

---

## ***4.RESULTATS***



***4.1. CARACTERITZACIÓ IN VITRO DE LA INHIBICIÓ DE  
L'EXPRESSIÓ DE CD40 MITJANÇANT RNAi. EFECTES  
FUNCIONALS EN CÈL·LULES ENDOTELIALS***



### 4.1.1. Anàlisi de l'expressió de CD40 humà per qRT-PCR

Inicialment, es va analitzar l'expressió endògena de CD40 a nivell de mRNA en diferents tipus cel·lulars humans mitjançant la tècnica de qRT-PCR.

Tal i com es mostra a la Taula 15, es va detectar expressió de CD40 en totes les línies cel·lulars analitzades: la línia cel·lular ECV-304, el cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC, les cèl·lules epitelials HEK-293, KB3-1 i 6CFSME, i diferents línies de cèl·lules hematopoiètiques com limfòcits B, cèl·lules Raji i cèl·lules Jurkat. Tots aquests tipus cel·lulars expressen CD40 de manera basal, essent les cèl·lules Raji, una línia de limfòcits B, la que presenta un major nivell d'expressió de CD40.

		CD40	CD40L
Línies cel·lulars humanes	ECV-304 (cèls. de carcinoma de bufeta)	+	-
	HUVEC (cèls. endotelials de vena de cordó umbilical)	+	-
	HEK-293 (cèls.epitelials de ronyó)	+	-
	KB3.1 (cèls. de carcinoma epitelial)	+	-
	Limfòcits B transformats amb EBV	+	-
	6CFSME (cèls.epiteli submucosa de pulmó)	+	-
	Raji (limfoma de Burkitt)	+	-
	Jurkat (leucèmia limfòcits T)	+	-/+
	Jutkat +PMA+ionomicina	+	+

Taula 15. Expressió del mRNA de CD40 i CD40L en diferents línies cel·lulars humanes.

### 4.1.2. Disseny i síntesi de siRNAs anti-CD40 humà

Es van dissenyar un total de 8 siRNAs dirigits contra CD40 humà. Aquests siRNAs es van dissenyar al llarg de la seqüència codificant del cDNA de CD40 (GenBank Acc.Nº NM\_001250), seguint les recomanacions descrites en l'apartat de materials i mètodes. Es van evitar les regions 5' i 3' UTR i la regió propera al codó d'iniciació ATG, ja que solen ser regions riques en llocs d'unió a proteïnes reguladores, entre elles el complex d'iniciació de la traducció, que podrien interferir en la posterior unió del complex RISC que desencadena el mecanisme de RNAi i causa la degradació del mRNA diana.

Per als experiments inicials de cribatge dels diferents siRNAs dissenyats anti-CD40 es va fer servir un siRNA-control *scrambled* no específic (siRNA-C). Els 8 siRNAs dúplex dirigits contra CD40 humà i el corresponent siRNA-control no específic, van ser sintetitzats per transcripció *in vitro* fent servir la T7 RNA polimerasa i el sistema *Silencer Construction kit* d'Ambion, seguint les instruccions descrites pel fabricant.

A la Figura 31 es mostra la distribució d'aquests 8 siRNAs al llarg de la seqüència del cDNA de CD40 humà.

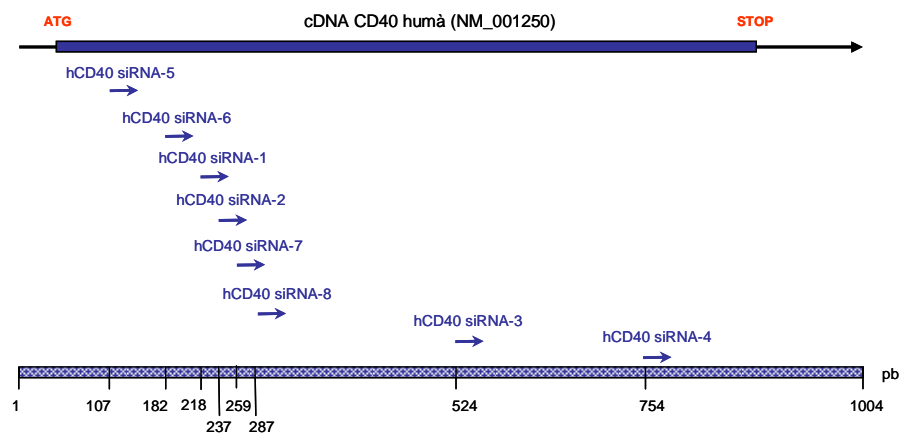


Figura 31. Representació gràfica de la distribució dels diferents siRNAs dissenyats al llarg de la seqüència de cDNA de CD40 humà.

El mecanisme de RNAi és altament específic i es requereix una total complementaritat entre la seqüència diana i la seqüència del siRNA, sent un factor determinant de l'eficàcia inhibidora d'aquestes molècules. Per aquest motiu, un cop seleccionades les regions del mRNA de CD40 sobre les quals s'actuarà, es van amplificar aquestes regions per RT-PCR en les diferents línies cel·lulars analitzades i es va recomprovar la seva seqüència per descartar possibles diferències respecte a la seqüència publicada a la base de dades.

A la Taula 16 es mostra la seqüència dels siRNAs anti-CD40 humà dissenyats i els dos siRNAs utilitzats com a control.

siRNA	mRNA CD40	Seqüència
CD40 siRNA-1	173-193	5'-UGCCUUCUUGCGGUGAAAUU-3' 3'-UUACGGAAGGAACGCCACUUU-5'
CD40 siRNA-2	192-212	5'-GCGAAUCCUAGACACCUGUU-3' 3'-UUCGCUUAAGGAUCUGUGGAC-5'
CD40 siRNA-3	479-499	5'-UGUCACCCUUGGACAAGCUUU-3' 3'-UUACAGUGGGAACCGUUCGU-5'
CD40 siRNA-4	709-729	5'-UUUUCGACGAUCUCCUUU-3' 3'-UUAAAAGGGCUGCUAGAAGGA-5'
CD40 siRNA-5	62-82	5'-CCACCCACUGCAUGCAGAGUU-3' 3'-UUGGUGGGUGACGUACGUCUC-5'
CD40 siRNA-6	137-157	5'-CUGGUGAGUGACUGCACAGUU-3' 3'-UUGACCACUCACUGACGUGUC-5'
CD40 siRNA-7	214-234	5'-CAGAGAGACACACUGCCACUU-3' 3'-UUGUCUCUCUGUGACGGUG-5'
CD40 siRNA-8	242-262	5'-UACUGCGACCCCAACCUAGUU-3' 3'-UUUAGACGCGGGGUUGGAUC-5'
<i>mismatch</i> siRNA control	192-212	5'-GCGAAUUCG <u>AUCU</u> CACCUGUU-3'; 3'-UUCGCUUAAG <u>CUAG</u> AUGGAC-5'
<i>scrambled</i> siRNA control		5'-ACUACAAGACUCGUGACCAUU-3'; 3'-UUUGAUGUUCUGAGCACUGGU-5'

Taula 16. Seqüència dels 8 siRNAs anti-CD40 dissenyats i els dos siRNAs utilitzats com a control i la seva localització dins la regió codificant del mRNA de CD40 humà (respecte al codó ATG).

### 4.1.3. Optimització del sistema de transfecció in vitro en ECV-304

Per tal de seleccionar el tipus cel·lular on realitzar el cribatge dels diferents siRNAs dissenyats contra CD40, calia trobar una línia cel·lular que expressés CD40 i fos fàcilment transfectable. La línia cel·lular amb expressió màxima de CD40 eren les Raji, un cultiu de limfòcits B que creix en suspensió i resulta difícil de transfectar. Per aquest motiu, es van escollir les cèl·lules HEK-293 i ECV-304, amb menor expressió de CD40, i es va comparar l'eficiència de transfecció fent servir el lípid catiónic oligofectamina. La oligofectamina és un agent utilitzat principalment en la transfecció d'oligonucleòtids (ODNs), que ha estat emprat amb èxit en una gran varietat de tipus cel·lulars en cultiu, incloent NIH3T3, CHO, HEK-293, K562, HeLaS3 i HeLa, amb eficiències de transfecció d'entre el 90 i el 95%.

La captació de ODNs o siRNAs per part de la cèl·lula depèn de la seva longitud i composició química, no tant de la seva seqüència. És per això que es va utilitzar un ODN de 21 pb amb enllaços de tipus fosforotioat, per incrementar la seva estabilitat en front a la degradació per nucleases intracel·lulars.

L'eficiència de transfecció depèn del tipus cel·lular i de les condicions de cultiu, però també del nombre de passatges i de la confluència de les cèl·lules en el moment de la transfecció, sobretot per als ODNs, on l'eficiència de transfecció és molt més sensible a densitat cel·lular que en el cas del DNA plasmídic. És per això, que l'experiment es va realitzar en els dos tipus cel·lulars anteriors a confluències del 40 i 70%.

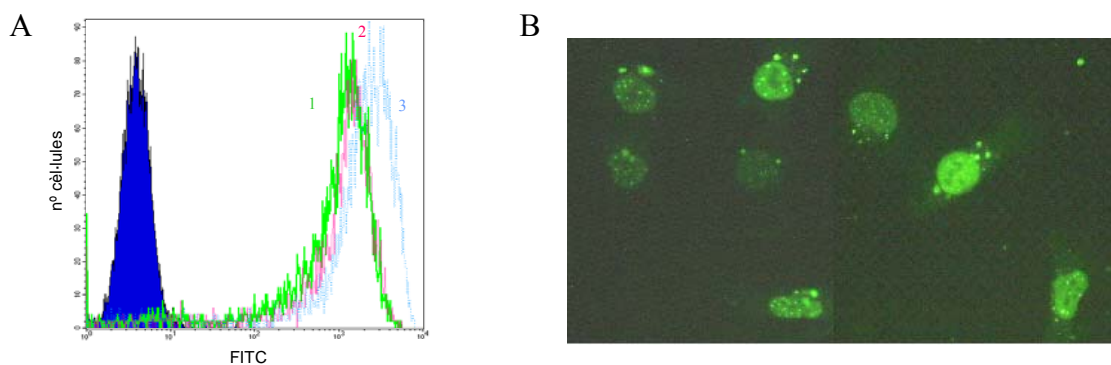


Figura 32. A). Anàlisi per citometria de flux de l'eficiència de transfecció de les cèl·lules ECV-304 amb 100nM de PS-ODN-FITC; 1, 2µl oligofectamina; 2, 3µl oligofectamina; 3, 4µl oligofectamina. L'histograma blau correspon a l'autofluorescència de cèl·lules no transfectades. B). Localització cel·lular dels complexos ODN-FITC-oligofectamina en cèl·lules ECV-304.

Es va fer servir un ODN fosforotioat (PS-ODN) marcat amb fluoresceïna (FITC) a dues concentracions diferents: 50nM i 100nM, i, fent servir aquest sistema de transfecció, es va mesurar el percentatge de cèl·lules que incorporaven la fluorescència mitjançant citometria de flux. Finalment es va seleccionar la línia cel·lular ECV-304 per ser la que presentava una

eficiència de transfecció més elevada. Aproximadament el 97-99% del total de cèl·lules eren transfectades i incorporaven la fluorescència. L'eficiència de transfecció utilitzant aquest lípid catiònic va ser similar fent servir diferents quantitats d'oligofectamina (Figura 32A). Tampoc no es van observar diferències en la incorporació del ODN degudes a densitat cel·lular.

Els complexos es localitzaven majoritàriament en el nucli de la cèl·lula transfectada, estant també presents al citoplasma encara que en menor quantitat (mesurat per microscopia de fluorescència) (Figura 32B).

### 4.1.4. Estimulació de l'expressió de CD40 per citoquines en ECV-304

Un cop seleccionada la línia cel·lular ECV-304 per als assaigs de cribatge dels diferents siRNAs anti-CD40 dissenyats, es va mesurar l'expressió del receptor CD40 en aquestes cèl·lules a nivell de proteïna. Es va observar que aquesta línia cel·lular presentava un nivell basal d'expressió de CD40 molt baix, sent pràcticament indetectable per Western blot. Per tal d'induir l'expressió de CD40 a nivell proteic en aquesta línia cel·lular, les cèl·lules es van fer créixer en presència de les citoquines proinflamatòries IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  a les concentracions de 1000U/ml i 100U/ml respectivament.

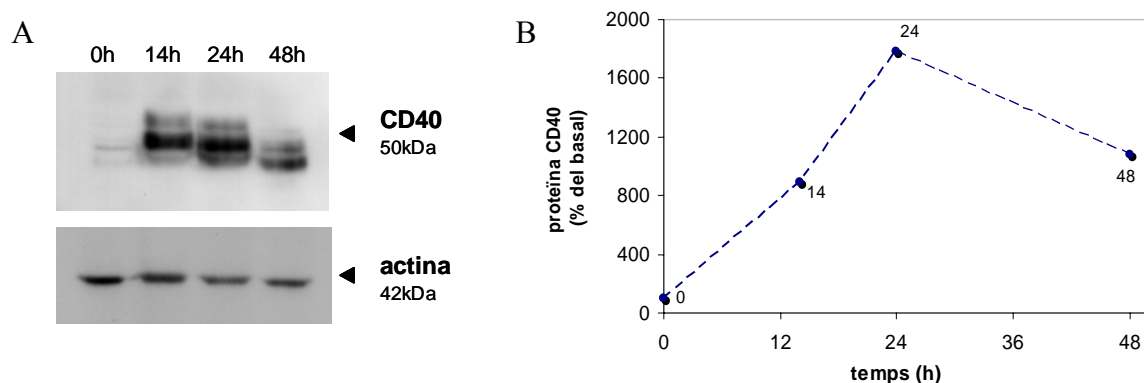


Figura 33. A). Anàlisi per Western blot de l'expressió de CD40 en cèl·lules ECV-304 estimulades amb IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  a diferents temps. B). Cinètica de la inducció de l'expressió de CD40 en cèl·lules ECV-304.

Es va quantificar l'expressió del receptor CD40 a diferents períodes de temps: 14, 24 i 48 hores, en les cèl·lules ECV-304 estimulades amb les citoquines proinflamatòries anteriors i es va mesurar la cinètica d'inducció de l'expressió d'aquesta proteïna. Com a gen *housekeeping* es va fer servir la  $\beta$ -actina. Tal i com es mostra a la Figura 33, en condicions proinflamatòries en les cèl·lules ECV-304 té lloc un increment en l'expressió basal de la proteïna CD40, assolint un màxim d'expressió a les 24 hores, que es veu disminuït 48 hores després de l'estimulació amb IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ .



#### 4.1.5. Eficàcia inhibidora de CD40 per siRNA en ECV-304

Per tal de determinar l'eficàcia inhibidora dels 8 siRNAs dissenyats contra CD40 humà, es van transfectar les cèl·lules ECV-304 amb cadascun d'aquests siRNAs utilitzant el lípid catiònic oligofectamina seguint el protocol descrit a l'apartat de materials i mètodes. Es va quantificar l'expressió de CD40 en aquestes cèl·lules tant a nivell de transcrit per qRT-PCR a temps real, com a nivell de proteïna per Western blot. En tots dos casos, es va comparar l'expressió de CD40 de cèl·lules que havien estat transfectades amb cadascun dels siRNAs anti-CD40 i les mateixes cèl·lules tractades amb un siRNA-control no específic.

Els nivells d'expressió del mRNA de CD40 es van calcular relatius al gen constitutivament expressat de la ciclofilina-A (ratio CD40/CypA).

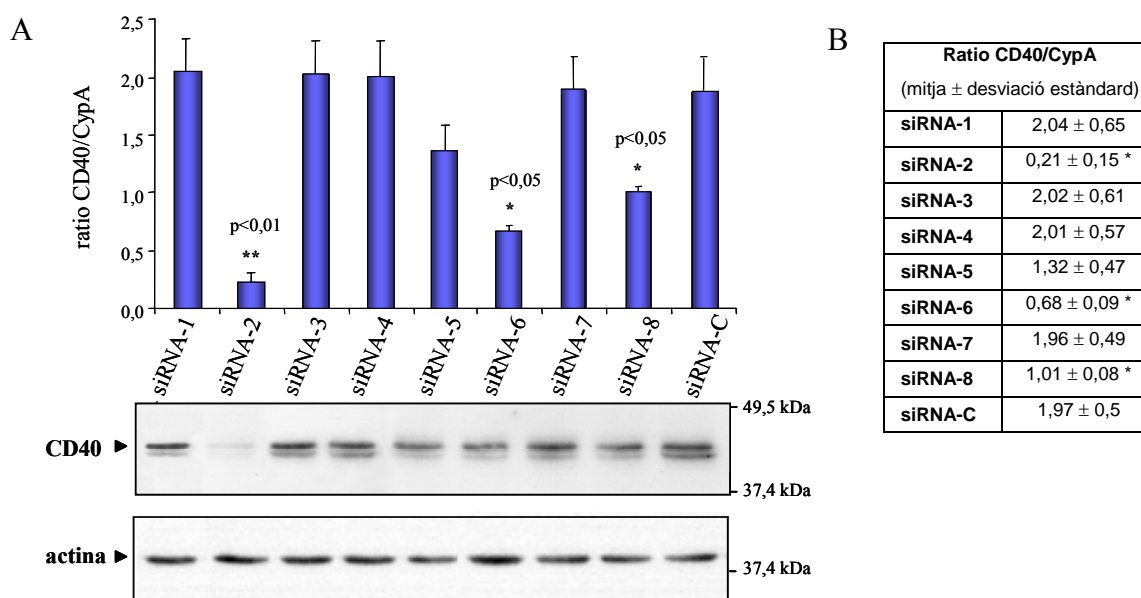


Figura 34. A). Anàlisi per qRT-PCR a temps real i western blot de l'expressió de CD40 en cèl·lules ECV-304 tractades amb els diferents siRNAs anti-CD40 dissenyats. B). Valors del ratio d'expressió relativa CD40/CypA. Els resultats es mostren com la mitja ± desviació estàndard (SD) de 3 experiments independents.

Segons els resultats, 3 dels 8 siRNAs dissenyats (siRNA-2, siRNA-6 i siRNA-8) causaven una inhibició significativa de l'expressió basal de CD40 a nivell de mRNA. El siRNA-2 era el siRNA més eficient causant una inhibició de l'expressió de CD40 d'aproximadament el 80-90% comparat amb el siRNA-control (Figura 34).

Per a mesurar els nivells d'expressió del receptor CD40 a nivell proteic, les cèl·lules ECV-304, un cop transfectades, eren estimulades amb les citokines proinflamatòries IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , tal i com s'ha descrit anteriorment. La quantificació a nivell proteic es va realitzar per densitometria mesurant l'expressió de CD40 relativa a l'expressió de la proteïna  $\beta$ -actina,

## Resultats

confirmant que el siRNA-2 era el siRNA més potent en la inhibició de l'expressió de CD40 en condicions no basals.

L'eficàcia inhibidora d'un siRNA depèn, entre altres factors, de la seva accessibilitat a unir-se al seu mRNA diana. En aquesta unió juga un paper molt important l'estructura secundària que adquireix el mRNA diana. Utilitzant un programa teòric de predicció d'estructura secundària de mRNA anomenat mFold, es va predir l'estructura secundària més energèticament favorable del mRNA de CD40 (Figura 35).

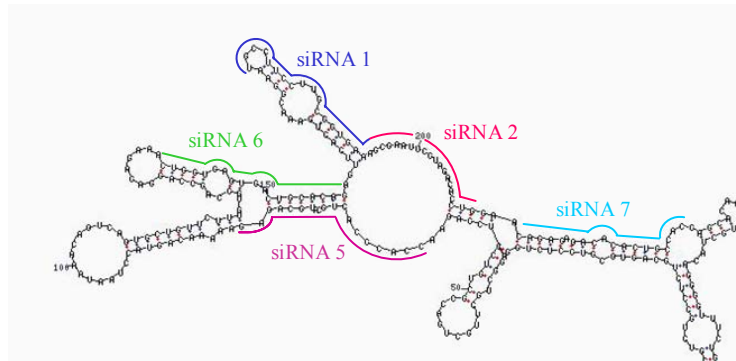


Figura 35. Estructura secundària predita del mRNA de CD40 humà i localització dins un fragment de 1-250 pb d'aquest mRNA de 5 siRNAs anti-CD40 dissenyats.

En termes d'accessibilitat al mRNA diana, la major eficiència en el silenciament gènic observada en el cas del siRNA-2 podria explicar-se per la seva unió a un *loop* intern força estable dins de l'estructura secundària predita del mRNA de CD40.

Posteriorment, per als experiments d'estudi de la inhibició de CD40 causada per siRNA-2 en ECV-304 i altres assaigs funcionals en cèl·lules endotelials, es va utilitzar un siRNA-control *mismatched* (msiRNA-2) amb la mateixa seqüència que aquest siRNA-2, però amb una transversió de 5 nucleòtids centrals (Taula 16).

### 4.1.6. Inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2 en ECV-304

#### Temps/resposta

Es va quantificar a nivell proteic la inhibició de l'expressió de CD40 causada per siRNA-2 al llarg del temps en cèl·lules ECV-304 estimulades amb les citocines proinflamàtòries IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Segons els resultats obtinguts, el siRNA-2 causava una inhibició de l'expressió de CD40 que es mantenia fins a les 72 hores posttransfecció (Figura 36). A temps més llargs, probablement es manté la inhibició de CD40, però no va ser possible mesurar-ho a causa de la citotoxicitat de IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ .

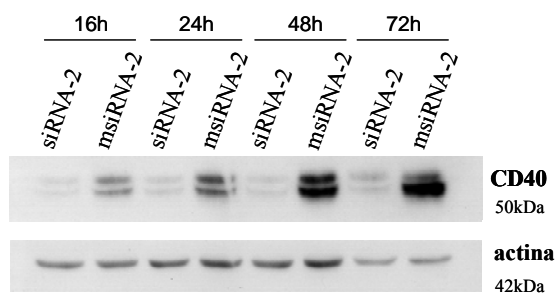


Figura 36. Anàlisi per Western blot de l'expressió de CD40 en cèl·lules ECV-304 transfectades amb siRNA-2 anti-CD40 i msiRNA-2 al llarg del temps.

### Dosi/resposta

Es va fer un estudi dosi-resposta i es va determinar el percentatge d'inhibició de CD40 per siRNA-2 utilitzant diferents concentracions de siRNA: des de 0,2nM a 200nM. Segons els resultats obtinguts, la IC<sub>50</sub> de siRNA-2, que fa referència a la concentració de siRNA que causa una inhibició de l'expressió de CD40 del 50%, seria de 10nM (Figura 37).

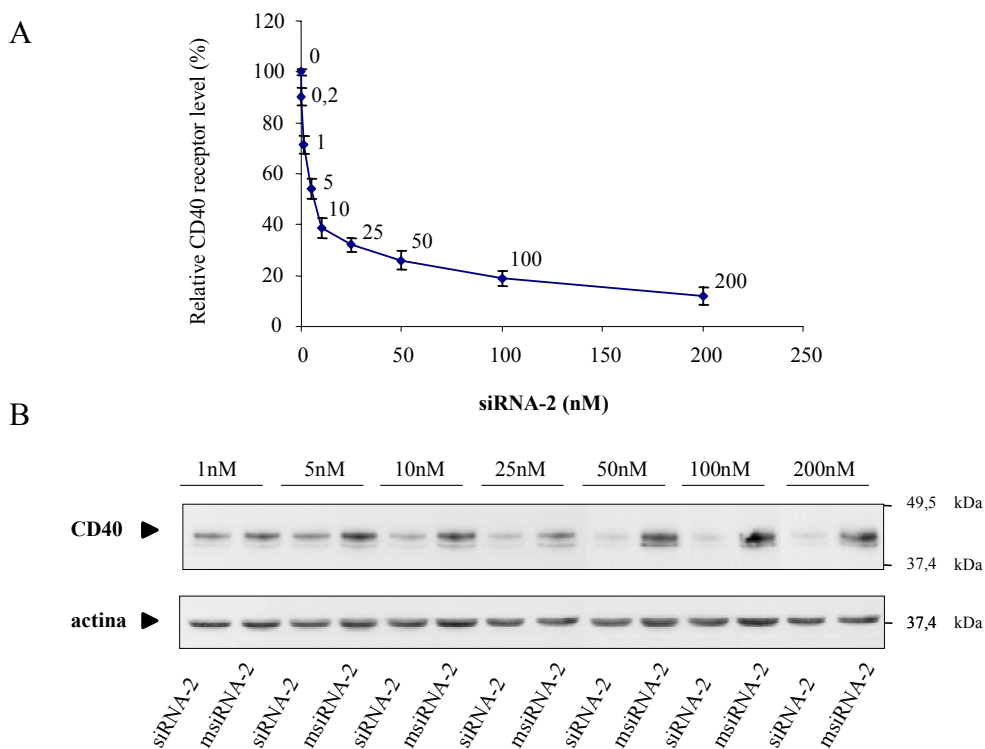


Figura 37. A). Cinètica d'inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2. Els resultats es mostren com la mitja ± SD de 2 experiments independents. B). Anàlisi per Western blot de l'expressió de CD40 en cèl·lules ECV-304 transfectades amb siRNA a 1-200nM.

#### 4.1.7. Inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2 en HUVEC

Per a posteriors assaigs funcionals en cèl·lules HUVEC, calia optimitzar la incorporació de siRNA en aquest cultiu primari. Utilitzant el lípid catiònic Targefect i un siRNA marcat

## Resultats

amb cianina 3 (Cy3), es va assolir una eficiència de transfecció del 50-60% del total de cèl·lules (mesurat per microscopia de fluorescència). Els complexos es localitzaven principalment en el citoplasma de les cèl·lules endotelials transfectades (Figura 38).

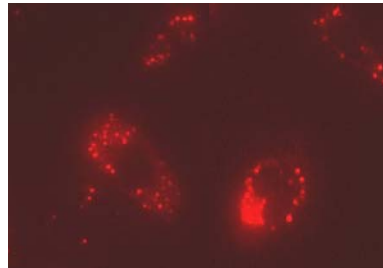


Figura 38. Localització cel·lular dels complexos siRNA-Cy3-Targefect en el citoplasma de les cèl·lules HUVEC transfectades.

Utilitzant aquest sistema de transfecció, es va mesurar l'expressió de CD40 a nivell proteic en aquest cultiu primari de cèl·lules endotelials transfectades amb el siRNA anti-CD40. Tal i com s'observa a la Figura 39, comparat amb el corresponent siRNA control *mismatched* (msiRNA-2), el siRNA-2 causava una inhibició de l'expressió endògena del receptor CD40 en aquestes cèl·lules del 60% (quantificat per densitometria).

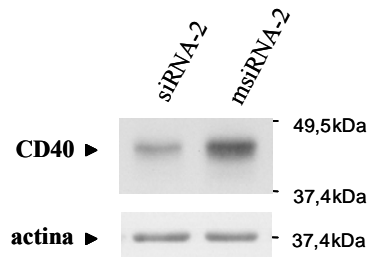


Figura 39. Anàlisi per Western blot de l'expressió de CD40 en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 o msiRNA-2.

### 4.1.8. Assaig d'adhesió leucocitària

#### 4.1.8.1. Inhibició de l'expressió de CAM

En el procés inflamatori, l'activació endotelial via interacció CD40-CD40L indueix l'expressió a la seva superfície cel·lular de diferents molècules d'adhesió que finalment causen l'extravasació dels leucòcits al lloc d'inflamació. Per tal de determinar si aquest siRNA-2 era capaç d'interferir en l'activació de la via CD40-CD40L en cèl·lules HUVEC, es va quantificar l'expressió de 3 molècules d'adhesió cel·lular: ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina en la superfície d'aquestes cèl·lules. Utilitzant citometria de flux, es va analitzar l'efecte de siRNA-2 comparat amb el siRNA control *mismatched* (msiRNA-2) en cèl·lules HUVEC estimulades via CD40L mitjançant cocultiu amb cèl·lules Jurkat D1.1 (un clon de Jurkat que

sobreexpressa el lligand CD40L). Es van fer créixer les cèl·lules endotelials en presència de Jurkat D1.1 a una relació cèl·lula T/cèl·lula endotelial de 5:1 (T/EC) durant diferents períodes de temps: 16 hores en el cas de ICAM-1 i VCAM-1 o 6 hores en el cas de E-selectina.

Segons els resultats obtinguts, les cèl·lules tractades amb el siRNA-2 i estimulades via CD40L presentaven una reducció significativa de l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina del 52, 58 i 52% respectivament.

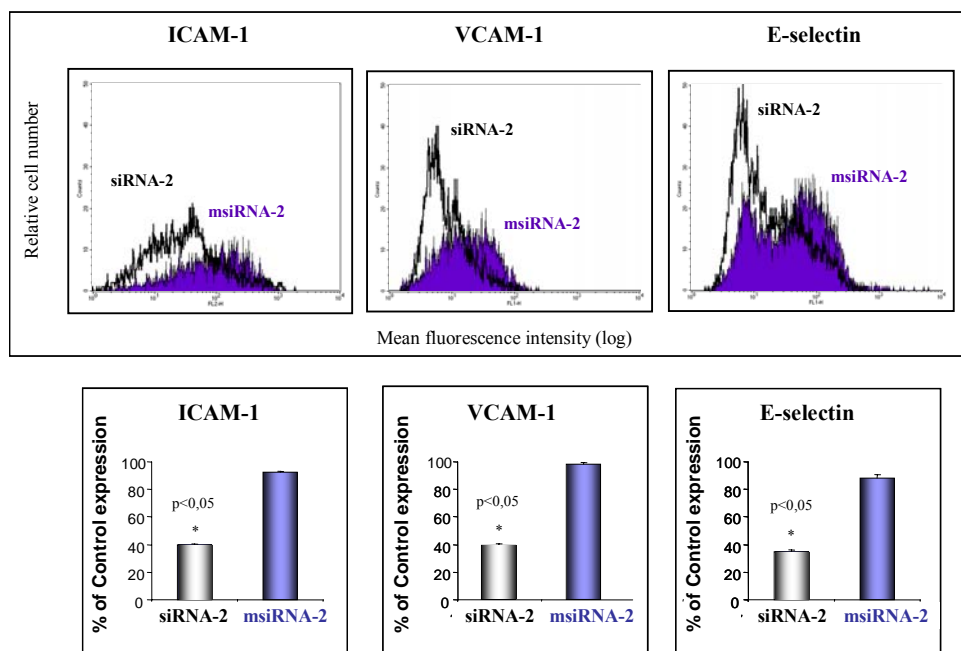


Figura 40. Anàlisi per citometria de flux de l'expressió de molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina en HUVEC transfectades amb siRNA-2 i activades via CD40L mitjançant cocultiu amb Jurkat D1.1. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents.

#### 4.1.8.2. Inhibició de l'adhesió leucocitària

Utilitzant un cultiu de cèl·lules leucocitàries HL-60 (derivades de leucèmia promielocítica), que expressen els lligands per a les 3 molècules d'adhesió anteriors, es va mesurar l'adhesió directa d'aquestes cèl·lules a les HUVEC activades via CD40L per microscopia de contrast de fases.

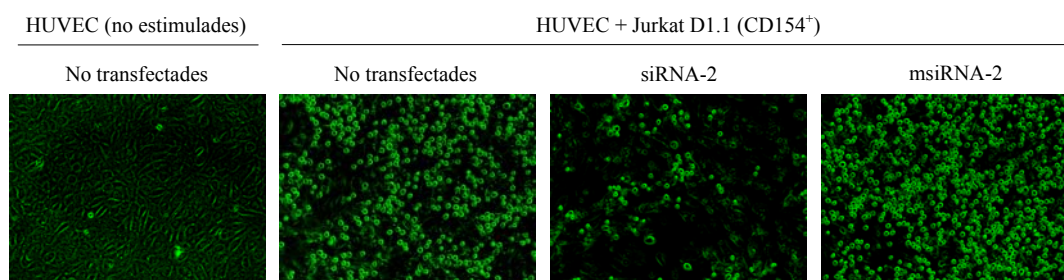


Figura 41. Determinació per microscopia de contrast de fases, de l'adhesió leucocitària en HUVEC transfectades amb siRNA-2 o msiRNA-2 i activades via CD40L.

## Resultats

Tal i com s'observa a la Figura 41, el pretractament de les HUVEC amb el siRNA-2 causava una reducció significativa de l'adhesió leucocitària en comparació amb les cèl·lules tractades amb el msiRNA-2.

Mitjançant citometria de flux i per tal de quantificar el percentatge d'adhesió leucocitària en les cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2, es va realitzar l'assaig anterior fent servir cèl·lules HL-60 marcades amb Calceina-AM. Segons els resultats obtinguts i mostrats a la Figura 42, el siRNA-2 reduïa l'adhesió leucocitària en les HUVEC activades via CD40L en un 87%.

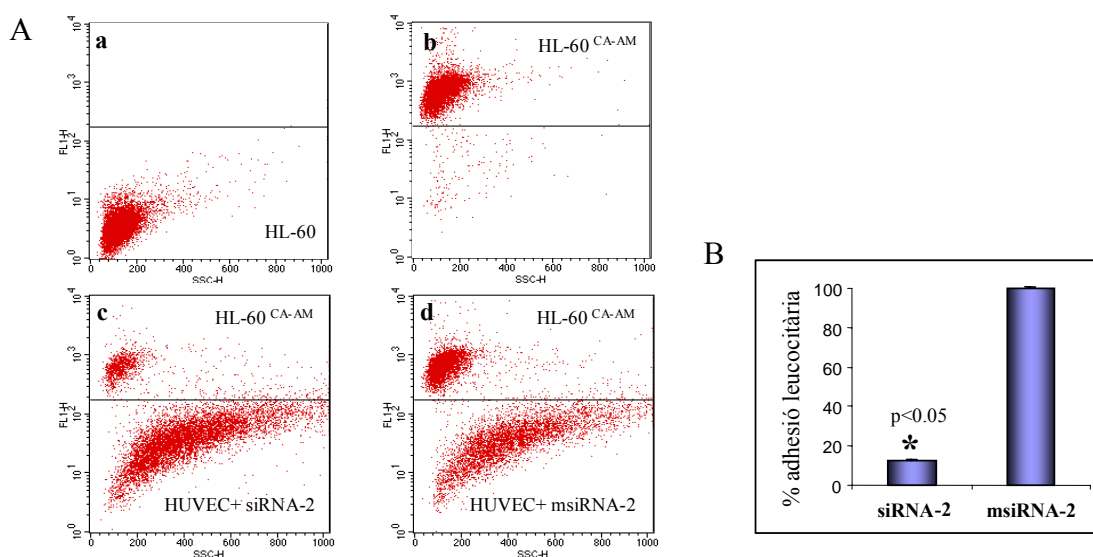


Figura 42. A). Quantificació mitjançant citometria de flux, de l'adhesió de HL-60 en HUVEC transfectades amb siRNA-2. a, HL-60 no marcades; b, HL-60 marcades amb calceina; c i d, HUVEC transfectades amb siRNA-2 o msiRNA-2 i cocultivades amb HL-60 marcades amb calceina. B). Percentatge d'adhesió leucocitària en HUVEC transfectades amb siRNA-2. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 5 experiments independents.

Amb aquest assaig funcional es va demostrar que el siRNA anti-CD40 humà era capaç de silenciar l'expressió del receptor CD40 en les HUVEC fent que aquestes cèl·lules es tornessin insensibles a l'activació via CD40L, impeding tant la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) com l'adhesió leucocitària.

El mateix assaig d'adhesió leucocitària i quantificació de l'expressió de les molècules d'adhesió anteriors, es va realitzar en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA anti-CD40 i estimulades amb la citoquina proinflamatòria TNF- $\alpha$ . Tal i com s'observa a la Figura 43, el siRNA-2 anti-CD40 no tindria efecte en l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina, ni en l'adhesió leucocitària en cèl·lules HUVEC activades amb TNF- $\alpha$ . La incapacitat de siRNA-2 per interferir amb aquest receptor membre de la mateixa família

de receptors que CD40, demostra l'especificitat de l'efecte de siRNA-2 per a la via de CD40-CD40L.

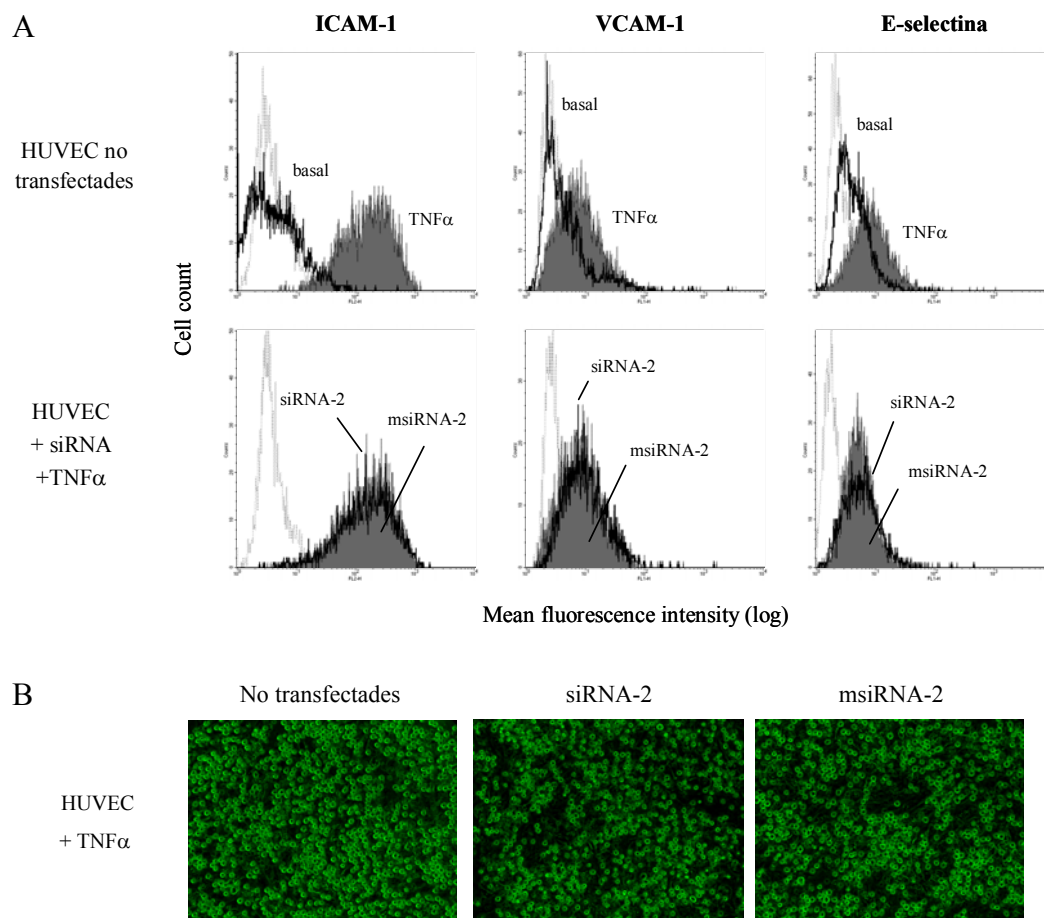


Figura 43. A). Anàlisi per citometria de flux de l'expressió de molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina en HUVEC transfectedes amb siRNA-2 o msiRNA-2 i activades via TNF- $\alpha$ . B). Determinació per microscopia òptica, de l'adhesió leucocitària en HUVEC transfectedes amb siRNA-2 o msiRNA-2 i activades via TNF- $\alpha$ .

#### 4.1.9. Vectors lentivirals que expressen un shRNA anti-CD40

Es van generar vectors lentivirals recombinants productors d'un shRNA anti-CD40 humà. Es va optimitzar la transducció del cultiu primari de cèl·lules HUVEC amb aquests vectors lentivirals amb la finalitat d'assolir un efecte de silenciament gènic de CD40 a llarg termini. Els lentivirus utilitzats en aquest treball estan basats en el virus VIH-1 (virus de la immunodeficiència humana de tipus 1) i contenen la càpside del virus de l'estomatitis vesicular (VSV) per incrementar els tipus cel·lulars susceptibles de ser infectats.

##### 4.1.9.1. Síntesi dels shRNAs i clonació en el vector pLVTHM

Pel disseny i la síntesi dels shRNAs es va seguir el protocol proposat per Didier Trono, en el que la unitat de shRNA s'introdueix sota el control del promotor H1 de la polimerasa III en un vector lentiviral autoinactivat que expressa el gen reporter GFP (*Green fluorescent protein*) i s'anomena pLVTHM. Durant la transcripció reversa, la regió U3 de la unitat 5'LTR del vector víric és sintetitzada utilitzant la regió 3' homòloga com a motlle, la qual cosa resulta en la duplicació del *cassette* del siRNA en el provirus integrat dins el genoma de les cèl·lules transduïdes. La presència de la proteïna GFP en el plasmidi pLVTHM, permet la posterior detecció i selecció per citometria de flux de les cèl·lules que han estat transduïdes amb les partícules lentivirals recombinants.

Les construccions plasmídiques obtingudes es mostren en el següent esquema:

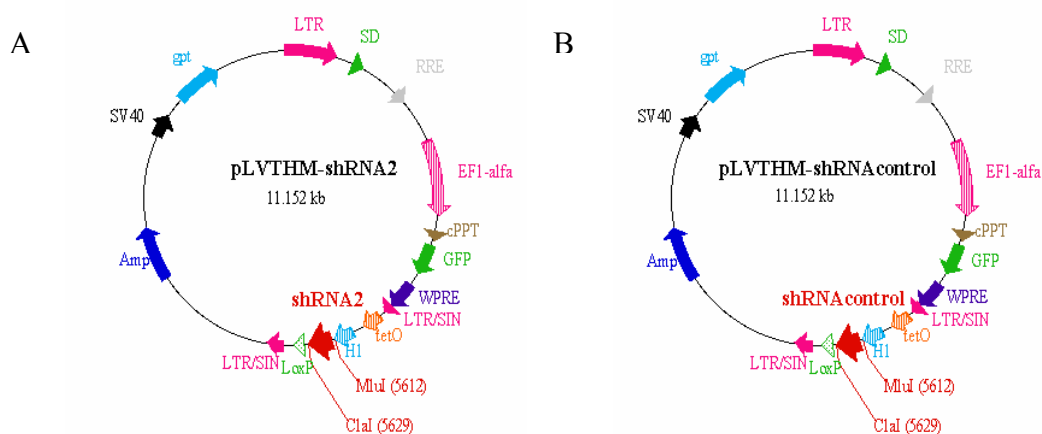


Figura 44. Representació gràfica de (A) construcció pLVTHM-shRNA2; (B) construcció pLVTHM-shRNAcontrol.

##### 4.1.9.2. Producció de lentivirus recombinants i titulació

La producció dels vectors lentivirals recombinants que expressaven shRNA-2 (pLV-shRNA2) o shRNA-control (pLV-shRNAcontrol), es va fer utilitzant com a línia cel·lular



productora les cèl·lules 293FT, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes.

Per determinar el títol de partícules virals present en cadascun dels estocs lentivirals obtinguts es van transduir cèl·lules KB3.1 amb diferent quantitat d'aquests lentivirus recombinants. 48 hores després de la transducció es va quantificar el percentatge de cèl·lules que havien incorporat la fluorescència per citometria de flux (Figura 45).

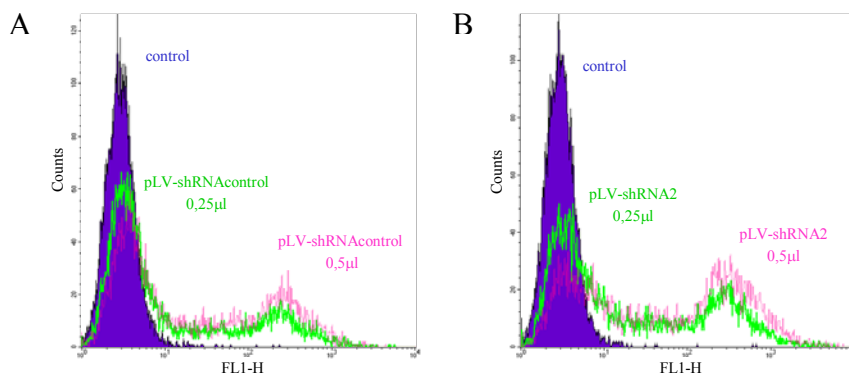


Figura 45. Anàlisi per citometria de flux de l'eficiència de transducció de KB3.1 amb diferents quantitats de l'estoc lentiviral que expressa: A), shRNA-control i B), shRNA-2. L'histograma blau correspon a l'autofluorescència de cèl·lules no transduïdes.

El títol viral, o nombre d'unitats transductores per ml, es va calcular a partir del nombre de cèl·lules positives per GFP aplicant la fórmula descrita a l'apartat de materials i mètodes. En el cas del lentivirus que expressaven el shRNA-control el títol viral obtingut va ser de l'ordre de  $9.8 \times 10^7$  TU/ml, i per shRNA-2 va ser de l'ordre de  $1.4 \times 10^8$  TU/ml.

#### 4.1.9.3. Assaig de transducció de HUVEC amb lentivirus

Per tal de determinar l'eficiència de transducció d'aquests lentivirus recombinants en les HUVEC, aquest cultiu primari es va transduir amb diferents unitats transductores (TU) de cadascun dels estocs lentivirals anteriors ( $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  i  $1 \times 10^5$  TU).

24 hores posttransducció, es van visualitzar les cèl·lules amb el microscopi de fluorescència. No es van observar efectes tòxics sobre la viabilitat cel·lular derivats de l'ús del polibré durant la transducció amb aquests vectors lentivirals.

##### 4.1.9.3.1. Determinació de l'eficiència de transducció per Citometria de Flux

48 hores posttransducció es va quantificar mitjançant citometria de flux, el percentatge de cèl·lules HUVEC que havien incorporat els virus i eren positives per GFP. L'eficiència de transducció de pLV-shRNA2 i de pLV-shRNAcontrol, utilitzant  $5 \times 10^5$  TU de cadascun dels estocs lentivirals, va ser de l'ordre de 94%-98% del total de cèl·lules (M.O.I al voltant de 2)

(Figura 46).

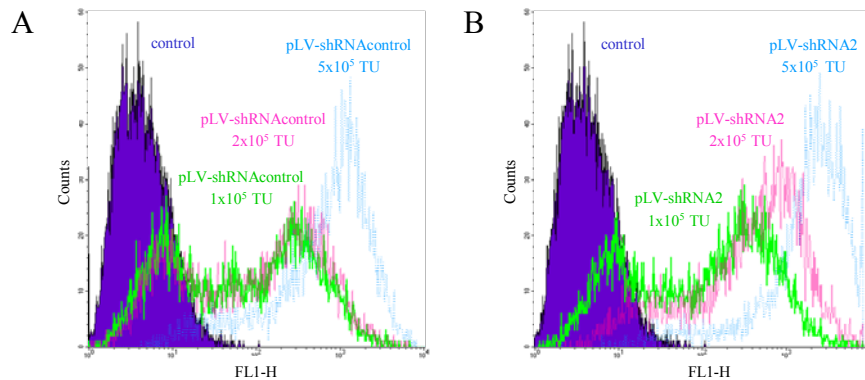


Figura 46. Anàlisi per citometria de flux de l'eficiència de transducció de HUVEC amb diferents TU de l'estoc lentiviral que expressen: A), shRNA-control i B), shRNA-2. L'histograma blau correspon a l'autofluorescència de cèl·lules no transduïdes.

Quantitats més elevades de lentivirus no causaven un augment en el percentatge de cèl·lules transduïdes, però incrementava la intensitat de fluorescència observada probablement a causa d'un major nombre de còpies de lentivirus per cèl·lula.

#### 4.1.9.4. Determinació de la eficàcia inhibidora del shRNA-2

Fent servir la tècnica de qRT-PCR a temps real es va quantificar l'expressió del transcrit CD40 humà en cèl·lules HUVEC transduïdes amb els lentivirus. A la Figura 47 es mostra la inhibició de l'expressió de CD40 per shRNA-2 en aquestes cèl·lules 48 hores després de ser transduïdes amb diferents títols de lentivirus recombinants.

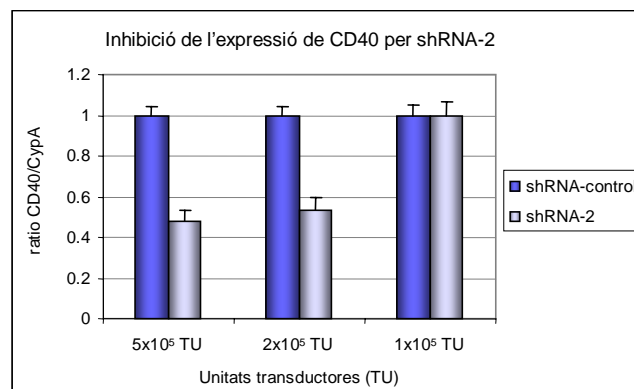


Figura 47. Anàlisi per qRT-PCR a temps real de l'expressió de CD40 en cèl·lules HUVEC transduïdes amb diferents TU de lentivirus que expressen shRNA-2 o shRNA-control. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents.

Segons els resultats obtinguts, el shRNA-2 és un inhibidor efectiu de l'expressió basal de CD40. A mida que s'augmentava la quantitat de virus utilitzada en la transducció

incrementava el percentatge d'inhibició de l'expressió de CD40. A les 48 hores de transduir les HUVEC amb un títol de  $5 \times 10^5$  TU de vector lentiviral que expressava el shRNA-2, s'assolia una inhibició de l'expressió de CD40 del 52% comparat amb el shRNA-control (Figura 47). Tot i així, l'eficiència de silenciament gènic utilitzant shRNA anti-CD40 ha estat inferior a l'obtinguda amb un siRNA sintètic.

Per altra banda, es volia comprovar si la inhibició de CD40 per shRNA era persistent a llarg termini. Es va fer un estudi d'inhibició de l'expressió de CD40 a nivell de mRNA a diferents temps posttransducció. Les cèl·lules HUVEC van ser transduïdes amb un títol de  $5 \times 10^5$  TU de vector lentiviral que expressava el shRNA-2 o amb el mateix títol del vector lentiviral que expressava el shRNA-control, i es van quantificar els nivells de transcrit de CD40 per qRT-PCR al llarg del temps.

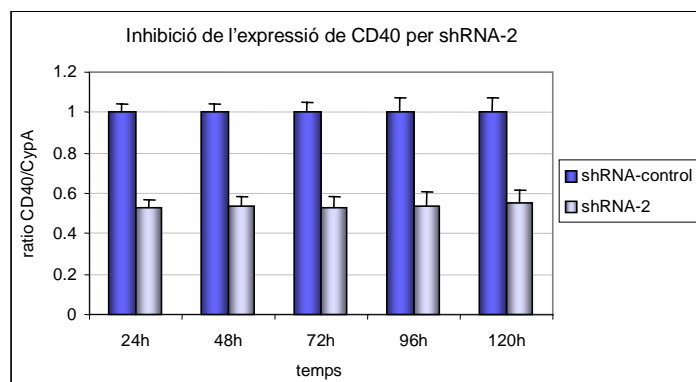


Figura 48. Anàlisi per qRT-PCR a temps real de l'expressió de CD40 en cèl·lules HUVEC transduïdes amb  $5 \times 10^5$  TU de lentivirus que expressa shRNA-2 o shRNA-control al llarg del temps. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents.

Segons els resultats obtinguts, la inhibició de l'expressió de CD40 causada per shRNA-2 es mantenia fins a 120 hores posttransducció (Figura 48). Per tant, la utilització de vectors lentivirals que codifiquen per shRNA anti-CD40 permetria assolir una reducció sostinguda de l'expressió d'aquest receptor en les cèl·lules HUVEC transduïdes.



***4.2. ANÀLISI DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL EN  
CÈL·LULES ENDOTELIALS ACTIVADES VIA CD40  
UTILITZANT MICROARRAYS***



### 4.2.1. Anàlisi de la regulació de l'expressió gènica transcripcional mitjançant microarrays de DNA

Amb la finalitat d'establir el paper de CD40 en l'activació de cèl·lules endotelials en processos immunoinflamatoris, es va inhibir específicament aquesta via de senyalització amb siRNA-2 i es va utilitzar la tecnologia de microarrays per determinar els perfils d'expressió gènica o grups de gens dependents de CD40 en cèl·lules endotelials HUVEC.

Per a realitzar aquest estudi es va optimitzar el sistema de transfecció del cultiu primari de cèl·lules endotelials. Es va fer servir el mètode d'electroporació aconseguint un 80-90% d'eficiència d'entrada del siRNA en aquestes cèl·lules.

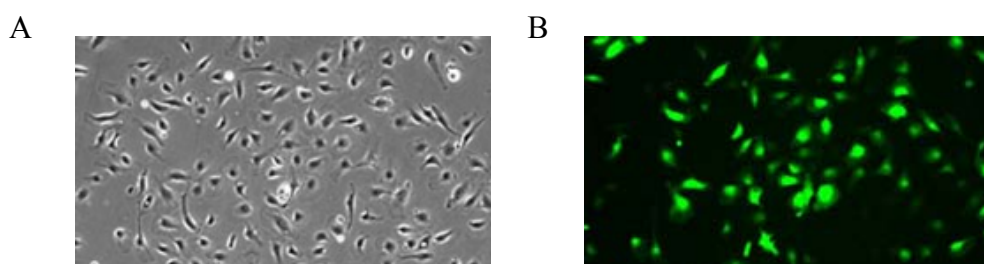


Figura 49. Determinació mitjançant microscopia de fluorescència, del percentatge de cèl·lules HUVEC electroporades que incorporen un siRNA-FITC. A). Imatge de microscopia òptica. B). Imatge de microscopia de fluorescència.

Utilitzant aquest sistema, les HUVEC van ser transfectades en paral·lel amb el siRNA-2 anti-CD40 o el msiRNA-2, i després van ser activades via CD40L mitjançant el cocultiu d'aquestes cèl·lules amb JurkatD1.1 durant 3 temps d'estimulació (4, 10 i 16 hores). 48 hores després de la transfecció, es van extreure els RNAs (Figura 50).

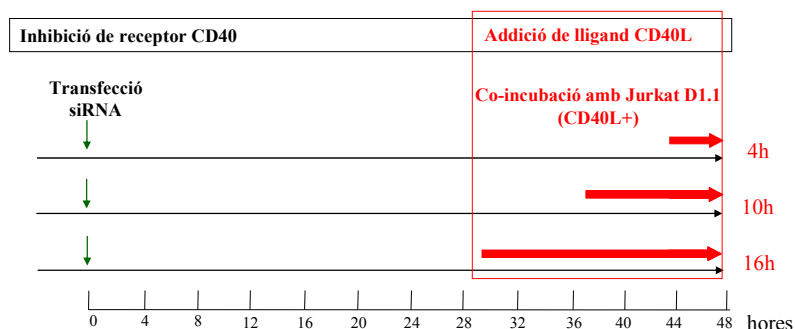


Figura 50. Protocol del tractament de les cèl·lules: els RNAs es van extreure a les 48 hores posttransfecció, prèviament les cèl·lules havien estat estimulades mitjançant cocultiu amb Jurkat D1.1 durant 4, 10 o 16 hores.

Inicialment, es quantificava per qRT-PCR l'expressió de CD40 i de la molècula d'adhesió ICAM-1 en cadascuna de les mostres de RNA a utilitzar en els experiments

## Resultats

d'hibridació. Una vegada confirmat el silenciament gènic tant del receptor, com de la molècula d'adhesió ICAM-1, conseqüència de la inhibició de la via de transducció de senyals de CD40 per RNAi, aquests RNAs eren amplificats i marcats. Per a cada temps d'estimulació, les mostres amb i sense inhibició de CD40 es van marcar respectivament amb dos fluorocroms diferents Cy5 i Cy3. Posteriorment aquestes mostres eren cohibridades per duplicat, amb intercanvi de fluorocroms, en un array de genoma complet. Es van realitzar dos experiments independents per cada temps d'estimulació, així doncs per cada condició experimental es van hibridar 4 microarrays, la qual cosa fa un total de 12 xips.

Els microarrays utilitzats en aquest estudi van ser microarrays comercials d'oligonucleòtids d'Agilent de 44.000 elements que representaven un total de 37.312 transcrits o ESTs representats per 41000 sondes. Les característiques de l'array així com els protocols de marcatge, hibridació i normalització es detallen en l'apartat de materials i mètodes. A continuació es mostra un esquema del protocol de l'experiment de microarrays:

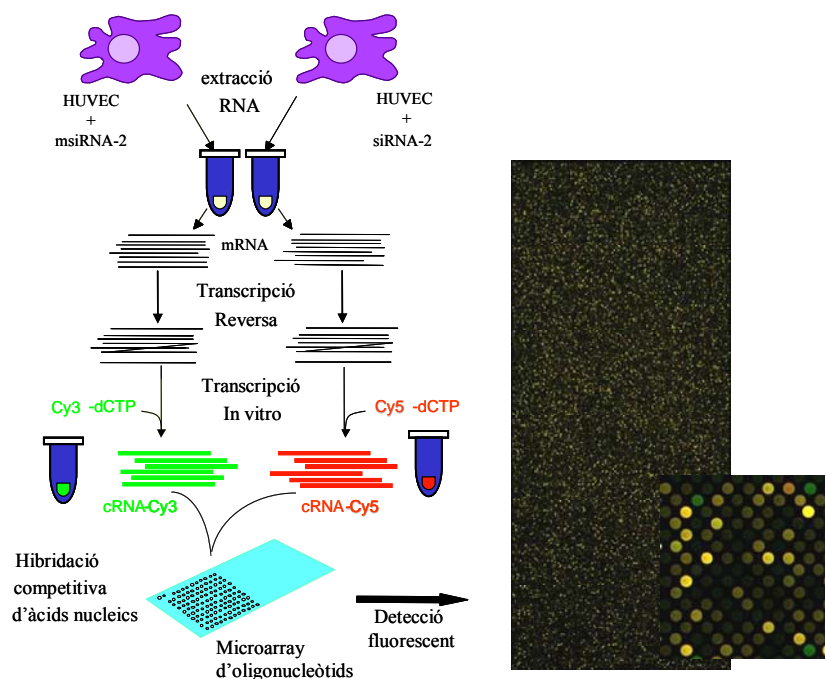


Figura 51. Disseny de l'experiment de microarrays en cèl·lules HUVEC. Els RNAs obtinguts es van amplificar i amb cadascun d'ells es van hibridar 2 microarrays, un marcant la mostra problema amb Cy3 i la control amb Cy5, i l'altre de manera inversa.

Els paràmetres utilitzats en l'anàlisi van ser la taxa de canvi (*fold change*, FC) i el rang del valor de l'estadístic B (B rank) [283]. FC és un indicador de l'expressió diferencial entre les intensitats de fluorescència dels dos canals (relació tractat/control) amb correcció de l'escala per als valors negatius ( $FC > 1$  inducció;  $FC = \pm 1$  sense canvis;  $FC < -1$  repressió). L'estadístic Bayesià (B) indica la probabilitat de que un gen estigui diferencialment regulat.



En el cas de que el nombre de rèpliques sigui baix, és possible que no s'assoleixin valors de B prou alts, en aquest cas es fa servir el criteri de rang de la B (B rank) definit com el valor d'ordre (expressat com a percentatge) de cada gen segons el seu valor de B. Es calcula de la següent manera:  $1 - ((n \text{ spots} - \text{rang del gen}) / n \text{ spots})$ . Quant més proper és el valor de B rank a 100 més probable és que aquest gen estigui regulat.

L'anàlisi global de les dades indicava que, en silenciar específicament el receptor de CD40 mitjançant RNAi en cèl·lules endotelials estimulades via CD40L, hi havia un baix nivell de regulació gènica. Utilitzant com a punt de tall un valor absolut de fold change ( $|\text{fold change}| \geq 1.2$ ) i B rank  $\geq 95\%$ , es van identificar 715 transcrits, de la totalitat de gens presents al xip, diferencialment regulats almenys en algun dels tres temps d'estimulació (2%) (Annex 1). Aquest percentatge de regulació representa el 3% respecte al transcriptoma expressat a les HUVEC. Aproximadament  $\frac{3}{4}$  d'aquests transcrits estarien sobreexpressats, mentre que  $\frac{1}{4}$  veurien disminuïda la seva expressió, la qual cosa confirma el paper de CD40 com a "activador" cel·lular. Tal i com s'observa a la Figura 52A, la majoria de canvis en l'expressió gènica s'obtenien a 4 i 16 hores d'estimulació. Només un 23% d'aquests transcrits (165) estarien regulats en els tres temps d'estimulació analitzats (Figura 52A).

Així doncs, els experiments de microarrays van permetre identificar un total de 715 transcrits, dels 37.312 analitzats, com a diferencialment regulats en cèl·lules endotelials activades via CD40L. La major part d'aquests 715 transcrits estaven induïts o reprimits per sota d'un valor de fold change de 1.5 (Figura 52B).

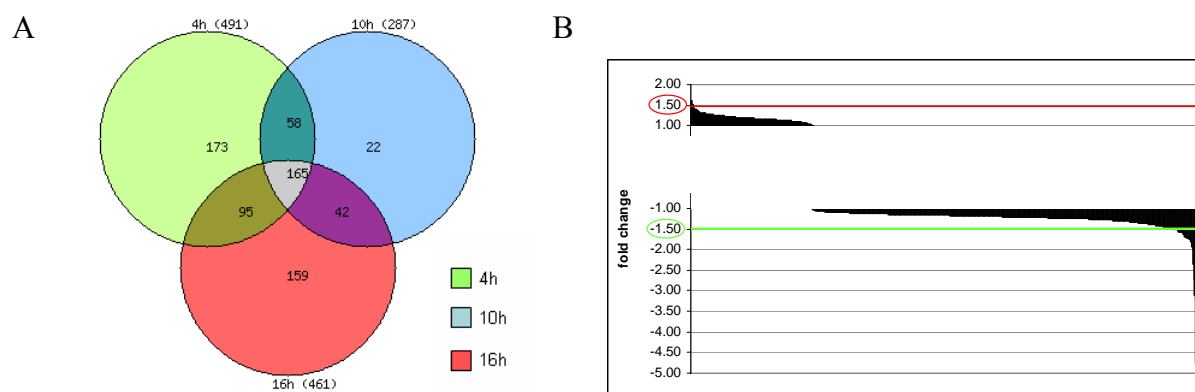


Figura 52. A). Diagrama de Venn mostrant la regulació gènica diferencial dels 715 transcrits amb un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$  en els tres temps d'estimulació analitzats. B). Distribució dels valors de fold change dels 715 transcrits regulats.

Es va realitzar una anàlisi d'ontologia gènica (GO) per tal de determinar quines funcions biològiques estaven significativament sobrerepresentades en el grup de gens

## Resultats

regulats, és a dir, es trobaven presents amb major freqüència en el llistat de gens regulats respecte la resta de gens del xip. En el moment de realitzar aquesta anàlisi, dels 715 transcrits regulats, només 241 gens tenien anotació a la base de dades de GO, i per tant presentarien una funció coneguda. A la Figura 53 es mostra la distribució d'aquests gens dins les diferents categories de GO sobrerrepresentades de manera significativa amb  $p\text{-valor} < 0.05$ . Segons els resultats de l'anàlisi de GO, la major part dels gens regulats codificaven per molècules amb funcions en resposta immune i processos inflamatoris, entre elles la cascada de senyalització del factor de transcripció NF $\kappa$ B.

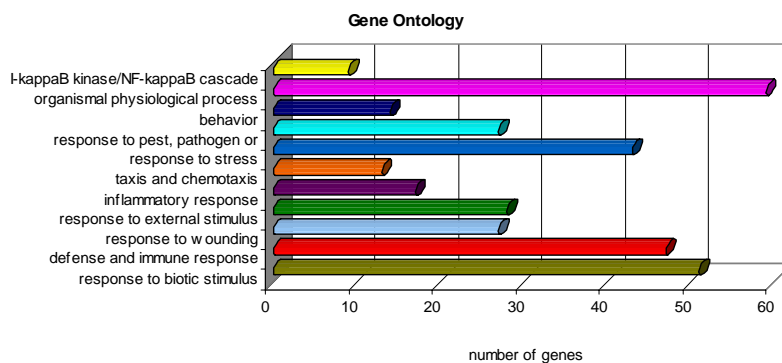


Figura 53. Categories d'ontologia gènica significativament sobrerrepresentades entre els gens regulats per CD40 amb un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ .

A la Figura 54 es mostren els canvis en el patró d'expressió gènica en resposta a la inhibició de CD40 per RNAi a 4 i 16 hores d'estimulació de les cèl·lules HUVEC amb Jurkat D1.1. Els gens estan agrupats en categories funcionals segons la seva activitat biològica. Entre els gens més significativament regulats per CD40 es troben les molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1); gens implicats en apoptosi (BIRC-3), citokines i quimioquines proinflamàtores (CCL-2, CCL-20, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, CX3CL-1, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3, CXCL-11), gens involucrats en el procés d'angiogènesi (VEGF), gens implicats en la regulació del cicle cel·lular (CCNG1/2), gens de la cascada de coagulació i complement (THBD), factors de transcripció (NF $\kappa$ B1, Rel B) i gens implicats en la presentació d'antígens (TAP-1) (Figura 54).

Tot i que alguns d'aquests gens ja havien estat descrits com a dianes de CD40, s'han identificat altres gens que prèviament no havien estat relacionats amb la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials. Aquest patró global d'expressió confirma el paper clau de CD40 i de l'activació de les cèl·lules endotelials en l'inici i progressió dels processos immunoinflamatoris.

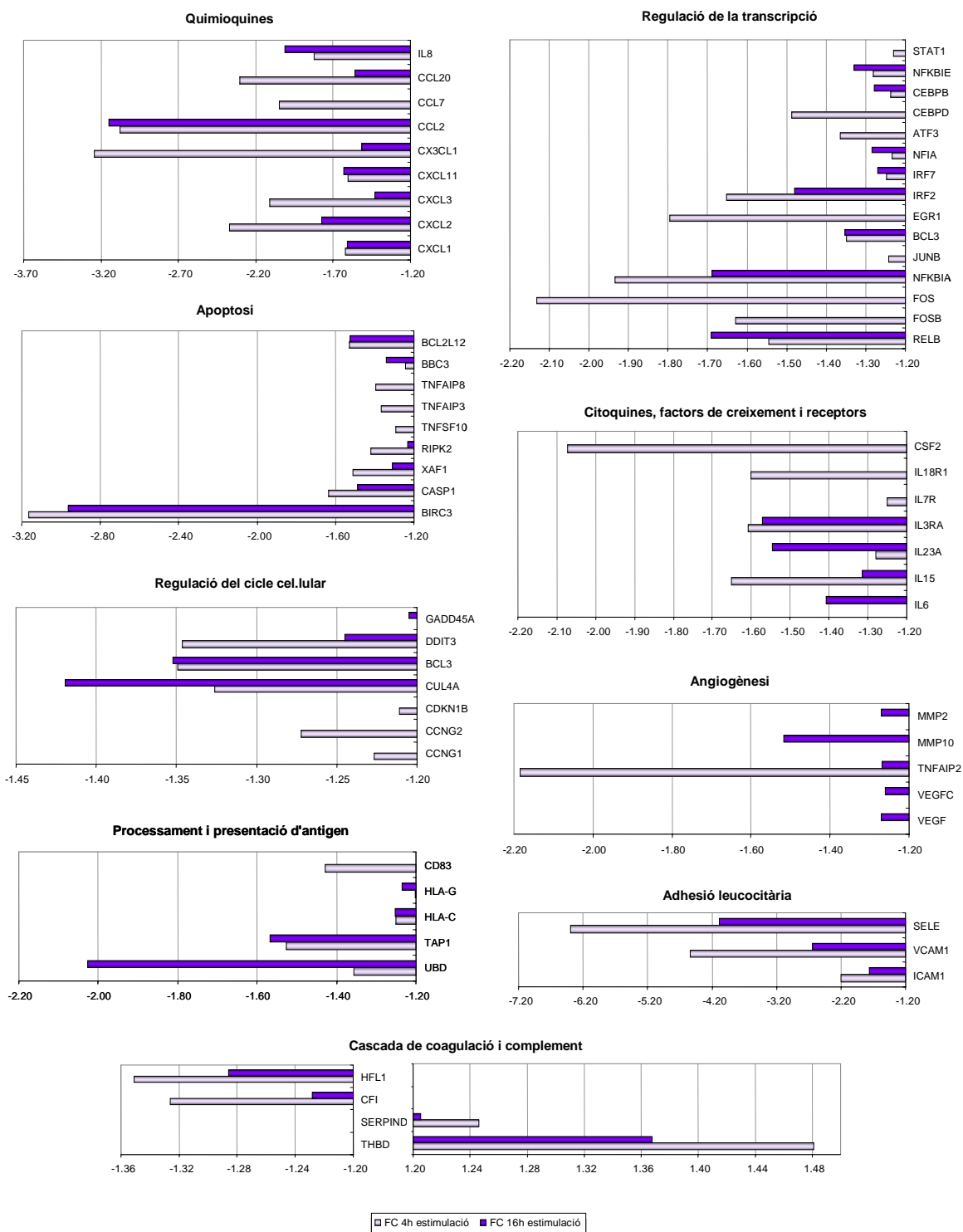


Figura 54. Canvis d'expressió gènica en cèl·lules HUVEC on s'ha silenciat el receptor CD40 en condicions d'estimulació de la via amb Jurkat D1.1 durant 4 i 16 hores. Els resultats s'expressen en termes de fold change (FC) de cèl·lules tractades amb siRNA-2 anti-CD40 respecte a cèl·lules tractades amb msiRNA-2.

A la Taula 17 es mostra un llistat amb els principals gens anotats que estarien regulats per CD40 en cèl·lules endotelials en almenys un dels tres temps d'estimulació, fent servir un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.45$  i B rank  $\geq 99\%$ .

# Resultats

Log2ratio xip 1	Log2ratio xip 2	Log2ratio xip 3	Log2ratio xip 4	Log2ratio xip 5	Log2ratio xip 6	Log2ratio xip 7	Log2ratio xip 8	Log2ratio xip 9	Log2ratio xip 10	Log2ratio xip 11	Log2ratio xip 12	Unigene Symbol	GenBank accession	Unigene Name	FC 4h	FC 10h	FC 16h
												APLN	AF086248	Apelin, AGTRL1 ligand	1.72	1.38	1.72
												PSMD10	NM_002814	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	1.38	1.34	1.84
												THBD	NM_000361	Thrombomodulin	1.48	1.44	1.37
												MSN	NM_002444	Moesin	1.46	1.22	1.57
												TMSL8	NM_021992	Thymosin-like 8	1.34	1.37	1.50
												FAM102A	BC047949	Family with sequence similarity 102, member A	1.45	1.29	1.47
												PRDX5	NM_012094	Peroxiredoxin 5	1.51	1.24	1.41
												FAM89B	NM_152832	Family with sequence similarity 89, member B	1.26	1.30	1.47
												CXCR4	NM_003467	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1.53	1.10	1.31
												CEBPD	NM_005195	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	-1.49	-1.11	-1.11
												BTN2A1	NM_078476	Butyrophilin, subfamily 2, member A1	-1.23	-1.11	-1.47
												ZFP36	NM_003407	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	-1.53	-1.30	-1.01
												RELL1	AK025431	Receptor expressed in lymphoid tissues like 1	-1.24	-1.10	-1.52
												LAMP3	NM_014398	Lysosomal-associated membrane protein 3	-1.21	-1.17	-1.51
												MMP10	NM_002425	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	1.01	-1.48	-1.52
												PTGS2	BC013734	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	-1.30	-1.18	-1.52
												GIMAP2	NM_015660	GTPase, IMAP family member 2	-1.55	-1.37	-1.17
												RPL22L1	AL110170	Ribosomal protein L22-like 1	-1.32	-1.21	-1.55
												CXCR7	NM_020311	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	-1.54	-1.24	-1.31
												CSF2	NM_000758	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-2.07	-1.04	-1.17
												IL18R1	NM_003855	Interleukin 18 receptor 1	-1.60	-1.35	-1.19
												XAF1	NM_017523	XIAP associated factor-1	-1.51	-1.31	-1.31
												TMED10	NM_006827	Transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	-1.38	-1.31	-1.46
												FOS	NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-2.13	-1.21	-1.02
												CNKSR3	NM_173515	CNKSR family member 3	-1.53	-1.23	-1.41
												LRRC17	NM_005824	Leucine rich repeat containing 17	-1.53	-1.37	-1.27
												BTN3A2	NM_007047	Butyrophilin, subfamily 3, member A2	-1.46	-1.41	-1.35
												EGR1	NM_001964	Early growth response 1	-1.80	-1.65	1.05
												SULT1E1	NM_005420	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	-1.53	-1.25	-1.48
												FLRT2	NM_013231	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	-1.30	-1.55	-1.42
												SECTM1	NM_003004	Secreted and transmembrane 1	-1.53	-1.38	-1.35
												PSME2	NM_002818	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	-1.43	-1.35	-1.48
												PAPLN	AK131073	Papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein	-1.27	-1.51	-1.52
												FLRT2	AF169676	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	-1.35	-1.43	-1.51
												FAM129A	NM_052966	Family with sequence similarity 129, member A	-1.28	-1.45	-1.60
												CXCL1	NM_001511	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	-1.62	-1.16	-1.61
												TAP1	NM_000593	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	-1.53	-1.27	-1.57
												LRIG3	NM_153377	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	-1.52	-1.41	-1.46
												FABP4	A_23_P8812	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	-1.27	-1.65	-1.51
												LINCR	NM_138397	Likely ortholog of mouse lung-inducible	-1.61	-1.36	-1.46
												IL15	BC018149	Interleukin 15	-1.65	-1.48	-1.31
												NCOA7	NM_181782	Nuclear receptor coactivator 7	-1.68	-1.39	-1.42
												TNFAIP2	NM_006291	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	-2.18	-1.18	-1.27
												GBP3	NM_018284	Guanylate binding protein 3	-1.65	-1.29	-1.56
												HSPA5	NM_005347	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	-1.41	-1.48	-1.60
												CXCL2	NM_002089	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-2.37	-1.48	-1.77
												MPZL1	NM_024569	Myelin protein zero-like 1	-1.42	-1.44	-1.68
												APOL3	NM_145640	Apolipoprotein L, 3	-1.62	-1.58	-1.35
												CCL7	X72308	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-2.05	-1.50	-1.13
												BCL2L12	NM_138639	BCL2-like 12 (proline rich)	-1.53	-1.49	-1.53
												CNDBP1	NM_012142	Cyclin D-type binding-protein 1	-1.56	-1.40	-1.60
												IRF2	NM_002199	Interferon regulatory factor 2	-1.65	-1.46	-1.48
												RELB	BC028013	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B	-1.55	-1.43	-1.69
												TIFA	BC014259	TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain	-1.66	-1.48	-1.55
												ARL2BP	NM_012106	ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein	-1.69	-1.27	-1.78
												CXCL3	NM_002090	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-2.11	-1.30	-1.43
												GBP4	NM_052941	Guanylate binding protein 4	-1.61	-1.63	-1.49
												NDUFC2	AF369952	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	-1.50	-1.44	-1.84
												YME1L1	NM_139313	YME1-like 1 (S. cerevisiae)	-1.54	-1.41	-1.83
												CASP1	NM_033292	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	-1.63	-1.65	-1.49
												IL3RA	NM_002183	Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	-1.61	-1.68	-1.57
												WSB2	NM_018639	WD repeat and SOCS box-containing 2	-1.57	-1.47	-1.85
												NFKBIA	NM_020529	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-1.93	-1.38	-1.69
												UBD	NM_006398	Ubiquitin D	-1.36	-1.74	-2.03
												CCL20	NM_004591	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.30	-1.34	-1.56
												NLF2	THC1880502	Nuclear localized factor 2	-1.89	-1.64	-1.57
												PSMB8	NM_148919	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	-1.67	-1.73	-1.73
												CXCL11	NM_005409	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.61	-1.97	-1.63
												IFIH1	AK056293	Interferon induced with helicase C domain 1	-1.82	-1.66	-1.72
												SRPR	NM_003139	Signal recognition particle receptor (docking protein)	-1.73	-1.53	-2.05
												IL8	NM_000584	Interleukin 8	-1.82	-1.56	-2.01
												TRAF1	AK090468	TNF receptor-associated factor 1	-2.04	-1.68	-1.75
												CD69	NM_001781	CD69 molecule	-2.84	-1.73	-1.85
												ICAM1	NM_000201	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	-2.20	-2.05	-1.76
												CX3CL1	NM_002996	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-3.24	-2.64	-1.51
												BIRC3	NM_001165	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-3.16	-2.12	-2.96
												CCL2	NM_002982	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-3.08	-3.11	-3.15
												VCAM1	NM_001078	Vascular cell adhesion molecule 1	-4.54	-2.84	-2.63
												SELE	NM_000450	Selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	-6.40	-4.15	-4.08

Taula 17. Principals gens coneguts que estarien induïts (vermell) o reprimits (verd) transcripcionalment en silenciar CD40, almenys en un dels tres temps d'estimulació de la via, amb un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.45$  i B rank  $\geq 99\%$ . FC (Fold Change); Log2ratio (logaritme en base 2 del ratio). Els xips del 1-4 corresponen a 4 hores, del 5-8 corresponen a 10 hores, i del 9-12 corresponen a 16 hores d'estimulació.

#### 4.2.1.1. Validació dels resultats de microarrays per qRT-PCR

Per verificar els resultats de microarrays, es va validar per qRT-PCR semiquantitativa a temps real, la inducció o inhibició de l'expressió d'un total de 16 gens a 4 hores d'estimulació amb Jurkat D1.1. Amb l'anàlisi de microarrays es va confirmar que la ciclofilina-A (CypA), el gen de referència utilitzat anteriorment per a la quantificació relativa, era un gen de referència òptim donat que la seva expressió no es veia modificada en les condicions experimentals assajades.

Entre els gens seleccionats validats a 4 hores d'estimulació es troben: la molècula d'adhesió ICAM-1, el marcador d'activació de cèl·lules T CD69, l'inhibidor de l'apoptosi BIRC-3, la quimioquina IL-8, el gen antioxidant SOD-2, el factor de transcripció DSCR-1 (*Down Syndrome Candidate Region 1*), el factor I del complement CFI, i la citoquina IL-11 (Figura 55). Aquests 4 últims gens (SOD-2, DSCR-1, IF, IL-11) van ser inclosos en l'anàlisi ja que presentaven un valor de  $|\text{fold change}|$  entre 1.22-1.33, i volíem determinar si érem capaços de validar la seva expressió per qRT-PCR.

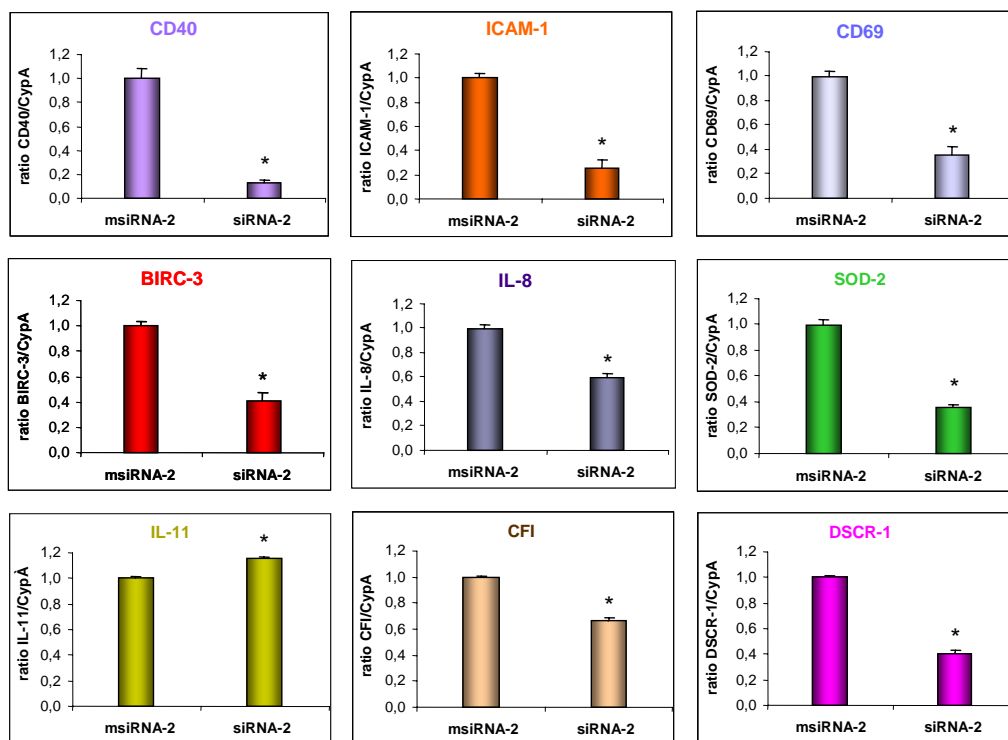


Figura 55. Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR dels transcrits de CD40, ICAM-1, CD69, BIRC-3, IL-8, SOD-2, IL-11, IF i DSCR-1 a 4 hores d'estimulació amb Jurkat D1.1. Els nivells d'expressió s'han normalitzat utilitzant com a gen de referència la ciclofilina. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents (\* $p < 0.05$ ).

Els resultats de validació de l'expressió gènica per qRT-PCR per aquests 8 gens eren totalment concordants amb les dades obtingudes en els experiments de microarrays. La

## Resultats

majoria de gens estarien significativament reprimits a 4 hores d'estimulació excepte la citoquina IL-11, que estaria sobreexpressada en les mostres tractades amb siRNA-2 anti-CD40 en comparació amb les mostres tractades amb el msiRNA-2, tal com indicaven els resultats de microarrays.

Posteriorment es van seleccionar 8 gens més d'interès i es va quantificar la seva expressió per qRT-PCR en els tres temps d'estimulació analitzats: 4, 10 i 16 hores. Entre els gens induïts es va seleccionar la trombomodulina (THBD), i entre els gens reprimits es va escollir la molècula d'adhesió E-selectina, la citoquina CCL2, la metal·loproteasa MMP10, els factors de creixement CSF2 i VEGF, el factor de transcripció FOSB i el factor nuclear NLF2 (Figura 56).

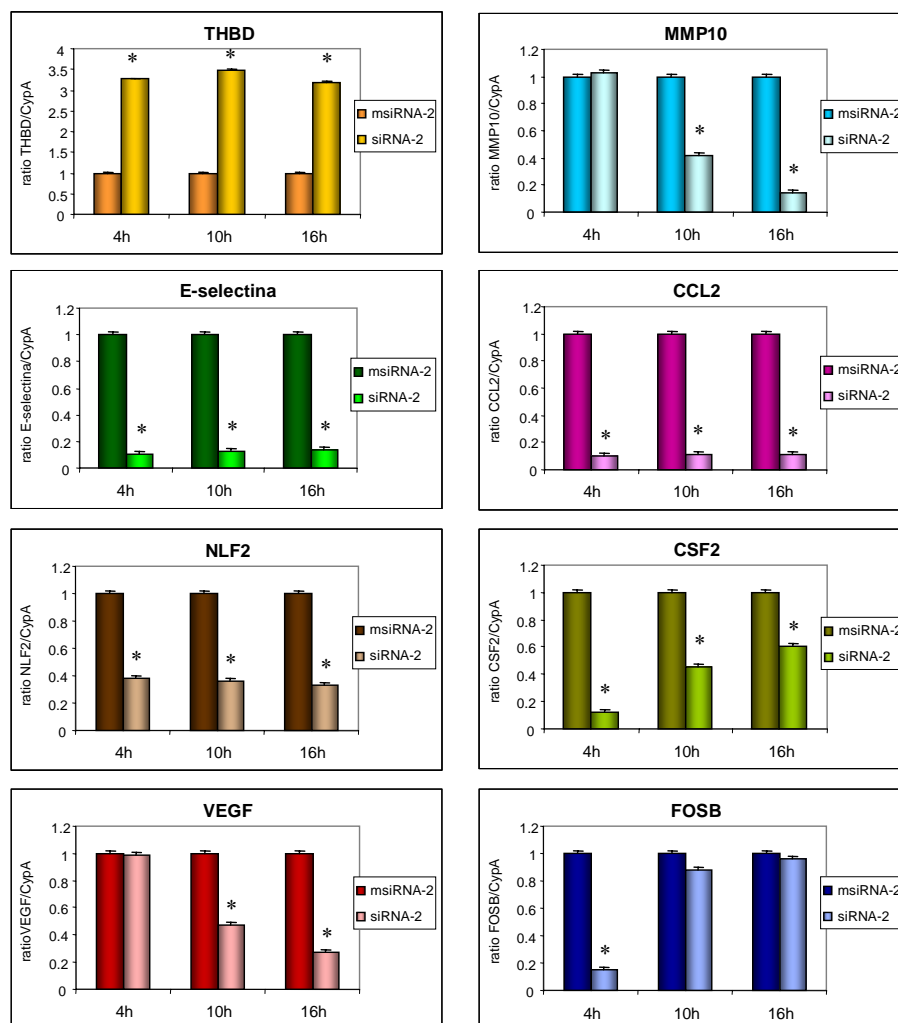


Figura 56. Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR a temps real dels transcrits de THBD, E-selectina, CCL2, MMP10, CSF2, VEGF, FOSB i NLF2, en els tres temps d'estimulació amb Jurkat D1.1. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents (\* $p < 0.05$ ).

Donat que el xip no incloïa una sonda específica per NLF1, l'altre membre de la família de factors nuclears NLF, es va quantificar la seva expressió per qRT-PCR. Tal i com

s'observa a la Figura 57, NLF1 també es trobava reprimint en cèl·lules endotelials on es silenciava CD40 en els tres temps d'estimulació analitzats.

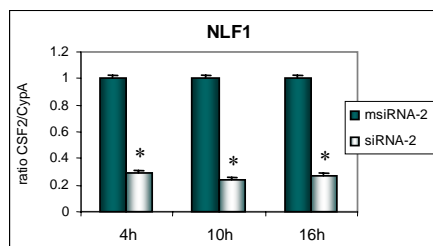


Figura 57. Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR del transcrit de NLF1 en els tres temps d'estimulació. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.2.1.1.1. Comparació dels resultats de Microarrays/qRT-PCR

Després de la validació de les dades de microarrays per qRT-PCR i, per tal d'avaluar el grau de fiabilitat dels resultats, a partir del ratio d'expressió relativa (Log<sub>2</sub>ratio siRNA-2/msiRNA-2) obtingut per RT-qPCR, es va calcular el valor de fold change de cadascun dels gens validats, i es va comparar amb les dades d'expressió dels microarrays (Figura 58).

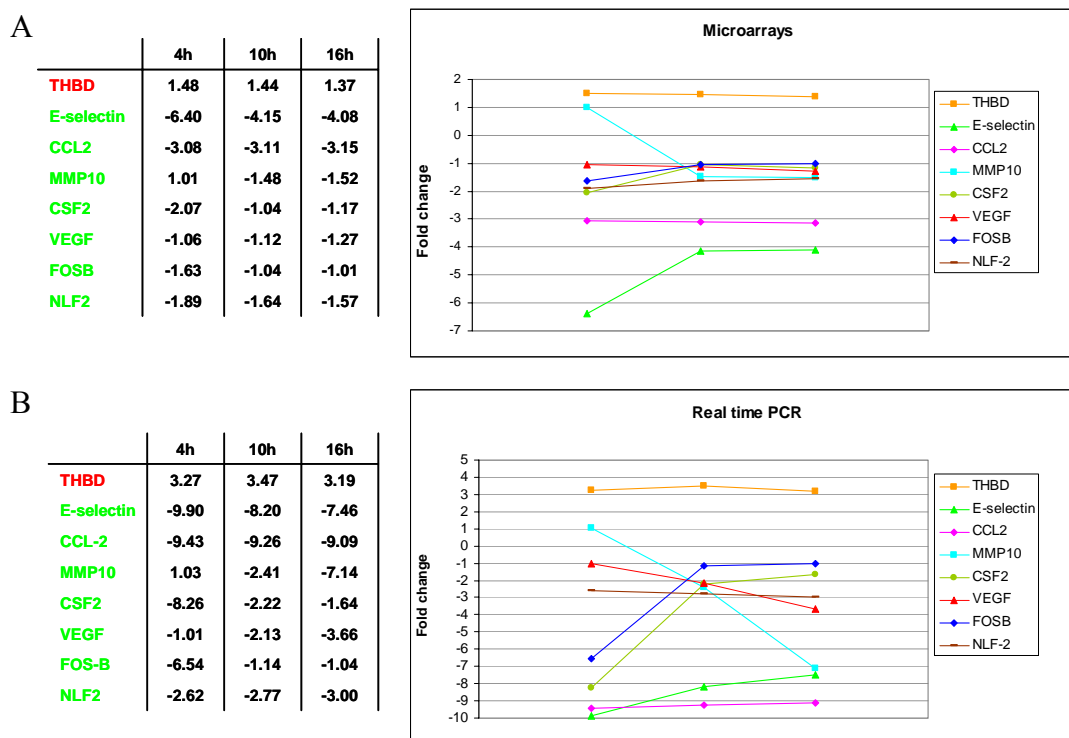


Figura 58. Quantificació de l'expressió dels transcrits de THBD, E-selectina, CCL-2, MMP10, CSF2, VEGF, FOS-B i NLF2 en HUVEC al llarg dels tres temps d'estimulació mitjançant la tecnologia de microarrays (A) o per qRT-PCR a temps real (B).

La validació de les dades confirma la tendència en el patró d'expressió per a tots els gens seleccionats. Les diferències observades es deuen a la diferent robustesa de les dues

## Resultats

tècniques utilitzades. En general, els valors d'expressió obtinguts per qRT-PCR han estat superiors als determinats mitjançant l'anàlisi genòmica. A la Figura 59 es mostren els mateixos resultats comparant l'expressió obtinguda mitjançant microarrays o qRT-PCR per a cada gen individualment.

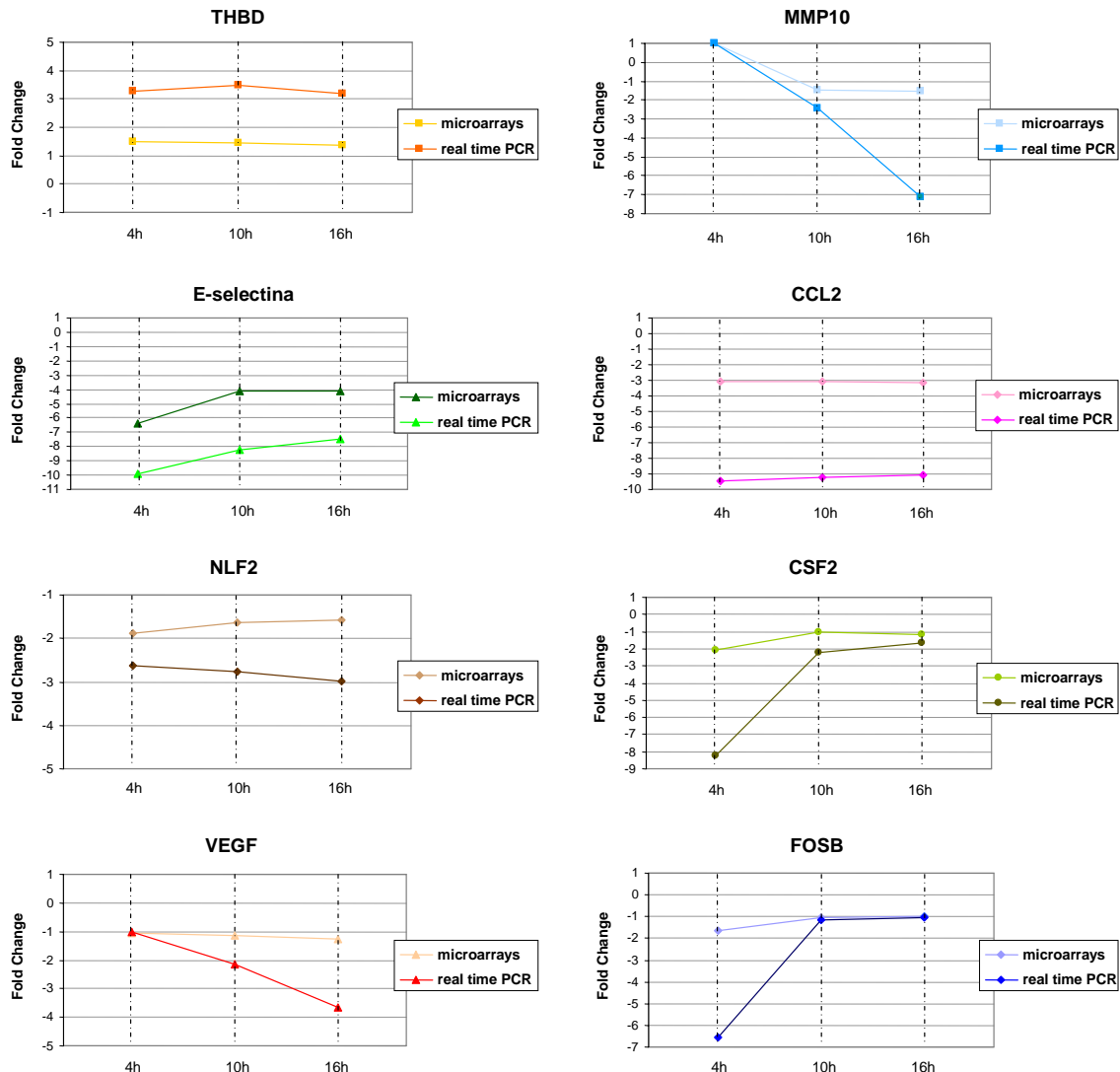


Figura 59. Comparació de l'expressió dels transcrits de THBD, E-selectina, CCL-2, MMP10, CSF2, VEGF, FOS-B i NLF2 en HUVEC al llarg dels tres temps d'estimulació mitjançant la tecnologia de microarrays i per qRT-PCR a temps real.

Per tal d'establir el grau de correspondència entre les dues tècniques, es van estimar els valors de logaritme en base 2 del ratio ( $\text{Log}_2\text{ratio}$ ) a partir de les dades d'expressió obtingudes mitjançant l'anàlisi per qRT-PCR i es van comparar amb els obtinguts en els experiments de microarrays per a la totalitat dels 16 gens i en els tres temps d'estimulació analitzats. Es van representar gràficament els seus valors i es va calcular la recta de regressió. El coeficient de regressió inferior a 0.8 reflecteix la compressió de les dades de microarrays respecte a la qRT-PCR (Figura 60). Les dades dels microarrays concorden amb les dades



d'expressió obtingudes per qRT-PCR, sent aquesta última una tècnica molt més sensible ja que permet detectar diferències d'expressió més petites. La validació realitzada utilitzant aquesta tècnica confirma els resultats de regulació de l'expressió gènica dels microarrays per a tots els gens seleccionats i garanteix la robustesa de les dades obtingudes.

A

	Fold change		Log2ratio	
	Microarrays	RT-PCR	Microarrays	RT-PCR
THBD	1.48	3.27	0.57	1.71
E-selectina	-6.40	-9.90	-2.68	-3.31
CCL2	-3.08	-9.43	-1.62	-3.24
MMP10	1.01	1.03	0.02	0.04
CSF2	-2.07	-8.26	-1.05	-3.05
VEGF	-1.06	-1.01	-0.08	-0.02
FOSB	-1.63	-6.54	-0.70	-2.71
NLF2	-1.89	-2.62	-0.92	-1.39
IL-11	1.22	1.15	0.29	0.21
SOD-2	-1.23	-2.78	-0.30	-1.47
DSCR-1	-1.30	-2.48	-0.38	-1.31
IF	-1.33	-1.52	-0.41	-0.60
IL-8	-1.89	-1.67	-0.92	-0.74
ICAM-1	-2.24	-3.86	-1.16	-1.95
CD69	-2.70	-2.80	-1.43	-1.48
BIRC-3	-3.30	-2.44	-1.72	-1.29
THBD	1.44	3.47	0.53	1.80
E-selectina	-4.15	-8.20	-2.05	-3.04
CCL2	-3.11	-9.26	-1.64	-3.21
MMP10	-1.48	-2.41	-0.57	-1.27
CSF2	-1.04	-2.22	-0.05	-1.15
VEGF	-1.12	-2.13	-0.17	-1.09
FOSB	-1.04	-1.14	-0.06	-0.18
NLF2	-1.64	-2.77	-0.71	-1.47
THBD	1.37	3.19	0.45	1.67
E-selectina	-4.08	-7.46	-2.03	-2.90
CCL2	-3.15	-9.09	-1.66	-3.18
MMP10	-1.52	-7.14	-0.60	-2.84
CSF2	-1.17	-1.64	-0.23	-0.71
VEGF	-1.27	-3.66	-0.34	-1.87
FOSB	-1.01	-1.04	-0.02	-0.06
NLF2	-1.57	-3.00	-0.65	-1.58

B

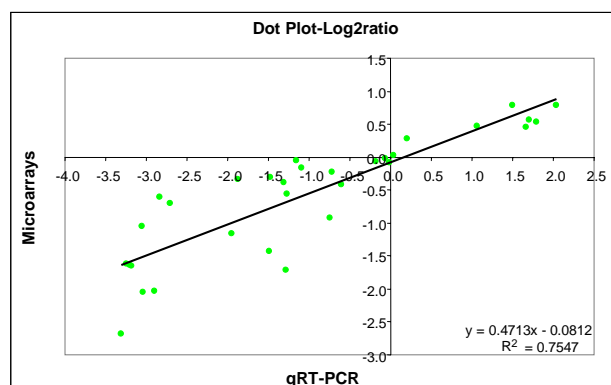


Figura 60. A). Comparació del nivell d'expressió dels diferents gens analitzats expressat en unitats de fold change i Log2ratio, al llarg dels tres temps d'estimulació mitjançant microarrays i qRT-PCR. B). Representació gràfica dels valors d'expressió en Log2ratio obtinguts per els 16 gens analitzats fent servir microarrays i qRT-PCR.

### 4.2.1.2. Anàlisi de les dades de Microarrays

#### 4.2.1.2.1. Anàlisi de *clustering*: K-means

Per tal d'inspeccionar de manera visual l'estructura de les dades i obtenir una aproximació dels diferents nivells de regulació gènica existents en el conjunt de transcrits regulats significativament per CD40, es va utilitzar l'eina de *clustering*. El *clustering* és un mètode exploratori que es fa servir per identificar grups de gens amb un patró de regulació comú. S'espera que gens amb un patró d'expressió similar estiguin relacionats funcionalment o bé intervinguin en una mateixa ruta metabòlica. Inicialment es van aplicar diferents mètodes de *clustering* no jeràrquic, com K-means i SOM (*Self-organising maps*), i un mètode de *clustering* jeràrquic anomenat SOTA (*Self-organising tree algorithm*).

Per tal d'identificar patrons d'expressió similars al llarg dels tres temps d'estimulació, finalment es va escollir el mètode de *clustering* no supervisat-no jeràrquic K-means [284] utilitzant el software TMEV (*TIGR Multiple Experiment Viewer*). Aquest sistema funciona agrupant gens en diferents *clusters* segons el seu patró d'expressió i, a diferència d'altres mètodes, permet fixar prèviament el nombre de *clusters* en que volem dividir la mostra. Es va aplicar l'algorisme K-means a partir de la mitja dels valors d'expressió relativa expressada com a Log2ratio dels 715 transcrits diferencialment regulats, almenys en un dels tres temps d'estimulació amb un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ . Es va fer servir la distància euclídea i, degut al baix nivell de regulació gènica, es va fixar el nombre de *clusters* a 4 (nombre de *clusters* òptim segons l'anàlisi de FOM, *Figure of Merit*, [285]). Posteriorment es va realitzar una anàlisi de sobrerepresentació de categories d'ontologia gènica (*Gene Ontology*) de cada *cluster* individual utilitzant l'eina de classificació funcional EASE. L'objectiu era esbrinar si el grup de gens que formen un *cluster* i comparteixen un mateix patró de regulació, presentaven una funció biològica similar i, obtenir així informació sobre característiques biològiques comunes en cada grup de gens coregulats.

Sovint, per tal d'analitzar de manera global la informació generada en els experiments de microarrays i definir funcions biològiques enriquides, el nombre de gens que han de ser analitzats de manera independent pot arribar a ser de l'ordre de centenars o milers de gens, la qual cosa dóna lloc a un problema de múltiples tests. A causa de l'enorme quantitat de tests a realitzar és probable que alguns d'aquests tests realitzats de manera individual mostrin un resultat significatiu per atzar. Per tant, és necessari fer una correcció per múltiples tests (*Multiple Hypothesis Testing*). Existeixen diferents mètodes, el més simple i conservatiu és el test de Bonferroni que consisteix en multiplicar el p-valor per el nombre total de tests

realitzats [286]. Aquest p-valor dona una indicació del nivell de significància i permet establir una classificació ordenada dels grups de gens més significatius.

Segons l'anàlisi de *clustering*, els 715 transcrits diferencialment regulats es podrien agrupar en 4 *clusters* cadascun dels quals presentaria un patró d'expressió força homogeni. A continuació es mostren els patrons d'expressió d'aquests 4 *clusters* i les categories de GO sobrerrepresentades de manera significativa per aquests grups de gens.

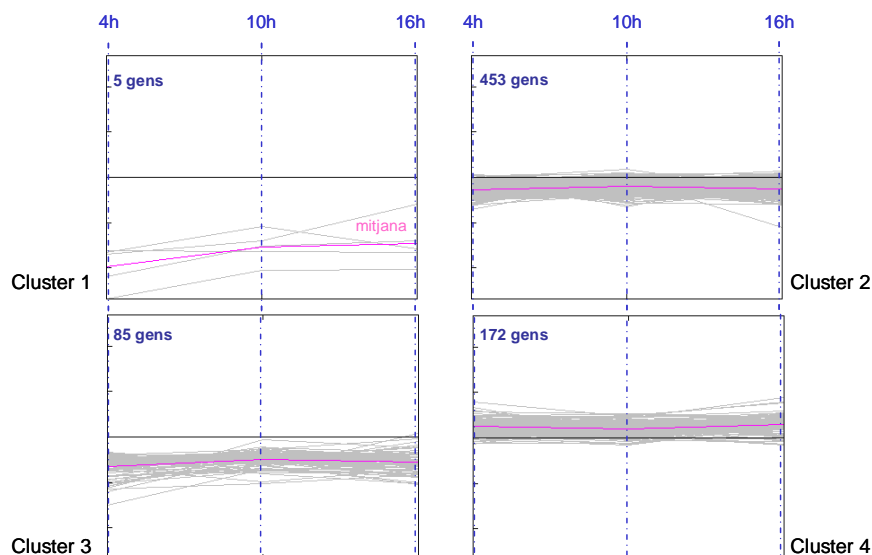


Figura 61. Representació gràfica de l'anàlisi de *clustering* dels patrons d'expressió gènica dels 715 transcrits diferencialment regulats per CD40 amb un  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ , utilitzant l'algoritme K-means implementat en el programa TMEV.

El primer *cluster* correspon a un grup de 5 gens que estarien sobreexpressats en resposta a CD40 a major nivell. Es tracta de gens de resposta primerenca, que presenten una major regulació a 4 hores d'estimulació. Segons l'anàlisi de GO, són gens implicats en quimiotaxi i adhesió cel·lular (amb un p-valor corregit per múltiples tests mitjançant Bonferroni de  $3,66 \times 10^{-2}$ ) (Taula 18). En aquest grup de gens s'hi troben la E-selectina, CCL-2, VCAM-1 i CX3CL1 i el gen antiapoptòtic BIRC-3 (Figura 62).

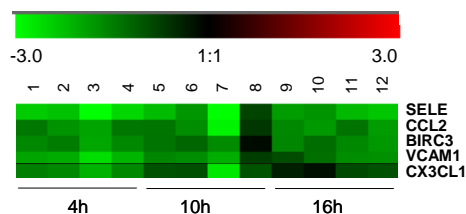


Figura 62. Perfil d'expressió dels gens significativament regulats del *cluster* 1. Els xips del 1-4 corresponen a 4 hores, del 5-8 corresponen a 10 h, i del 9-12 corresponen a 16 hores d'estimulació.

System	Gene Category	List Hits		Population Hits	Population Total	EASE score	Bonferroni
		List	Total				
GO Biological Process	cell adhesion	4	5	610	12843	0.000411	3.66E-02
GO Biological Process	inflammatory response	3	5	182	12843	0.001176	1.05E-01
GO Biological Process	innate immune response	3	5	195	12843	0.001349	1.20E-01
GO Biological Process	response to wounding	3	5	272	12843	0.002607	2.32E-01
GO Biological Process	cell communication	5	5	3156	12843	0.003641	3.24E-01
GO Molecular Function	cell adhesion molecule activity	3	5	371	13220	0.004539	4.04E-01
GO Biological Process	response to pest/pathogen/parasite	3	5	456	12843	0.007197	6.41E-01
GO Molecular Function	chemokine activity	2	5	47	13220	0.014147	1.00E+00
GO Molecular Function	chemokine receptor binding	2	5	47	13220	0.014147	1.00E+00
GO Molecular Function	G-protein-coupled receptor binding	2	5	49	13220	0.014745	1.00E+00
GO Molecular Function	chemoattractant activity	2	5	49	13220	0.014745	1.00E+00
GO Biological Process	immune response	3	5	714	12843	0.017179	1.00E+00
GO Biological Process	defense response	3	5	797	12843	0.021218	1.00E+00
GO Biological Process	response to stress	3	5	803	12843	0.021525	1.00E+00
GO Biological Process	response to biotic stimulus	3	5	866	12843	0.024868	1.00E+00
GO Biological Process	anti-apoptosis	2	5	92	12843	0.028351	1.00E+00
GO Biological Process	negative regulation of apoptosis	2	5	92	12843	0.028351	1.00E+00
GO Biological Process	taxis	2	5	120	12843	0.036858	1.00E+00
GO Biological Process	chemotaxis	2	5	120	12843	0.036858	1.00E+00

Taula 18. Categories de GO sobrerrepresentades en el *cluster* 1 utilitzant l'algoritme K-means.

El segon *cluster* correspon a un grup de gens que estarien lleugerament induïts per CD40 i de manera uniforme en tots tres temps d'estimulació. Entre les categories de GO sobrerrepresentades en aquest cluster es troba la funció immune, el control del cycle cel·lular i proliferació, l'apoptosi, i l'activitat de factors de transcripció. Aquestes vies estarien regulades de manera significativa utilitzant com a criteri estadístic un EASE *score* < 0.05, però no serien significatives fent servir el p-valor corregit per Bonferroni, més estricte i conservatiu que EASE *score*.

System	Gene Category	List Hits		Population Hits	Population Total	EASE score	Bonferroni
		List	Total				
GO Biological Process	regulation of cell cycle	19	248	400	12843	0.000736	7.78E-01
GO Biological Process	response to biotic stimulus	31	248	866	12843	0.001232	1.00E+00
GO Biological Process	immune response	27	248	714	12843	0.00131	1.00E+00
GO Molecular Function	transcription factor binding	14	252	285	13220	0.003163	1.00E+00
GO Biological Process	cell proliferation	35	248	1092	12843	0.003445	1.00E+00
GO Biological Process	cell death	18	248	430	12843	0.004	1.00E+00
GO Molecular Function	transcription cofactor activity	13	252	262	13220	0.00436	1.00E+00
GO Biological Process	death	18	248	434	12843	0.004387	1.00E+00
GO Biological Process	apoptosis	17	248	402	12843	0.004857	1.00E+00
GO Biological Process	programmed cell death	17	248	404	12843	0.00509	1.00E+00
GO Biological Process	cytokinesis	8	248	110	12843	0.00531	1.00E+00
GO Biological Process	defense response	27	248	797	12843	0.005775	1.00E+00
GO Molecular Function	hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity	6	252	61	13220	0.005939	1.00E+00
GO Biological Process	response to pest/pathogen/parasite	18	248	456	12843	0.007105	1.00E+00
GO Molecular Function	manganese ion binding	5	252	45	13220	0.010273	1.00E+00
GO Biological Process	response to stress	26	248	803	12843	0.01181	1.00E+00
GO Biological Process	cell cycle	24	248	726	12843	0.012815	1.00E+00
GO Cellular Component	endoplasmic reticulum	16	242	412	12573	0.013191	1.00E+00
GO Biological Process	response to external stimulus	39	248	1384	12843	0.015159	1.00E+00
GO Molecular Function	oxidoreductase activity; acting on single donors with incorporation of mol	4	252	30	13220	0.018817	1.00E+00
GO Molecular Function	oxidoreductase activity; acting on single donors with incorporation of mol	4	252	31	13220	0.020547	1.00E+00
GO Molecular Function	transition metal ion binding	18	252	521	13220	0.021236	1.00E+00
GO Molecular Function	cytokine binding	5	252	57	13220	0.022852	1.00E+00
GO Biological Process	cell cycle arrest	5	248	57	12843	0.023813	1.00E+00
GO Biological Process	protein metabolism	63	248	2564	12843	0.027405	1.00E+00
GO Molecular Function	oxidoreductase activity; acting on paired donors; with incorporation or re	6	252	90	13220	0.02828	1.00E+00
GO Biological Process	glutamine family amino acid metabolism	4	248	38	12843	0.03617	1.00E+00
GO Biological Process	protein folding	7	248	128	12843	0.037136	1.00E+00
GO Molecular Function	procollagen-proline dioxygenase activity	2	252	2	13220	0.037614	1.00E+00
GO Molecular Function	interferon-gamma receptor activity	2	252	2	13220	0.037614	1.00E+00
GO Molecular Function	procollagen-proline 4-dioxygenase activity	2	252	2	13220	0.037614	1.00E+00
GO Molecular Function	interferon-gamma binding	2	252	2	13220	0.037614	1.00E+00
GO Molecular Function	catalytic activity	106	252	4798	13220	0.038752	1.00E+00
GO Biological Process	protein modification	30	248	1078	12843	0.04075	1.00E+00
GO Molecular Function	growth factor binding	4	252	42	13220	0.045122	1.00E+00
GO Biological Process	collagen catabolism	3	248	18	12843	0.046039	1.00E+00
GO Biological Process	cell adhesion	19	248	610	12843	0.047262	1.00E+00

Taula 19. Categories de GO sobrerrepresentades en el *cluster* 2 utilitzant l'algoritme K-means.

El *cluster* número 3 correspon a un grup de gens que es trobarien induïts per CD40 a nivell intermig i presentarien un patró de regulació desigual entre els diferents temps d'estimulació analitzats, amb una regulació lleugerament superior a 4 hores. Segons l'anàlisi de GO, aquest grup de gens amb un patró de regulació similar es troba significativament implicat en resposta immune, resposta inflamatòria, resposta a estrès, activitat de citoquines i quimioquines, taxi i quimiotaxi (amb un p-valor corregit per Bonferroni d'entre  $10^{-10}$  i  $10^{-2}$ ).

System	Gene Category	List Hits		Population Hits		EASE score	Bonferroni
		List Total	Population Total	List Total	Population Total		
GO Biological Process	response to biotic stimulus	22	51	866	12843	2.08E-12	8.33E-10
GO Biological Process	defense response	21	51	797	12843	4.55E-12	1.82E-09
GO Biological Process	immune response	20	51	714	12843	6.74E-12	2.70E-09
GO Biological Process	response to external stimulus	22	51	1384	12843	1.28E-08	5.13E-06
GO Biological Process	response to wounding	11	51	272	12843	7.49E-08	3.00E-05
GO Biological Process	response to pest/pathogen/parasite	13	51	456	12843	1.24E-07	4.96E-05
GO Biological Process	inflammatory response	9	51	182	12843	4.50E-07	1.81E-04
GO Biological Process	innate immune response	9	51	195	12843	7.61E-07	3.05E-04
GO Molecular Function	chemokine receptor binding	6	51	47	13220	8.58E-07	3.44E-04
GO Molecular Function	chemokine activity	6	51	47	13220	8.58E-07	3.44E-04
GO Molecular Function	cytokine activity	9	51	205	13220	8.96E-07	3.59E-04
GO Molecular Function	chemoattractant activity	6	51	49	13220	1.06E-06	4.25E-04
GO Molecular Function	G-protein-coupled receptor binding	6	51	49	13220	1.06E-06	4.25E-04
GO Biological Process	response to stress	13	51	803	12843	4.39E-05	1.76E-02
GO Biological Process	chemotaxis	6	51	120	12843	9.92E-05	3.98E-02
GO Biological Process	taxis	6	51	120	12843	9.92E-05	3.98E-02
GO Cellular Component	extracellular space	9	49	410	12573	0.000143	5.75E-02
GO Molecular Function	receptor binding	9	51	541	13220	0.000879	3.52E-01
GO Molecular Function	signal transducer activity	19	51	2305	13220	0.001295	5.19E-01
GO Biological Process	response to chemical substance	6	51	240	12843	0.002334	9.36E-01
GO Biological Process	cell-cell signaling	7	51	548	12843	0.018983	1.00E+00
GO Molecular Function	GTP binding	5	51	277	13220	0.02043	1.00E+00
GO Molecular Function	guanyl nucleotide binding	5	51	283	13220	0.021906	1.00E+00
GO Cellular Component	extracellular	11	49	1304	12573	0.023355	1.00E+00
GO Biological Process	cell communication	20	51	3156	12843	0.02401	1.00E+00
GO Cellular Component	cell fraction	8	49	777	12573	0.026973	1.00E+00
GO Molecular Function	enzyme activator activity	4	51	195	13220	0.037332	1.00E+00
GO Biological Process	signal transduction	16	51	2475	12843	0.045564	1.00E+00

Taula 20. Categories de GO sobrerrepresentades en el cluster 3 utilitzant l'algoritme K-means.

Finalment el *cluster* número 4 inclou gens que estarien reprimits per CD40 de manera homogènia en els tres temps d'estimulació analitzats. Encara que no seria significatiu per Bonferroni, aquest *cluster* agrupa un conjunt de gens amb funcions relacionades amb el procés d'hemostàsia i coagulació sanguínia, l'activació de MAPKs, l'organització del citoesquelet d'actina i la unió de glicosaminglicans, amb un EASE score > 0.05.

System	Gene Category	List Hits		Population Hits		EASE score	Bonferroni
		List Total	Population Total	List Total	Population Total		
GO Biological Process	MAPKKK cascade	5	105	52	12843	0.000815	5.22E-01
GO Cellular Component	cytoplasm	55	105	4819	12573	0.0032	1.00E+00
GO Molecular Function	glycosaminoglycan binding	5	107	84	13220	0.00461	1.00E+00
GO Biological Process	obsolete biological process	11	105	505	12843	0.007731	1.00E+00
GO Biological Process	activation of MAPK	3	105	17	12843	0.00816	1.00E+00
GO Molecular Function	cytoskeletal protein binding	8	107	323	13220	0.015138	1.00E+00
GO Biological Process	cell surface receptor linked signal transduction	17	105	1126	12843	0.01865	1.00E+00
GO Cellular Component	endoplasmic reticulum	9	105	412	12573	0.020797	1.00E+00
GO Biological Process	response to wounding	7	105	272	12843	0.023094	1.00E+00
GO Biological Process	actin cytoskeleton organization and biogenesis	4	105	77	12843	0.024494	1.00E+00
GO Biological Process	actin filament-based process	4	105	80	12843	0.02704	1.00E+00
GO Biological Process	signal transduction	29	105	2475	12843	0.035128	1.00E+00
GO Biological Process	cell communication	35	105	3156	12843	0.037561	1.00E+00
GO Molecular Function	phosphorylase activity	2	107	5	13220	0.039459	1.00E+00
GO Biological Process	blood coagulation	4	105	93	12843	0.039636	1.00E+00
GO Molecular Function	signal transducer activity	27	107	2305	13220	0.039824	1.00E+00
GO Biological Process	protein kinase cascade	5	105	166	12843	0.045794	1.00E+00
GO Biological Process	hemostasis	4	105	99	12843	0.046293	1.00E+00
GO Biological Process	intracellular signaling cascade	13	105	864	12843	0.046312	1.00E+00
GO Biological Process	organelle organization and biogenesis	8	105	414	12843	0.050802	1.00E+00

Taula 21. Categories de GO sobrerrepresentades en el cluster 4 utilitzant l'algoritme K-means.

#### 4.2.1.2.2. Anàlisi per SAM

Es va realitzar una anàlisi per SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), un algoritme desenvolupat a la Universitat de Stanford [287] i implementat en el programa TMEV. Aquesta eina estadística es va utilitzar per trobar gens diferencialment expressats de manera significativa entre els diferents temps d'estimulació de la via de senyalització de CD40.

A partir dels valors d'expressió gènica dels experiments de microarrays i tenint en compte la variable temps d'estimulació com a variable resposta, el programa SAM computa un estadístic per a cada gen i mesura la força de la relació de l'expressió gènica entre el control i la variable resposta. Utilitza una sèrie de permutacions de les dades per determinar si l'expressió diferencial de cadascun d'aquests gens està relacionada significativament amb la resposta. El punt de tall per a la significància es fixa fent servir el valor de delta ( $\delta$ ), un paràmetre que permet controlar la FDR (*false discovery rate*). FDR és un mètode estadístic utilitzat en test d'hipòtesi múltiple que corregeix per comparacions múltiples i controla la probabilitat d'obtenir un fals positiu en l'anàlisi [288]. Es tracta d'un mètode menys astringent que Bonferroni, utilitzat anteriorment.

El programa SAM genera un *plot* on representa cadascun dels gens analitzats i li assigna un valor en la distribució real comparada amb la distribució esperada per atzar. Els gens diferencialment expressats són aquells que es troben a una distància ortogonal  $>\delta$  respecte a la recta.

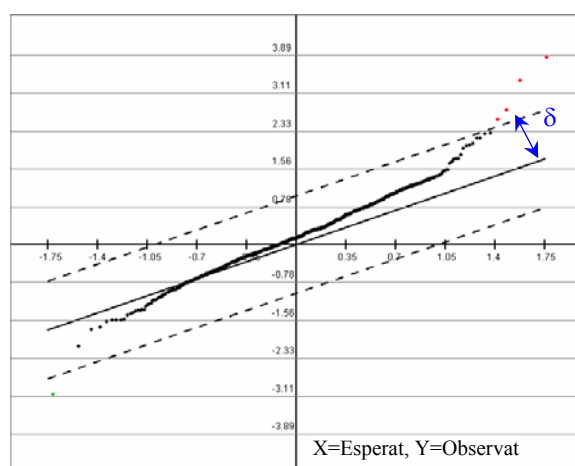


Figura 63. Representació del SAM *plot* obtingut en l'anàlisi per SAM a partir del llistat amb les dades d'expressió en Log2ratio de la totalitat dels gens del xip. El valor de  $\delta$  es va ajustar per tal de fixar FDR=0.

Fent servir aquest programa i fixant una FDR del 0% (0 gens falsos positius), es van analitzar les dades d'expressió dels 12 xips comparant siRNA-2/msiRNA-2 a temps curt

respecte als temps més llargs d'estimulació (4 hores contra 10/16 hores). Es podria treballar amb  $FDR > 0$ , el que implica tolerar un nombre prefixat de falsos positius.

De la totalitat de gens del xip, es van trobar 5 gens que estarien diferencialment regulats a  $FDR 0\%$  entre els dos períodes de temps d'estimulació analitzats. Es van trobar 4 *positive significant genes* (FOSB, CSF2, CD69 i TNFAIP2) o gens de resposta immediata regulats a temps curt, estant la seva expressió incrementada a 4 hores, però no a 10 ni a 16 hores d'estimulació. Contràriament, la metal·loproteasa MMP10, anomenada *negative significant gene*, seria un gen de resposta tardana que estaria induït a temps llargs (10 i 16 hores) però no a temps curts (4 hores).

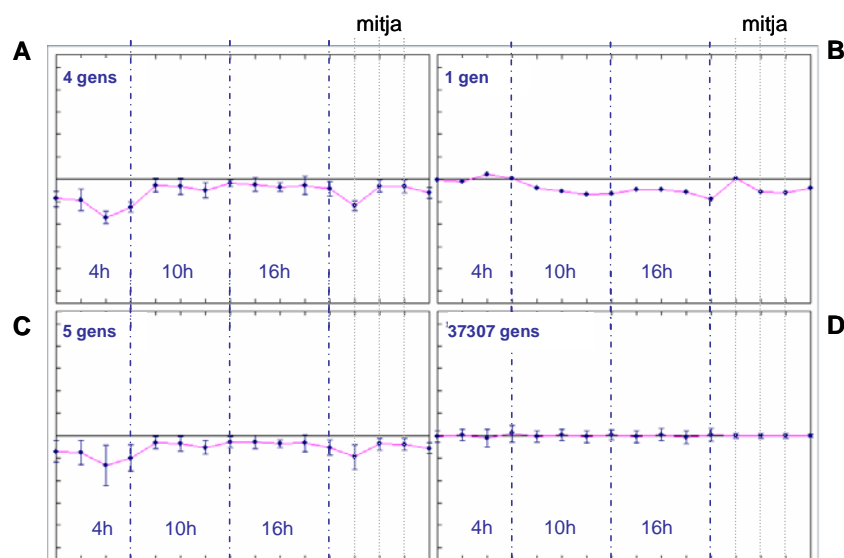


Figura 64. Representació del patró d'expressió dels gens diferencialment regulats entre 4 i 10/16 hores d'estimulació segons l'anàlisi per SAM. A). Gens significativament regulats a 4 hores respecte 10 i 16 hores. B). Gens significativament regulats a 10 i 16 hores respecte 4 hores. C). Gens significativament regulats. D). Gens no regulats.

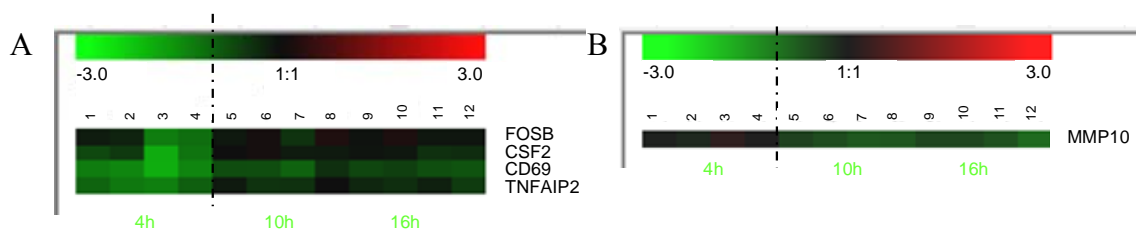


Figura 65. Perfil d'expressió dels gens diferencialment regulats entre 4 i 10/16 hores d'estimulació segons l'anàlisi per SAM. A). Gens induïts a temps curt (4 hores). B). Gen induït a temps llargs (10-16 hores). Els xips del 1-4 corresponen a 4 hores, del 5-8 corresponen a 10 hores, i del 9-12 a 16 hores d'estimulació.

En el cas del factor de transcripció FOSB, la citoquina CSF2 i la metal·loproteasa MMP10, el seu patró d'expressió al llarg dels tres temps d'estimulació ja havia estat validat per qRT-PCR a temps real. En els tres casos es van confirmar els resultats obtinguts en els

## Resultats

experimentos de microarrays. Es tracta de gens diferencialment regulats entre els diferents temps d'estimulació analitzats: FOS-B i CSF2 són gens de resposta primerenca i MMP10 és un gen de resposta tardana.

Es va realitzar una anàlisi d'expressió diferencial per SAM comparant 4 hores respecte 16 hores (FDR=0). En aquest cas entre els gens diferencialment regulats, a més dels anteriors trobem la molècula d'adhesió VCAM-1, el factor de transcripció EGR1 i la quimioquina CX3CL1 com a gens de resposta primerenca, i el lligand del receptor Notch, JAG1, com a gen induït de manera tardana.

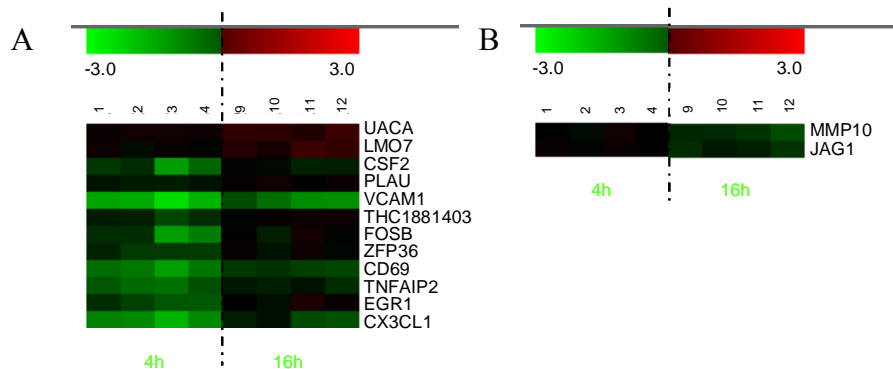


Figura 66. Perfil d'expressió dels gens diferencialment regulats entre 4 i 16 hores d'estimulació segons l'anàlisi per SAM. A). Gens induïts a 4 hores respecte 16 hores. B). Gens induïts a 16 hores respecte 4 hores. Els xips del 1-4 corresponen a 4 hores i del 9-12 a 16 hores d'estimulació.

### 4.2.1.2.3. Anàlisi d' anotació funcional

La finalitat de l'anàlisi d'anotació funcional és estudiar blocs de gens i veure si aquests estan funcionalment relacionats. Es basa en determinar si gens amb patrons d'expressió similars comparteixen una mateixa funció biològica per tal d'identificar funcions predominantment alterades en la situació experimental estudiada.

### Anàlisi de FATIGO

El programa FATIGO+ implementat per GEPAS, compara dos grups de gens i permet analitzar categories de *Gene Ontology*, *KEGG pathways*, *Swissprot*, TFBSs (*Transcription Factor Binding Site*) o *CisRed motifs* sobrerrepresentades de manera significativa en un dels grups respecte l'altre. El programa realitza un test de Fisher ajustat per múltiples tests.

Es va fer servir aquest programa per determinar si dintre del grup de gens diferencialment regulats hi havia alguna categoria de *Gene Ontology*, ruta metabòlica o lloc d'unió a factor de transcripció sobrerrepresentat en comparació amb la resta de gens del xip. Per realitzar aquesta anàlisi es va fer servir el llistat dels 715 transcrits diferencialment regulats almenys en un dels tres temps d'estimulació amb un criteri de tall de |fold change|



$\geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ . Es va fixar el valor de significància a  $FDR_{qval} < 0.05$ . L'anàlisi es va fer utilitzant les bases de dades de GO i KEGG *pathway*.

L'objectiu del projecte *Gene Ontology* és proporcionar un conjunt de vocabulari controlat per a la descripció i classificació de gens dins les categories de Procés Biològic, Funció Molecular i Component Cel·lular. Les categories de GO mantenen una estructura jeràrquica, anomenada *gene ontology tree*, que permet moure's en un rang molt ampli, des de nivells superiors amb termes descriptius de GO més generals fins a nivells inferiors amb termes de GO altament específics. A partir de les dades d'expressió, aquest arbre de GO permet investigar si existeixen grups funcionals amb patrons de regulació comuns. En el moment de realitzar aquesta anàlisi, de la totalitat de gens coneguts dins el genoma humà, només una part (15.403 gens) estaven anotats a *Gene Ontology*, el 82% (12.776 gens) en la categoria de Procés Biològic, el 90% en la categoria de Funció Molecular (13.902 gens) i el 76% en la categoria de Component Cel·lular (11.740 gens).

L'anàlisi FATIGO+ utilitzant la base de dades de GO en la categoria de Procés Biològic, va mostrar els termes de resposta immune, resposta inflamatòria, resposta a estímuls externs, taxi i quimiotaxi, com a processos biològics sobrerrepresentats a diferents nivells en el grup de gens regulats comparat amb la resta de gens del xip. Els p-valor ajustats per FDR en cadascuna de les categories de GO-procés biològic es mostren a la Figura 67.

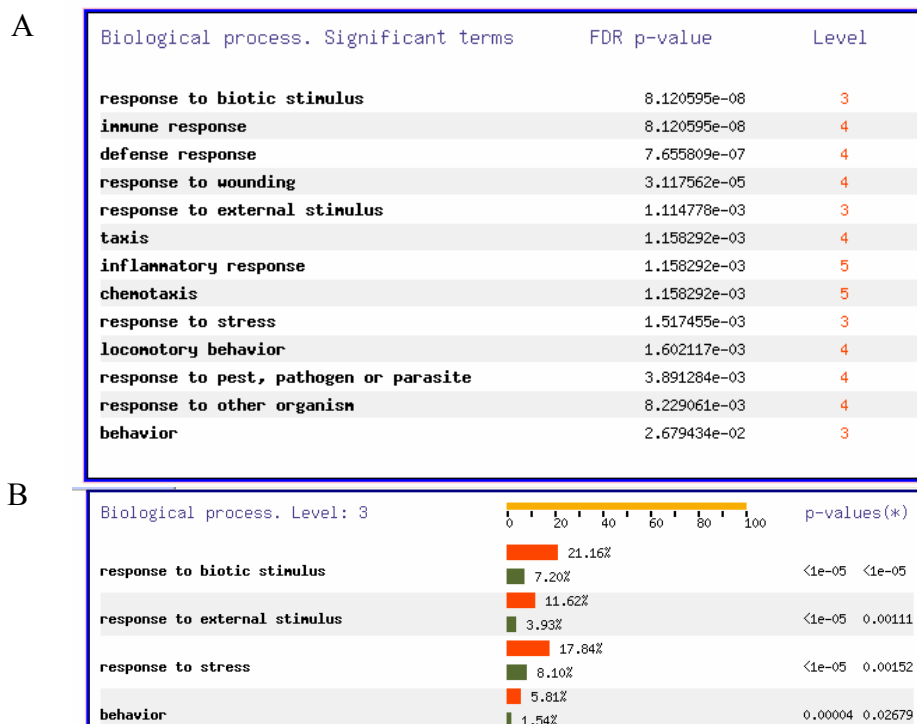


Figura 67. A). Categories de GO-Procés Biològic significatives en el conjunt de gens regulats (p-valor corregit  $< 0.05$ ). B). Distribució gràfica de les freqüències observades contra esperades per atzar de cada categoria de GO amb p-valor no corregit (esquerra) i p-valor ajustat per FDR (dreta).

## Resultats

La mateixa anàlisi utilitzant la base de dades de GO, en la categoria de Funció Molecular, va mostrar l'activitat de citoquines i quimioquines, i la unió a receptors de quimioquines i receptors associats a proteïna G com a categories de GO sobrerrepresentades de manera significativa en el grup de gens regulats amb una FDR  $q_{val} < 0.05$ .

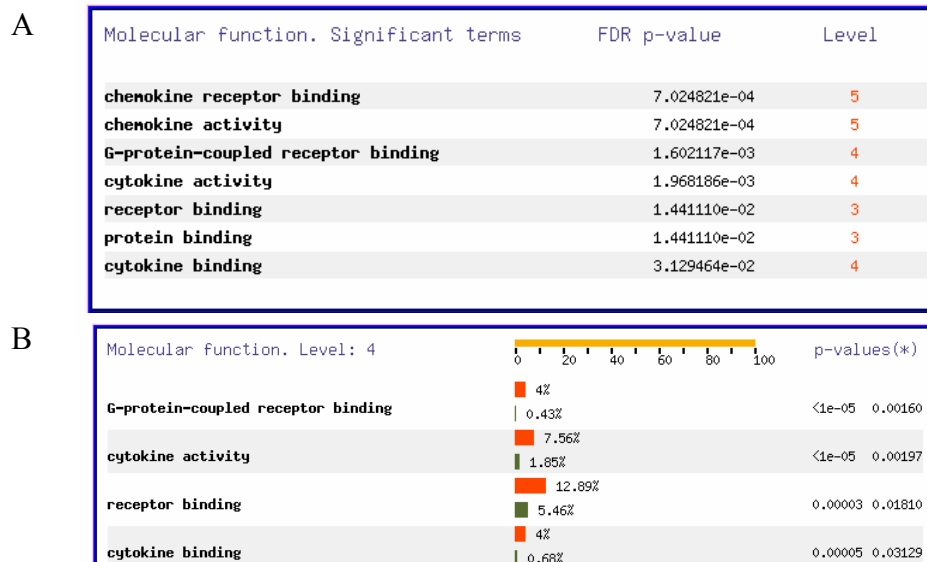


Figura 68. A). Categories de GO-Funció Molecular significatives en el conjunt de gens regulats comparat amb la resta de gens del xip (p-valor corregit  $< 0.05$ ). B). Distribució gràfica de les freqüències observades contra esperades per atzar de cada categoria de GO de nivell 4, amb p-valor no corregit (esquerra) i p-valor ajustat per FDR (dreta).

Es va fer la mateixa anàlisi de FATIGO+ comparant amb la base de dades de **KEGG pathways** (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Aquesta base de dades va ser desenvolupada per el *Human Genome Center of the University of Tokyo* amb l'objectiu de computeritzar el coneixement actual sobre interaccions moleculars i vies metabòliques. A partir de les dades d'expressió gènica i fent servir FATIGO+, es va assignar informació de les rutes metabòliques sobrerrepresentades en el conjunt de gens analitzats.

Aquesta anàlisi va mostrar la via d'interacció de citoquines i la via de senyalització de *Toll like receptor*, com a vies significativament sobrerrepresentades tant a 4 hores com a 16 hores d'estimulació amb una FDR  $q_{val} < 0.05$ .

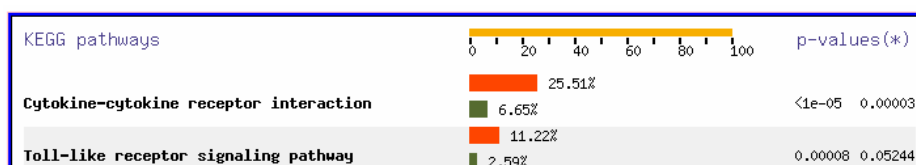


Figura 69. Representació gràfica de les freqüències observada versus esperada de les vies metabòliques significativament sobrerrepresentades en el conjunt de gens regulats amb un p-valor corregit  $< 0.05$ . p-valor no corregit (esquerra) i p-valor ajustat per FDR (dreta).

---

### *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)*

Per analitzar grups de gens amb una funció biològica o mecanisme de regulació comú, es va utilitzar una eina estadística anomenada GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Es va fer servir l'aplicació GSEA en versió java, un software desenvolupat al *Massachusetts Institute of Technology* (MIT). Es tracta d'una eina útil per detectar blocs de gens funcionalment relacionats en el cas que existeixi un baix nivell de regulació o l'anàlisi de microarrays mostri pocs gens regulats de manera significativa.

L'anàlisi per GSEA és un mètode computacional que determina si, a priori, un conjunt definit de gens mostra diferències estadísticament significatives entre dos estats biològics. La definició d'aquests conjunts de gens és de gran importància, donat que, com millor representin un programa transcripcional específic o un procés rellevant per a un estat cel·lular en particular, millor treballaran com a "sondes" de GSEA. A diferència del programa implementat per GEPAS, que utilitza les bases de dades de GO, KEGG pathway i TransFac, l'anàlisi per GSEA fent servir la versió en java del GSEA-p *software* fa servir una col·lecció de bases de dades que ells mateixos han generat anomenada MSigDB 1.0 (*Molecular Signature Database*) que conté 4 categories o bases de dades de gens (C1, C2, C3 i C4) que representen un total de 1325 grups de gens. Dins d'aquesta col·lecció, nosaltres hem fet servir principalment la base de dades funcional anomenada C2. Aquesta base de dades a la versió 1.01, recull informació sobre 475 vies de senyalització i rutes metabòliques obtingudes a partir de 10 bases de dades públiques: BioCarta, *Signaling pathway database*, *Signaling gateway*, *Signal transduction knowledge environment*, *Human protein reference database*, GenMAPP, *Gene Ontology*, *Sigma Aldrich pathways*, *Gene arrays*, *BioScience corporation*, i *Human cancer genome anatomy consortium*. A més incorpora informació sobre 51 sets amb dades d'expressió gènica causades per pertorbacions genètiques i químiques i que han estat recopilades a partir de diversos resultats experimentals recollits a la literatura.

Mitjançant aquesta anàlisi per GSEA, més sensible, es volia determinar quines altres funcions o processos biològics no evidenciats anteriorment per EASE o FATIGO, estarien afectats comparant el tractament amb siRNA-2 o msiRNA-2 en cadascun dels 3 temps d'estimulació. Per altra banda, també es va voler comparar si hi havia funcions biològiques diferencialment regulades entre els diferents temps d'estimulació analitzats. Per a aquesta anàlisi es van utilitzar les dades d'expressió de la totalitat de gens del xip, a diferència d'anàlisis anteriors on es va fer servir un subconjunt de gens filtrats amb un determinat criteri de FC i B rank. Es van considerar els valors d'intensitat d'expressió en el cas de comparar tractament amb siRNA-2 respecte msiRNA-2, o els valors d'expressió en forma de Log2ratio,

en el cas de comparar temps d'estimulació entre si.

L'aplicació GSEA analitza grups de gens i calcula un *Enrichment Score* (ES) que indica el grau en què un determinat grup de gens està acumulat cap a un extrem a la llista total de gens ordenada segons els valors relatius d'expressió. Al mateix temps fa una estimació del nivell de significància d'aquest ES donant un p-valor ajustat per múltiples tests. L'*Enrichment plot* representa la posició de tots els gens d'un grup concret, dins la llista ordenada segons els valors d'expressió relativa. Quant més a l'extrem de la llista es troba un gen, més contribueix al càlcul d'aquest grau d'enriquiment calculat sumant un valor cada vegada que hi ha un gen del grup analitzat, i restant un altre valor si el gen no pertany al grup. El resultat és la generació d'una corba. La part de la corba que precedeix el màxim és el *leading edge*, que mesura el biaix del grup i el seu enriquiment en els valors extrems d'expressió relativa.

A continuació es proposa un model d'activació endotelial per CD40 segons l'anàlisi temporal de la resposta transcripcional. Es mostra el conjunt de processos biològics que estarien significativament regulats per CD40 en cèl·lules endotelials com a conseqüència de la seva interacció amb el CD40L expressat en els limfòcits T a diferents temps d'estimulació.

### **Regulació després de 4 hores d'estimulació de la via CD40/CD40L**

L'anàlisi per GSEA a 4 hores d'estimulació indicaria que té lloc una resposta cel·lular primerenca, on hi ha una sèrie de processos biològics que es troben induïts de forma significativa i concorden amb un fenotip "activador" de CD40. La interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials activaria entre altres, vies de transducció de senyals proinflamatòries, com la via de NFκB i Ca-NFAT (Figura 70), implicades en el control de l'expressió de gens amb funció immune i inflamatòria. També estarien activades altres vies de transducció de senyals proinflamatòries com PI3K/AKT i la via de les MAPKs (p38, JNK i Erk). Al mateix temps, segons GSEA, podria haver-hi una activació de factors de transcripció i la inducció de gens amb funció immune i inflamatòria.

L'activació primerenca de les cèl·lules endotelials via CD40-CD40L faria que aquestes cèl·lules adquirissin un estat de proadhesió, amb la inducció de l'expressió, a la seva superfície cel·lular, de diferents molècules d'adhesió leucocitàries (CAM) (Figura 70), entre elles ICAM-1 i E-selectina (validades per qRT-PCR), i induiria la producció i alliberament de citoquines proinflamatòries que promouen l'ancoratge i extravasació dels leucòcits activats al lloc d'inflamació.

Al mateix temps, les cèl·lules adquiririen un fenotip antiapoptòtic, amb la inducció de l'expressió de gens de la via de les caspases com BIRC-2 i BIRC-3 (validat per qRT-PCR),

membres de la família d'inhibidors de l'apoptosi (IAPs).

Aquesta activació endotelial primerenca desencadenada per CD40, estimularia altres sistemes “d'alerta” o vigilància capaços de detectar perill i actuar en conseqüència protegint la cèl·lula d'insults nocius. Entre els mecanismes d'alerta activats per CD40 hi hauria la via del bacteri Gram- NTHi (*Nontypeable Haemophilus influenzae*), la via de ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), *Granule cell survival pathway* i *FcεR1 pathway*. També es trobarien induïdes la via del IL1R, amb un paper important en la regulació de la resposta inflamatòria incrementant l'expressió de molècules d'adhesió, la via de TNF, citoquina involucrada en inflamació, proliferació i diferenciació, i la via de *Toll like receptor* (Figura 70).

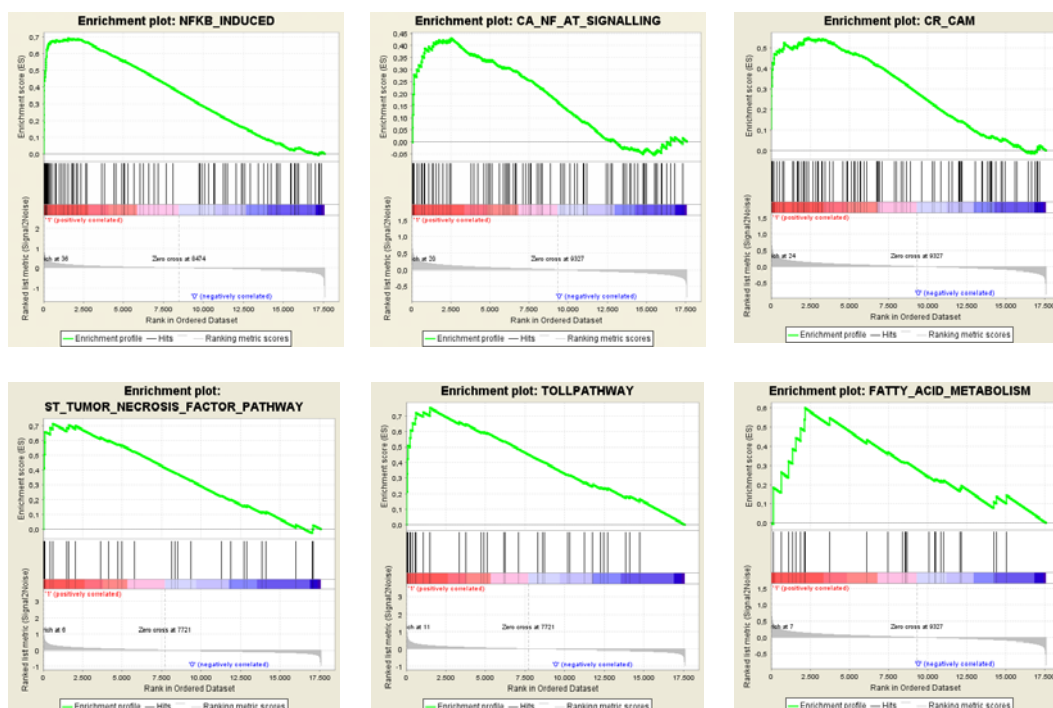


Figura 70. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament activades a 4 hores d'estimulació en el conjunt de gens regulats amb un FDR <0.25.

En aquesta situació es produeixen alteracions metabòliques importants que reflecteixen un increment en la despesa energètica com a conseqüència de l'estat d'activació cel·lular. Entre d'altres, segons GSEA, hi hauria un augment del metabolisme de piruvat, un increment en la producció d'insulina, un increment en la taxa d'utilització de glucosa, i una major degradació d'aminoàcids de cadena ramificada (valina i isoleucina). Entre altres funcions, aquest augment de la despesa energètica cel·lular en resposta a l'activació primerenca de CD40 implicaria també un increment del metabolisme d'àcids grassos, per exemple amb l'activació de la via de PPARA (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), i donaria lloc a un augment en el procés de fosforilació oxidativa (Taula 22).

En aquest estadi d'activació endotelial primerenca, també tindria lloc una activació de la

via del proteasoma amb la inducció de molècules involucrades en la presentació d'antigen.

Segons l'anàlisi per GSEA, la matriu extracel·lular (ECM *pathway*), seria la única categoria gènica significativament inhibida 4 hores després de la interacció CD40-CD40L (Taula 22), suggerint un augment de la permeabilitat vascular conseqüència de l'activació endotelial per tal de permetre la diapedesi dels leucòcits adherits a través de l'endoteli.

Rank	Up-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	NFKB_INDUCED	0.76	2.23	0.000	0.018
2	IL1RPATHWAY	0.68	2.12	0.000	0.018
3	TOLL_PATHWAY	0.75	2.07	0.000	0.018
6	NFKB_PATHWAY	0.71	2.02	0.000	0.020
7	CR_IMMUNE_FUNCTION	0.61	1.98	0.000	0.021
8	CR_CAM	0.58	1.97	0.000	0.021
10	ATM_PATHWAY	0.70	1.96	0.000	0.020
11	STRESS_PATHWAY	0.68	1.96	0.000	0.020
14	TNFR2_PATHWAY	0.77	1.87	0.000	0.024
15	TNF_AND_FAS_NETWORK	0.71	1.84	0.000	0.027
16	HUMAN_CD34_ENRICHED_TF_JP	0.39	1.83	0.000	0.029
17	EMT_UP	0.62	1.83	0.000	0.029
29	CYTOKINE_PATHWAY	0.69	1.73	0.000	0.048
31	INFLAM_PATHWAY	0.70	1.72	0.000	0.047
34	CELL_ADHESION_MOLECULE_ACTIVITY	0.47	1.71	0.000	0.049
36	P38MAPK_PATHWAY	0.51	1.67	0.000	0.060
37	CA_NF_AT_SIGNALLING	0.48	1.67	0.000	0.060
42	RAR_UP	0.55	1.63	0.028	0.072
43	MITOCHONDRIA_PATHWAY	0.53	1.61	0.000	0.078
46	DRUG_RESISTANCE_AND_METABOLISM	0.39	1.59	0.000	0.080
48	ST_JNK_MAPK_PATHWAY	0.50	1.59	0.044	0.079
50	PPARA_PATHWAY	0.42	1.56	0.036	0.091
53	MAPK_PATHWAY	0.45	1.56	0.065	0.090
56	CR_TRANSCRIPTION_FACTORS	0.50	1.54	0.000	0.098
57	ST_ERK1_ERK2_MAPK_PATHWAY	0.46	1.54	0.044	0.097
58	MAPK_CASCADE	0.53	1.54	0.046	0.095
60	FATTY_ACID_METABOLISM	0.50	1.53	0.000	0.097
61	CASPASE_PATHWAY	0.60	1.53	0.040	0.096
63	SIG_CD40PATHWAYMAP	0.47	1.53	0.080	0.098
80	INSULIN_PATHWAY	0.48	1.45	0.049	0.130
83	FCER1_PATHWAY	0.39	1.42	0.041	0.146
88	AKT_PATHWAY	0.51	1.39	0.070	0.156
89	GLUCOSE_DOWN	0.37	1.39	0.128	0.157
90	CELL_ADHESION	0.36	1.38	0.141	0.164
95	MAP00120_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	0.41	1.34	0.140	0.199
101	PROTEASOME_PATHWAY	0.53	1.31	0.213	0.210
105	INSULIN_2F_UP	0.36	1.29	0.232	0.229
Rank	Down-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	ECM_PATHWAY	-0.58	-1.86	0.000	0.176

Taula 22. Vies o grups de gens significativament activats o inhibits (FDR<0.25) a 4 hores d'estimulació. ES, *enrichment score*; NES, *normalized enrichment score*; NOM p-val, nominal p-value; FDR q-val, *false discovery rate*.

### Regulació després de 10 hores d'estimulació de la via CD40/CD40L

La tendència observada a 4 hores d'estimulació de la via de senyalització CD40-CD40L, es manté 10 hores després de la interacció entre la cèl·lula endotelial i el limfòcit T (CD40L<sup>+</sup>). En aquest estat d'activació endotelial es mantindria la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió, la inducció de les vies de senyalització de NFκB, Ca-NFAT, i MAPKs, un increment en el metabolisme d'àcids grassos, la degradació d'aminoàcids de cadena ramificada, la inducció de la via de TNF i l'activació de la via de *Toll like receptor* (Taula 23). A 10 hores postinducció no hi hauria cap funció gènica significativament reprimida.

Rank	Up-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	CR_CAM	0.55	2.09	0.000	0.015
2	NFKB_INDUCED	0.64	2.08	0.000	0.015
3	MATRIX_METALLOPROTEINASES	0.65	2.02	0.000	0.019
6	FATTY_ACID_METABOLISM	0.60	1.95	0.000	0.023
8	TNF_AND_FAS_NETWORK	0.65	1.90	0.000	0.023
10	RAR_UP	0.63	1.82	0.000	0.029
12	CR_IMMUNE_FUNCTION	0.49	1.77	0.000	0.040
13	CELL_CYCLE_ARREST	0.44	1.71	0.000	0.067
16	TNFR2_PATHWAY	0.64	1.66	0.000	0.084
17	NTHL_PATHWAY	0.62	1.66	0.000	0.080
18	CA_NF_AT_SIGNALLING	0.43	1.66	0.000	0.078
21	MITOCHONDRIA_PATHWAY	0.53	1.62	0.048	0.089
22	CR_TRANSCRIPTION_FACTORS	0.49	1.62	0.000	0.087
26	EMT_UP	0.55	1.60	0.000	0.095
27	TOLL_PATHWAY	0.56	1.60	0.026	0.093
28	IL1RPATHWAY	0.52	1.59	0.030	0.098
35	PPARA_PATHWAY	0.44	1.55	0.000	0.115
36	CELL_ADHESION	0.36	1.55	0.017	0.113
37	ST_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_PATHWAY	0.63	1.54	0.000	0.120
38	NFKB_PATHWAY	0.58	1.54	0.000	0.120
39	CELL_ADHESION_MOLECULE_ACTIVITY	0.39	1.54	0.000	0.117
44	STRESS_PATHWAY	0.55	1.51	0.000	0.135
48	DRUG_RESISTANCE_AND_METABOLISM	0.38	1.50	0.000	0.136
51	INFLAMMATORY_RESPONSE_PATHWAY	0.44	1.49	0.103	0.139
55	CYTOKINE_PATHWAY	0.69	1.46	0.030	0.161
56	INFLAM_PATHWAY	0.59	1.46	0.030	0.170
60	CELL_ADHESION_RECEPTOR_ACTIVITY	0.42	1.44	0.031	0.181
61	CASPASE_PATHWAY	0.60	1.53	0.040	0.096
62	IL6_PATHWAY	0.57	1.41	0.077	0.216

Taula 23. Vies o grups de gens significativament activats (FDR<0.25) a 10 hores d'estimulació. ES, *enrichment score*; NES, *normalized enrichment score*; NOM p-val, nominal p-value; FDR q-val, *false discovery rate*.

En aquest estadi d'activació endotelial, s'observa una inducció de l'expressió de metal·loproteases o proteïnes degradadores de la matriu extracel·lular (MMPs) (Figura 71), entre elles MMP10 (validat per qRT-PCR), una metal·loproteasa rellevant en la remodelació tissular. Aquest fet és consistent amb l'inici del procés angiogènic.

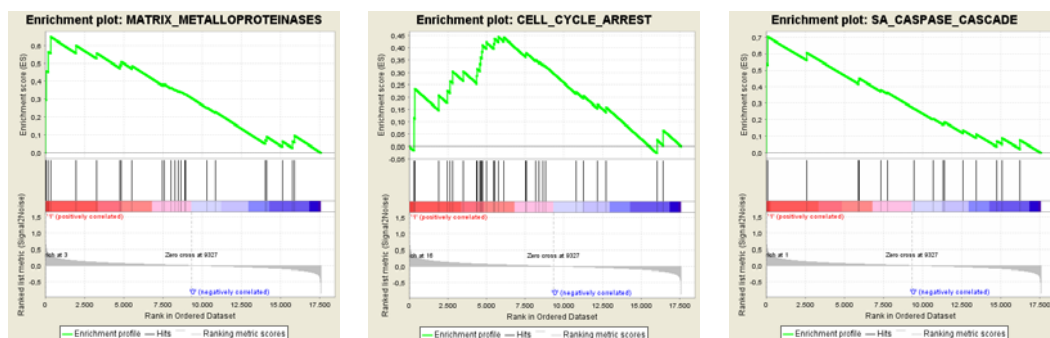


Figura 71. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament activades a 10 hores d'estimulació en el conjunt de gens regulats amb un FDR <0.25.

Segons GSEA, a 10 hores postinducció, les cèl·lules endotelials adquirien un estat no proliferatiu i tindria lloc un arrest del cycle cel·lular, presentant una parada en la fase G1 a S del cycle. Per altra banda, les cèl·lules mantindrien el fenotip antiapoptòtic, amb la inducció de l'expressió de gens de la via de les caspases (Figura 71).

### Regulació després de 16 hores d'estimulació de la via CD40/CD40L

Segons l'anàlisi per GSEA, a 16 hores d'estimulació de la via es mantindrien induïts la major part dels processos biològics que a 4 hores ocasionaven l'activació primerenca de les cèl·lules endotelials. 16 hores després de la interacció de les cèl·lules endotelials amb els limfòcits T, el procés d'adhesió cel·lular és un dels que encara es manté actiu, amb la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular. Pel que fa a les vies de transducció de senyals a través de receptors de la superfície cel·lular, tant la senyalització via NFκB com la via de Ca-NFAT es troben encara actives en aquest temps d'estimulació. La via de senyalització per MAPKs (p38, Erk, JNK) i la via de TNF també estarien induïdes a 16 hores (Taula 24).

Rank	Up-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	CR_CAM	0.48	2.14	0.000	0.014
2	NFKB_INDUCED	0.69	2.07	0.000	0.014
3	SA_CASPASE_CASCADE	0.72	2.06	0.000	0.014
5	TNF_AND_FAS_NETWORK	0.79	2.00	0.000	0.014
6	ST_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_PATHWAY	0.68	1.98	0.000	0.014
8	IL1RPATHWAY	0.55	1.96	0.000	0.014
14	TNFR2_PATHWAY	0.63	1.80	0.000	0.023
15	CYTOKINE_PATHWAY	0.75	1.78	0.000	0.024
18	ST_GNANULE_CELL_SURVIVAL_PATHWAY	0.55	1.76	0.000	0.026
20	TOLL_PATHWAY	0.57	1.75	0.000	0.026
23	ATM_PATHWAY	0.43	1.73	0.000	0.026
25	INFLAM_PATHWAY	0.65	1.71	0.000	0.029
27	EMT_UP	0.57	1.71	0.000	0.029
28	CA_NF_AT_SIGNALLING	0.41	1.70	0.000	0.030
30	NFKB_PATHWAY	0.56	1.69	0.000	0.032
32	CELL_ADHESION	0.39	1.67	0.000	0.036
33	NTHL_PATHWAY	0.58	1.66	0.000	0.036
34	STRESS_PATHWAY	0.48	1.65	0.000	0.040
42	CELL_ADHESION_MOLECULE_ACTIVITY	0.38	1.55	0.000	0.075
43	CR_TRANSCRIPTION_FACTORS	0.40	1.53	0.000	0.084
45	GLUCOSE_UP	0.52	1.51	0.046	0.098
46	ST_ERK1_ERK2_MAPK_PATHWAY	0.46	1.50	0.000	0.101
49	IL6_PATHWAY	0.51	1.47	0.028	0.111
52	ST_JNK_MAPK_PATHWAY	0.41	1.46	0.043	0.115
53	SIG_CD40PATHWAYMAP	0.47	1.46	0.043	0.114
54	ST_P38_MAPK_PATHWAY	0.45	1.45	0.022	0.121
57	INFLAMMATORY_RESPONSE_PATHWAY	0.46	1.45	0.084	0.116
62	DNA_DAMAGE_SIGNALLING	0.39	1.38	0.053	0.166
71	CR_IMMUNE_FUNCTION	0.42	1.31	0.060	0.214
72	MAP00260_GLYCINE_SERINE_AND_THREONINE_METABOLISM	0.40	1.29	0.103	0.231
76	RAR_UP	0.42	1.28	0.164	0.243
Rank	Down-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	MCALPAIN_PATHWAY	-0.65	-1.98	0.000	0.095
2	INTEGRIN_PATHWAY	-0.64	-1.92	0.000	0.075
3	MET_PATHWAY	-0.56	-1.92	0.000	0.059
4	ECM_PATHWAY	-0.66	-1.87	0.000	0.061
9	EGF_PATHWAY	-0.49	-1.71	0.000	0.092
13	RHO_PATHWAY	-0.52	-1.63	0.000	0.128
16	FCER1_PATHWAY	-0.45	-1.62	0.000	0.113
17	NKDYNAMIN_PATHWAY	-0.60	-1.60	0.036	0.130
18	ERK5_PATHWAY	-0.59	-1.60	0.000	0.129
19	FATTY_ACID_SYNTHESIS	-0.68	-1.58	0.000	0.139
30	SIG_CHEMOTAXIS	-0.47	-1.47	0.000	0.207
35	INSULIN_PATHWAY	-0.52	-1.45	0.069	0.208

Taula 24. Vies o grups de gens significativament activats o inhibits (FDR<0.25) a 16 hores d'estimulació. ES, *enrichment score*; NES, *normalized enrichment score*; NOM p-val, nominal p-value; FDR q-val, *false discovery rate*.

Pel que fa a alteracions en el metabolisme, 16 hores postinducció tindria lloc un increment en la síntesi d'aminoàcids com la glutamina i leucina, serina i treonina, que no



s'observava a 4 hores. Per altra banda, a diferència de l'activació primerenca de les cèl·lules endotelials via CD40 on es produïa un increment de la despesa energètica amb elevada taxa d'utilització de glucosa, a 16 hores d'estimulació tindria lloc una recuperació dels nivells de glucosa, indicant una diferència en el consum d'aquest sucre entre els dos temps d'estimulació, i mostrant un alentiment de l'activitat metabòlica cel·lular en aquest estadi.

Segons aquesta anàlisi, 16 hores després de la interacció CD40-CD40L, tindria lloc una inducció de processos de mort cel·lular i senyalització per dany al DNA, que podria ser resultat de la inducció primerenca de gens implicats en estrès oxidatiu observada a 4 hores.

Alguns processos biològics que abans no es veien afectats ara es trobarien reprimits. En aquest estadi d'activació endotelial, les cèl·lules iniciarien un estat proliferatiu i es prepararien per adquirir un fenotip angiogènic, amb un increment en l'expressió de metal·loproteases que afavoririen el procés de migració cel·lular. Consistent amb aquesta hipòtesi, tindria lloc una disminució de la via de senyalització per integrines (Figura 72), i una disminució de l'expressió de molècules de matriu extracel·lular, essencials per al desenvolupament de nous vasos sanguinis durant el procés d'angiogènesi i la remodelació vascular. També tindria lloc una disminució de la via de senyalització de Rho, al mateix temps que es produiria una inhibició del procés de quimiotaxi i de la via de senyalització per EGF (Taula 24).

En aquest estadi d'activació endotelial més tardà, hi hauria una sèrie de funcions biològiques anteriorment activades que començarien a recuperar els nivells basals, com la síntesi d'àcids grassos, i alguns senyals d'alerta cel·lulars com la via de FcεR1 (Figura 72).

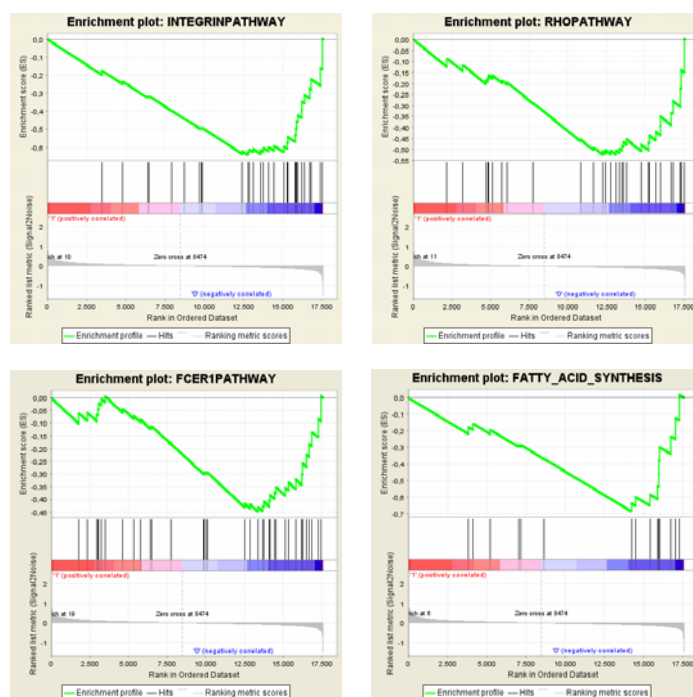


Figura 72. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament inhibides a 16 hores d'estimulació en el conjunt de gens regulats amb un FDR <0.25.

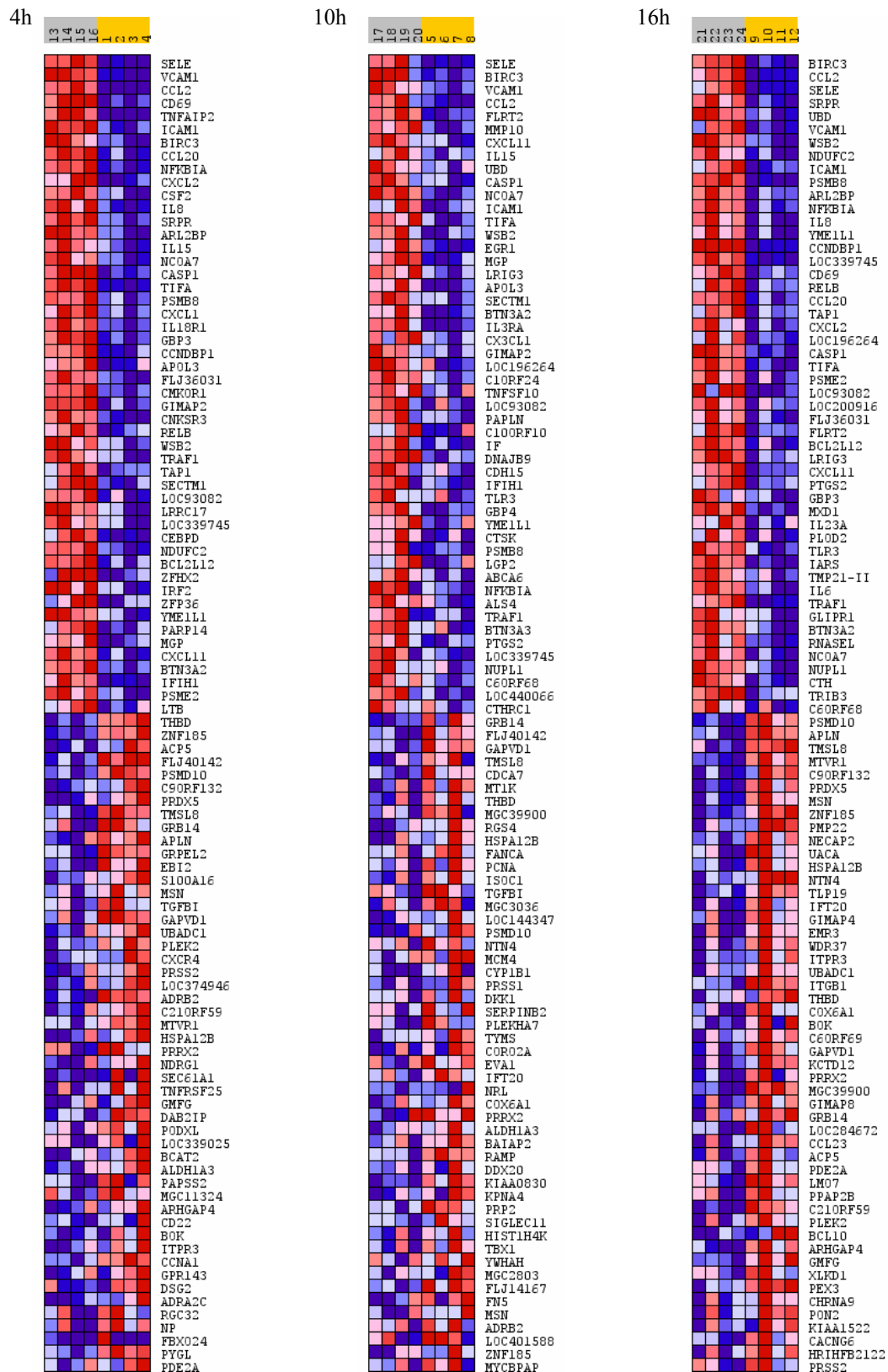


Figura 73. Heat map amb els 50 gens més regulats segons l'anàlisi per GSEA, comparant msRNA-2 (xips 4h #13-14-15-16; 10h #17-18-19-20; 16h #21-22-23-24) amb siRNA-2 (xips 4h #1-2-3-4; 10h #5-6-7-8; 16h #9-10-11-12), per a cada temps d'estimulació de la via de CD40. Expressat en Log2 de la intensitat centrat per la mediana, vermell: sobreexpressat; blau: infraexpressat.

## Regulació diferencial entre 4 i 16 hores d'estimulació de la via CD40/CD40L

Per esbrinar quines funcions biològiques estarien diferencialment regulades entre els temps d'estimulació analitzats, es va fer la mateixa anàlisi per GSEA comparant els valors de Log2ratio entre temps. L'objectiu d'aquest estudi és equivalent al de l'anàlisi per SAM realitzat anteriorment per a gens individuals, es tracta de dues eines estadístiques diferents per analitzar l'expressió gènica diferencial. Segons l'anàlisi per GSEA, es confirma que l'únic grup de gens que es trobaria diferencialment induït a 16 hores d'estimulació en comparació amb 4 hores serien les metal·loproteases (Taula 25).

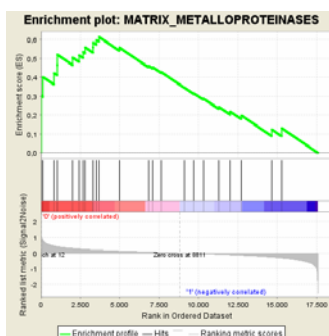


Figura 74. *Enrichment plot* de la via de les metal·loproteases, significativament activada a 16 hores d'estimulació respecte 4 hores en el conjunt de gens regulats amb un FDR <0.25.

Rank	Up-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	MATRIX_METALLOPROTEINASES	0.61	1.79	0.000	0.178

Taula 25. Via de MMPs diferencialment induïda a 16 hores respecte 4 hores d'estimulació (FDR<0.25). ES, *enrichment score*; NES, *normalized enrichment score*; NOM p-val, nominal p-value; FDR q-val, *false discovery rate*.

Algunes de les funcions biològiques que estarien diferencialment reprimides a 16 hores en comparació amb 4 hores d'estimulació serien la degradació d'aminoàcids de cadena ramificada, el metabolisme d'àcids grassos, el metabolisme de piruvat, la taxa d'utilització de glucosa, la síntesi d'insulina i el metabolisme de purines i pirimidines (Figura 75).

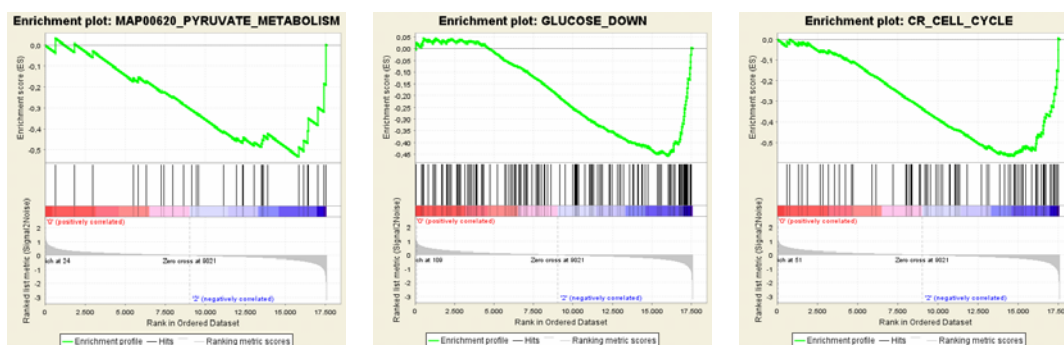


Figura 75. *Enrichment plot* de vies significativament reprimides a 16 hores d'estimulació respecte 4 hores en el conjunt de gens regulats amb un FDR <0.25.

## Resultats

Per altra banda l'anàlisi per GSEA entre 4 i 16 hores postestimulació confirma la regulació diferencial de la via de senyalització per integrines i l'expressió de ECM, i alguns sistemes d'alerta cel·lular entre elles la via de FcεRI i la via de ATM.

Rank	Down-regulated Gene Set	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	MAP00640_PROPANOATE_METABOLISM	-0.70	-2.06	0.000	0.010
2	MAP00280_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	-0.54	-2.04	0.000	0.010
3	CR_CELL_CYCLE	-0.57	-2.00	0.000	0.010
6	GLUCOSE_DOWN	-0.46	-1.88	0.000	0.026
10	MAP00620_PYRUVATE_METABOLISM	-0.53	-1.85	0.000	0.021
11	FCER1_PATHWAY	-0.55	-1.81	0.000	0.033
12	MAP00340_HISTIDINE_METABOLISM	-0.60	-1.81	0.000	0.035
13	NFKB_INDUCED	-0.44	-1.79	0.000	0.044
14	MET_PATHWAY	-0.51	-1.78	0.000	0.047
18	TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	-0.60	-1.75	0.000	0.052
19	MAP00410_BETA_ALANINE_METABOLISM	-0.62	-1.75	0.000	0.049
25	ACTINY_PATHWAY	-0.64	-1.71	0.000	0.064
40	MAP00071_FATTY_ACID_METABOLISM	-0.40	-1.63	0.000	0.067
46	MAP00650_BUTANOATE_METABOLISM	-0.51	-1.60	0.037	0.075
49	CR_IMMUNE_FUNCTION	-0.42	-1.58	0.000	0.089
52	INTEGRIN_PATHWAY	-0.51	-1.58	0.041	0.086
54	CR_REPAIR	-0.48	-1.57	0.056	0.088
59	ATM_PATHWAY	-0.56	-1.54	0.084	0.101
62	GLYCOGEN_METABOLISM	-0.42	-1.54	0.000	0.102
64	CELL_ADHESION_MOLECULE_ACTIVITY	-0.32	-1.53	0.000	0.106
67	DRUG_RESISTANCE_AND_METABOLISM	-0.33	-1.51	0.000	0.115
68	MAP00230_PURINE_METABOLISM	-0.42	-1.50	0.025	0.118
71	NDKDYNAMIN_PATHWAY	-0.51	-1.50	0.065	0.117
74	CREB_PATHWAY	-0.41	-1.49	0.000	0.118
75	MCALPAIN_PATHWAY	-0.47	-1.49	0.122	0.117
76	ERK5_PATHWAY	-0.51	-1.49	0.028	0.116
80	TNFR2_PATHWAY	-0.48	-1.43	0.130	0.166
81	MAP00120_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	-0.45	-1.42	0.093	0.172

Taula 26. Vies o grups de gens diferencialment reprimides a 16 hores respecte 4 hores d'estimulació (FDR<0.25). ES, *enrichment score*; NES, *normalized enrichment score*; NOM p-val, nominal p-value; FDR q-val, *false discovery rate*.

## 4.2.2. Anàlisi funcional d'activació de vies de senyalització per CD40

### 4.2.2.1. Determinació de l'activitat de factors de transcripció

En condicions proinflamatòries, l'activació de les cèl·lules endotelials implica la iniciació de la transcripció gènica [289]. En condicions basals (estat inactiu), la cèl·lula endotelial expressa quantitats insignificants o baixes d'algunes molècules d'adhesió com ICAM-1 i E-selectina, i altres productes solubles secretats per les cèl·lules endotelials com MCP-1, GM-CSF, IL-6, i IL-8. Aquests productes d'activació endotelial veuen incrementada la seva expressió en resposta a estímuls inflamatoris com les citoquines IL-1 o TNF- $\alpha$ .

Els factors de transcripció integren les diferents cascades de senyalització que controlen l'expressió gènica. Entre els factors de transcripció que regulen l'expressió de molècules endotelials involucrades en inflamació s'inclouen els gens de la família AP-1 (c-jun i c-fos) i el sistema de NF $\kappa$ B. La regulació d'aquests factors de transcripció és important per determinar la resposta a diversos estímuls fisiològics i ambientals. A més del control transcripcional de la seva expressió, l'activitat d'un factor de transcripció pot estar regulada per fosforilació o desfosforilació a través de múltiples vies de transducció de senyals intracel·lulars.

L'anàlisi funcional dels 715 transcrits regulats utilitzant el *software* comercial *Ingenuity* (<http://ingenuity.com>), indicava que a 4 hores d'estimulació de la via de CD40 aparentment hi havia una major regulació transcripcional de factors de transcripció i altres gens implicats en el control de l'expressió gènica comparat amb 16 hores d'estimulació ( Figura 76).

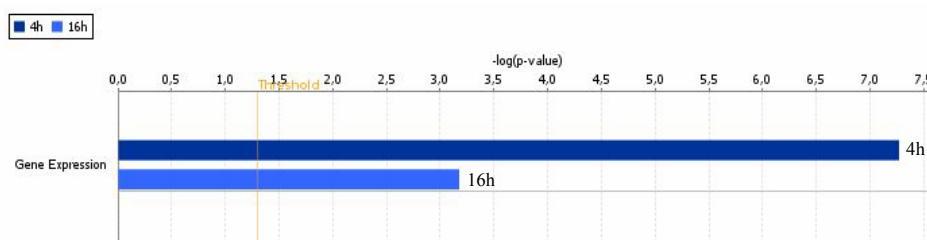


Figura 76. Significació estadística del grau de sobrerrepresentació de la categoria funcional que agrupa els gens involucrats en el control de l'expressió gènica a 4 i 16 hores d'estimulació de la via.

A la Figura 77 es mostren alguns dels factors de transcripció regulats per CD40 a nivell transcripcional en cèl·lules endotelials, segons els experiments de microarrays. En la mateixa figura es mostra el valor d'expressió en termes de Log2ratio per a cadascun d'aquests gens i en el cas en que es conegui, la ruta de senyalització a través de la qual s'ha descrit que CD40 podria regular la seva activitat en diferents tipus cel·lulars. Alguns dels factors de transcripció

## Resultats

regulats per CD40 intervenen en la senyalització per NFκB (RelB, NFκBIA, NFκBIE), en la senyalització per quimioquines i les citoquines IL2, IL6 i IL10 (Fos, Jun), la senyalització per calci intracel·lular (DSCR1) o bé estan implicats en el mecanisme d'apoptosi (BCL3).

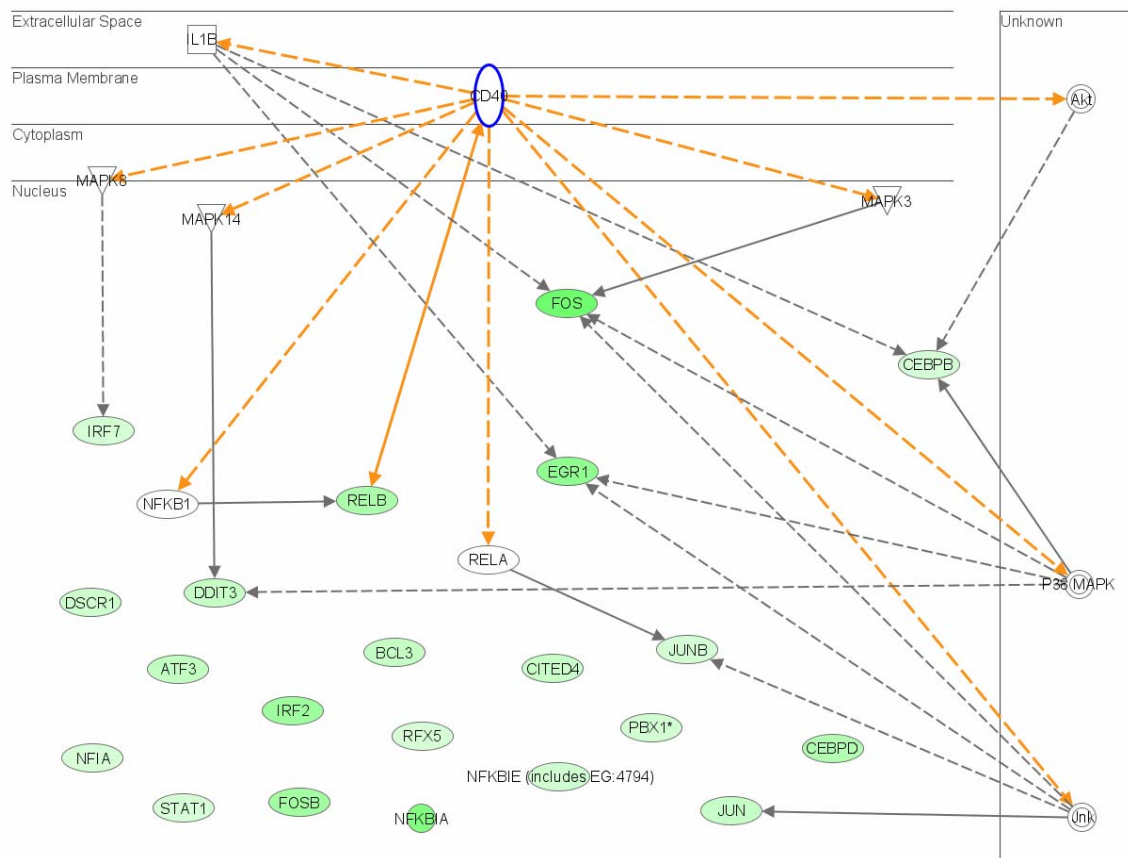


Figura 77. Factors de transcripció regulats per CD40 a nivell transcripcional en HUVEC. La tonalitat de color verd indica el nivell de inhibició per siRNA a 4 hores d'estimulació. FOS, *v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*; FOSB, *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*; IRF7, *interferon regulatory factor 7*; IRF2, *interferon regulatory factor 2*; DSCR1, *Down syndrome critical region gene 1*; DDIT3, *DNA-damage-inducible transcript 3*; RelB, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)*; EGR1, *early growth response 1*; BCL3, *B-cell CLL/lymphoma 3*; CITED4, *Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4*; JUNB, *jun B proto-oncogene*; JUN, *jun oncogene*; CEBPB, *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta*; CEBPD, *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta*; RFX5, *regulatory factor X, 5*; ATF3, *activating transcription factor 3*; NFIA, *nuclear factor I/A*; PBX1, *pre-B-cell leukemia transcription factor 1*; NFκBIA i NFκBIE, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha and epsilon*, STAT1; *signal transducer and activator of transcription 1*.

A més de la regulació transcripcional de factors de transcripció per la via de senyalització de CD40, es volia investigar amb més profunditat canvis a nivell d'activitat d'aquestes proteïnes. Per tal de determinar la implicació funcional de NFκB i altres factors de transcripció en la resposta primerenca mediada per CD40 que desencadena l'activació

endotelial, es va realitzar una anàlisi del perfil d'activitat de diferents famílies de factors de transcripció involucrats en processos inflamatoris. Es va utilitzar un assaig d'activació transcripcional basat en la tècnica d'ELISA, que és molt més sensible, acurat i específic comparat amb altres tècniques utilitzades amb aquest propòsit com l'EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*). L'assaig es va realitzar a partir d'extractes proteics nuclears de cèl·lules HUVEC que havien estat transfectades amb siRNA i estimulades amb Jurkat D1.1 durant 4 hores.

Es va analitzar l'activitat d'unió al DNA de 15 factors de transcripció relacionats amb inflamació pertanyents a la família NFκB, entre ells c-Rel, NFκB p50 i NFκB p65; factors de transcripció de la família AP-1 com c-Jun, c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, JunB i JunD; i factors de transcripció regulats per MAPKs com ATF-2, c-Myc, STAT-1, Mef-2 i CREB-1.

Segons aquest estudi, els factors de transcripció l'activació dels quals es troba significativament inhibida en presència del siRNA anti-CD40 serien: NFκB p50 i p65, ATF-2, c-Jun, c-Fos, FosB, JunB, JunD i STAT-1. L'activació de la resta de factors de transcripció analitzats, entre ells c-Rel i CREB-1, no es veuria afectada per CD40 (Figura 78).

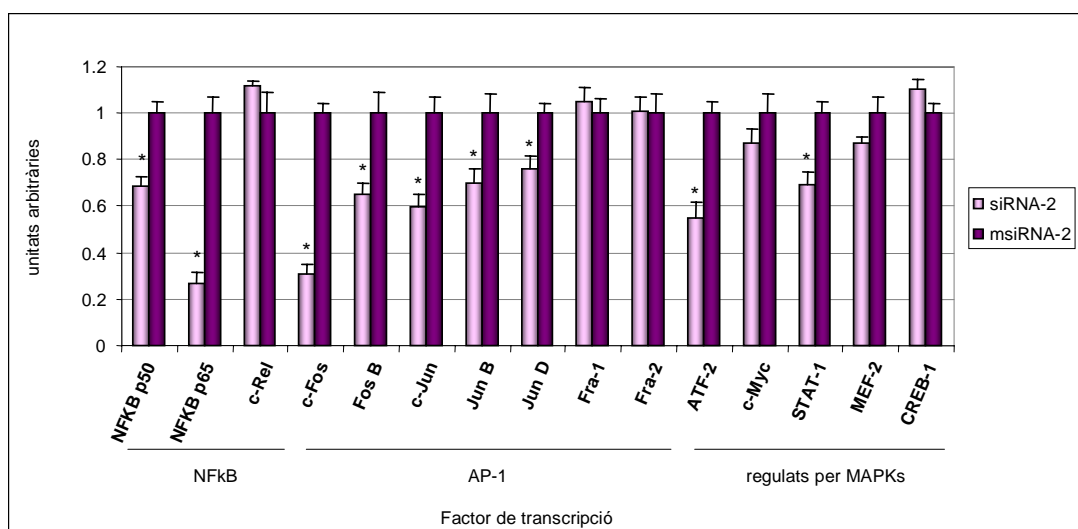


Figura 78. Perfil d'activitat de diferents factors de transcripció en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 anti-CD40 o msiRNA-2 a 4 hores d'estimulació. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents. (\* $p < 0.05$ ). Unitats arbitràries =  $(OD_{450nm}$  en cèl·lules tractades amb siRNA-2 o msiRNA-2) /  $(OD_{450nm}$  en cèl·lules tractades amb msiRNA-2).

Aquests resultats indiquen que el siRNA anti-CD40 tindria un efecte antiinflamatori directe en cèl·lules endotelials a través de la regulació de factors de transcripció que controlen l'expressió de molts gens implicats en processos inflamatoris al sistema vascular. Aquesta regulació de factors de transcripció dependent de CD40 tindria lloc a dos nivells: a nivell transcripcional i d'activació de la proteïna, processos que poden estar o no estar relacionats.



#### 4.2.2.2. Activació de MAPKs en resposta a CD40

Les proteïnes MAPKs són mediadores de la transducció de senyals des de la superfície cel·lular fins al nucli. S'han estudiat intensivament tres grups de MAPK: les Erks, o quinases regulades per senyals extracel·lulars sensibles a mitògens com els factors de creixement, i les quinases JNK i p38/MAPK, activades per citoquines proinflamatorïes i estrès mediambiental. L'activació de l'expressió gènica dependent, entre altres, dels factors de transcripció NFκB i AP-1, s'assoleix per l'activació de les MAPKs, una família de Ser/Thr quinases activades per fosforilació doble.

Les MAPKs estan al cap d'avall d'una cascada de reaccions que implica un sistema de tres quinases activades seqüencialment per fosforilació en treonines i tirosines. Una vegada fosforilada la darrera component de la via, la pròpia MAPK, aquesta s'activa i es transloca al nucli on desencadena l'activació d'una sèrie de factors de transcripció afavorint o impedit la seva unió a les regions promotores de gens que regulen principalment la proliferació i diferenciació cel·lular. Alguns dels factors de transcripció activats per MAPKs són els factors complexos ternaris TCFs (per Erk i p38), c-Jun (per JNK), o ATF-2 (per JNK i p38).

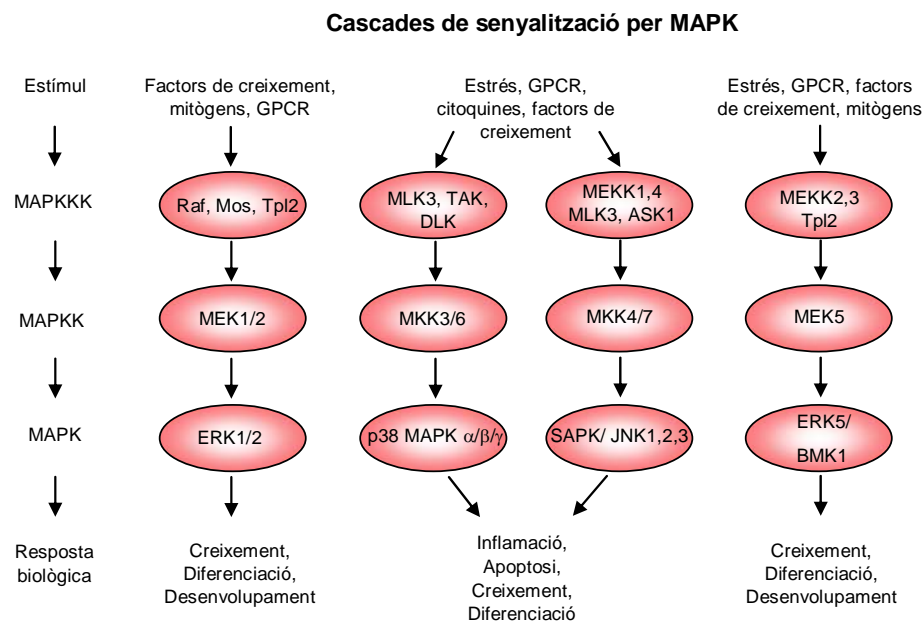


Figura 79. Cascades d'activació/fosforilació de les MAPK.

L'anàlisi de microarrays en resposta a l'estimulació via CD40 no mostrava regulació transcripcional de l'expressió gènica de Erk1/2, JNK ni p38/MAPK en cèl·lules endotelials. Tot i així, l'anàlisi per GSEA indicava que la via de MAPKs podria estar activada per interacció CD40-CD40L en aquestes cèl·lules.

Segons l'anàlisi de microarrays, entre els gens regulats transcripcionalment per CD40



que intervenen en la via de senyalització d'Erk es troba la PI3K i la proteïna quinasa dependent de AMPc (PKA o PRKA). Altres gens regulats per CD40 serien DUSP1 (*dual-specificity phosphatase*) un regulador negatiu de la via MAPKs membre de la família de les MAPK fosfatases MKP 1/2/3/4; i PP1/2, membre d'una altra família de fosfatases que actuen modulant l'activitat de MEK1/2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* o MAP2K1/2).

Un altre gen que intervé en aquesta via de senyalització i estaria regulat transcripcionalment per CD40 és la fosfolipasa A2 (CPLA2 o PLA2G) que catalitza l'alliberament d'àcid araquidònic partir dels fosfolípids de membrana. L'àcid araquidònic és un precursor dels eicosanoids, mediadors lipídics de la inflamació implicats en l'inici de la resposta inflamatòria. Erk1/2 indueix l'activació d'aquesta proteïna a través de les MKNK1/2 (*Map kinase interacting kinase*).

Finalment, entre els gens regulats transcripcionalment per CD40 i involucrats en la via d'Erk/MAPKs trobem els factors de transcripció c-Fos i el factor activador de la transcripció STAT1 que regula la transcripció d'una àmplia varietat de gens involucrats en viabilitat cel·lular en resposta a diferents estímuls.

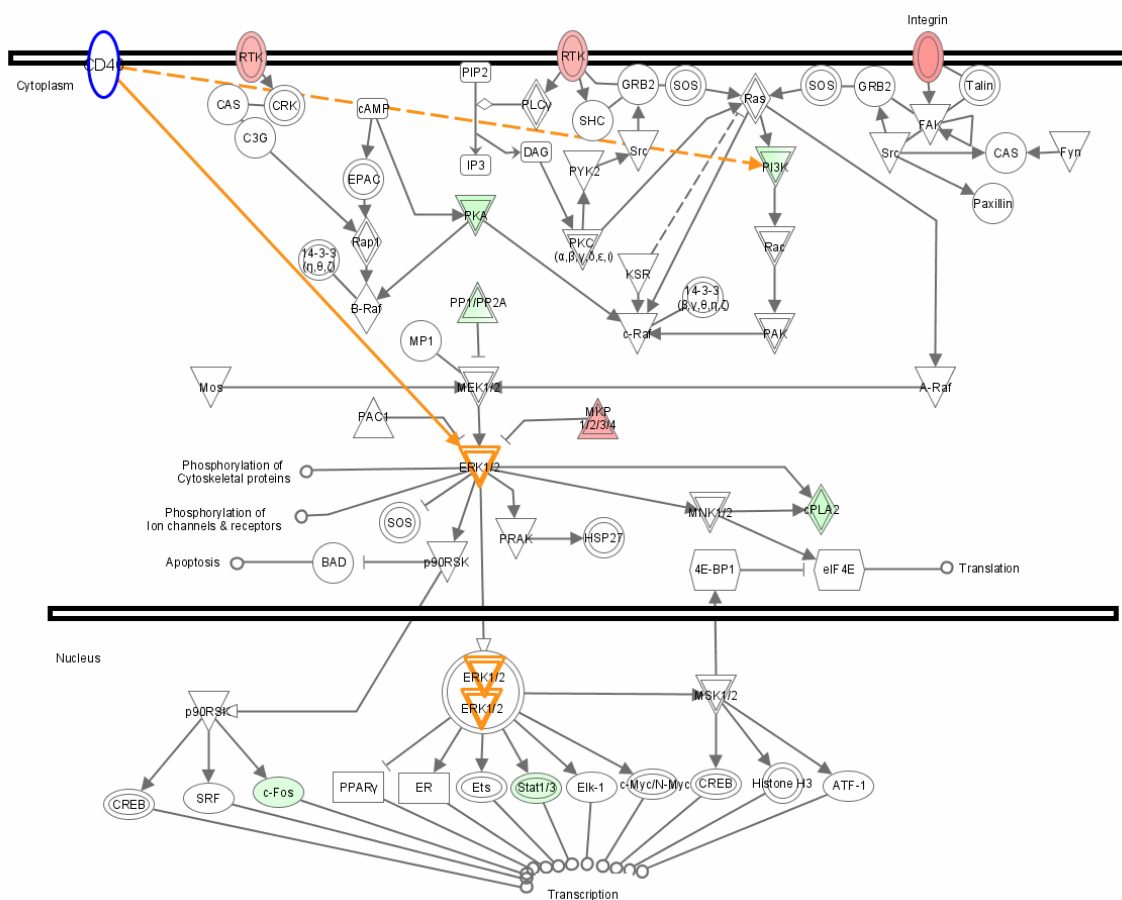


Figura 80. Gens regulats transcripcionalment per CD40 i implicats en la via de senyalització de Erk/MAPK. En color es mostra el valor d'expressió gènica en Log2ratio a 16 hores d'estimulació de la via CD40 (vermell: induït, verd: reprimet per siRNA-2). Esquema generat per Ingenuity.

## Resultats

Pel que fa a la via de senyalització de SAPK/JNK, està descrit que CD40 activa aquesta via a través de la unió del seu domini citoplasmàtic amb la proteïna TRAF2 i la posterior activació de la ASK1 (Figura 81).

Segons l'estudi de microarrays, entre els gens regulats transcripcionalment per CD40 que intervenen en la via de senyalització JNK en cèl·lules endotelials trobem la PI3K i un activador de la via anomenat ZAK (*sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK*), que indueix l'activació de MKK4/7. També intervenen en aquesta via i estarien regulats transcripcionalment per CD40, el factor de transcripció c-jun i el gen GADD45 (*growth arrest and DNA damage inducible*) que es troba regulat únicament a 16 hores d'estimulació de la via CD40-CD40L. GADD45 està implicat en el mecanisme de reparació de DNA, i pertany a un grup de gens que s'indueixen en resposta a estrès desencadenant l'activació de la via p38/JNK a través de la quinasa MEKK4.

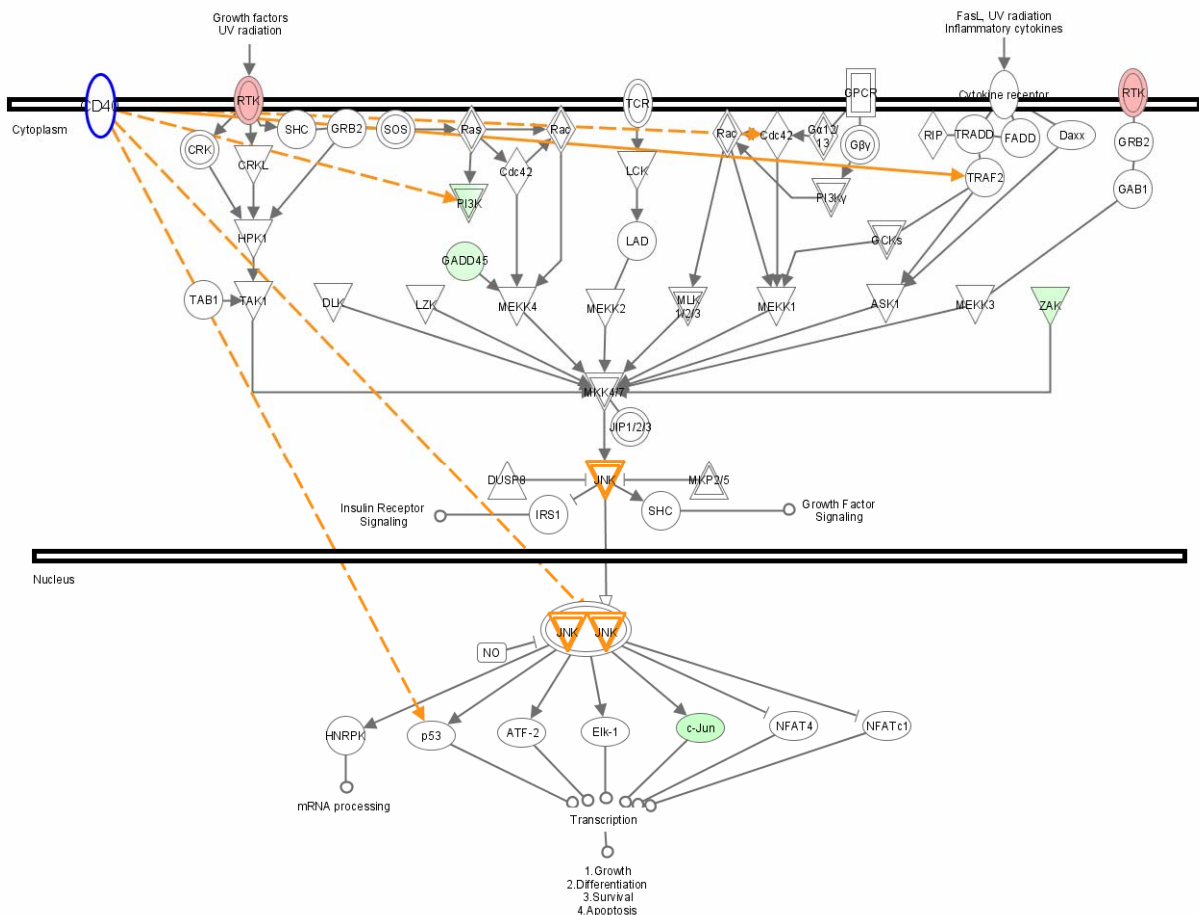


Figura 81. Gens regulats transcripcionalment per CD40 i implicats en la via de senyalització de SAPK/JNK. En color es mostra el valor d'expressió gènica en Log2ratio a 16 hores d'estimulació de la via CD40 (vermell: induït, verd: reprimat per siRNA-2). Esquema generat per *Ingenuity*.

S'ha descrit que, en diferents tipus cel·lulars, la via de transducció de senyals mediada per CD40 implica l'activació de les tres principals MAPKs: Erk, JNK i p38/MAPK. En aquest

treball es va voler avaluar l'estat d'activació d'aquestes MAPKs en cèl·lules endotelials activades via CD40-CD40L durant 4, 10 i 16 hores.

Inicialment es va analitzar el nivell d'expressió de la forma fosforilada d'aquestes 3 proteïnes MAPKs en cèl·lules HUVEC en condicions basals i en condicions proinflamatòries, coincubant les cèl·lules amb Jurkat D1.1 a diferents temps (Figura 82).

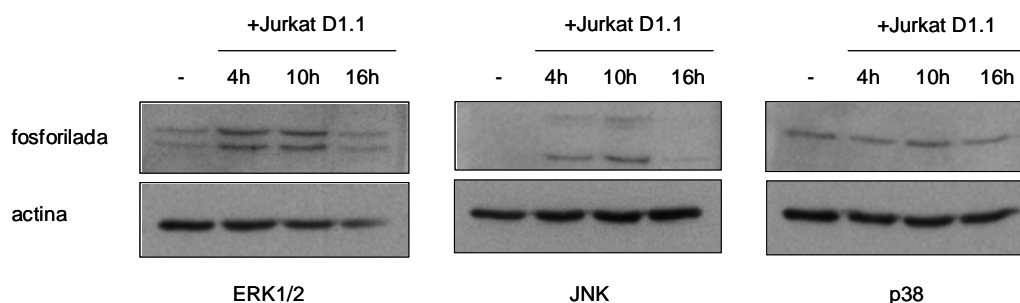


Figura 82. Quantificació de l'expressió de la forma fosforilada d'Erk1/2, JNK i p38 en HUVEC en condicions basals i estímulant les cèl·lules amb Jurkat D1.1 durant 4, 10 i 16 hores.

En les cèl·lules HUVEC no estimulades, gairebé no es detectava expressió de la forma fosforilada de JNK i el nivell d'expressió d'Erk1/2 fosforilada era molt baix. En canvi, després de l'estimulació de les cèl·lules endotelials amb Jurkat D1.1, tenia lloc una inducció en l'estat de fosforilació d'Erk i JNK tant a 4 hores com a 10 hores d'estimulació. 16 hores després de l'estimulació, aquestes dues MAPKs recuperaven els nivells basals de fosforilació. En el cas de p38/MAPK, en condicions basals ja s'observava certa expressió de la forma fosforilada de la proteïna, que no variava en estimular les cèl·lules amb Jurkat D1.1.

Aquests resultats indicaven que l'estimulació, entre altres, de la via de senyalització de CD40 per cocultiu amb JurkatD1.1 donava lloc a la fosforilació i activació de les proteïnes Erk1/2 i JNK que serien translocades al nucli per tal de regular la transcripció gènica, a diferència de p38/MAPK, que semblava estar activada de manera constitutiva en condicions basals sense haver estimulat la via CD40-CD40L.

Per tal de confirmar que aquest efecte en la regulació de l'expressió de la forma fosforilada activa d'Erk1/2 i JNK, era dependent de CD40, es va quantificar l'expressió tant de la forma fosforilada com de la forma total d'aquestes dues proteïnes en les cèl·lules HUVEC que havien estat transfectades amb el siRNA-2 anti-CD40 o msiRNA-2, i estimulades via CD40L durant 4, 10 i 16 hores.

Inicialment, es comprovava la inhibició de l'expressió de la proteïna CD40 per RNAi en aquestes cèl·lules en els 3 temps d'estimulació de la via CD40-CD40L (Figura 83). Posteriorment es mesurava l'estat de fosforilació d'Erk1/2, JNK i p38/MAPK, així com de la forma total de cadascuna de les proteïnes.

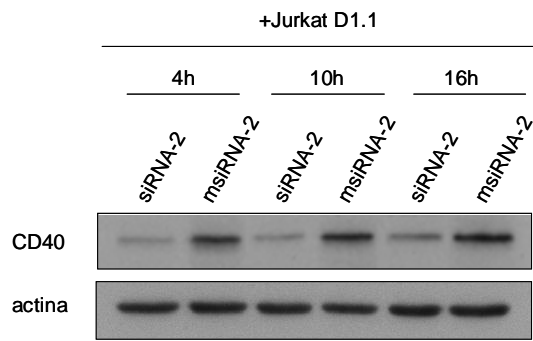


Figura 83. Quantificació de l'expressió de CD40 en HUVEC transfectades amb siRNA-2 i msiRNA-2 en els diferents temps d'estimulació de la via CD40-CD40L.

Segons els resultats obtinguts, el silenciament de CD40 per RNAi suprimeix l'activació d'Erk i JNK. En canvi, la inhibició de CD40 no tindria efecte en l'activació de p38/MAPK, ja que no s'observaven diferències en l'estat de fosforilació d'aquesta MAPK (Figura 84).

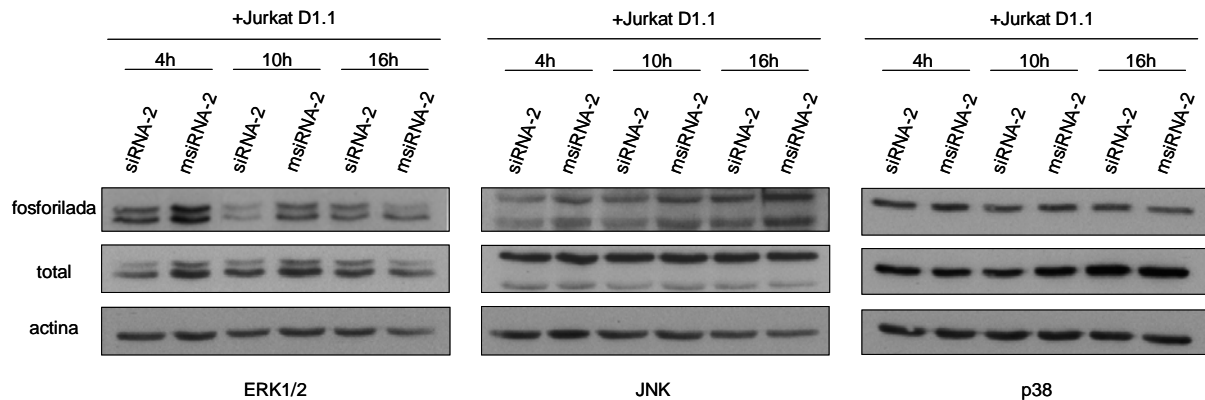


Figura 84. Quantificació de l'expressió de la forma fosforilada i la forma total de les proteïnes Erk1/2, JNK i p38, en HUVEC transfectades amb siRNA-2 o msiRNA-2 en els diferents temps d'estimulació de la via CD40-CD40L.

En el cas d'Erk1/2 la inhibició de l'expressió de la proteïna fosforilada es produïa també per a la forma total de la proteïna a 4 i 10 hores d'estimulació. En el cas de JNK, l'activació induïda per CD40 i mesurada segons l'expressió de la forma fosforilada, encara que a menor nivell que Erk1/2, tindria lloc en els tres temps d'estimulació de la via. Tot i així, només es detectava regulació de la forma fosforilada, però no la forma total de la proteïna, que es mantenia constant.

Segons aquests resultats, l'estimulació de la via CD40-CD40L en cèl·lules endotelials causaria un increment en l'activitat cel·lular d'Erk1/2 i JNK, però no en l'activitat de p38/MAPK, que no presentava regulació aparent ni en la forma total ni en la forma fosforilada de la proteïna, mantenint-se activa en els diferents temps d'estimulació analitzats.

### 4.2.2.3. Anàlisi de la via de senyalització de TLR-3

La resposta immune innata respon de manera general a factors presents en els organismes patògens. Els factors bacterians com el LPS, lipoproteïnes bacterianes, peptidoglicans, motius d'àcid nucleic CpG, i dsRNA i ssRNA producte de la replicació vírica, activen la immunitat innata estimulant el sistema immunitari i desencadenant la resposta inflamatòria.

Els membres de la família de proteïnes de *Toll like receptor* (TLR) juguen un paper molt important en la regulació de l'activació de la resposta immune innata en resposta a la invasió per microorganismes patògens [290]. Aquesta família de receptors reconeix motius estructurals anomenats PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*) [291]. Entre aquests PAMPs s'inclouen components de la paret cel·lular bacteriana de bacteris Gram+ i Gram-, flagelina, DNA bacterià i viral, dsRNA viral i ssRNA [290]. La família de gens dels TLRs es troben conservats evolutivament tant en invertebrats com en vertebrats [292, 293]. S'han identificat homòlegs en plantes, insectes i animals. Fins al moment s'han caracteritzat 10 TLRs humans (TLR1-10), capaços de formar homodímers o heterodímers entre ells i reconèixer diferents PAMPs. Els TLRs s'expressen predominantment en cèl·lules involucrades en funcions immunes, com els macròfags i leucòcits de sang perifèrica. A més de les cèl·lules del sistema immune, els TLRs també s'expressen en una àmplia varietat de tipus cel·lulars com cèl·lules epitelials i APCs. Tal i com es descriu a la Figura 85, cada receptor TLR reconeix un conjunt únic de PAMPs.

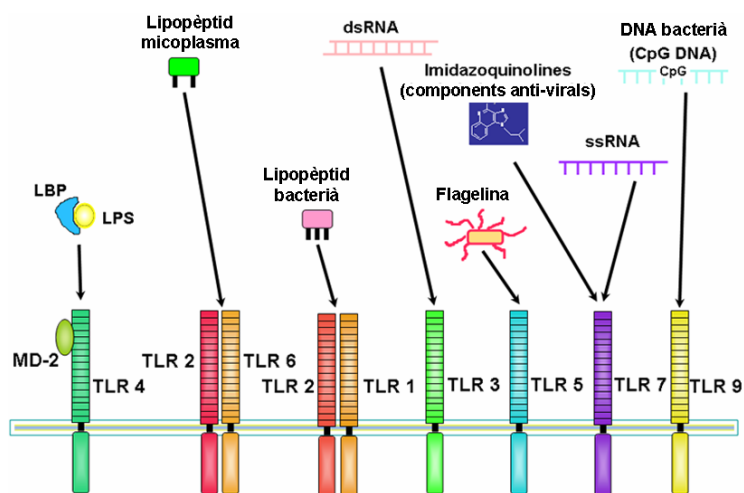


Figura 85. Reconeixement de PAMPs per els diferents membres de la família de receptors TLRs.

La majoria de TLRs (TLR-1, TLR-2, TLR-6, TLR-4 i TLR-5) es troben a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i presenten un domini extracel·lular que reconeix el PAMP. Altres TLRs com el TLR-3, TLR-7, TLR-8 i TLR-9, són intracel·lulars i es localitzen en vesícules

## Resultats

endosomals on reconeixen els àcids nucleics d'aquests organismes patògens.

Molts virus de RNA expressen dsRNA en algun moment del seu cicle replicatiu. Aquest dsRNA està involucrat en l'activació de la immunitat innata durant la infecció vírica. El TLR-3 és un receptor per dsRNA viral, i la unió de dsRNA a aquest receptor activa la producció de IFN de tipus I, bloquejant la replicació vírica dins les cèl·lules infectades [294] i desencadenant la resposta immune i inflamatòria. TLR-3, juntament amb els TLR-7 i TLR-8, que reconeixen ssRNA, constitueixen un sistema potent per detectar el material genètic dels virus de RNA.

Prèviament ja havia estat descrit que diferents tipus de cèl·lules endotelials expressen TLR-2, 3, 4, 5 i 9, però no TLR-7, ni TLR-8 [295-297]. En concret, s'ha descrit que les cèl·lules HUVEC expressen TLR-3, i la seva expressió a nivell de proteïna està induïda per IFN- $\alpha$ , la qual cosa resulta en un increment en la resposta a RNA viral [295].

Segons els resultats de microarrays, el cultiu de cèl·lules endotelials HUVEC expressa de forma constitutiva entre d'altres: TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4 i TLR-6, però només el TLR-3 veuria alterada la seva expressió i estaria regulat a nivell transcripcional en silenciar la via de CD40 en aquestes cèl·lules.

Es va quantificar per qRT-PCR la regulació de l'expressió de TLR-3 per CD40 en cèl·lules endotelials transfectades amb siRNA i estimulades a diferents temps amb Jurkat D1.1. Tal i com s'observa a la Figura 86A, i en concordància amb els resultats de microarrays, el transcrit de TLR-3 es trobava inhibït de manera significativa en cèl·lules endotelials on es silenciava CD40 per RNAi en tots tres temps d'estimulació analitzats.

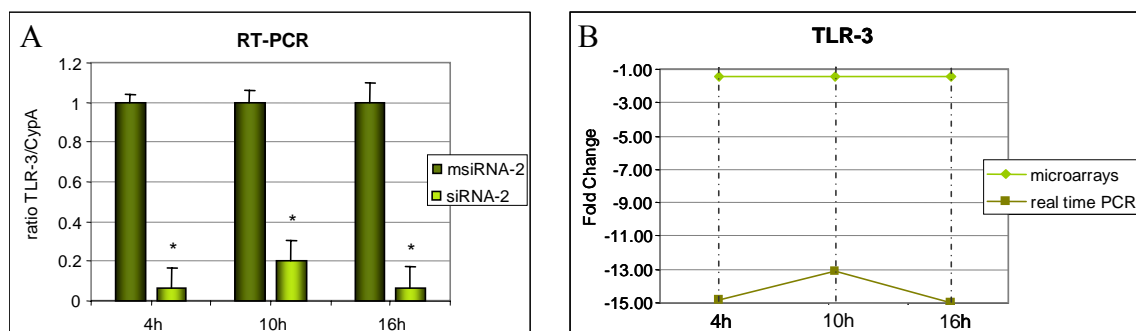


Figura 86. A). Anàlisi de l'expressió de TLR-3 per qRT-PCR en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA i estimulades via CD40L 4, 10 i 16 hores. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents. (\* $p < 0.05$ ). B). Comparació del perfil transcripcional de TLR-3 obtingut per microarrays i per qRT-PCR.

La validació del nivell d'expressió del transcrit de TLR-3 realitzada per qRT-PCR confirmava la inhibició de l'expressió del gen, essent el valor d'expressió en termes de *fold change* superior al determinat mitjançant l'anàlisi de microarrays (Figura 86B).

Per altra banda, l'anàlisi per GSEA mostrava que la inducció d'alguns importants sistemes "d'alerta" cel·lulars, entre ells la via de TLR, podria ser dependent de la interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials.

A la Figura 87 es mostra la via de senyalització per *Toll like receptor* i el que està descrit a la literatura sobre el paper de CD40 en la regulació d'alguns gens que intervenen en aquesta via. Segons l'estudi de microarrays, a més de TLR-3, estarien regulats transcripcionalment per CD40 alguns factors de transcripció implicats en aquesta via de senyalització com per exemple, els factors de transcripció de la família NFκB i AP-1 (c-jun i c-Fos), i la proteïna inhibidora NFκBIA o IκBα (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b cells inhibitor, alpha*). Un altre gen de la via de TLRs regulat transcripcionalment per CD40 seria el gen MD2, també anomenat LY96 (*lymphocyte antigen 96*), un gen que s'associa amb el TLR-4 de la superfície cel·lular en resposta a LPS.

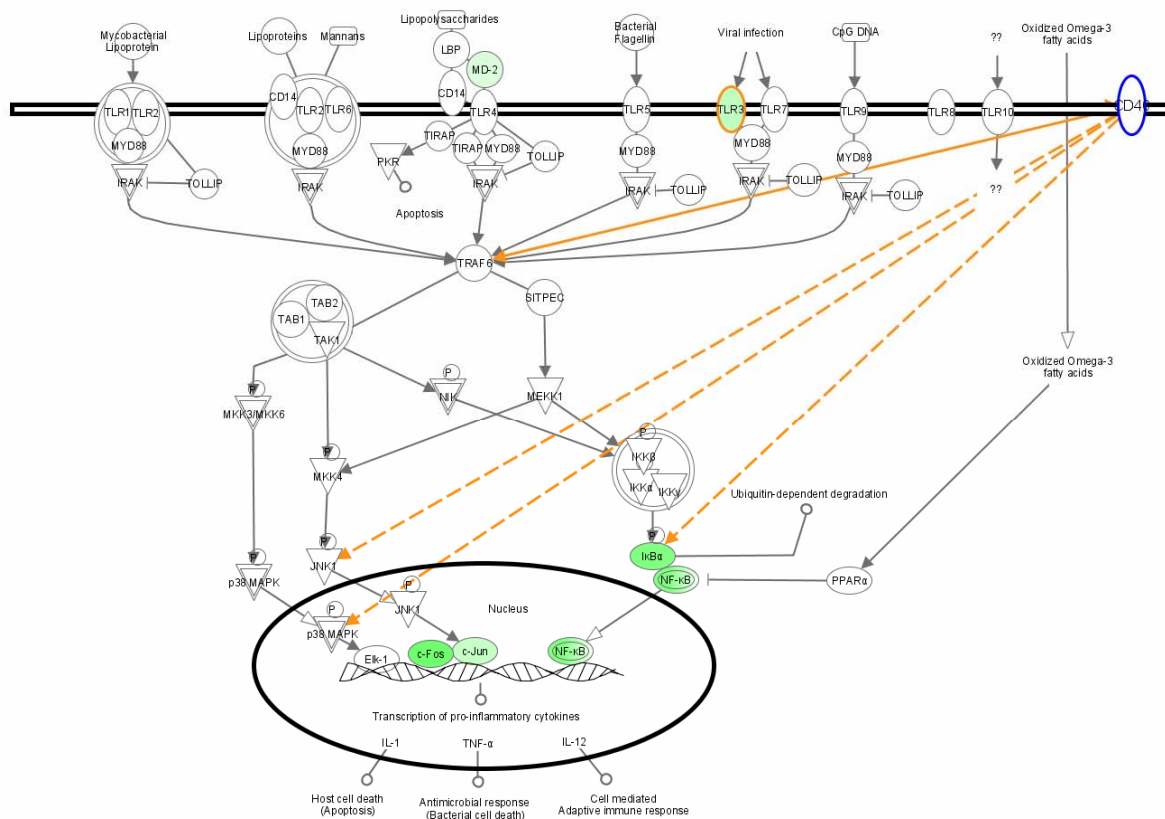


Figura 87. Via de senyalització de TLRs. Gens implicats en aquesta via que estan regulats per CD40. En color es mostra el valor d'expressió gènica en termes de Log2ratio a 4 hores d'estimulació de la via de CD40 (vermell: induït, verd: reprimat per siRNA-2). Esquema generat per *Ingenuity*.

Es volia investigar el paper de CD40 en la resposta immune innata en cèl·lules endotelials en resposta a infecció viral a través del reconeixement de dsRNA per TLR-3.

## Resultats

Es va realitzar un assaig funcional d'estimulació de la via de TLR-3 en cèl·lules HUVEC que havien estat transfectades amb siRNA anti-CD40 i estimulades amb Jurkat D1.1 durant 4 i 16 hores. Per induir la via de TLR-3 es va utilitzar un agonista del lligand de TLR-3: poly (I:C) (*polyinosine-polycytidylic acid*), un anàleg sintètic de dsRNA, que un cop dins la cèl·lula, indueix la síntesi de IFN- $\beta$  i la producció d'altres citoquines, entre elles la quimioquina IL-8 que participa en el reclutament dels leucòcits cap al lloc d'inflamació.

Es va analitzar l'expressió d'aquestes citoquines per qRT-PCR i es va observar que l'expressió de IL-8 i de IFN- $\beta$  disminuïa en les mostres tractades amb siRNA-2 anti-CD40 en comparació amb les mostres tractades amb msiRNA-2 en els dos temps d'estimulació analitzats (4 i 16 hores).

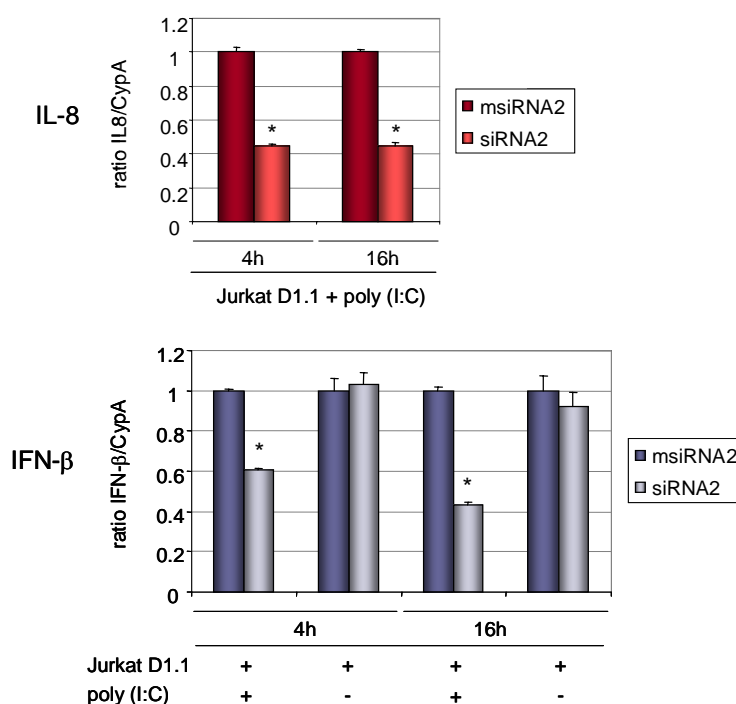


Figura 88. Quantificació de l'expressió de IL-8 i IFN- $\beta$  per qRT-PCR en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA, preestimulades amb Jurkat D1.1 4 i 16 hores, i tractades amb poly (I:C). Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents. (\* $p < 0.05$ ).

Aquests resultats indicaven que la regulació d'aquests dos efectors *downstream* de la via de senyalització de TLR-3 en aquestes cèl·lules era dependent de CD40.

Donat que les dades dels experiments de microarrays mostraven un nivell d'expressió de IFN- $\beta$  per sota dels límits de detecció de la tècnica, es va mesurar l'expressió del transcrit IFN- $\beta$  per qRT-PCR en cèl·lules endotelials activades únicament via CD40L. El fet de que l'expressió de IFN- $\beta$  no es veiés alterada per activació de la via CD40-CD40L (Figura 88), demostrava que aquesta inducció de la producció de IFN- $\beta$  era dependent de l'activació de la via de TLR-3.



Per tal de confirmar a nivell proteic la regulació de l'expressió de IFN- $\beta$  per la via de TLR-3, es va analitzar l'expressió d'aquesta citoquina per Western blot en cèl·lules endotelials activades via TLR-3 on s'havia silenciat CD40 amb siRNA-2. Segons els resultats obtinguts, IFN- $\beta$  es troba inhibit en les mostres tractades amb siRNA-2 anti-CD40 en comparació amb les mostres tractades amb msiRNA-2 en els dos temps d'estimulació analitzats (4 i 16 hores).

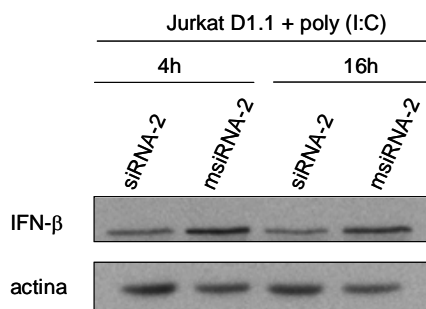


Figura 89. Quantificació de l'expressió de IFN- $\beta$  en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 o msiRNA-2, preestimulades amb Jurkat D1.1 4 i 16 hores, i tractades amb poly (I:C).

D'aquests resultats es desprèn que la inducció de l'expressió de IFN- $\beta$  en resposta a poly (I:C) en les cèl·lules endotelials és específica i estaria modulada per la via de senyalització de CD40, possiblement a través de la regulació de TLR-3. Aquestes dades proporcionen evidències de la rellevància funcional de l'expressió d'aquest receptor en cèl·lules endotelials, i confirmen el paper clau de CD40 com a nexse d'unió entre immunitat adquirida i immunitat innata.

### 4.2.2.4. APELIN

L'Apelin (APLN) és un pèptid bioactiu originalment identificat en extractes d'estómac boví com el lligand endogen d'un receptor orfe associat a proteïna G anomenat APJ [298]. Apelin es sintetitza com a un prepropèptid de 77 aa que és processat posttraduccionalment donant lloc a un fragment de 55 aa i altres formes més petites de 36, 17, 13 i 12 aa. La forma fisiològicament activa es creu que seria l'Apelin-36, i la biològicament més efectiva seria la forma piroglutamilada d'Apelin-13 (pGlu-Apelin-13). Hi ha poca informació sobre el paper fisiològic de l'Apelin, però sembla que estaria involucrada en la regulació de la funció cardiovascular [299-301] i l'homeòstasi de fluids [302].

D'acord amb un possible paper rellevant en angiogènesi, l'expressió d'Apelin durant el desenvolupament embrionari es troba restringida en àrees amb una formació vascular activa, on s'expressa de forma abundant en cèl·lules endotelials. A més, durant la formació de nous vasos sanguinis té lloc una inducció de l'expressió del seu receptor APJ, concordant amb una funció angiogènica. Hi ha evidències que suggereixen que l'Apelin promouria el procés d'angiogènesi induint la migració, la proliferació i la formació de tubs capil·lars en cèl·lules endotelials de retina [303]. Mentre que durant l'embriogènesi l'Apelin s'expressa també en cardiomiòcits, en adults en canvi, la seva expressió està principalment restringida a l'endoteli vascular.

Pel que fa a la seva funció en el sistema cardiovascular adult, la senyalització via Apelin modula la funció contràctil cardíaca i el to vascular. S'ha descrit que l'Apelin actuaria com a un potent ionòtrop positiu [304]. Estudis clínics indiquen que l'expressió de l'Apelin estaria fortament regulada en condicions d'insuficiència cardíaca, ja que s'han trobat concentracions alterades del receptor APJ i el pèptid en pacients amb cardiomiopatia on l'Apelin tindria un possible efecte cardioprotector [305]. L'Apelin també s'ha descrit que estaria implicada en la regulació de la pressió sanguínia per un mecanisme dependent d'òxid nítric [299, 306].

El perfil transcripcional resultant de l'activació de les cèl·lules endotelials via CD40, va mostrar que el transcrit que codifica per Apelin és el que veia disminuïda la seva expressió a major nivell en activar-se la via de senyalització de CD40 en aquestes cèl·lules en tots 3 temps d'estimulació analitzats. Dues sondes independents mostraven el mateix comportament (sondes Agilent 1 i 2) mentre que una tercera sonda no estava regulada (sonda Agilent 3).

El gen de l'Apelin presenta dues senyals de poliadenilació a la regió 3'UTR que poden donar lloc a dos transcrits alternatius: un transcrit de 3,1 kb i un transcrit més curt de 2,7 kb. L'existència de transcrits alternatius feia pensar en que pogués donar-se una regulació diferencial dels dos transcrits. L'anàlisi d'expressió per qRT-PCR a temps real amb primers

que reconeixien la forma amb 3' UTR més llarga concordava amb la possibilitat de que aquest transcrit estigués regulat (Figura 90), però no era possible establir si la forma curta estava regulada.

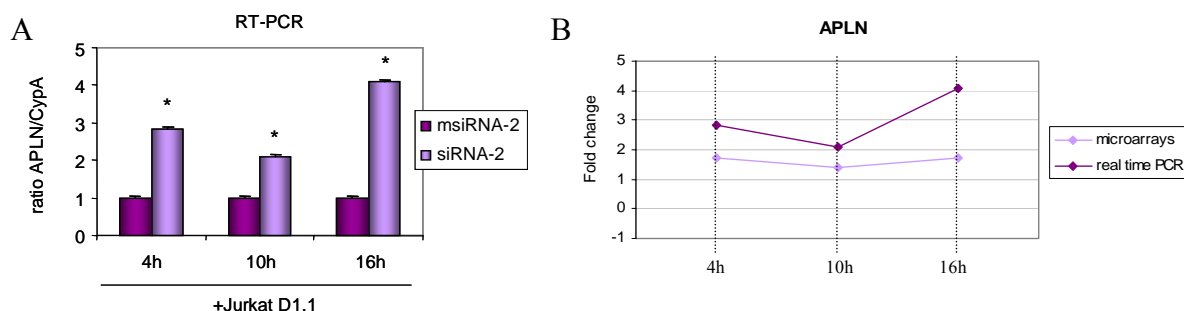


Figura 90. A). Anàlisi de l'expressió del transcrit de APLN per qRT-PCR en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA i estimulades amb Jurkat D1.1 a 4, 10 i 16 hores. Els resultats són la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents. (\* $p < 0.05$ ). B). Comparació del perfil transcripcional de APLN obtingut per microarrays (sonda Agilent 1) i per qRT-PCR (F3-R3).

#### 4.2.2.4.1. Northern

Utilitzant la tècnica de Northern blot i fent servir dues sondes de cDNA (F3-R3 i F4-R4), es va quantificar l'expressió d'ambdós transcrits en cèl·lules endotelials.

A la Figura 91 es mostra la localització al llarg de la seqüència de mRNA del gen de l'Apelin, de les diferents sondes d'Agilent contingudes en els microarrays i els fragments de RT-PCR utilitzats com a sonda en l'anàlisi de Northern.

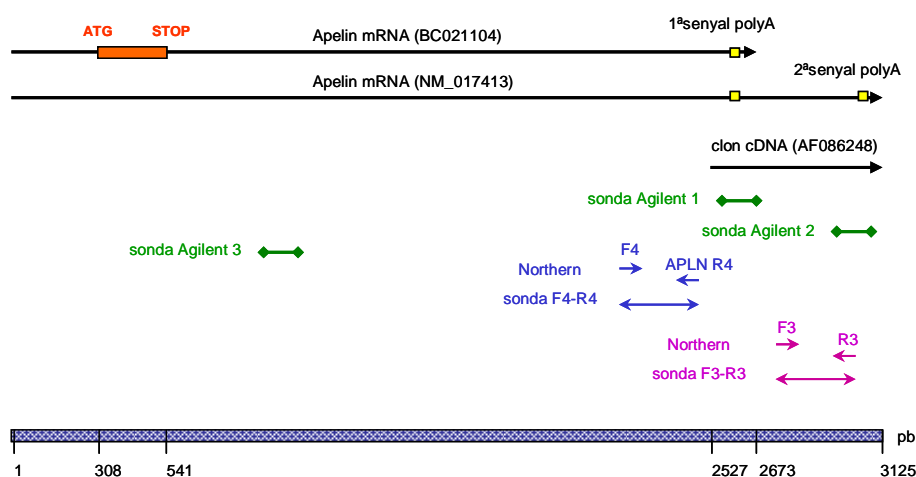


Figura 91. Localització al llarg de la seqüència del mRNA del gen d'Apelin, de les diferents sondes utilitzades per l'anàlisi de Northern i els experiments de microarrays.

Inicialment es va comparar el nivell d'expressió dels dos transcrits d'Apelin en cèl·lules HUVEC en condicions basals i en condicions proinflamàtores, ja fossin crescudes en presència de les citoquines TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , o estimulades via CD40L mitjançant cocultiu amb

## Resultats

Jurkat D1.1 durant 4 hores. Tal i com s'observa a la Figura 92, en cèl·lules HUVEC crescudes en condicions proinflamatòries, tenia lloc una disminució molt significativa de l'expressió de tots dos transcrits de l'Apelin, comparat amb els nivells d'expressió basal observats en cèl·lules no estimulades.

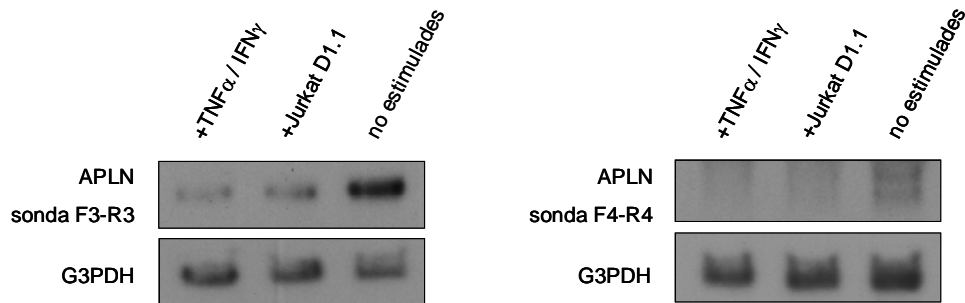


Figura 92. Quantificació de l'expressió dels dos transcrits de APLN en cèl·lules HUVEC estimulades amb Jurkat D1.1 o amb les citoquines proinflamatòries TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ .

Posteriorment, per comprovar que l'efecte d'estimulació de les cèl·lules Jurkat D1.1 era directament dependent de CD40, es va quantificar l'expressió dels dos transcrits de l'Apelin en les cèl·lules HUVEC transfectades amb el siRNA-2 anti-CD40 o en cèl·lules tractades amb el msiRNA-2. Tal i com s'observa a la Figura 93, la inhibició de CD40 per RNAi causa un increment en el nivell d'expressió del gen de l'Apelin, tant en el cas del transcrit curt de 2,7 kb, com pel transcrit més llarg de 3,1 kb.

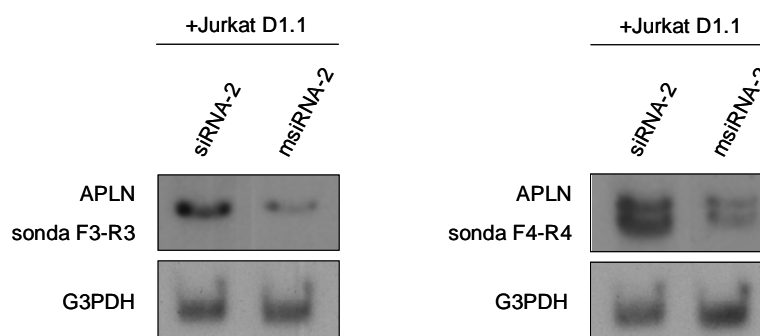


Figura 93. Quantificació de l'expressió dels dos transcrits de APLN en cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA i estimulades amb Jurkat D1.1 durant 4 hores.

El siRNA-2 reverteix la inhibició de l'expressió del transcrit d'Apelin en cèl·lules endotelials activades via CD40L. Aquests resultats indiquen que l'expressió del transcrit d'Apelin està regulada per la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials i que el control d'aquesta regulació podria ser important en el procés inflamatori.

### 4.2.2.4.2. Western

Per altra banda es volia determinar si aquesta regulació de l'expressió de l'Apelin a

nivell de transcrit es veia reflectida també en una regulació de l'expressió a nivell de proteïna.

Es va quantificar la proteïna intracel·lularment mitjançant la tècnica de Western blot a partir d'extractes proteics cel·lulars de HUVEC. Els resultats es mostren a la Figura 94. Segons els resultats, en cèl·lules HUVEC activades via CD40L durant 4 hores, té lloc una disminució de l'expressió de la proteïna Apelin intracel·lular en comparació amb cèl·lules no estimulades. Per tant, la disminució observada en el mRNA del gen Apelin en condicions proinflamatòries, es correlaciona amb una disminució en els nivells del prepropèptid de 77 aa. Per altra banda, en inhibir el receptor CD40 amb siRNA-2 es recupera el nivell basal d'expressió del prepropèptid en comparació amb cèl·lules tractades amb el msiRNA-2.

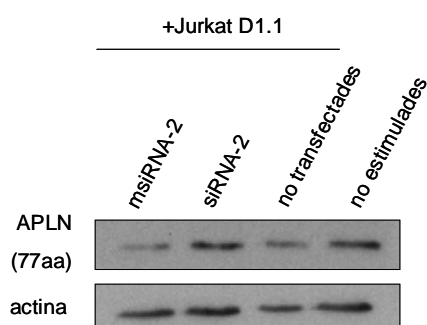


Figura 94. Quantificació de l'expressió a nivell proteic del prepropèptid de APLN en cèl·lules HUVEC control i HUVEC transfectades amb siRNA-2 anti-CD40 i msiRNA-2 i estimulades amb Jurkat D1.1 durant 4 hores.

Tot i així, l'efecte del silenciament gènic de CD40 per RNAi sobre la regulació de l'Apelin a nivell posttranscripcional en cèl·lules HUVEC activades via CD40L, és menor que l'observat anteriorment a nivell de transcrit.

D'aquest estudi es desprèn que en condicions proinflamatòries es produeix una disminució de l'expressió de l'Apelin en cèl·lules endotelials tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna, i que la regulació de l'expressió d'aquest pèptid està mediada per CD40. Aquests resultats confirmen per una banda la importància de la senyalització via CD40 en la regulació dels nivells de l'Apelin en cèl·lules endotelials i per altre, la rellevància d'aquest pèptid en els processos inflamatoris d'origen cardiovascular.



**4.3. CONSEQÜÈNCIES DE LA INHIBICIÓ DE CD40 IN VIVO MITJANÇANT RNAi. APLICACIÓ PER A LA INDUCCIÓ DE TOLERÀNCIA EN UN MODEL D'AL·LOTRASPLANTAMENT RENAL EN RATA**





### 4.3.1. Disseny i síntesi de siRNAs anti-CD40 de rata

Inicialment es van dissenyar un total de 6 siRNAs de 21 pb dirigits contra la seqüència de CD40 de rata (GenBank Acc.Nº AF241231). Aquests siRNAs es van dissenyar al llarg de la seqüència codificant parcial del cDNA de CD40 de rata de 547 pb que estava publicada a la base de dades de GenBank en el moment de la realització d'aquest treball. Aquests siRNAs dúplex van ser sintetitzats per transcripció *in vitro* fent servir la T7 RNA polimerasa i el sistema *Silencer Construction kit* d'Ambion. Posteriorment es van utilitzar 3 nous siRNAs (TNFRSF5\_1, TNFRSF5\_2 i TNFRSF5\_3), anomenats *Silencer pre-designed siRNAs*, els quals van ser dissenyats i sintetitzats químicament per Ambion fent servir un algoritme desenvolupat per *Cenix BioScience*.

En la següent figura es mostra la distribució d'aquests 9 siRNAs al llarg de la seqüència parcial del cDNA de CD40 de rata.

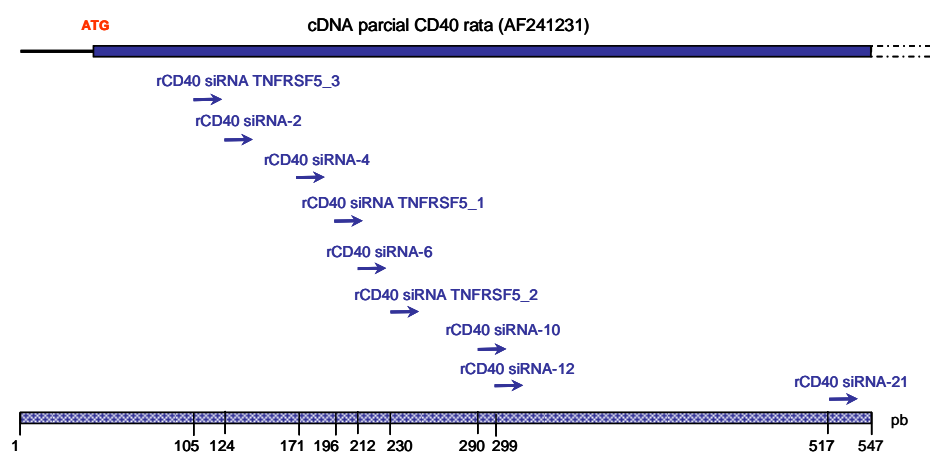


Figura 95. Representació gràfica de la distribució dels siRNAs dissenyats al llarg de la seqüència parcial del cDNA de CD40 de rata.

NOM	SEQ	ATG position	NOM	SEQ	ATG position
rCD40-RNAi-2	ACAGUACCUCCAAGGUGGCUU UUUGUCAUGGAGGUUCCACCG	124-145	TNFRSF5-1	GCUCUUGAGAAGACCCAAUUU GTCGAGAACUCUUCUGGGUUA	157-175
rCD40-RNAi-4	ACCGACUAGUUAGCCACUGUU UUUGGCUGAUCAAUCGGUGAC	171-192	TNFRSF5-2	GGCGAAUUCUCAGCUCACUUU GTCCGCUUAAGAGUCGAGUGA	193-211
rCD40-RNAi-6	UGCCAACCGUGCGACUCAGUU UUACGGUUGGCACGCUGAGUC	212-233	TNFRSF5-3	GUGUGUUACGUGCAGUGACUU GTCACACAAUGCACGUCACUG	66-84
rCD40-RNAi-10	CUCAAUCAAGGGCUUCAGGUU UUGAGUUAGUCCCGAAGUCC	290-251			
rCD40-RNAi-12	GGGCUUCAGGUUAAGAAGGUU UUCCGAAGUCCAAUUCUCC	299-320			
rCD40-RNAi-21	GUGUCAUCCAUGGACAAGCUU UUCACAGUAGGUACCGUUCG	517-538			

Taula 27. Seqüència i localització respecte al codó d'inici ATG dintre del cDNA de CD40 de rata dels 6 siRNAs dissenyats i sintetitzats per transcripció *in vitro* i els 3 siRNAs generats per síntesi química.

### 4.3.2. Anàlisi de l'expressió de CD40 de rata per qRT-PCR

Es va analitzar l'expressió de CD40 endogen a nivell de mRNA en diferents línies cel·lulars i cultius primaris de rata mitjançant la tècnica de qRT-PCR a temps real.

Tal i com es mostra a la següent taula, es va detectar expressió de CD40 en totes les línies cel·lulars analitzades, sent les cèl·lules A7r5, una línia de musculatura embrionària d'aorta de rata, i el cultiu primari SMC (*aortic smooth muscle cells*) les que presentaven un major nivell d'expressió del transcrit CD40.

Línia cel·lular		expressió CD40
<b>transformada</b>		
NRK-52E	epitelial de ronyó	+
C58	limfoma	+
L6E9	musculatura esquelètica	+
ARL-6	hepatoma	+
A7r5	musculatura embrionària d'aorta	++
<b>cultiu primari</b>		
SMC	musculatura llisa d'aorta	+++
mesangials		+

Taula 28. Expressió del mRNA de CD40 de rata en diferents línies cel·lulars i cultius primaris.

### 4.3.3. Optimització del sistema de transfecció de siRNAs in vitro

Per tal de seleccionar el tipus cel·lular on realitzar el cribatge dels diferents siRNAs dissenyats contra CD40 de rata, calia trobar una línia cel·lular que expressés CD40 i fos fàcilment transfectable. Amb aquest objectiu es va comparar l'eficiència de transfecció dels dos tipus cel·lulars que expressaven CD40 a nivells més elevats: A7r5 i el cultiu primari SMC. Per optimitzar el sistema de transfecció en aquestes cèl·lules, es van utilitzar diferents lípids catiónics: OligofectAMINA (Invitrogen), jetSI siRNA *transfection reagent* (QBiogene), RNAifect *transfection reagent* (Qiagen) i Targefect (*Targeting systems*). Es van transfectar les cèl·lules amb cadascun d'aquests lípids catiónics acomplexats a un siRNA marcat amb Cy3 a una concentració de 100nM, seguint el protocol descrit pel fabricant en cada cas.

Mitjançant microscopia de fluorescència, 5 hores després de la transfecció, es va visualitzar el percentatge aproximat de cèl·lules que incorporaven la fluorescència, al mateix temps que es determinava el grau de citotoxicitat del sistema de transfecció utilitzat. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 29. En general es va obtenir una baixa eficiència de transfecció amb els diferents lípids catiónics utilitzats i en els dos tipus cel·lulars anteriors.

Línia cel·lular	expressió CD40	Transfecció oligofectamina	Transfecció jet SI	Transfecció rRNAifect	Transfecció targefect
A7r5	++	>10-15%	>10%	>20-30%	~ 40% (↑toxicitat)
cultiu primari					
SMC	+++	>5-10%	0%	>20-30%	50%

Taula 29. Eficiència de transfecció de A7r5 i SMC utilitzant diferents sistemes de transfecció.

Finalment, es va seleccionar el cultiu primari SMC per ser el que presentava una major eficiència de transfecció i una menor toxicitat fent servir el lípid catiónic Targefect. Aproximadament un 50% de les cèl·lules eren transfectades i incorporaven el siRNA fluorescent. Un cop dins la cèl·lula, aquests complexos es localitzaven majoritàriament en el citoplasma de la cèl·lula transfectada (Figura 96).

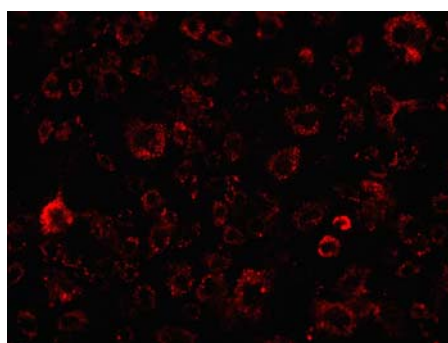


Figura 96. Localització cel·lular dels complexos siRNA-Cy3-Targefect en les SMC.

#### 4.3.4. Eficàcia inhibidora de CD40 de rata per siRNA en SMC

Per tal de determinar l'eficàcia inhibidora dels 6 siRNAs inicialment dissenyats contra CD40 de rata, es va transfectar el cultiu primari de cèl·lules SMC amb cadascun d'aquests siRNAs utilitzant el lípid catiónic Targefect i seguint el protocol descrit a l'apartat de materials i mètodes. Es va quantificar l'expressió de CD40 en aquestes cèl·lules tant a nivell de transcrit per qRT-PCR a temps real, com a nivell de proteïna per Western blot. Es va comparar l'expressió de CD40 de cèl·lules que havien estat transfectades amb cadascun dels siRNAs anti-CD40 i les mateixes cèl·lules tractades amb un siRNA-control *scrambled* no específic. A la Figura 97 es mostren els resultats obtinguts a nivell proteic.

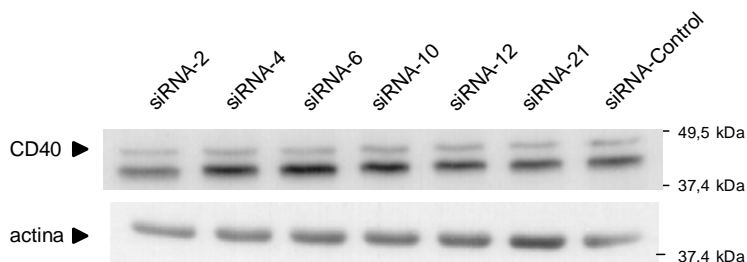


Figura 97. Anàlisi per Western blot de l'expressió de CD40 de rata en SMC transfectades amb els diferents siRNAs dissenyats.

Cap dels 6 siRNAs dissenyats mostrava una inhibició significativa de l'expressió basal de CD40 de rata en comparació amb el siRNA-control en aquestes cèl·lules.

A causa de la baixa eficàcia inhibidora observada per aquests 6 siRNAs dissenyats anti-CD40 es va demanar a Ambion la síntesi de 3 nous *pre-designed* siRNAs: TNFRSF5\_1, TNFRSF5\_2 i TNFRSF5\_3. L'algoritme utilitzat per dissenyar aquests siRNAs té en compte la composició en C/G de certs residus en l'extrem 3' i 5' de la cadena antisentit, la temperatura de fusió de dominis interns específics del siRNA, la posició de la seqüència diana dins la regió codificant i el contingut de nucleòtids de l'extrem 3' cohesiu del siRNA, garantint una elevada eficàcia i especificitat d'aquests siRNAs.

Un percentatge significatiu del total de siRNAs que es dissenyen per a un determinat gen resulta no ser eficaç. De mitjana només 1 de cada 5 siRNAs seleccionats contra una regió específica del gen diana mostra un silenciament gènic eficaç. Les possibles causes del fracàs d'un siRNA particular poden ser la inestabilitat del siRNA *in vivo*, la incapacitat d'aquest siRNA per interaccionar amb els components de la maquinària de RNAi, o la inaccessibilitat d'aquest siRNA al seu mRNA diana a causa d'impediments estructurals secundaris locals.

Per altra banda i donada l'elevada variabilitat interassaig observada en l'eficiència de transfecció del cultiu primari de cèl·lules SMC, es va decidir utilitzar un mètode alternatiu de cribatge d'aquests 9 siRNAs anti-CD40 de rata dissenyats.

### 4.3.5. *Gene Eraser luciferase gene suppression system*

El *Gene Eraser luciferase gene suppression system* de Promega representa una aproximació quantitativa per realitzar el cribatge de múltiples siRNAs *in vitro*. Aquest sistema permet monitoritzar canvis en l'expressió del gen de la luciferasa com a resultat de la inducció del mecanisme de RNAi. L'esquema es mostra a la Figura 98.

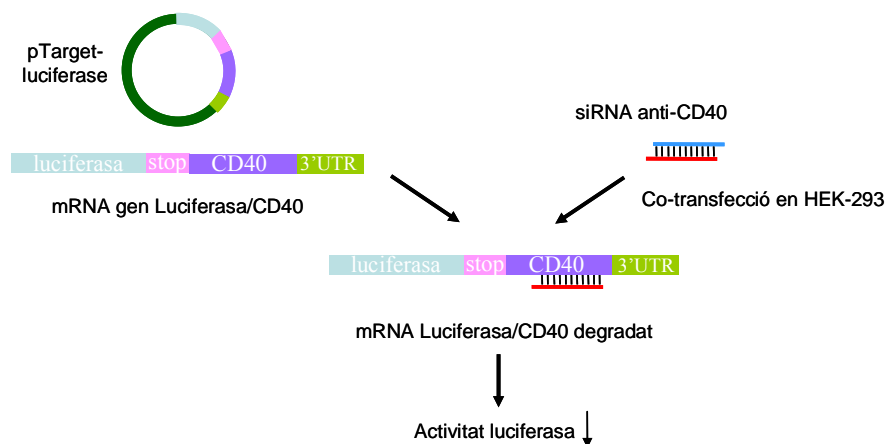


Figura 98. Esquema del sistema de cribatge *Gene Eraser luciferase gene suppression system*.

Aquest sistema es basa en clonar la seqüència del cDNA d'interès en un plasmidi que incorpora el gen reporter de la luciferasa. Es cotransfecten cèl·lules HEK-293 amb aquesta construcció i els diferents siRNAs dissenyats. L'efecte d'unió del siRNA al gen diana resulta en la degradació d'aquest mRNA de fusió. Posteriorment es mesura el descens en l'activitat luciferasa com a indicador de l'efecte de RNAi.

Com a control de transfecció, es cotransfectaven en paral·lel cèl·lules HEK-293 amb un plasmidi que contenia el gen de la lamina A/C fusionat al gen de la luciferasa i un siRNA anti-lamina A/C o un siRNA-control negatiu.

Utilitzant aquest sistema de cribatge, 5 dels 9 siRNAs dissenyats mostraven certa inhibició de l'expressió de luciferasa, sent els siRNAs TNFRSF5\_1 i TNFRSF5\_2, els que presentaven una major eficiència silenciadora, de l'ordre del 81-84%, comparable a la obtinguda amb el siRNA-2 anti-CD40 humà (Figura 99).

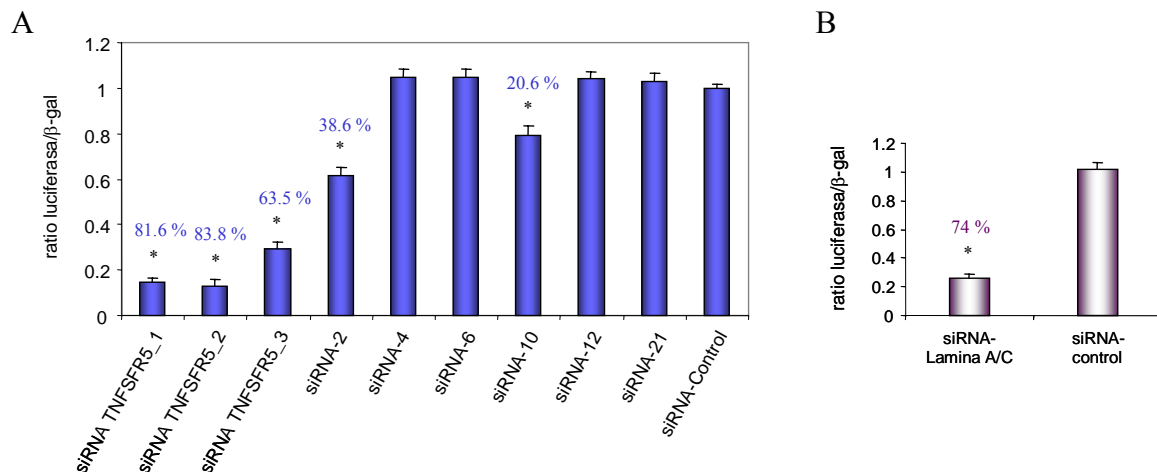


Figura 99. A). Quantificació de l'activitat luciferasa en HEK-293 fent servir aquest sistema de cribatge dels diferents siRNAs dissenyats anti-CD40 de rata. B). Inhibició de l'expressió de lamina A/C com a control positiu del sistema. Els resultats són la mitja ± SD de 3 experiments independents.

#### 4.3.6. Estudis *in vivo*

Un cop obtingut el siRNA que presentava una elevada eficàcia inhibidora del receptor CD40 de rata, l'objectiu dels experiments *in vivo* era determinar els efectes biològics a curt i llarg termini d'aquestes molècules i veure si el seu ús representa una eina eficaç per assolir el bloqueig del senyal coestimulador i així evitar el rebuig agut i induir un estat de tolerància immunològica en un model experimental d'al·lotrasplantament renal en rates.

Es van abordar diferents estratègies per tal d'optimitzar el sistema de transferència que permetés la màxima incorporació d'aquest material genètic als tipus cel·lulars més rellevants en una situació de rebuig en trasplantament renal causant la mínima toxicitat.

Aquesta part del treball es va realitzar en col·laboració amb el Laboratori de Nefrologia Experimental del Servei de Nefrologia de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB).

### 4.3.6.1. Bany d'òrgans

Inicialment es va fer servir el sistema de bany d'òrgans per reperfondre el ronyó *ex vivo*. L'esquema del sistema de bany d'òrgans i el protocol utilitzat es detallen a l'apartat de materials i mètodes. Es van realitzar diversos experiments de perfusió *ex vivo* amb aquest sistema fent servir com a vehicle de transferència el polímer catiónic lineal *in vivo* jet PEI (Qbiogene) acomplexat a un oligonucleòtid fosforotioat marcat amb biotina (PS-ODN-Biotina). Es reperfonia el ronyó i seguidament aquest era processat per immunohistoquímica. Segons els resultats obtinguts, tenia lloc la filtració glomerular cap als túbuls renals i el ODN es localitzava en el nucli de les cèl·lules tubulars proximals (Figura 100).

El comportament dels complexos un cop dins el glomèrul i la ruta que aquests seguiran en el ronyó depèn de la seva mida i càrrega, ja que aquests paràmetres són els que determinen el pas dels complexos a través de la barrera de filtració glomerular [307]. A diferència de lípids catiónics com la citofectina (utilitzada anteriorment), el polímer catiónic *in vivo* jet PEI forma complexos de menor tamany (70-100nm) i amb una forma menys globular, la qual cosa facilitaria el seu pas a través de la barrera de filtració glomerular [308]. Això explica per què aquest vector és més eficient en l'arribada fins als túbuls renals. S'han realitzat diferents experiments de perfusió amb aquest vector variant la relació N/P (nombre de residus de nitrogen del polímer catiónic per cada grup fosfat del DNA, que mesura la càrrega iònica dels complexos) sense observar millores significatives en l'eficiència de transfecció.

El polímer lineal jet PEI escollit per als experiments de perfusió, havia estat emprat abans en altres estudis *in vivo*, sent menys tòxic que el PEI *branched* 25 kDa (no lineal), el qual s'ha descrit que causa dany glomerular i tubular, activació del complement i trombosi capil·lar en experiments de perfusió *ex vivo* del ronyó [278], impeding la correcta reperfusió de l'òrgan un cop aquest havia estat trasplantat.

Per tal d'avaluar la potencial citotoxicitat d'aquest sistema de bany d'òrgans i el polímer catiónic *in vivo* jet PEI, es va realitzar l'experiment de perfusió *ex vivo* i posteriorment aquest ronyó era trasplantat en una rata receptora on prèviament s'havia extret el ronyó contralateral (nefrectomia contralateral). A les 48 hores posttrasplantament el ronyó va ser processat per immunohistoquímica. Es va observar que els complexos es localitzaven dins els nuclis de les cèl·lules tubulars, però el ronyó presentava cert grau de necrosi tubular. Els túbuls renals

estaven dilatats i s'observava la presència de restes de cèl·lules tubulars necrotitzades dins l'espai tubular.

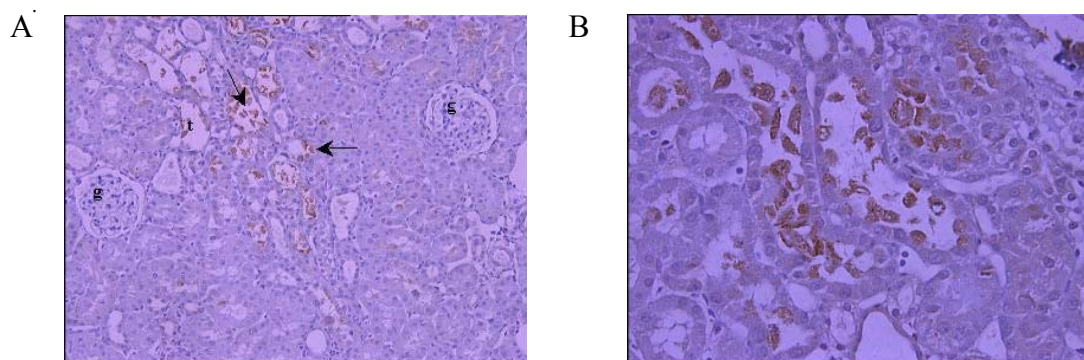


Figura 100. Localització dels complexos PS-ODN-Biotina-jet-PEI en el ronyó perfós 48 hores posttrasplantament. A). 200X. B). 400X. g, glomèrul; t, túbul renal.

Es va realitzar un experiment control amb aquest sistema de bany d'òrgans on es perfonia el ronyó amb el líquid de reperfusió sol i posteriorment el ronyó reperfós era trasplantat. Segons els resultats observats, el sistema de perfusió *ex vivo* per si mateix causava cert dany isquèmic en els ronyons perfosos 48 hores després del trasplantament. Per aquest motiu es va decidir canviar d'estratègia i perfondre el ronyó *in situ*.

#### 4.3.6.2. Perfusió *in situ*

En el sistema de perfusió *in situ*, el ronyó era perfós *in situ* en la rata donadora administrant un oligonucleòtid biotinilat acomplexat amb el polímer catiònic *in vivo* jet PEI mitjançant injecció directa a l'artèria renal. Posteriorment la rata era sacrificada, el ronyó extret i trasplantat en una rata receptora. 48 hores posttrasplantament, el ronyó era processat per immunohistoquímica. Tal i com s'observa a la Figura 101, la perfusió *in situ* permetia assolir una bona transferència gènica al ronyó amb l'avantatge que, a diferència del sistema de bany d'òrgans, causava una menor toxicitat en l'òrgan.

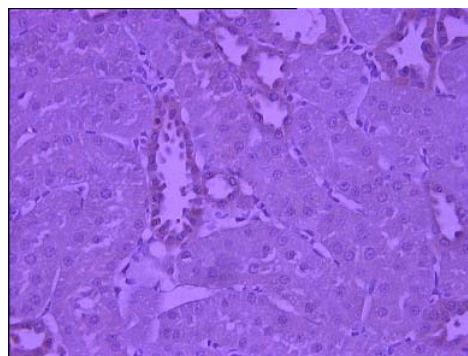


Figura 101. Localització dels complexos PS-ODN-Biotina-jet-PEI en el ronyó perfós 48 hores posttrasplantament. 400X.



### 4.3.6.3. Electrotransferència

Una altra tècnica utilitzada va ser l'electrotransferència d'aquest material genètic *in vivo* en el ronyó a trasplantar. Aquesta tècnica consisteix en la injecció intraarterial de l'oligonucleòtid biotinitat seguida de l'aplicació d'un o diversos camps elèctrics. Per tal d'optimitzar aquest sistema es van provar diferents condicions de voltatge, nombre de polsos i durada de cadascun d'aquests. Finalment la rata era sacrificada, el ronyó electroporat era extret i trasplantat en una rata receptora prèviament nefrectomitzada. 48 hores posttrasplantament, el ronyó era processat per immunohistoquímica i avaluada la possible toxicitat del sistema.

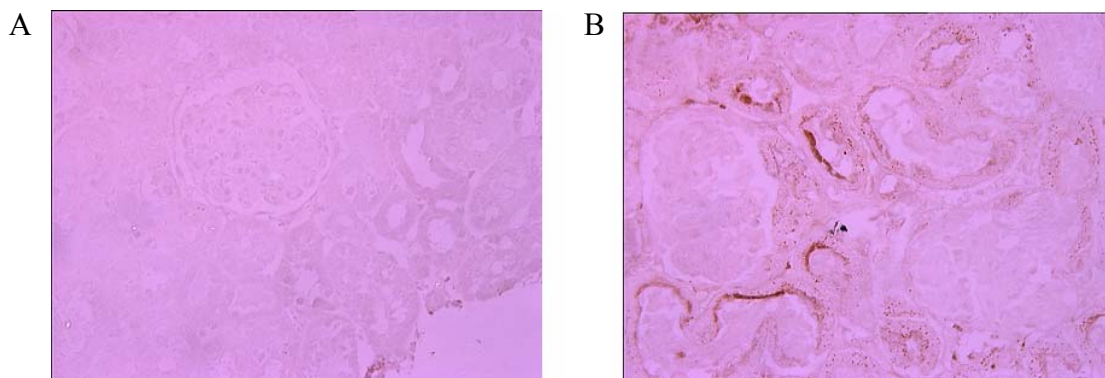


Figura 102. Localització dels complexos PS-ODN-Biotina en el ronyó perfós 48 hores posttrasplantament. A). Ronyó control no tractat. B). Ronyó electroporat amb ODN-Biotina. 200X.

Segons s'observa a la Figura 102, els ronyons electroporats incorporen l'oligonucleòtid biotinitat i mantenen una arquitectura renal ben conservada sense presentar necrosi tubular. Aquests resultats indiquen que l'electrotransferència representa una alternativa eficient a la perfusió *in situ* de l'òrgan amb una elevada eficiència de transferència gènica a les estructures renals causant la mínima toxicitat.

En l'actualitat s'estan realitzant assaigs de transferència del siRNA anti-CD40 de rata TNFSFR5\_2 en el ronyó a trasplantar amb la finalitat de silenciar temporalment l'expressió del receptor CD40 en les cèl·lules renals i bloquejar la interacció CD40-CD40L essencial per a la inducció del procés immunoinflamatori que dona lloc al rebuig.

S'ha fet servir un model experimental de rebuig agut en trasplantament renal al·logènic, caracteritzat prèviament en el grup [309], entre rates Wistar-Agouti (WA) i rates Brown-Norway (BN). El trasplantament es va fer utilitzant rates WA com a receptores de ronyons al·logènics de rates BN. Per a l'electrotransferència, es va fer servir 30µg de siRNA anti-CD40 o d'un siRNA-control en 1 ml de solució de preservació EuroCollins (2µM). El siRNA



s'incorporava per l'artèria renal seguit de l'electroporació del ronyó en dosi única prèvia al trasplantament. Les condicions d'electroporació utilitzades van ser 6 polsos de 20ms a 100V/cm. En el moment del trasplantament, les rates receptores eren bilateralment nefrectomitzades.

Inicialment es va fer un seguiment de la incorporació del siRNA marcat amb FITC a diferents temps posttrasplantament. A la Figura 103 es mostra la incorporació d'aquest siRNA marcat a la cèl·lula tubular sense causar danys a l'estructura renal fins a 48 hores posttrasplantament.

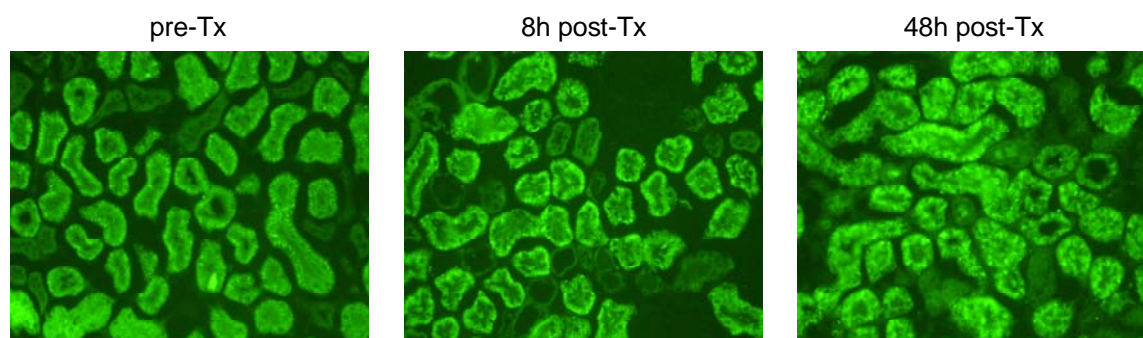


Figura 103. Imatges de fluorescència de la incorporació del siRNA marcat a teixit renal a diferents hores posttrasplantament entre rates al·logèniques binefrectomitzades. 200X.

L'anàlisi per qRT-PCR dels nivells del mRNA de CD40, mostrava que CD40 es trobava sobreexpressat en les cèl·lules tubulars, paret dels vasos i glomèruls del grup d'animals control que desenvolupaven rebuig agut, a diferència dels animals tractats amb siRNA anti-CD40 on tenia lloc una disminució significativa de l'expressió del receptor en teixit renal (Figura 104). En associació amb el tractament amb l'immunosupressor rapamicina (un dels immunosupressors més utilitzat en trasplantament), aquesta inhibició de l'expressió de CD40 era superior, assolint-se nivells d'expressió similars als observats en el cas d'un trasplantament singènic.

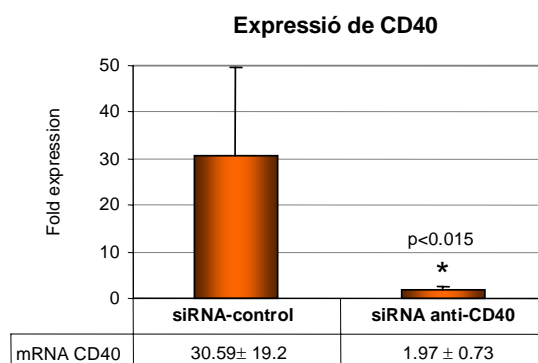


Figura 104. Quantificació de l'expressió de CD40 en ronyons tractats amb siRNA-control o siRNA anti-CD40 i trasplantats en el model de rebuig agut al·logènic. Els resultats són la mitja ± SD de 5 animals.

Resultats preliminars indiquen una major supervivència dels animals trasplantats amb els ronyons tractats amb el siRNA anti-CD40 de rata. Es van comparar els resultats obtinguts amb l'administració conjunta de dosis terapèutiques de rapamicina. El temps mig de supervivència de les rates tractades amb siRNA anti-CD40 en comparació amb les rates control (7 dies) gairebé es va duplicar, i en associar-se amb l'administració de rapamicina tenia lloc un increment significatiu de la supervivència. En els animals tractats amb siRNA anti-CD40 es retardava l'aparició d'insuficiència renal en comparació amb els animals no tractats. En els animals on el siRNA anti-CD40 s'associava amb rapamicina, a més, es recuperaven els valors normals de creatinina en sèrum.

A nivell histològic, els animals no tractats desenvolupaven diferents graus de necrosi tubular amb infiltrat cel·lular (amb presència de macròfags i cèl·lules NK), hemorràgia intersticial, dany vascular amb necrosi fibroide en els vasos sanguinis i glomèruls, i edema perivascular. Aquests animals presentaven, a més, rebuig agut humoral amb producció d'anticossos. En els animals tractats amb siRNA anti-CD40 en canvi, l'afectació histològica era menor, observant-se una disminució de la incidència de rebuig agut humoral, tot i que en alguns casos existia cert rebuig de tipus cel·lular.

Amb aquests resultats, encara que preliminars, es demostra l'efectivitat del siRNA anti-CD40 de rata *in vivo* i el paper del senyal CD40-CD40L en l'evolució del rebuig agut en un model de trasplantament renal al·logènic.