



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante

Dra. Alejandra Vidal

Instituto de Histología y Patología

Facultad de Medicina

Profesor Co-patrocinante

Dr. Miguel Concha M

Instituto de Histología y Patología

Facultad de Medicina

**Caracterización de proteínas Fosforiladas en Queratinocitos humanos
secundaria a la estimulación de CD40**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de *Bioquímico*

Marcela Alejandra Herrera Ardabán

Valdivia Chile 2002

Agradecimientos

Quisiera a través de estas líneas expresar mi gratitud a todas las personas que, de forma directa, hicieron posible la realización de este trabajo.

De manera especial agradezco a mi profesor patrocinante Dra. Alejandra Vidal por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este estudio bajo su conducción y por su apoyo en todo momento.

A todas las personas que conforman el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile, que de alguna u otra manera me tendieron su apoyo desinteresado, en especial Dr Miguel Concha, al Dr Carlos Figueroa y al Licenciado en Ciencias Biológicas Angel Astroza por su tiempo, opiniones, comentarios y aportes que revistieron de un gran valor, ayudando a enriquecer este trabajo.

Finalmente quiero darle las gracias a mis Padres, a mi Esposo y a mi hijita, por brindarme siempre su apoyo incondicional, paciencia y comprensión. Y en especial a Dios el que me mantuvo con vida y salud dándome siempre las fuerzas para seguir adelante.

Esta tesis fue financiada por Proyecto FONDECYT, Líneas complementarias N° 8980002.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS	IV
1.- RESUMEN	1
SUMMARY	
2.- INTRODUCCIÓN	2
2.1 Prolegómenos	2
2.2 Mecanismos de transducción de señal	3
2.3 Fosforilación como mecanismo de transducción de señal	4
2.4 El antígeno de diferenciación leucocitaria CD40 como receptor de membrana	5
2.5 Objetivos	6
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Equipos	7
3.2 Medio de cultivos y enzimas	7
3.3 Anticuerpos	8
3.4 Preparación de fibroblastos irradiados	8
3.5 Aislamiento y cultivo de queratinocitos humanos	9
3.6 Congelación y descongelación de células	9
3.7 Caracterización inmunohistoquímica de los queratinocitos en medio bajo en calcio	10
3.8 Activación de queratinocitos <i>in vitro</i>	10
3.9 Determinación de proteínas por el método de Bradford	11
3.10 Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-SDS	12
3.11. Electrotransferencia	13
3.12 Inmunotinción de membranas de nitrocelulosa	13
3.12.1 Método de biotina-streptavidina-fosfatasa alcalina	13
3.12.2 Quimioluminiscencia	14
3.13 Visualización del factor de transcripción NF- κ B p65 en queratinocitos en cultivo	14

	Página
3.13 Determinación de (pro)filagrina como indicador de diferenciación, en queratinocitos estimulados con agonistas para CD40	15
4.- RESULTADOS	16
4.1 Aislamiento, cultivo y caracterización inmunohistoquímica de queratinocitos humanos	16
4.2 Análisis de la expresión de CD40 mediante western blotting	17
4.3 Identificación de polipéptidos fosforilados en queratinocitos estimulados con agonistas solubles de CD40	17
4.4 Translocación nuclear del factor de transcripción NF κ B	18
4.5 Inmunoreactividad para (pro)filagrina en queratinocitos estimulados con diferentes agonistas solubles de CD40	19
5.- DISCUSIÓN	30
6.- BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 : Cultivo de queratinocitos humanos aislados de biopsias de piel.	20
FIGURA 2.: Los queratinocitos cultivados en medio con bajo contenido de calcio presentan características inmunofenotípicas compatibles con queratinocitos basales.	21
FIGURA 3 : Expresión de CD40 en queratinocitos humanos determinada mediante western blotting.	22
FIGURA 4 : El anticuerpo anti-CD40 M89 induce la fosforilación tirosina-dependiente de polipéptidos en queratinocitos humanos.	23
FIGURA 5 : La fosforilación de polipéptidos inducida por M89 es ligeramente dependiente de la concentración de anticuerpo.	24
FIGURA 6 : El trímero recombinante hCD40L induce la fosforilación tirosina dependiente de polipéptidos en queratinocitos humanos.	25
FIGURA 7 : Distintos agonistas solubles de CD40 estimulan de manera diferenciada la fosforilación de polipéptidos en queratinocitos humanos.	26
FIGURA 8 : La fosforilación de polipéptidos producto de la estimulación de CD40 en queratinocitos humanos es sensible a herbimicina y PMA.	27
FIGURA 9 : La estimulación de CD40 induce la translocación nuclear de NF- κ B en queratinocitos humanos.	28
FIGURA 10 : Diferentes agonistas solubles de CD40 inducen en los queratinocitos inmunoreactividad para (pro)filagrina.	29

ABREVIATURAS

- AMPc : adenosina monofosfato cíclico
- BCIP : 5 bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate p-toluidine salt
- BSA : albúmina sérica de bovino
- CO₂ : dióxido de carbono
- DAG : diacilglicerol
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DK-SFM : Defined Keratinocyte-serum free medium
- AEC : 3-amino-9-ethylcarbazol
- EDTA : ácido etilendiaminotetraacético
- EGTA : etilene glycol bis-(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetracetic acid
- GTP : guanosina trifosfato
- IgG : inmunoglobulina G
- KDa : kilodalton
- NF- κ B: factor nuclear- κ B
- NTB : p-nitro blue tetrazolium chloride
- PBS : tampón fosfato salino
- PMA : Phorbol-12-myristate-13-acetate
- PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
- PTK : proteína tirosina quinasa
- RIPA : radioimmunoprecipitation assay
- SAV-AP: complejo streptavidina-fosfatasa alcalina
- SFB : suero fetal de bovino
- SDS : dodecil sulfato de sodio
- TBS : tampón tris salino
- TNF : factor de necrosis tumoral
- TTBS : tampón tris-tween salino

1. RESUMEN

La diferenciación de los queratinocitos de la epidermis humana, está regulada por una variedad de estímulos externos y señales intracelulares que interactúan mediante complejos mecanismos. Aunque en su comprensión se han realizado importantes avances, muchas de estas señales y sus efectos continúan siendo poco conocidos.

En el presente trabajo estudiamos en cultivos de queratinocitos humanos las señales intracelulares generadas por la conjugación de agonistas solubles a la molécula de membrana CD40. Para ello se aislaron queratinocitos a partir de biopsias de piel de pacientes sometidos a cirugía reparativa y se cultivaron en medio bajo en calcio. Este método permitió obtener células equivalentes a queratinocitos basales, los que fueron utilizados en todos los ensayos posteriores. Mediante western blotting se analizó la fosforilación de proteínas tirosina-dependiente en queratinocitos estimulados con agonistas solubles a CD40; Incluyendo anticuerpos monoclonales anti-CD40 y el trímero recombinante humano (hCD40L). Los anticuerpos EA-5 y en menor grado M89 indujeron la rápida fosforilación tirosina-dependiente, herbimicina y PMA sensible de péptidos de masa molecular aparente de 132 kDa. Además, hCD40L y M89 indujeron la translocación nuclear del factor transcripcional NF κ B y la expresión de (pro)filagrina de forma dosis dependiente. Sin embargo, debido a que los agonistas empleados corresponden, con excepción del trímero hCD40L, a inmunoglobulinas, el empleo de IgG₁ como control de la estimulación con agonistas solubles, podría permitir ratificar estos resultados.

Estos resultados sugieren que la activación de CD40 por agonistas solubles induce en queratinocitos humanos proteínas fosforiladas en tres residuos de tirosina de alrededor de 132 kDa. y la translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B, sugiriendo una posible vía de señales de transducción de CD40.

SUMMARY

Keratinocyte differentiation in human epidermis is regulated by a variety of external stimulus and intracellular signals that interact through complex mechanisms. Even though there it has important advances in the comprehension of these mechanisms, many of these signals and their effects continue to be poorly understood.

In this work, we studied the intracellular signals generated by the conjugation of soluble agonists to the CD40 membrane molecule in human keratinocyte cultures. To this purpose keratinocytes were isolated from skin biopsies from patients undergoing reparative surgery and cultured in low calcium medium. This method made it possible to obtain cells equivalent to basal keratinocytes, that which were used in all subsequent assays. Tyrosine-dependent protein phosphorylation was analyzed by means of Western blotting in keratinocytes stimulated with soluble agonists to CD40, including anti-CD40 monoclonal antibodies to CD40 and the human recombinant trimer (CD40L). EA-5 and with a lesser degree M89 antibodies, induced rapid tyrosine-dependent, herbimycin and PMA sensitive phosphorylation of peptides with an apparent molecular mass of 132 kDa. In addition, hCD40L and M89 induced nuclear translocation of the NF κ B transcriptional factor; and, the expression of (pro)filaggrin in a dose-dependent manner. However, because, the agonists used correspond, to immunoglobulins, with exception of the trimer hCD40L, the use of IgG₁ as a control of the stimulation with soluble agonists, could enable to ratify this results.

These results suggest that activation of CD40 by soluble agonists induce in human keratinocytes as a whole of 132 kDa. tyrosin phosphorylated proteins and nuclear translocation of NF κ B transcriptional factor, suggesting a possible transduction pathway for CD40.

2. INTRODUCCION

2.1 PROBLEGOMENOS

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado en constante renovación. Su principal población celular la constituyen los queratinocitos, un componente celular clave en los procesos homeostáticos y fisiopatológicos de la piel. Estas células se organizan formando los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo. Estos estratos constituyen una barrera defensiva que protege de agresiones físicas; mantiene el medio interno; impide la penetración de los rayos ultravioletas; y participa en la vigilancia inmunológica. El estrato basal está compuesto de células germinales, entre las cuales se incluyen células de reserva en reposo y células en proliferación. Durante el proceso de diferenciación iniciado como consecuencia de la división celular, los queratinocitos son desplazados progresivamente desde el estrato basal hasta alcanzar en el estadio de células cornificadas su plena diferenciación celular.

Tanto la proliferación como la diferenciación de los queratinocitos son estimuladas por una variedad de factores biológicos. Entre estos se incluyen factores de crecimiento, citokinas, hormonas esteroidales y retinoides, todos los cuales participan en la biología de la piel normal. Algunas de estas moléculas producen respuestas rápidas de corta duración mientras que otras inician cambios en la expresión génica que inducen modificaciones fenotípicas duraderas.

Uno de los pocos mecanismos de respuesta a señales extracelulares conocido en la actualidad en los queratinocitos corresponde a los cambios en la fosforilación de proteínas. (Gaspari y col 1996) Esta es una consecuencia general de la unión ligando/receptor que lleva a la activación de varios sistemas de transducción de señales en distintos tipos celulares. (Kazanietz y Blumberg, 1996)

Un ejemplo de la importancia de las interacciones ligando/receptor en la epidermis es el par molecular CD40L/CD40 (Gaspari y col, 1996). La unión de CD40 con CD40L expresado en fibroblastos inhibe la capacidad de proliferación de los queratinocitos e induce la producción de (pro)filagrina (Péguet-Navarro y col, 1997). Estas modificaciones son compatibles con la idea

que la estimulación de CD40 estimula la diferenciación terminal de los queratinocitos. Las señales intracelulares que regulan dichos cambios son desconocidas.

2.2 MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

La proliferación, crecimiento, diferenciación y muerte celular están reguladas mediante la comunicación molecular entre células y los compartimentos intracelulares. Las señales que afectan a las células - hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y una diversidad de polipéptidos, péptidos endógenos o exógenos- actúan mediante su unión a *receptores* específicos en la membrana celular. De allí que reciban el nombre genérico de *ligandos*. Una de las características de ésta unión es la elevada afinidad ligando/receptor. De esta forma, los receptores constituyen un componente esencial en la comunicación entre los ligandos extracelulares y el compartimento intracelular, transmitiendo la información al interior de las células y permitiendo, en consecuencia, que el efecto ligando-dependiente sea productivo. Este complejo proceso es conocido como *mecanismo de transducción de señal*.

Schwartz (1994) ha propuesto un modelo general de señalización celular. Según este autor, al unirse la señal al receptor induce en este último un cambio estructural que es transmitido por un *complejo molecular transductor* –asociado al receptor- a un tercer componente formado por *moléculas efectoras* que inducen la generación de *segundos mensajeros* y, finalmente, un cambio fenotípico. Existen varios tipos de moléculas transductoras, cada una de las cuales actúa en la transducción de la señal a una vía de transmisión intracelular específica. Los segundos mensajeros activan vías secundarias de transmisión de señales dentro de la célula, amplifican la señal inicial y tienen la capacidad de regular la actividad de una variedad de señales tales como enzimas, canales iónicos y genes (Kazanietz y Blumberg, 1996). Además, pueden modificar su concentración o localización intracelular en forma pasajera en respuesta a un estímulo específico. Diferentes receptores de membrana pueden acoplarse ya sea al mismo o a distintos efectores y a través de ellos, regular la respuesta a través de uno o diferentes segundos mensajeros. Por ejemplo, receptores de membrana β -adrenérgicos y ciertos tipos de receptores muscarínicos y prostaglandínicos, se acoplan en la membrana celular al efector adenilato ciclasa, una enzima generadora del segundo mensajero AMPc. Los intermediarios entre estos receptores y la adenilato ciclasa son proteínas que unen guanosina trifosfato (GTP), denominadas proteínas G.

Otra clase de receptores de membrana son los receptores α -1-adrenérgicos los cuales activan al efector fosfolipasa C, el cual se encarga de aumentar la concentración de los segundos mensajeros calcio y diacilglicerol (DAG). Las numerosas moléculas y vías de señalización tienen como meta final común la activación de factores de transcripción nucleares específicos y de co-activadores transcripcionales que regulan la transcripción de genes específicos, lo que da como resultado un fenotipo diferente. (Kazanietz y Blumberg, 1996)

2.3 FOSFORILACIÓN COMO MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

La fosforilación covalente de proteínas en residuos de tirosina, serina o treonina es el principal mecanismo mediante el cual las células responden a señales extracelulares tales como hormonas y factores de crecimiento. La fosforilación de proteínas es responsable, también, de la secuencia o lapso temporal en que ocurren etapas definidas del ciclo celular, tales como la síntesis de DNA y la mitosis.

En la fosforilación de proteínas actúan dos tipos de enzimas: 1) quinasas, como serina/treonina quinasas, que fosforilan proteínas en residuos de serina y treonina para tornarlas activas; y tirosina quinasas (PTK), que fosforilan residuos de tirosina. 2) Las fosfatasas tales como serina/treoninas fosfatasas remueven los grupos fosfato de proteínas fosforiladas en residuos de serina y treonina, permitiendo la reversibilidad de la fosforilación inducida por mecanismos transductores mediados por quinasas. Las tirosina fosfatasas remueven los grupos fosfatos de fosfotirosina, y no se encuentran estructuralmente relacionadas con las serinas/treoninas fosfatasa. Su alta especificidad asegura que la fosforilación de tirosina no se prolongue en el tiempo manteniéndose un nivel intracelular bajo de fosforilación tirosina-dependiente (Walton y Dixon, 1993). La importante actividad reguladora que la fosforilación proteica posee sobre diversos procesos fisiológicos puede ser explicada porque i) la modificación de las cargas y, consecuentemente, la conformación proteica, provocan un cambio de función o de actividad en la proteína; ii) ocurre a una velocidad tal (a menudo en segundos) que se ajusta a los requerimientos orgánicos; iii) su reversibilidad dependiente de fosfatasas facilita una forma dinámica de control. La fosforilación también es efectiva en integrar información, la que parece

depender de la interacción entre varias cascadas de fosforilación que son activadas por diferentes señales extracelulares.

En los queratinocitos la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina participa en la transducción de diversas señales. En estas células, varios receptores de factor de crecimiento y proteínas citosólicas, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento similar a insulina I exhiben actividad PTK. Las PTK están fuertemente relacionadas con crecimiento celular, proliferación y diferenciación (Mitev y Miteva, 1999). La inducción de la fosforilación de tirosinas es un evento temprano y específico requerido para la diferenciación de queratinocitos de ratón (Filvaroff y col, 1994). La diferenciación de los queratinocitos inducida por calcio y ésteres de forbol está asociada con la inducción de actividad PTK y fosforilación de tirosinas (Medema y col, 1995). Además, en los queratinocitos, las proteínas quinasas son transductores de segundos mensajeros como AMPc, calcio y DAG (Mitev y Miteva, 1999).

2.4 EL ANTÍGENO DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA CD40 COMO RECEPTOR DE MEMBRANA

El antígeno de diferenciación leucocitaria CD40 es una glicoproteína de membrana de 50 kDa que pertenece a la familia del receptor de TNF (Noelle y col, 1992). Identificado por primera vez en linfocitos B, se ha observado que también se expresa en células inmunocompetentes presentadoras de antígeno, incluyendo macrófagos activados y células dendríticas (Caux y col, 1994), así como en fibroblastos y células endoteliales (Stout y Suttles, 1996). Su ligando corresponde a una glicoproteína de 39 kDa (CD40L, gp39 o TRAP) expresada en linfocitos T activados. La interacción entre CD40 y CD40L es esencial para el desarrollo de la respuesta inmune humoral timo-dependiente (Armitage y col, 1992). En efecto, la interacción entre CD40 y su ligando durante la presentación de antígeno a la célula T es esencial para que ocurra la diferenciación de la célula B a célula productora de inmunoglobulinas, y de la célula T a célula inmunocompetente (van Kooten y Banchereau, 1997).

Recientemente se ha demostrado que CD40 se expresa también en la epidermis *in situ* y que su expresión es mantenida en queratinocitos en cultivo (Péguet-Navarro y col, 1997). La estimulación de queratinocitos con fibroblastos transfectados con CD40L inhibe la capacidad de

proliferación de los queratinocitos e induce la producción de profilagrina, un marcador de la diferenciación terminal de las células epidérmicas (Péguet-Navarro y col, 1997).

La cascada de señales bioquímicas generada por la activación de CD40 tiene gran importancia en el linfocito T porque su consecuencia es la proliferación celular y la adquisición de funciones diferenciadas. En linfocitos B la activación vía CD40 induce la fosforilación de tirosinas, aumento de inositol 1,4,5-trifosfato, y la activación de diferentes proteínas quinasas serina/treonina específicas (Uckun y col, 1991). Sin embargo, las señales de transducción generadas por CD40 son escasamente conocidas en otros tipos celulares, y la única observación que existe en la literatura sugiere que en los queratinocitos la activación de CD40 con anticuerpos específicos G28.5 podría inducir fosforilación de proteínas tirosina-dependiente (Gaspari y col, 1996). Como resultado, los queratinocitos activados con anticuerpos anti-CD40, son capaces de estimular la proliferación T.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que CD40 podría estar involucrado en fenómenos de diferenciación celular de los propios queratinocitos y, además, actuar como una molécula potencialmente activadora del infiltrado T producido en procesos patológicos de la piel. Sin embargo, existe escasa información sobre los mecanismos que podrían regular ambas funciones.

2.5 OBJETIVOS

El objetivo del siguiente trabajo de tesis fue estudiar en cultivo de queratinocitos humanos las señales intracelulares generadas por la unión de agonistas solubles a CD40. Específicamente, interesó conocer si la conjugación de CD40 a agonistas solubles, en particular anticuerpos anti-CD40 activaba o no la fosforilación de proteínas y/o la producción de segundos mensajeros.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 EQUIPOS

Centrífuga de aceleración programable Sigma 4k-10, balanza analítica electrónica Precisa 120 A, fuente de poder Apparatus EC-1000-90, cámara de electroforesis y cámara de transferencia Bio JSP Ltda., estufa de cultivo con CO₂ Forma Scientific, cámara de flujo laminar Factommet, baño termorregulado VWR Scientific Products Model 1202, ultrasonic homogenizer serie 4710, tambor de nitrógeno líquido, freezer -80°C, microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioskop HBO50 con cámara fotográfica MC80), microscopio invertido Nikon, espectrofotómetro Shimadzu (UV 150-0.2).

3.2 MEDIOS DE CULTIVOS Y ENZIMAS

Para los cultivos primarios de queratinocitos se utilizó medio DMEM 1.8 mM Ca⁺² (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, Life Technologies) con HAM F12 (Gibco BRL, Life Technologies) en una proporción 3:1, suplementado con suero fetal de bovino al 10% (SFB, Hyclone, Logan, Utah, USA), hidrocortisona 0.4 µg/ml (Sigma Chemical Co.), toxina del cólera 10⁻¹⁰ M (Sigma Chemical Co.), insulina 5 µg/ml (Sigma Chemical Co.), factor de crecimiento epidérmico 10 µg/ml (EGF, Sigma Chemical Co.), penicilina-estreptomina al 1% (10000 UI/ml de penicilina y 10000 µg/ml de estreptomina, Gibco BRL, Life Technologies) y Fungizone® al 1% (250 µg/ml anfotericina B y 205 µg/ml desoxicolato sódico (Gibco BRL, Life Technologies)).

Para los ensayos de activación celular se utilizó el medio de cultivo Defined Keratinocyte-serum free medium con <0.1mM de Ca⁺² (DK-SFM, Gibco BRL, Life Technologies). Este medio libre de suero y que contiene bajas concentraciones de calcio, permite que las células crezcan en una monocapa impidiendo su estratificación.

Las enzimas empleadas correspondieron a tripsina 0.05%-EDTA 1mM y tripsina 0.25%-EDTA 1mM (Gibco BRL, Life Technologies).

3.3 ANTICUERPOS

Se emplearon anticuerpos monoclonales específicos anti-CD40: M89 (Immunotech Marseille, France); EA-5 (Biosource International, USA) y G 28.5 (Gentilmente donado por el Dr. A Gaspari, University of Rochester School of Medicine and Dentistry NY, USA., anticuerpos anti-fosfotirosina biotilado (Upstate), el trímero recombinante hCD40L (donado por Immunex Corporation, W.A.), anticuerpos anti-CD29 (Serotec, Oxford, England), anti-involucrina (gentilmente donado por la Dra. F. Watt Keratinocyte Laboratory, Imperial Cancer Reserch Fund, London), anti-E-cadherina (Immunotech Marseille, France) y anti-(pro)filagrina (Biomedical Technologies Inc, Stoughton MA, USA).

También se empleó el anticuerpo policlonal anti NFκB p65 (A) (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Como control se utilizó el anticuerpo monoclonal anti IgG₁ de ratón de igual isotipo a los anticuerpos utilizados pero de especificidad no relacionada (DAKO, USA).

3.4 PREPARACIÓN DE FIBROBLASTOS IRRADIADOS

1×10^6 fibroblastos 3T3 de ratón fueron cultivados en botellas de 75 cm² (NUNC, Brand Products) por 4-5 días en medio DMEM suplementado con SFB al 10%; penicilina-estreptomicina al 1% y Fungizone® al 1%. Posteriormente los cultivos fueron sometidos a una radiación de 6000 rads en un irradiador de cobalto 60, del Servicio de Oncología del Hospital Regional de Valdivia. Los fibroblastos irradiados fueron desprendidos con tripsina 0,25%-EDTA, lavados en medio Hank-10% SFB y congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización.

3.5 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE QUERATINOCITOS HUMANOS

A partir de biopsias de piel de pacientes sometidos a cirugía reparadora en el Hospital Regional de Valdivia y mediante uso de un querátomo se obtuvieron láminas de aproximadamente 1mm de espesor las cuales fueron incubadas en tripsina 0,05% en medio Hank sin calcio ni magnesio por 60 min. a 37°C. De acuerdo al método descrito por Rheinwald y Green (1975) la epidermis fue separada de la dermis usando pinzas finas, luego disgregada con tijeras y pipeteada repetidas veces hasta obtener una suspensión celular homogénea. Esta suspensión se filtró en una gasa estéril y las células epidérmicas se lavaron en solución de Hank-10% SFB. Posteriormente, se realizó recuento celular y su viabilidad fue estimada por exclusión con azul Tripano 0.5% (Sigma Chemical Co.).

Las células así obtenidas fueron cultivadas con fibroblastos 3T3 irradiados, en igual proporción (25000 cel.x cm²), en botellas de 75 cm² en medio DMEM-F12 suplementado. Luego que los queratinocitos alcanzaron 70-80% de confluencia fueron desprendidos con tripsina 0,25%-EDTA, y guardados en nitrógeno líquido hasta su utilización.

3.6 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Las células una vez cultivadas a subconfluencia fueron tratadas con tripsina 0,25%-EDTA y lavadas dos veces en solución Hank-10% SFB. Posteriormente fueron resuspendidas en medio de congelación *cell culture freezing medium*-DMSO[®](Gibco BRL) a una concentración de 5-10x10⁶/ml y guardadas a -80°C en un congelador de células (Freezing Container, Nalgene “Mr. Frosty”, Sigma Chemical Co.). Luego de 24 hrs. los viales fueron guardados en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Para descongelar las células los viales guardados en nitrógeno líquido se llevaron a 37°C por 2 min. aproximadamente y se les agregó SFB. Las células una vez resuspendidas se lavaron 2 veces en solución de Hank-10% SFB y se pusieron a cultivar en el medio correspondiente.

3.7 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS QUERATINO-CITOS CULTIVADOS EN MEDIO BAJO EN CALCIO

Alícuotas de queratinocitos en suspensión fueron colocadas sobre portaobjetos cubiertos con una película de poli-L-lisina (Sigma) al 0.01% y se dejaron secar por 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar en PBS se bloquearon durante 20 minutos con PBS 0,5% BSA y se incubaron sucesivamente con: a) anticuerpos monoclonales específicos anti-CD40, anti-CD29, anti E-cadherin y anti-involucrina; b) segundo anticuerpo marcado con biotina; y c) complejo streptavidina-peroxidasa (kit LSAB Large vol, DAKO). El revelado se efectuó con el cromógeno 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC Substrate System, DAKO) el cual produce un precipitado visible de color rojo.

3.8 ACTIVACIÓN DE QUERATINOCITOS *IN VITRO*

Se despertaron aproximadamente 4×10^6 células y se cultivaron a subconfluencia en 3 botellas de 75 cm² en medio DK-SFM. Luego, las células fueron desprendidas con tripsina 0,05%-1mM EDTA a 37°C por 15 min., se les agregó inhibidor de tripsina (Gibco BRL) al 0,05% y se lavaron en medio de Hank. Posteriormente fueron re-sembradas en placas petri de 35 mm de diámetro a razón de 400.000 células por placa y cultivadas a subconfluencia en igual medio. Antes de realizar el ensayo de activación, las células se dejaron en medio DK-SFM sin factores de crecimiento (medio base) por 24 horas.

Las células se lavaron en medio base y se incubaron con el anticuerpo monoclonal M89 a una concentración de 10 µg /ml (60 nM) a 37°C por diferentes periodos de tiempo (0.5, 1, 2 y 5 min.). La reacción se detuvo aspirando el medio y lavando en frío con PBS-inhibidores (Na₃VO₃ 200 mM, NaF 200 mM, PMSF 100 mM, pepstatin 1mg/ml, aprotinin 1mg/ml y leupeptin 1mg/ml). Posteriormente, utilizando una espátula de teflón las células fueron recolectadas y resuspendidas en 100 µl de buffer RIPA más inhibidores (Tris-HCl 50mM, pH 7.4, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sodio 0.25%, NaCl 150mM, EGTA 1mM, PMSF 1mM, aprotinina 1mg/ml leupeptina 1mg/ml y pepstatina 1mg/ml). Luego de sonicar por 10 seg. en tubos de

microcentrífuga, se realizó determinación de proteínas totales por el método de Bradford. Las muestras fueron alicuotadas y guardadas a -80°C en buffer de muestra 2X (SDS al 4.6%, β -mercaptoetanol al 5%, Tris al 0.06%, glicerol al 10% y azul de bromofenol). Se realizaron además otros ensayos de activación utilizando diferentes concentraciones del anticuerpo M89 (2.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ que corresponden a 17, 33, 60, 100, 133 ηM respectivamente), así como otros agonistas solubles, tales como los anticuerpos anti CD40, EA-5, G28.5 y el trímero recombinante hCD40L utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para todos ellos se utilizó una dosis de 100nM durante 1 min. a 37°C .

Como control de la especificidad de la reacción, se utilizaron células no estimuladas así como células previamente tratadas con inhibidores de la fosforilación, GF109203x 1 μM por 30 min. (CalBiochem); Phorbol-12 mirystate-13-acetate (PMA) 500nM por 18 hrs. (Sigma Chemical Co); phorbol-12,13-dibutyrate (PdbU) 500 nM por 18 hrs. (Sigma Chemical Co) y Herbimycin A, Streptomyces sp 1 μM por 18 hrs. (CalBiochem).

3.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Para ello se preparó el reactivo de Bradford que contiene azul de Coomassie G 0.01%; etanol 4.75%; ácido fosfórico 8.5%. Con este reactivo se hizo una curva de calibración entre 1 a 40 μg de proteína por ml de reactivo, utilizando seroalbúmina de bovino en NaCl 0.15 M como estándar. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas del extracto celular se tomó una alícuota de 10 μl de la muestra y se le agregó 1ml del reactivo de Bradford. La absorbancia fue leída a la misma longitud de onda y su valor fue interpolado en la curva de calibración.

3.10 ELECTROFORESIS DISCONTÍNUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron placas de vidrio de 11,3x11,3 cm y espaciadores de teflón de 0,5 mm de espesor. Para formar la gradiente lineal se utilizaron “*vasos comunicantes formadores de gradiente*”.

Se utilizó un gel separador de gradiente lineal de 5%-15% preparado de la siguiente manera:

Gel separador	5%	15%
Acril bis 45%-1,2%	0,425ml	1,25 ml
Tris HCl 1,5 M, SDS 0,8% pH 8,8	0,95 ml	0,95 ml
Sacarosa		0,75 ml
Persulfato 1%	62,5 ul	62,5 ul
Agua destilada	2,35 ml	0,75 ml
TEMED	1,4 ul	1,4 ul

Gel espaciador:

Acril Bis 40%-4% 0,645 ml; Tris HCl 0,5 M (pH 6,8) 0,660 ml, SDS 10% 0,1 ml; persulfato 1% 0,645 ml; agua destilada 3,115 ml; TEMED. 5 μ l

El gel fue sembrado con 60 μ g de proteínas previamente hervidas por 3 min. y la corrida electroforética se realizó a 9 mA durante 3 h. aproximadamente. en tampón de corrida (tris 3% p/v, glicina 14.4% p/v y SDS 1% p/v). En la mayoría de los casos se utilizó un patrón de pesos moleculares biotinilados con bandas definidas en 200, 116, 97, 66.2, 45, 31, 21.5, y 14 kDa (BioRad) y para el ensayo en que se estudiaron los inhibidores de la fosforilación se utilizaron estándares de pesos moleculares preteñidos con bandas definidas en 175, 83, 62, 47.5, 32.5 y 25 kDa (W&Z).

3.11 ELECTROTRANSFERENCIA

La transferencia se llevó a cabo según el método de Towbin y col. (1979). Una vez realizada la separación de las proteínas mediante electroforesis, estas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Membranes, Immobilon-NG Pure Nitrocellulose, tamaño de poro 0,22 μm , SIGMA). La transferencia se realizó a 60 mA de corriente constante por 15-16 horas usando un tampón que contenía tris 0.02 M, glicina 0.15 M, metanol 20% y SDS 0.05%. Posteriormente las membranas fueron lavadas en una solución al 10% ácido acético y 25% de isopropanol para eliminar el SDS y realizar la inmunotinción.

3.12 INMUNOTINCIÓN DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

3.12.1 Método de la biotina-Streptavidina-Fosfatasa alcalina

Los papeles de nitrocelulosa provenientes del electrotransferido se lavaron dos veces con TTBS (Tris-HCl 20mM pH 7.4, Tween-20 0.05%, NaCl 500 mM) para eliminar restos de buffer de transferencia y se bloquearon por 60 min. con gelatina al 3% en TTBS a 37°C. Luego de dos lavados con TTBS, se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina biotinilado (Upstate) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Las membranas se lavaron dos veces con TTBS y una vez con TBS (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM pH 7.4) para posteriormente incubarse 1h. con SAV-AP a temperatura ambiente y agitación constante. Después de dos lavados con TBS, fueron reveladas por 15 min en una mezcla NTB y BCIP (Biorad), en tampón de revelado Tris-HCl 0,1M pH 9.5

3.12.2 Quimioluminiscencia

Las membranas provenientes del electrotransferido fueron bloqueadas durante 90 min. con solución TTBS-leche (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, Tween-20 0.05%, NaCl 500mM, leche en polvo descremada 5%) a temperatura ambiente y agitación constante. Luego de sucesivos lavados con TTBS por 30 min. fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo monoclonal (P-Tyr-100) anti-fosfotirosina (Cell Signaling Technology) diluido 1:2000 en TTBS-BSA 1%. Las membranas fueron lavadas varias veces con TTBS (3 x 5 min, 1 x 15 min y 3 x 30 min), para luego ser incubadas con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Pierce, Illinois, USA) diluido 1:50000 en TTBS-leche. Luego de nuevos lavados de 120 min. con TTBS distribuidos de la misma forma anteriormente explicada, se incubaron con Super Signal® West Dura Extended durante 20 min. Finalmente fueron expuestas en cámara oscura a una placa Kodak Biomax para quimioluminiscencia.

3.13 VISUALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFκB p65 EN QUERATINOCITOS EN CULTIVO

10×10^3 queratinocitos fueron cultivados en cámaras de cultivo tipo portaobjeto en medio DK-SFM hasta subconfluencia. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 100nM del anticuerpo anti- CD40 M89 por diferentes periodos de tiempo (0.5, 15, 30, 60 y 120 min.), fijadas con p-formaldehído 4% en PBS, lavadas y tratadas con metanol a -20°C . Luego se incubaron sucesivamente con: a) anticuerpo policlonal anti-NFκB p65 (A); b) F(ab')₂ IgG anti-conejo marcado con fluoresceína (DAKO, USA). Los preparados fueron montados con medio acuoso Mbiol 4-38 (Hoechst, Alemania) que contenía 0.5% de p-fenilendiamina.

3.14 DETERMINACIÓN DE (PRO)FILAGRINA COMO INDICADOR DE DIFERENCIACIÓN, EN QUERATINOCITOS ESTIMULADOS CON AGONISTAS PARA CD40

10x10³ queratinocitos fueron cultivados en cámaras de cultivo tipo portaobjeto (Chamber slide system, Lab-Tek, Nunc, USA) en medio DK-SFM hasta subconfluencia. Luego las células fueron tratadas por 48 horas con 100 UI/ml de IFN- γ y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones del trímero recombinante hCD40L o con los anticuerpos M89, G28.5, EA-5 por otras 48 horas. Como control las células fueron incubadas sin agonistas o con IgG₁. A continuación, los queratinocitos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti-(pro)filagrina humana por una hora a temperatura ambiente y revelados con el método de la biotina-streptavidina peroxidasa (DAKO LSAB 2 System, peroxidase).

4. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTO-QUÍMICA DE QUERATINOCITOS HUMANOS

Mediante la técnica de Rheinwald y Green (1975), se procedió al aislamiento de queratinocitos humanos a partir de biopsias de piel. Estos fueron cultivados por 10-12 días en medio DMEM-F12 (3:1) suplementado, junto a fibroblastos 3T3 irradiados. Como se muestra en la Fig. 1, luego de 2-3 resiembras los queratinocitos crecieron formando característicos islotes de células epiteliales rodeados de fibroblastos, estratificados desde el día uno. A medida que se avanzó hacia la confluencia, los fibroblastos irradiados fueron desapareciendo del cultivo y los queratinocitos formaron un tapiz continuo, cubriendo toda la placa de cultivo. En la etapa de postconfluencia presentaron el típico aspecto de “camino empedrado” de células en proliferación. Las uniones intercelulares eran evidentes y en etapas más avanzadas, las células paulatinamente se aplanaron y tomaron forma poligonal. Así, aproximadamente a los diez días de iniciado el cultivo los queratinocitos formaban un equivalente epidérmico (epidermis artificial) maduro.(Fig.1A)

Por el contrario, cuando los queratinocitos fueron cultivados en medio DK-SFM, que no contiene suero fetal de bovino y cuya concentración de Ca^{+2} es $< 0.1 \text{ mM}$, las células presentaron forma redondeada, tamaño pequeño, escasas uniones intercelulares y no se estratificaron.(Fig 1B) Dependiendo del número de células en cultivo, los queratinocitos conservaron este aspecto durante 4 a 6 días. La caracterización inmunofenotípica de los queratinocitos cultivados en medio DK-SFM demostró que correspondían a células $\text{CD40}^{(+)}$, $\text{CD29}^{(+)}$, $\text{e-cadherina}^{(-)}$ e $\text{involucrina}^{(-)}$ (Fig.2). De acuerdo a estas características fueron consideradas células equivalentes a queratinocitos basales y utilizadas en todos los experimentos siguientes.

4.2 AISLAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE CD40 MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Con el objeto de determinar la presencia de la molécula CD40 en queratinocitos humanos, se obtuvieron extractos proteicos de células epidérmicas totales y de queratinocitos cultivados en medio DK-SFM los cuales fueron analizados mediante western blotting. (Fig. 3). El revelado con el anticuerpo anti-CD40 M89 permitió identificar una proteína de 50 kDa, especialmente evidente en los queratinocitos cultivados. Este resultado concuerda con estudios realizados anteriormente donde se demostró la expresión de CD40 en queratinocitos en cultivo tanto con citometría de flujo como western blotting.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS FOSFORILADOS EN QUERATINOCITOS ESTIMULADOS CON AGONISTAS SOLUBLES DE CD40

Para estudiar segundas señales generadas luego de la estimulación de CD40 especialmente la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, los queratinocitos humanos cultivados en medio DK-SFM a un 70% de confluencia fueron incubados en medio DK-SFM base, sin factores de crecimiento y luego de 18-24 h. estimulados con los anticuerpos monoclonales anti-CD40, M89; EA-5; G-28.5 y con la proteína trimérica hCD40L y procesados para western blotting como se indica en el punto 3.8.

La estimulación de las células con M89 60 nM (10 μ g/ml), indujo a los 30 segundos la fosforilación de tirosina-dependiente de polipéptidos con una masa molecular aproximada de 132 kDa. Este proceso alcanzó su máxima intensidad luego de 1 min. de estimulación y decreció progresivamente con tiempos de estimulación más largos (Fig. 4).

Para determinar si existía un efecto dependiente de la dosis, se estimularon queratinocitos con concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 μ g/ml de M89 (17, 33, 60, 100 y 133 nM respectivamente) por 1 min. que fue el tiempo en que se observó la máxima respuesta. Los resultados obtenidos mostraron que 2,5 μ g/ml del anticuerpo eran suficiente para inducir un aumento en la reactividad para fosfotirosinas de 132 kDa y que al aumentar la concentración del

anticuerpo se producía un muy leve incremento de intensidad de la banda resuelta, existiendo una respuesta máxima de fosforilación con concentraciones de 15 µg/ml. (Fig. 5).

Con la utilización del trímero recombinante hCD40L 100 nM para estimular los queratinocitos, también se observó la fosforilación de polipéptidos de 132 kDa. Dicho efecto ocurrió de manera aún más rápida que la fosforilación inducida por M89, observándose el máximo de inmunoreactividad para fosfotirosinas luego de 30 segundos de estimulación. Esta fosforilación fue detectada al menos hasta 5 min después de efectuada la estimulación pero en menor intensidad (Fig. 6).

Cuando los queratinocitos fueron estimulados con diferentes agonistas de CD40 la magnitud de la respuesta fue dependiente del agonista utilizado. En efecto, el anticuerpo EA-5 y el trímero hCD40L fueron los más efectivos en la inducción de inmunoreactividad para fosfotirosina; en cambio, el anticuerpo G28.5 fue el menos efectivo (Fig. 7).

Para determinar con mayor precisión la especificidad de la reacción, se realizaron ensayos utilizando inhibidores de la fosforilación previo a la estimulación con el anticuerpo M89. Estos revelaron que la fosforilación fue sensible a herbimicina y PMA ya que la banda de 132 kDa desapareció al incubar previamente los queratinocitos con estos inhibidores. Sin embargo, la fosforilación tirosina-dependiente producida por M89 fue resistente al tratamiento de las células con GF 109203X y PdBU (Fig. 8).

4.4 TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFκB.

Para estudiar si la estimulación con agonistas solubles de CD40 inducía en el queratinocito la translocación de factores transcripcionales al núcleo, se investigó el efecto de M89 sobre la translocación nuclear de NFκB con anticuerpos anti-Rel A (p65) e inmunofluorescencia. Como se observa en la Fig. 9, M89 indujo luego de 5 min. de estimulación inmunoreactividad nuclear moderada para p65, la cual aumentó luego de 15 min. y se mantuvo hasta los 120 min. de estimulación. Un efecto similar fue observado cuando las células fueron estimuladas con hCD40L.

4.5 INMUNOREACTIVIDAD PARA (PRO)FILAGRINA EN QUERATINOCITOS ESTIMULADOS CON DIFERENTES AGONISTAS SOLUBLES CD40

Considerando que CD40 ha sido involucrado en la diferenciación del queratinocito, se estudió con inmunocitoquímica en queratinocitos estimulados con diferentes agonistas de CD40 la expresión de (pro)filagrina un marcador de la diferenciación terminal del queratinocito. Los resultados obtenidos mostraron que los agonistas solubles de CD40 estimulan en forma diferenciada y de manera dosis-dependiente la expresión de (pro)filagrina. Mientras que los anticuerpos anti-CD40, EA-5 y M89 revelaron un potente efecto inductor de (pro)filagrina, especialmente con concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (33 y 60 ηM respectivamente), hCD40 y G28.5 mostraron una menor capacidad de inducción. (Fig. 10).

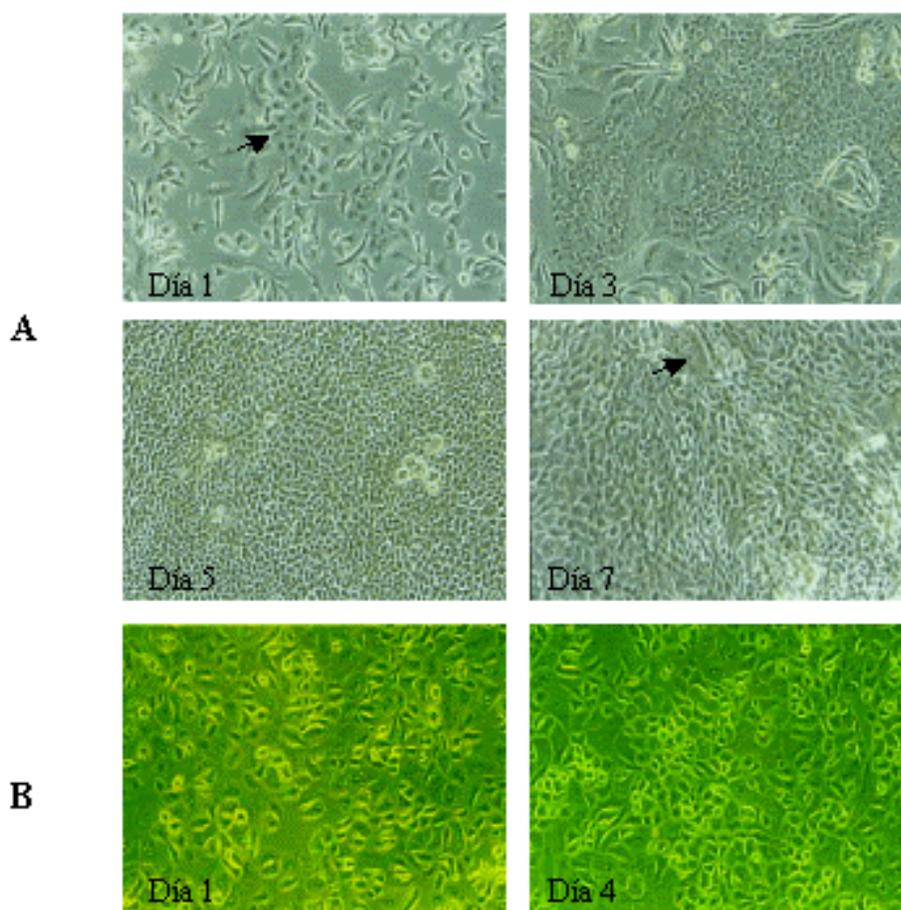


Fig. 1 Cultivo de queratinocitos humanos aislados de biopsias de piel. En A) queratinocitos cultivados en medio DMEM-F12. Se puede observar al día 1 algunos islotes de queratinocitos (flecha) creciendo entre fibroblastos. Al día 3, hay un aumento en el tamaño de los islotes. Se pueden identificar además, fibroblastos en vías de desprendimiento. Al día 5, cultivo de queratinocitos en confluencia. Las células presentan el típico aspecto de “camino empedrado” revelando una activa proliferación. A los 7 días de cultivo se aprecia que algunas células comienzan a diferenciarse adquiriendo forma hexagonal, aplanada y gran tamaño (flecha). En B) cultivo de queratinocitos en medio DK-SFM, sin suero fetal de bovino y baja concentración de calcio. Las células crecen redondeadas y con escasos contactos intercelulares. Al día 4, aunque se observa un discreto aumento en el número de células con respecto al día 1, no existen diferencias fundamentales en el aspecto de las células y en el crecimiento de éstas. X180.

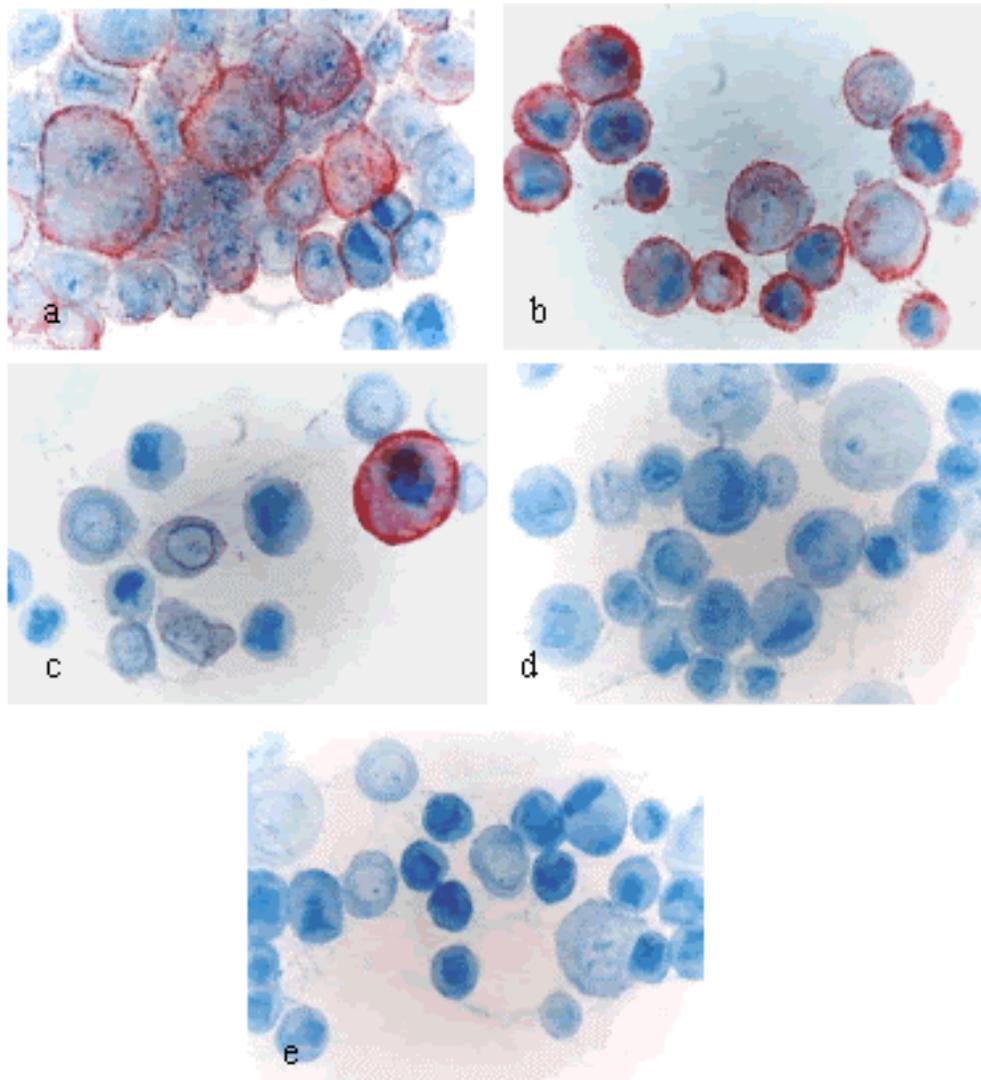


Fig. 2 Los queratinocitos cultivados en medio con bajo contenido de Ca^{+2} presentan características inmunofenotípicas compatibles con queratinocitos basales. Alícuotas de queratinocitos en suspensión fueron colocadas sobre portaobjetos cubiertos con una película de poli-L-lisina al 0.01% y se dejaron secar por 1 h. a temperatura ambiente. Luego de bloquear por 20 min. con PBS 0.5% BSA se efectuó inmunohistoquímica para diferentes marcadores celulares utilizando la técnica de la biotina-streptavidina-peroxidasa. El inmunorevelado se efectuó con AEC. Se observa que los queratinocitos son inmunoreactivos para CD40 (a); CD29 (b); poseen escasa reactividad para involucrina (c), y son e-cadherina⁽⁻⁾ (d). Los controles incubados con IgG1 de especificidad no relacionada fueron negativos (e). X500.

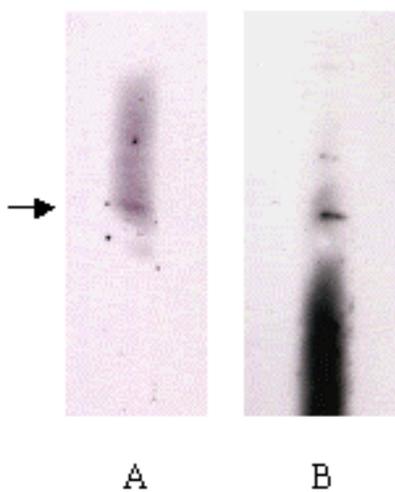


Fig. 3 Expresión de CD40 en queratinocitos humanos determinada mediante western blotting

Extractos proteicos de células epidérmicas totales (A) y queratinocitos cultivados en medio DK-SFM (B) separados en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. CD40 fue detectado utilizando el anticuerpo M89 y revelado mediante quimioluminiscencia. El polipéptido revelado presentó una masa molecular de 50kDa (flecha).

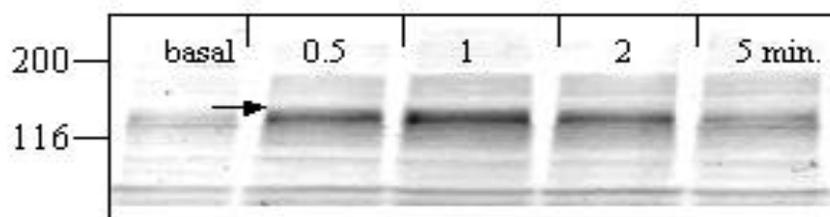


Fig. 4 El anticuerpo anti-CD40 M89 induce la fosforilación tirosina-dependiente de polipéptidos en queratinocitos humanos. Extractos de queratinocitos estimulados por diferentes periodos de tiempo con M89 60 nM fueron separados en gradientes de SDS-PAGE al 5-15% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina biotinilados y complejo streptavidina-fosfatasa alcalina. El revelado se efectuó con BCIP/NBT. Se puede observar que la banda resuelta es detectable después de 30 segundos de estimulación con el anticuerpo M89. Los números a la izquierda representan los estándares de masa molecular (kDa). La flecha muestra polipéptidos de una masa molecular de 132 kDa.

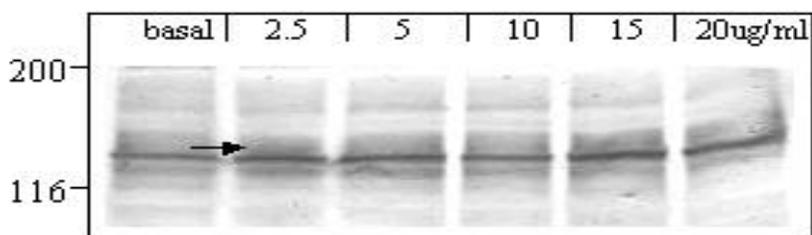


Fig. 5 La fosforilación de polipéptidos inducida por M89 es ligeramente dependiente de la concentración de anticuerpo. Extractos de queratinocitos estimulados durante 1 min. con diferentes concentraciones de M89 y procesados como en la Fig. 4. El basal corresponde a un control sin estímulo. Los números a la izquierda representan los estándares de masa molecular (kDa). La flecha representa la masa molecular de 132kDa de la banda resuelta.

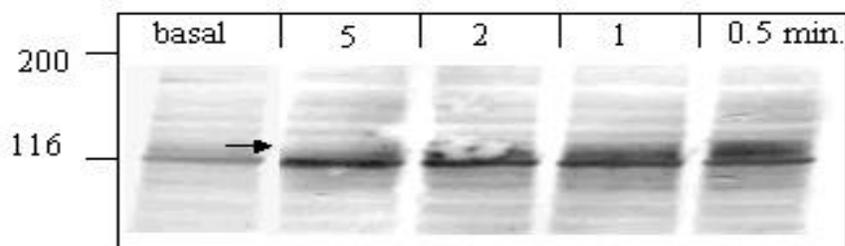


Fig. 6 El trímero recombinante hCD40L induce la fosforilación tirosina-dependiente de polipéptidos en queratinocitos humanos. Extractos de queratinocitos estimulados por diferentes periodos de tiempo con hCD40L 100 nM y procesados como en la figura 4. Los números a la izquierda representan los estándares de masa molecular (kDa). La flecha representa la masa molecular de 132 kDa de la banda resuelta. Se puede observar que la mayor intensidad de reacción para fosfotirosinas se produce luego de 30 segundos de estimulación.

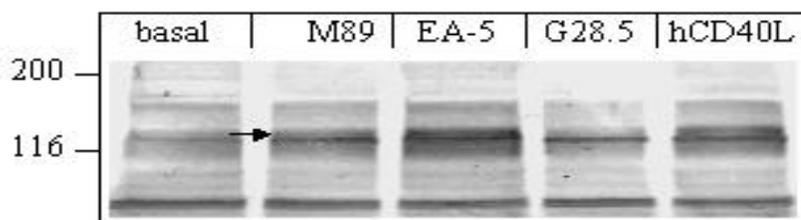


Fig. 7 Distintos agonistas solubles de CD40 estimulan de manera diferenciada la fosforilación de polipéptidos en queratinocitos humanos. Extractos de queratinocitos estimulados durante 1 min. con diferentes agonistas de CD40 y procesados como en la Fig. 4. A la izquierda están representados los estándares de masa molecular (kDa). La flecha muestra la banda resuelta de masa molecular de 132 kDa.

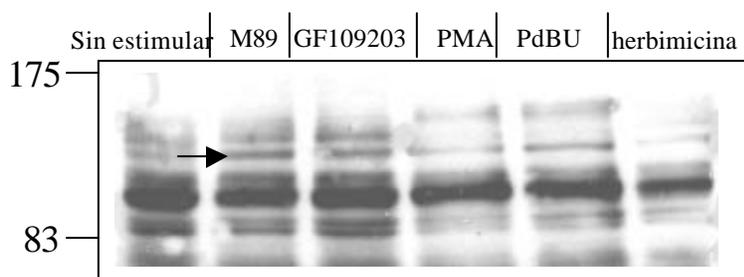


Fig. 8 La fosforilación de polipéptidos producto de la estimulación de CD40 en queratinocitos humanos es sensible a herbimicina y PMA. Queratinocitos cultivados en medio DK-SFM a subconfluencia fueron incubados en medio base con: GF 109203x por 30 min , PMA , PdBU y herbimicina por 18 hrs. Luego se estimularon durante 1 min. con M89 100 nM y posteriormente, los extractos fueron separados en gradientes de SDS-PAGE del 5-15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. La fosforilación de polipéptidos fue detectada utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina y revelada mediante quimioluminiscencia. A la izquierda se representan estándares de masa molecular (kDa). La flecha muestra la banda resuelta de masa molecular de 132 kDa. Observe que la inmunoreactividad para fosfotirosina inducida por M89 no es inhibida por el inhibidor de PKC, GF109203x ni por el inhibidor de tirosinas kinasas, PdBU. En cambio, es sensible a los inhibidores de tirosinas kinasas, PMA y herbimicina.

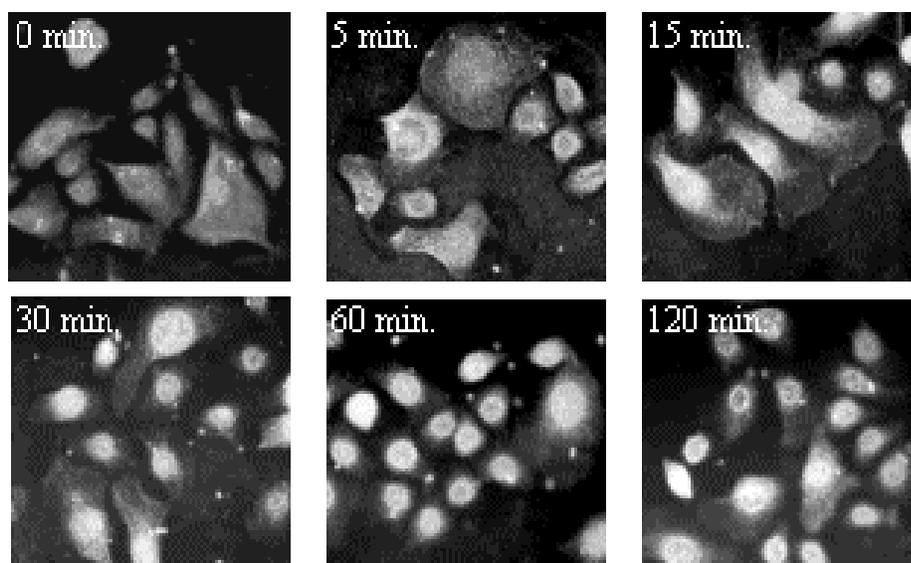


Fig. 9 La estimulación de CD40 induce la translocación nuclear de NFκB en queratinocitos humanos. Queratinocitos en cultivo estimulados con M89 100 nM por diferentes periodos de tiempo, y revelados sucesivamente con anticuerpo policlonal NFκB p65 (A) y F(ab')₂ anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína. Los preparados fueron montados en una solución de moviol con p-fenilendiamina. Se puede observar el incremento, progresivo en el tiempo, de la inmunoreactividad nuclear para p65 luego de la estimulación con M89. X200.

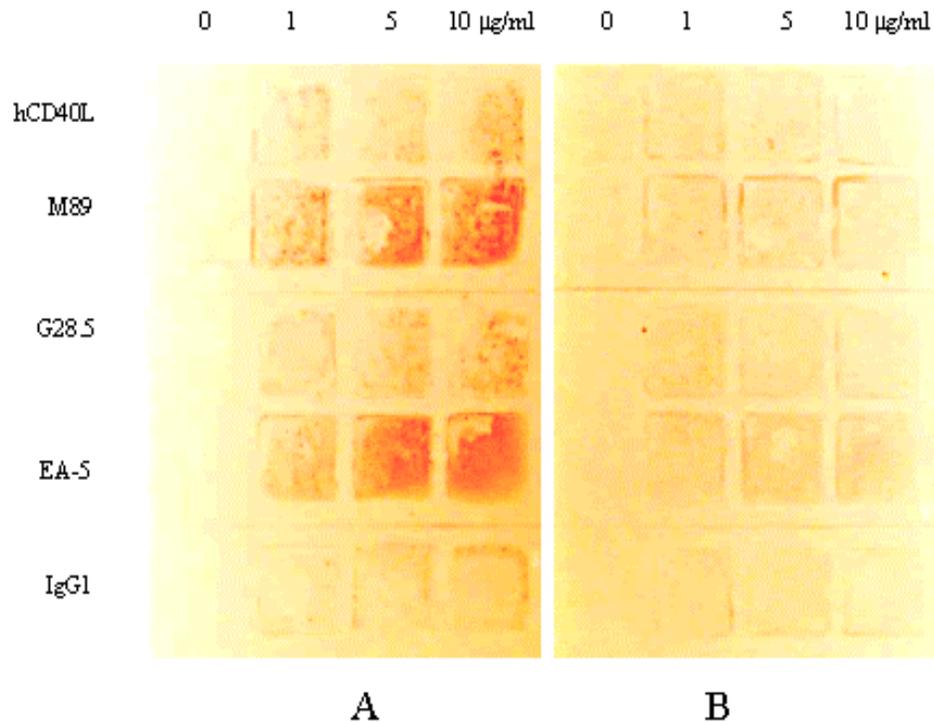


Fig. 10 Diferentes agonistas solubles de CD40 inducen en los queratinocitos inmunoreactividad para (pro)filagrina. Queratinocitos subconfluentes en medio DK-SFM fueron cultivados durante 48 horas en cámaras de cultivo tipo porta-objeto con diferentes agonistas solubles de CD40 e IgG₁ en las concentraciones indicadas (columna a la izquierda). Luego, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal BTI anti-profilagrina y reveladas utilizando el método de la biotina-streptavidina-peroxidasa y el cromógeno AEC (color rojo). Las placas de cultivo fueron fotografiadas a “ojo desnudo”. En A, inmunoreactividad para (pro)filagrina . B, duplicado en que el anticuerpo anti-profilagrina ha sido reemplazado por IgG₁ control.

5. DISCUSION

La diferenciación de los queratinocitos de la epidermis humana, así como la de otros vertebrados superiores, está regulada por una variedad de estímulos externos y señales intracelulares que interactúan mediante complejos mecanismos. Aunque en su comprensión ha habido un enorme avance, muchas de esas señales y sus efectos, continúan siendo poco conocidos. En esta tesis se estudió en particular la participación que tiene la molécula de membrana CD40 en la diferenciación del queratinocito. Es así como analizamos la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina secundaria a la activación de CD40 mediante agonistas específicos y la producción de (pro)filagrina, un marcador de la diferenciación epidérmica.

Nuestro primer objetivo fue obtener poblaciones de queratinocitos homogéneas, libres de células de Langerhans y melanocitos, en cantidad suficiente para los ensayos posteriores. Para ello se prepararon cultivos primarios de queratinocitos humanos según el método de Rheinwald y Green (1975). Estos autores han demostrado que los queratinocitos aislados de epidermis humana y murina pueden ser cultivados selectivamente sobre fibroblastos 3T3 irradiados. En estas condiciones las células maduran hasta formar un epitelio escamoso diferenciado que conserva el aspecto morfológico de la epidermis *in situ*. En nuestro estudio, los queratinocitos fueron aislados de biopsias de piel de pacientes sujetos a cirugía plástica reparadora y co-cultivados con fibroblastos 3T3 que previamente habían recibido una dosis letal de rayos γ . Como medio de cultivo se utilizó DMEM-F12 que contenía 1.2 mM Ca^{2+} , factores de crecimiento y SFB. Se ha demostrado que los medios de cultivos selectivos que usan SFB y altas concentraciones de calcio (1-2 mM) permiten la proliferación de los queratinocitos, la formación de desmosomas y la estratificación celular (Terskikh y Vasiliev, 1999). Bajo estas condiciones, los queratinocitos pudieron ser propagados durante varias generaciones y criopreservados en nitrógeno líquido, sin afectar posteriormente su viabilidad y capacidad de crecimiento (Fig 1A). A continuación, los ensayos de fosforilación de proteínas dependientes de agonistas de CD40, fueron realizados utilizando el cultivo secundario de los queratinocitos en medio definido DK-SFM, el cual no emplea SFB y posee bajos niveles de calcio (0.07 mM). En estas condiciones los queratinocitos crecieron en monocapa, no se estratificaron durante el período del ensayo y presentaron escasas

uniones intercelulares (Fig 1B). De acuerdo a sus características inmunofenotípicas correspondieron a células CD40⁽⁺⁾, CD29⁽⁺⁾, involucrina⁽⁻⁾ y E-cadherina⁽⁻⁾ (Fig 2). Según estas características fueron consideradas equivalentes a células basales. Resultados previos revelan que las células epidérmicas cultivadas en medios de cultivo con bajo contenido de calcio y sin SFB responden eficientemente a agonistas de CD40 produciendo IL-6 (Gaspari y col, 1996), ICAM-1 y la molécula anti-apoptótica Bcl-x (Denfeld y col, 1996). Por lo demás, Péguet-Navarro y col (1997) demostraron que la expresión de CD40 se produce principalmente en los estratos basal y parabasal de la epidermis *in situ*.

Los resultados obtenidos mediante electroforesis en poliacrilamida y western blotting con el anticuerpo monoclonal anti-CD40 M89 revelaron, especialmente en lisados de queratinocitos en cultivo y en menor grado en células epidérmicas totales, una proteína de masa molecular de aproximadamente 50 kDa (Fig.3). De acuerdo a estos resultados dicha banda podría corresponder a la molécula CD40. Sin embargo, se ha demostrado que en condiciones no reductoras los anticuerpos anti-CD40 inmunoprecipitan dos proteínas de 43 y 47 kDa respectivamente en lisados de células B y keratinocitos (Péguet-Navarro y col, 1997). Las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por estos autores podrían deberse a las diferentes técnicas utilizadas para poner en evidencia CD40. Por otra parte, nuestras observaciones concuerdan con observaciones previas que indican que los queratinocitos al igual que otras células epiteliales (Zong y col, 1991; Young y col, 1989) expresan bajos niveles de superficie de CD40 comparado con células B de diferente linaje (Gaspari y col, 1996).

La estimulación de cultivos subconfluentes de queratinocitos humanos con el anticuerpo M89 indujo la rápida fosforilación tirosina-dependiente de polipéptidos de una masa molecular de aproximadamente 132 kDa (Fig 4). En efecto, la cinética de fosforilación reveló que ya a los 30 segundos de estimulación ocurría la generación de polipéptidos fosforilados, la cual alcanzó su grado máximo luego de un minuto de estimulación con el anticuerpo M89 para declinar progresivamente con tiempos de estimulación más largos (Fig 4). Este resultado sugiere que en los queratinocitos existen no solo enzimas quinasas que fosforilan polipéptidos en residuos de tirosina, sino que también fosfatasas que remueven los grupos fosfatos, permitiendo la reversibilidad y regulación del mecanismo de fosforilación y, por lo tanto, la existencia de una forma dinámica de control sobre la fosforilación de proteínas. Nuestros resultados no

manifiestan claramente que la fosforilación de polipéptidos inducida por el anticuerpo M89 sea dependiente de la concentración del agonista (Fig 5), observándose un muy ligero aumento de intensidad de la banda resuelta al aumentar la concentración de éste.

En la literatura sólo existe un estudio previo que demuestra la fosforilación de proteínas en queratinocitos humanos como consecuencia de la estimulación de CD40 (Gaspari y col, 1996). En dicho trabajo los autores comprobaron mediante western blotting que la estimulación de queratinocitos con el anticuerpo G28.5 inducía la rápida fosforilación de proteínas tirosina-dependiente de una aparente masa de 50 kDa. Coincidentemente, los autores comprobaron que la estimulación con G28.5 también estimulaba la secreción dosis-dependiente de IL-6, una citoquina que ha sido relacionada con la proliferación de los queratinocitos (Neuner y col, 1991). Sin embargo, nuestros resultados consistentemente demostraron que no sólo el anticuerpo M89 sino también EA-5 y el trímero recombinante hCD40L fueron capaces de inducir de manera diferenciada la fosforilación de polipéptidos de 132 kDa (Fig 7). De todos los agonistas solubles empleados G28.5 fue el menos eficiente. Péguet- Navarro y col (1997) y más recientemente Grousson y col (2000) han encontrado evidencias que la activación de CD40 inhibe la incorporación de (³H)-timidina en queratinocitos y detiene su progresión en el ciclo celular. Este resultado sugiere que la activación dependiente de CD40 no estaría asociada a proliferación celular. La activación de CD40 en linfocitos B con anticuerpos monoclonales induce la fosforilación de polipéptidos tirosina-dependiente, aumento de inositol 1,4,5-trifosfato, y la activación de diferentes proteínas quinasas serina/treonina específicas (Uckun y col, 1991). La inducción de estas moléculas secundaria a la activación de CD40 no es conocida en el queratinocito.

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la fosforilación de polipéptidos con el trímero recombinante CD40L mostró que éste último induce en queratinocitos humanos una banda de 132 kDa. similar a la observada con otros agonistas (Fig. 6). Sin embargo, dicho efecto ocurrió de manera aún más rápida que con el anticuerpo M89. El máximo de inmunorreactividad para fosfotirosinas se observó luego de 30 segundos de estimulación y fue detectada al menos hasta 5 minutos después de efectuada la estimulación. Desde un punto de vista teórico, se puede considerar que la unión ligando-receptor es obligatoria para inducir señales intracelulares; sin embargo, el grado de conjugación ligando-receptor podría ser esencial para establecer la

magnitud de dicha respuesta. El trímero recombinante utilizado corresponde a una proteína sintética trimérica que a diferencia de los anticuerpos posee tres sitios de unión a CD40 (Peitsh y col, 1993; Mazzei y col, 1995). Aunque cada monómero del trímero se asemeja molecularmente al agonista fisiológico identificado en los linfocitos T, se estima que su potente efecto activador de la habilidad inmunoestimuladora en otros sistemas celulares que expresan CD40 (Kuniyoshi y col, 1999) se debe a su forma trimérica. De hecho, la magnitud de la respuesta fue dependiente del agonista utilizado, siendo el anticuerpo EA-5 y el trímero recombinante CD40L los más efectivos inductores de la inmunoreactividad para fosfotirosina. También podrían influir en la eficiencia de las señales intracelulares generadas por la unión de los agonistas a CD40 los epítopes reconocidos por los diferentes anticuerpos utilizados. Dependiendo de la localización estérica de los epítopes en la molécula de CD40 y la asociación de esta última a otras moléculas, la accesibilidad de los epítopes podría variar. De este modo, algunos anticuerpos se podrían unir más eficientemente a CD40 e inducir una respuesta más productiva que otros anticuerpos.

En el presente trabajo pudimos observar que la estimulación de CD40 con el anticuerpo M89 también induce en los queratinocitos translocación nuclear de marca inmunofluorescente para la proteína p65 fosforilada, la cual pudo ser detectada aún después de 120 min. de estimulación con el anticuerpo M89 (Fig 9). Es conocido que el factor de transcripción NF- κ B es un complejo proteico constituido por una subunidad de 65 kDa (o Rel A) que se une al DNA y que está asociada a una proteína de 50 kDa (Urban y col, 1991). En la actualidad se reconocen además las proteínas c-Rel p75 y Rel B p68, que están funcionalmente relacionadas con p65, una segunda proteína asociada a p50 y la existencia de precursores proteicos del complejo (Hansen y col, 1994; Weih y col, 1996). Como consecuencia de la fosforilación de I κ B -inhibidor citoplasmáticos de NF- κ B- el complejo de proteínas NF- κ B es activado y traslocado al núcleo donde participa en la entrada de la célula al ciclo celular, procesos de diferenciación, inmunidad innata, inflamación, rescate de apoptosis, etc (DiDonato y col, 1997; Chen y col, 2001). Una interpretación de los resultados obtenidos sugiere que la fosforilación de proteínas generada por la estimulación de CD40 podría estar relacionada con la transmisión de señales al núcleo que, secundariamente, activarían procesos específicos a nivel del DNA.

La fosforilación de polipéptidos inducida por el anticuerpo M89 en queratinocitos humanos no fue bloqueada por el inhibidor específico de proteína kinasa C (PKC) GF109203x pero sí por phorbol 12-miristato 13 acetato (PMA) y herbimicina A. (Fig 8) PKC posee actividad anti-proliferativa en los queratinocitos que puede ser superada mediante su inhibición específica con GF109203x (Mitev y Miteva, 1999). Por esta razón diversos autores consideran que PKC facilita la diferenciación. Por otra parte, PMA corresponde a un activador específico de PKC que guarda similitud molecular con uno de sus activadores y ligandos naturales, diacilglicerol. Su uso en concentraciones superiores a 100 nM por tiempos prolongados inhibe proteínas kinasas debido a agotamiento por sobre-estimulación. Por esta razón nosotros lo utilizamos por un período de 18 h. para producir inhibición de fosfotirosinas kinasas. Herbimicina A podría modificar grupos thiol esenciales de tirosinas quinasas mediante un grupo benzoquinona (Akiyama y col, 1987). Más importante aún, Mahon y O'Neill (1995) han encontrado evidencias que la activación de NF- κ B es sensible a herbimicina, la que modificaría la interacción entre p50 y el DNA. En conjunto estas evidencias permiten postular que la estimulación de CD40 con agonistas específicos induce la fosforilación de proteínas de 132 kDa, proteínas kinasas-dependiente. Aunque nuestros resultados no permiten saber si el bloqueo producido por PMA afecta subclases específicas de PKC, el resultado obtenido con GF109203x sugiere que en los queratinocitos PKC no estaría involucrada en la fosforilaciones mediadas por CD40. Asimismo, se debe considerar que la inhibición de la fosforilación producida por herbimicina A podría afectar directamente la activación del complejo NF- κ B.

En los ensayos efectuados en queratinocitos cultivados por períodos de 2 días con diferentes agonistas solubles de CD40 observamos que éstos, pero no IgG1 control, indujeron de manera diferencial y dosis-dependiente inmunoreactividad para (pro)filagrina (Fig 10). Este resultado sugiere que CD40 participa en la inducción de la diferenciación celular. Filagrina es una proteína cuyo precursor es sintetizado en el estrato granuloso de la epidermis y almacenado en gránulos citoplasmáticos (Fleckman y col, 1985). En su forma madura, filagrina se encuentra libre en el citoplasma de los queratinocitos del estrato córneo donde interacciona con los filamentos de keratina estabilizándolos, al mismo tiempo que forma un pool de amino ácidos y péptidos de diferentes tamaños hidrófilos que permiten mantener húmedos los estratos más

externos de la epidermis (Smith y col, 1986). Debido a estas características se la reconoce como un marcador de la diferenciación terminal del queratinocito (Asselineau y col, 1990).

En conjunto, nuestros resultados sugieren por primera vez que la unión de agonistas solubles a CD40 induce en queratinocitos humanos la fosforilación tirosina-dependiente de proteínas de una masa molecular de aproximadamente 132 kDa, la translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B y la producción de (pro)filagrina. Un tema pendiente es conocer si la probable acción reguladora que CD40 ejerce sobre la diferenciación de los queratinocitos es parte de la fisiología normal de la epidermis o está asociada a fenómenos reparativos. El único ligando conocido de CD40 es la proteína gp39 (CD40L) expresada en el linfocito T. Aunque la interacción entre queratinocitos y linfocitos T vía las moléculas co-estimuladoras CD40/CD40L ha sido mencionada en diversos cuadros patológicos que afectan a la piel humana, el linfocito T es una célula infrecuente en la epidermis normal. Los resultados aquí mostrados insinúan que CD40 participa activamente en la diferenciación de la epidermis normal.

6. BIBLIOGRAFIA

Armitage RJ, Sato TA, Macduff BM, Clifford KN, Alpert AR, Smith CA, Fanslow WC. (1992). Identification of a source of biologically active CD40 ligand. *Eur J Immunol* 22: 2071-2076.

Asselineau D, Dale BA, Bernard BA. (1990). Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid. *Differentiation* 45: 221-229.

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262: 5592-5595.

Caux C, Massacrier C, Vanverliten B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180: 1263-1272.

Chen F, Castranova C, Shi X. (2001). New Insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am. J Pathol* 159: 387-397.

Denfeld RW, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, Weiss JM, von Leoprechting A, Mai B, Voith U, Schöpf E, Aruffo E, Simon JC. (1996). CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur J Immunol* 26: 2329-2334.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388: 548-554.

Filvaroff E, Calautti E, Reiss M, Dotto GP. (1994). Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J Biol. Chem* 269: 21735-21740.

Fleckman P, Dale BA, Holbrook KA. (1985). Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 85: 507-512.

Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish J, Phipps RP. (1996). Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 co-stimulate T Lymphocytes proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 26: 1371-1377.

Grousson J, EFrench M, Concha M, Schmitt D, Peguet-Navarro J. (2000). CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 114: 581-586.

Hansen SK, Baeuerle PA, Blasi F. (1994). Purification, reconstitution, and I kappa B association of the c-Rel-p65 (Rel A) complex, a strong activator of transcription. *Mol Cell Biol* 14: 2593-2603.

Kazanietz MG, Blumberg PM. (1996). Protein kinase C and signal transduction in normal and neoplastic cells. En Sirica AE. (ed) *Cellular and Molecular Pathogenesis*: 389-402. Lippincott-Raven, New York.

Kuniyoshi JS, Kuniyoshi CJ, Lim AM, Wang FY, Bade ER, Lau R, Thomas EK; Weber JS. (1999). Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40L and augment the stimulation of antigen-specific cytolytic T cell. *Cell Immunol* 193: 46-58.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Mahon TM, O'Neill LA. (1995). Studies into the effect of the tyrosine kinase inhibitor herbimycin A on NF-kappa B activation in T Lymphocytes. Evidence for covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 270: 28557-28564.

Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S. (1995). Recombinant Soluble trimeric CD40 ligand is Biologically active *J Biol Chem* 270: 7025-7028.

Medema JP, de Vries-Smits AM, Bos JL. (1995). Calcium induces tyrosine phosphorylation of a novel p120GAP-associated protein of 65 kDa. *Oncogene* 11: 757-762.

Mitev V, Miteva L. (1999). Signal transduction in keratinocytes. *Exp Dermatol* 8: 96-108.

Neuner P, Urbanski A, Trutinger F, Moller A, Kirnbauer R, Kapp A, Schopl E, Schwarz T, Luger TA. (1991). Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 97: 27-33.

Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. (1992). CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 13: 431-433

Péguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Moulon C, Berthier O, Réano A, Gaucherand M, Bancherau J, Rousset F, Schmitt D. (1997). CD40 Ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J Immunol* 158: 144-152.

Peitsch MC, Jongeneel CV. (1993). A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factor. *Int Immunol* 5: 233-238.

Rheinwald JG, Green H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-343.

Schwartz DW. (1994). Cellular communication through signal transduction: The background. *J Cardiovasc* 8: 118-136

Smith SA, Dale BA. (1986). Immunologic Localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinization. *J Invest Dermatol* 86: 168-172.

Stout RD, Suttles J. (1996). The many role of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 17: 487-492.

Terskilkh VV, Vasilev AV. (1999). Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int Rev Cytol* 188: 41-72.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

Uckun FM, Schieven GL, Dibirdik I, Chandan-Langlie M, Tuel-Ahlgren L, Ledbetter JA. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositides turnover, and multiple previously unidentified serine/threonine-specific protein kinases by the Pan-B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem* 266: 17478-17485.

Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. (1991). NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J* 10: 1817-1825.

van Kooten C, Banchereau J. (1997). Function of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *J Immunol* 9: 330-337.

Walton KM, Dixon JE. (1993). Protein tyrosine phosphatases. *Ann Rev Biochem* 62: 102-120.

Weih F, Lira SA, Bravo R. (1996). Overexpression of RelB in transgenic mice does not affect I kappa B alpha levels: differential regulation of RelA and RelB by the inhibitor protein. *Oncogene* 12: 445-449.

Young LS, Dawson CW, Brown KW, Rickinson AB, (1989). Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *Int J Cancer* 43: 786-794.

Zong YS, Lin H, Choy DT, Sham JS, Wei W, Chan KH, Ng MH. (1991). Nasopharyngeal carcinoma and lymphoinfiltration. *Oncology* 48: 290-296.