat transcripcional de Stat1 (Bromberg et al., 1996). Stat1 també participa en l'inducció de gens inflamatoris activats en resposta a IFN- γ , com la nítric òxid sintasa induïble (iNOS), COX-2, i molècules d'adhesió vascular i intercel·lular (VCAM i ICAM). Se sap que els interferons poden induir l'apoptosi i inhibir el creixement cel·lular a través de diferents senyals de mort, com Fas, caspases i el *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) (Chang et al., 2000; Ossina et al., 1997). IFN- γ promou l'apoptosi a través de Fas i indueix l'activació de les caspases 1, 3 i 8 en cèl·lules eritroides humanes (Dai et al., 1998). També s'ha demostrat que les cèl·lules Stat1^{-/-} són resistents a l'apoptosi induïda per TNF- α (Levy i Darnell, 2002). A més a més, Stat1 promou l'inhibició de gens que codifiquen per proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-x (Lee et al., 1999).

De manera que és probable que l'inducció de l'apoptosi per Stat1 vingui donada tant per l'activació de gens proapoptòtics com per l'inhibició de gens antiapoptòtics.

Stat1 activat també s'ha identificat com a factor proapoptòtic en resposta a un ampli ventall d'estímuls. Stat1 regula l'apoptosi induïda per LPS/D-galactosamina en fetge (Kim et al., 2003) i regula l'activació de p21 i de l'apoptosi cel·lular en resposta 7-cetocolesterol, un producte derivat de l'oxidació de lipoproteïnes de baixa densitat (Agrawal et al., 2002). Stat1 indueix l'expressió dels gens Fas i Fas-L donant lloc a apoptosi en miòcits cardíacs sotmesos a isquèmia/reperfusió (Stephanou et al., 2002). Stat1 també promou l'apoptosi a través de mecanismes independents del seu paper com a factor de transcripció. S'ha observat que Stat1 s'associa amb el receptor de TNF- α (TNFR1) i bloqueja l'activació de la via de senyalització antiapoptòtica de NF κ B (Wang et al., 2000).

A diferència de Stat1, a Stat3 se li atribueixen propietats antiapoptòtiques (Fukada et al., 1996; Hirano et al., 1997). Stat3 es troba constitutivament activat en molts tipus de càncers. L'inhibició específica de Stat3 amb dominants negatius o molècules d'ARN *antisense*, indueix apoptosi cel·lular en melanoma (Niu et al., 1999), càncer de mama (Garcia et al., 2001) i mieloma múltiple (Catlett-Falcone et al., 1999).

Tot i els seus efectes oposats, algunes citoquines poden induir l'activació de Stat1 i de Stat3, i poden donar lloc a la formació d'heterodímers. En canvi, d'altres afavoreixen l'activació selectiva d'una o l'altra proteïna STAT. El balanç d'activació de les proteïnes STAT pot desviar-se per l'acció combinada de diferents citoquines; l'activació de Stat3 induïda per IL-10 en macròfags és reprogramada cap a l'activació de Stat1 al tractar amb IFN- γ , transformant l'estat antiinflamatori dels macròfags a un estat proinflamatori (Herrero et al., 2003). El fet que una única citoquina activi més d'una proteïna STAT o que una STAT sigui activada per varies citoquines dóna lloc a una regulació dinàmica que permet a les cèl·lules integrar els senyals provinents de diferents citoquines per poder reprogramar la seva funció.

Stat1 i Stat3 poden tenir efectes compensatoris; en cèl·lules Stat3^{-/-}, IL-6 perllonga l'activació de Stat1 i augmenta l'expressió de gens de resposta a IFN, mentre que en cèl·lules Stat1^{-/-}, Stat3 regula la resposta a IFN- γ (Costa-Pereira, 2002). Això corrobora l'existència d'un equilibri finament regulat entre l'activació de les diferents proteïnes STAT.

Les proteïnes STAT també es poden fosforilar en serina (Wen i Darnell, 1997). Aquesta fosforilació té lloc independentment de la fosforilació en tirosina i és necessària per assolir el màxim nivell d'activació transcripcional. L'exposició a H₂O₂ fosforila la serina 727 de Stat1, però no la de Stat3. El pretractament amb AG490 no té efecte sobre la fosforilació en serina. S'ha descrit diferents serina quinases capaces de

fosforilar a Stat1 depenent de l'estímul. Després de hipòxia/reoxigenació, Stat1 es fosforila en serina per la via fosfoinositol-3-quinasa/Akt (Terui et al., 2004). La fosforilació en serina de Stat1 està regulada per la p38MAPK en resposta a LPS, irradiació UV i TNF- α (Kovarik et al., 1999). En cultius primaris d'astròcits exposats a H₂O₂ la fosforilació en serina també depèn de p38 (Robinson et al., 1999). Tot i que Stat1 es fosforila en serina després de la exposició a H₂O₂, en el nostre treball, el senyal crucial que relaciona a Stat1 amb l'inducció de la mort cel·lular és la fosforilació en tirosina. Doncs, el tractament amb AG490 que indueix protecció, inhibeix la fosforilació en tirosina 701 de Stat1 però no en serina 727.

L'AG490 s'ha utilitzat com a un inhibidor específic de la Jak2 quinasa (Duhé et al., 2002), encara que diferents treballs mostren efectes inespecífics d'aquest fàrmac. S'ha observat que l'AG490 és capaç d'inhibir l'activitat tirosina quinasa del receptor de EGF (Luo i Laaja, 2004) i Jak3 (Wang et al., 1999). En el primer treball es presenta la possibilitat de que l'AG490 tingui un efecte antioxidant. Aquest efecte antioxidant faria perdre força a la hipòtesi de que la fosforilació en tirosina de Stat1 està directament relacionada amb la mort, doncs podria ser que la protecció que confereix l'AG490 als astròcits tractats amb H₂O₂ fos atribuïble a l'acció antioxidant de l'AG490 i no pas al seu efecte inhibidor sobre Jak2. Tot i així, l'activació de la serina de Stat1 induïda per peròxid d'hidrogen es manté en presència de l'AG490, de manera que, aquest compost, tot i ser un antioxidant, no inhibeix completament la senyalització de la via JAK/STAT induïda per H₂O₂ en els cultius d'astròcits. Seguidament, ens vam plantejar, d'una banda estudiar com els antioxidants poden afectar les vies redox, com és ara la via JAK/STAT, i de l'altra comparar l'efecte de l'H₂O₂ sobre la producció d'estrès oxidatiu i la fosforilació de Stat1 amb altres agents prooxidants.

STAT1 I L'ESTRÈS OXIDATIU

Els agents prooxidants emprats en aquest estudi han estat el FeSO₄, que produeix peròxids i radicals hidroxils (Burkitt i Gilbert, 1989), el nitroprussiat (NP) que és un donador d'òxid nítric, i el paraquat que és un herbicida i principalment indueix la generació d'anió superòxid (Bus i Gibson, 1984). Els tractaments amb H₂O₂, FeSO₄ i NP augmenten la producció de DCF, mentre que el PQ i l'H₂O₂ generen estrès oxidatiu mesurat mitjançant DHE. La tècnica de DCFH-DA és principalment sensible a peròxids i òxid nítric, en canvi, la tècnica del DHE mesura la producció de superòxids (Sharikabad et al., 2001). Els nostres resultats mostren que tots aquests components indueixen la formació de espècies reactives d'oxigen (ROS) en cultius de glia mixta, però únicament el peròxid d'hidrogen pot induir fortament la fosforilació en tirosina 701 de Stat1. Aquests resultats estan d'acord amb dades prèvies (Simon et al., 1998). El

FeSO₄ induïx un petit increment en la fosforilació de Stat1, en canvi, causa una gran producció ROS. Aquests resultats suggereixen que la fosforilació de Stat1 té lloc en resposta a peròxids en concret i no a ROS en general.

En aquest treball també s'ha analitzat els efectes dels antioxidants propilgallat (PG), trolox i N-acetilcisteïna (NAC) sobre la producció de ROS i l'activació de Stat1.

El PG és un antioxidant fenòlic sintètic que té capacitat per eliminar radicals hidroxils i superòxids (Kahl i Hildebrandt, 1986; Sroka i Cisowski, 2003), mentre que el trolox és un anàleg de la vitamina E i és un potent *scavenger* de radical hidroxil (Auroma et al., 1990). El NAC reacciona i elimina ràpidament els radicals hidroxils i més lentament els peròxids (Vanderbist et al., 1996). Els antioxidants PG i trolox aconseguixen inhibir efectivament la generació de ROS, però en canvi no impedeixen la fosforilació de Stat1 en resposta a peròxids. En canvi el NAC no redueix la producció de ROS, però sí que inhibeix la fosforilació de Stat1 en resposta a H₂O₂ en cultius de glia mixta. La baixa capacitat de reacció del NAC amb els peròxids pot explicar que aquest antioxidant sigui incapaç d'inhibir la producció de DCF induïda per H₂O₂. El NAC també pot ser desacetilat donant lloc a cisteïna que és un precursor de la síntesi de glutatió, i per tant estimular el sistema del glutatió (Gillissen i Nowak, 1998). Així que no podem descartar que l'efecte del NAC com activador del sistema del glutatió pugui participar en l'inhibició de la fosforilació de Stat1 induïda per H₂O₂. En conclusió, tots aquests resultats suggereixen que l'activació de Stat1 és independent de la generació de ROS.

En aquest treball es corrobora que la quinasa responsable de l'activació de Stat1 per peròxid és Jak2. El tractament amb els dos inhibidors de Jak2 utilitzats (AG490 i Jak2-Inhibitor-II) inhibeix la fosforilació de Stat1 per H₂O₂. D'aquesta manera hem identificat a la quinasa implicada però el mecanisme d'activació de Jak2/Stat1 per peròxids encara no és ben conegut. Diferents treballs posen les bases per pensar que l'inhibició de proteïnes tirosina fosfatases podria ser la peça clau d'aquesta activació (Carballo et al., 1999).

En aquest treball es va voler ampliar l'estudi de la capacitat antioxidant de l'AG490 que ja s'havia iniciat en el primer treball. Aquí es demostra que l'AG490 inhibeix de manera dosi-dependent la producció de ROS induïda per H₂O₂, FeSO₄ i NP i que disminueix l'oxidació de proteïnes en mostres tractades amb H₂O₂. La capacitat antioxidant de l'AG490 va ser avaluada en paral·lel en un sistema lliure de cèl·lules. Mitjançant la tècnica del TBARS es va demostrar que l'AG490 redueix la peroxidació lipídica produïda per FeSO₄, i el valor d'IC₅₀ obtingut, que expressa la dosi de fàrmac a la que la formació de ROS es redueix a la meitat, indica que l'AG490 és un molt bon antioxidant.

Finalment, es va determinar que l'efecte antioxidant de l'AG490 és una propietat totalment independent de la seva capacitat d'inhibir la quinasa Jak2, propietat que no comparteix l'altre inhibidor de Jak2 utilitzat, el Jak2-Inhibitor-II. Mitjançant la tècnica d'ARN d'interferència és va inhibir l'expressió de Jak2 en cultius de glia mixta i d'astròcits purs. En absència de Jak2, l'AG490 continua presentant la seva capacitat antioxidant. Tots aquests resultats confirmen que l'AG490 té propietats antioxidants intrínseques determinades per la seva estructura molecular i independents del seu paper com a inhibidor de Jak2. L'estructura química de l'AG490 presenta algunes similituds amb l'estructura típica de molts antioxidants, com el PG i el trolox. L'AG490 presenta dos anells aromàtics amb grups hidroxil disposats com un catecol, això confereix una elevada activitat antioxidant a aquest compost (Sroka i Cisowski, 2003).

L'AG490 és l'inhibidor farmacològic de Jak2 més àmpliament utilitzat, el fet que el nostre treball hagi demostrat que té activitat antioxidant inespecífica fa que molts dels estudis on ha estat emprat necessitin ser revisats. Pel que fa al nostre treball anterior, la propietat antioxidant de l'AG490 no ens impedeix afirmar que la mort induïda per peròxids està regulada per l'activació de la via Jak2/Stat1. Per demostrar que l'activació de la via Jak2/Stat1 també participa en la mort induïda per peròxids, el model de mort amb H₂O₂ es va traslladar a cultius de glia mixta de ratolí KO de Stat1 i es va comprovar que l'astròcits Stat1^{-/-} són més resistents a la mort induïda per H₂O₂.

En el cultius de glia mixta hi ha aproximadament un 75% d'astròcits i un 25% de microglia, per saber si la fosforilació de Stat1 en resposta a peròxids té lloc en un tipus cel·lular o altre, es van preparar cultius purs d'astròcits i microglia per separat. La producció de ROS en resposta a H₂O₂ s'observa en els diferents tipus cel·lulars, encara que l'augment respecte el basal és molt més elevat en astròcits que en microglia. L'activació de Stat1 per H₂O₂ únicament es detecta en astròcits, i el nivell d'inducció és més alt en cultius de glia mixta que en astròcits purs. Aquests resultats mostren que l'activació de Stat1 en glia mixta és atribuïble a l'astroglia, però el comportament, i possiblement el fenotip, dels astròcits és diferent depenent de si es troben o no en presència de microglia. El següent treball presentat en aquesta tesi també posa de manifest que existeixen diferències en les respostes dels astròcits depenent de si es troben en cultiu acompanyats o no de microglia.

STAT1 I LA RESPOSTA IMMUNE INNATA

El tercer treball presentat en aquesta tesi descriu a Stat1 com a marcador de la resposta immune en astròcits. En un primer moment aquest treball es va plantejar per tal d'inhibir l'expressió de Stat1 amb siRNA en cultiu d'astròcits i validar la participació de la via Jak2/Stat1 en la mort cel·lular per H₂O₂. El tractament amb un siRNA

específic pel mARN de Stat1 va donar una resposta inesperada, enlloc de una disminució de l'expressió de la proteïna, s'observava un increment dels nivells d'expressió de Stat1 total. En aquest treball es presenta que els astròcits són molt sensibles a desenvolupar respostes immunes innates al ser transfectats amb siRNA i aquest efectes estan associats a l'inducció de l'expressió de Stat1 i a l'alliberació de citoquines i quimioquines. L'activació d'aquestes vies no interfereix en el silenciament dels missatgers específics i és dependent de seqüència.

Es van examinar els efectes de diferents siRNAs específics per a diferents proteïnes (2 seqüències inespecífiques que s'utilitzen de control negatiu, i les seqüències específiques pel silenciament de Stat1, p21, ERK, Jak2 i GAPDH). En la primera part del treball es demostra que aquestes seqüències són efectives i indueixen el silenciament dels mARNs diana, a excepció de la seqüència dirigida a inhibir l'expressió de Stat1, que enlloc d'inhibir-la, l'incrementa. La resta de siRNAs també augmenten l'expressió de Stat1 i ho fan en diferents graus dependent de la seqüència. Utilitzant el siRNA específic de p21 s'ha demostrat que l'increment de l'expressió de Stat1 depèn de la concentració de siRNA.

En cultius de glia mixta també vam observar que els siRNA indueixen l'expressió d'iNOS i secreció de la citoquina IL-6 i les quimioquines IP-10 i IP-9. En cultius d'astròcits purs es manté l'inducció de Stat1, IL-6 i IP-10 en resposta als siRNAs. En cultius de microglia i en la línia cel·lular no glial NIH3T3 no hi ha augment de l'expressió d'aquestes molècules. En els cultius d'astròcits purs no té lloc l'augment d'iNOS ni IP-9 en resposta als siRNAs. Això concorda amb treballs previs que assenyalen que l'expressió d'iNOS i l'expressió de la quimioquina IP-9 tenen lloc preferencialment en microglia (Solà et al., 2002; Carter et al., 2007). Així doncs, en cultiu de glia mixta la resposta dels astròcits estimula una resposta microglial que pot participar en la modulació de la resposta astròcitària. D'aquest estudi s'extreu que són els astròcits les cèl·lules responsables de la resposta immune innata a siRNAs i que l'intensitat d'aquesta resposta varia en funció de si els astròcits es cultiven sols o en presència de microglia. La microglia pot modular la resposta astrocitària i alterar el fenotip dels astròcits en cultiu.

El fet que diferents seqüències de siRNAs indueixin l'expressió de Stat1 en diferent grau, fa pensar que es tracta d'una activació específica de seqüència com ja s'havia proposat en altres estudis (Judge et al., 2005; Hornung et al., 2005). Vam modificar la cadena *sense* del siRNA específic per p21 introduint grups 2'-O-metilats en els nucleòtids o bé d'uridina o bé de guanina. La metilació de nucleòtids és una estratègia per atenuar els efectes inespecífics dels siRNA (Judge et al., 2006; Sioud 2007). Un treball recent mostra que els ARNs 2'-O-metilats poden actuar com a

antagonistes de l'ARN immunoestimulador (Robbins et al., 2007). Els nostres resultats demostren que aquestes modificacions no afecten el silenciament de p21, i a més a més, la 2'-O-metilació de totes les guanines de la cadena *sense* impedeix l'inducció de Stat1 i iNOS i l'alliberació d'IP-10, IP-9 i IL-6 en cultiu de glia mixta. Aquests resultats demostren que la 2'-O-metilació d'alguns residus de la cadena *sense* del siRNA és una estratègia eficient per impedir que els siRNA induïxin respostes d'immunitat innata en astròcits.

Els siRNAs són ARNs de doble hèlix (dsRNA) que poden ser interpretats per la cèl·lula com un senyal d'activitat gènica no desitjada. La resposta típica de les cèl·lules als dsRNA és un augment de la degradació global d'ARN, l'inhibició de la síntesi de proteïnes i la producció d'interferó. Les cèl·lules estan equipades amb diferents proteïnes capaces de reconèixer els dsRNA, aquestes proteïnes pertanyen al grup de receptors de reconeixement de patrons (*pattern recognition receptors*, PRRs). La proteïna quinasa R (PKR) pertany als PRRs que participen en la detecció de virus. La PKR és una ARN helicasa i una serina quinasa que s'activa quan interacciona amb dsRNA (Jefferie i Fitzgerald, 2005). Quan té lloc una infecció vírica, PKR participa en l'inducció d'interferó (Diebold et al., 2003) i fosforila factors involucrats en la traducció gènica, com el factor d'iniciació eIF2 α (Srivastava et al., 1998). La fosforilació de eIF2 α produeix l'inhibició de la síntesi de proteïnes. El treball de Sledz et al. (2003) mostra que es produeix l'activació de PKR en resposta a siRNAs en algunes línies cel·lulars. En canvi, en el nostre sistema experimental no vam detectar fosforilació de eIF2 α en cap dels temps estudiats (des de 30 minuts fins a 4 dies), el que suggereix que la PKR no és responsable dels efectes observats.

Uns altres PRRs que participen en la detecció d'intermediaris vírics pertanyen a la família dels TLRs. En l'introducció de la tesi, s'ha presentat àmpliament a aquesta família de receptors de membrana que inicien l'activació de la resposta innata a través de complexes rutes de senyalització. TLR3 i TLR7 són els principals candidats a activar la resposta immune induïda per siRNA. TLR3 regula la resposta cel·lular a dsRNA (Alexopoulo et al., 2001) i induïx l'activació d'IRF3 (Doyle et al., 2002), mentre que TLR7 reconeix ARN de cadena simple (Lund et al., 2004). Hi ha un estudi que mostra que la resposta immune a siRNA s'inicia per la senyalització de TLR3 (Karikó et al., 2004), i un altre treball on s'observa l'inducció d'IFN- α activada per TLR7 en resposta a siRNA en cèl·lules dendrítiques (Hornung et al., 2005). Se sap que els astròcits expressen diferents TLRs (Farina et al., 2005; Konat et al., 2006) que els permeten respondre davant d'una infecció vírica i que s'activen en resposta al agonista de TLR3 poli dI:dC (PIC) (Scumpia et al., 2005; Carpentier et al., 2007; Krasowska-Zoladek et al., 2007; Vincent et al., 2007).

Per saber si els TLRs participen en l'activació de la resposta innata activada per siRNA en astròcits, es va estudiar el nivell d'expressió de TLR3 i TLR7 en cultiu glial mixta, en astròcits purs, en microglia i en les cèl·lules 3T3. Comparativament els astròcits expressen un nivell basal més elevat de TLR3 que de TLR7, en canvi la microglia és més rica en TLR7. Aquestes diferències en el patró d'expressió dels diferents TLRs proposen que els astròcits i la microglia poden tenir un paper especialitzat en l'activació del sistema immune innat. D'acord amb la major expressió de TLR3 en astroglia, el tractament amb PIC induïx una major alliberació d'IFN- β en cultius amb astròcits que en microglia pura. També es va comparar la resposta inflamatòria induïda per PIC amb la resposta induïda pels siRNAs. En resposta a ambdós estímuls s'observa un augment de l'expressió de Stat1, COX-2 i VCAM-1. Al tractar amb l'inhibidor de l'acidificació endossomal cloroquina, es redueix l'augment de Stat1 en resposta a PIC i a siRNAs, suggerint que el TLR3 intracel·lular podria ser responsable de l'inducció de la resposta immune activada per siRNA en astròcits. Alguns estudis demostren que TLR3 s'expressa en les vesícules intracel·lulars (de Bouteiller et al., 2005) mentre que altres descriuen la presència de TLR3 a la membrana cel·lular externa. El treball de Bsibsi et al., 2002 mostra l'expressió preferencial de TLR3 en la membrana plasmàtica en astròcits. Els experiments portats a terme amb la cloroquina no ens permeten excloure que el TLR3 localitzat a la membrana externa pugui participar en la resposta a siRNA en astròcits.

Les citoquines proinflamatòries, els agonistes de TLR3 i TLR4 i l'estrès oxidatiu poden augmentar l'expressió dels TLRs en astròcits humans (Bsibsi et al., 2006). En els nostres cultius purs d'astròcits de ratolí vam analitzar l'expressió de TLR3 després del tractament amb siRNA, PIC i una dosi de siRNA equivalent a la dosi de PIC utilitzada, i vam observar que després de 24h s'indueix l'expressió de TLR3 de manera significativa amb PIC i amb la dosi més elevada de siRNA, mentre que amb cap tractament es va observar inducció de TLR7. Tots aquests resultats ens indiquen que els efectes inespecífics dels siRNAs estant mediat per l'activació de TLR3. Els siRNA s'utilitzen normalment en dosis que van del 1-100nM en els diferents sistemes, les dosis de siRNA elevades poden induir l'activació del sistema immunitari en les cèl·lules especialitzades en la detecció d'organismes invasors, com són les cèl·lules professionals del sistema immunitari. En aquest treball demostrem que els astròcits també són especialment sensibles i efectius en l'activació de la resposta immune innata.

STAT1 I STAT3 EN LA ISQUÈMIA

En el context de la isquèmia cerebral, els diferents treballs presentats en aquesta tesi ens permeten concloure que Stat1 és una important ruta efectora en astròcits, que es pot activar en resposta a diferents estímuls i que participa en processos inflamatoris i de mort cel·lular.

Com ja s'ha explicat amb detall a l'introducció, les proteïnes JAK i STAT s'expressen normalment en el cervell i la seva expressió augmenta després de la isquèmia focal en rata, principalment en astròcits i microglia reactiva (Planas et al., 1996; Planas et al., 1997; Justicia et al., 2000). L'augment de l'expressió de Stat1 i Stat3 en microglia reactiva/macròfags coincideix en el temps amb el moment on la reacció glial és màxima, uns 4 dies després de la isquèmia. L'augment de les citoquines té lloc molt abans (hores després de la isquèmia), això suggereix que l'activació de la via JAK/STAT té lloc en la fase aguda de la resposta a la isquèmia i que posteriorment té lloc l'augment de l'expressió de les proteïnes com a resultat de la pròpia activació. En el treball de Suzuki et al. (2001) la fosforilació de Stat3 s'observa en neurones a les 3 hores i mitja i incrementa fins a 24h. Stat1 també es fosforila i transloca al nucli poques hores després de la isquèmia (Takagi et al., 2002).

En el cervell isquèmic interaccionen molts estímuls que poden ser responsables de l'inducció de la via de senyalització JAK/STAT de manera que possiblement no hi hagi una única causa responsable d'aquesta activació, i tant l'estrès oxidatiu, com la resposta immunitària i inflamatòria hi contribueixen.

El paper de Stat1 en l'inducció de la mort isquèmica es descriu en els estudis portats a terme en ratolins KO de Stat1, on es demostra que aquests ratolins presenten un menor volum d'infart respecte als *wild type* després de la isquèmia/reperfusió (Takagi et al., 2002). En el treball de Satriotomo et al. (2006), l'activació de Jak2 i Stat3 s'observa a les 6h després del reperfusió en microglia reactiva/macròfags i es demostra que l'inhibició de Stat3 és beneficiosa.

Existeixen diferents estudis que demostren que Stat3 també pot tenir propietats pro-apoptòtiques i altres que els contradiuen i defensen el paper antiapoptòtic de Stat3 en la isquèmia cerebral. L'activació de Stat3 s'associa amb supervivència en el paradigma del preconditionament isquèmic (Hattori et al., 2001) i és un factor protector en malalties cardiovasculars. El fet que Stat1 i Stat3 es puguin activar en resposta al mateix estímulo com és el cas de l'estrès oxidatiu o de la citoquina IL-6, fa difícil determinar els efectes individuals de cada proteïna. Probablement el fet que IL-6 activi tant a Stat1 com a Stat3 contribueix a que el seu paper en la mort cel·lular sigui tant controvertit.

La nostra aportació suggereix que en la isquèmia existeix un equilibri entre les propietats proapoptòtiques i proinflamatòries de Stat1 i les propietats antiapoptòtiques i antiinflamatòries de Stat3 que determinen la resposta cel·lular al dany per isquèmia/reperfusió. L'activació de Stat1 podria representar una diana terapèutica en malalties inflamatòries del SNC. Tot i així, Stat1 és una proteïna essencial en la senyalització de citoquines i és necessària per la defensa antiviral (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). La senyalització de Stat1 regula l'inducció de l'expressió del MHC de classe II en resposta a IFN- γ , i el MHC de classe II és important en la resposta immune (Lee i Benveniste, 1996). Un tractament hipotètic dirigit a l'inhibició de Stat1 en malalts induiria una immunosupressió que incrementaria el risc d'infeccions. Un oportunitat podria ser dissenyar una aproximació terapèutica dirigida a l'inhibició de l'activació de Stat1 en cèl·lules específiques.