

---

## ***5.DISCUSSIÓ***



El procés inflamatori és una resposta complexa del teixit vascularitzat al dany en un intent per restablir l'homeòstasi. L'alteració anòmala de la resposta inflamatòria és la causa de moltes patologies com l'aterosclerosi, les malalties autoimmunes, la fibrosi pulmonar, l'asma i el rebuig en trasplantament d'òrgans. Les cèl·lules endotelials són claus en aquest procés ja que estan en contacte directe amb el sistema immune i són una component essencial de la vasculatura. El receptor CD40 està implicat en l'amplificació i regulació d'aquesta resposta inflamatòria en cèl·lules endotelials. L'objectiu d'aquest estudi és aprofundir en el coneixement a nivell molecular del procés d'activació endotelial i les rutes de senyalització activades exclusivament via CD40 implicades en el procés inflamatori.

### Disseny i caracterització d'un siRNA anti-CD40 humà

Amb la finalitat d'assolir la inhibició de l'expressió gènica de CD40 inicialment es va utilitzar la tecnologia antisentit. Es van dissenyar i sintetitzar 8 oligonucleòtids antisentit amb enllaços de tipus fosforotioat per estabilitzar i protegir aquestes molècules de la degradació enzimàtica per nucleases. Donat que cap d'aquests oligonucleòtids antisentit va mostrar una inhibició efectiva de l'expressió de CD40 *in vitro*, es va optar per utilitzar la recentment desenvolupada tecnologia de siRNAs aprofitant la maquinària endògena cel·lular de RNAi.

El silenciament de l'expressió gènica utilitzant siRNAs s'ha descrit que és molt més efectiu que altres estratègies com l'ús d'anticossos bloquejants o oligonucleòtids antisentit. L'eficàcia del bloqueig és més potent i el silenciament del gen diana és més específic [310]. El nivell d'inhibició mig causat per un siRNA, és de l'ordre de 100 a 1000 vegades superior que la d'un oligonucleòtid fosforotioat òptim dirigit contra el mateix gen diana [311]. A més, s'ha descrit que els siRNAs són més resistents a la degradació per nucleases intracel·lulars i extracel·lulars que els oligonucleòtids antisentit [312].

En comparació amb els oligonucleòtids antisentit, l'eficàcia de la transfecció de siRNAs *in vitro* és millor, la qual cosa permet assolir un silenciament gènic estable al llarg del temps [228]. Mitjançant l'ús d'un vector amb promotor específic de teixit o liposomes dirigits amb anticòs conjugat a la seva superfície, es pot assolir el silenciament gènic específic en un determinat teixit o tipus cel·lular [313]. A més, per incrementar la seva eficàcia, és possible aconseguir el silenciament simultani de múltiples gens o múltiples exons d'un mateix gen [226]. Pel que fa a la seva utilització *in vivo*, l'ús de siRNAs és més pràctic i segur que altres metodologies, donat que concentracions baixes de siRNA permeten obtenir l'efecte terapèutic desitjat.

Un dels desafiaments més grans per assolir el silenciament gènic mitjançant la

tecnologia antisentit o de RNAi és identificar la seqüència d'unió més efectiva dins del mRNA diana que proporcioni el silenciament més potent amb la menor concentració de l'agent [314]. El fet de trobar una seqüència efectiva dins del mRNA no és trivial. Hi ha diferents factors que afecten que una seqüència donada sigui una bona candidata, com per exemple, l'accessibilitat d'unió del siRNA a aquesta seqüència a causa de l'estructura secundària interna d'aquest mRNA o d'una oclusió estèrica, ja que hi ha llocs dins del mRNA que poden estar bloquejats *in vivo* per proteïnes i polications. Per a un determinat mRNA diana, la majoria d'aquests factors no són coneguts o previsibles *a priori*. El que fa que el mecanisme de RNAi sigui tan atractiu, és que a diferència d'altres tecnologies antisentit, hi ha moltes seqüències que poden causar un silenciament de l'expressió gènica eficient. Els mètodes utilitzats inicialment pel disseny de siRNAs permetien que, estadísticament, una de cada cinc seqüències fos efectiva. Actualment, existeixen diferents algorismes disponibles via *web* que es poden utilitzar per ajudar en la selecció del siRNA més potent per a un determinat gen diana, de tal manera que de mitjana una de cada dues seqüències provades serà capaç d'inhibir l'expressió gènica. En aquest treball, per al disseny de siRNAs anti-CD40 de rata s'ha utilitzat un algorisme desenvolupat per *Cenix BioScience* (Ambion). La major part d'aquests algorismes tenen en compte diferents factors com per exemple, el contingut mitjà de G-C en la seqüència i la identificació d'un determinat nucleòtid en una posició determinada, i es basen en anar recopilant trets similars entre seqüències de siRNA eficaces que han estat testades experimentalment.

A més de la seqüència del siRNA i la seva accessibilitat al mRNA diana, l'eficàcia del siRNA en la supressió gènica depèn d'altres factors, com per exemple, de la capacitat de la cèl·lula per incorporar aquest siRNA, i de la vida mitja del missatger o de la proteïna.

Per al desenvolupament terapèutic d'un siRNA és important demostrar que aquesta molècula afecta només l'expressió del gen desitjat i no la d'altres gens no relacionats. Encara que els estudis inicials de silenciament amb siRNA suggerien una elevada especificitat, s'han descrit efectes no específics i altres efectes tòxics en experiments en cèl·lules en cultiu [315]. Aquesta potencial toxicitat pot ser causada pel trencament o repressió traduccional de transcrits de gens que comparteixen cert grau d'homologia amb alguna de les cadenes del dúplex de siRNA. Inicialment es pensava que el mecanisme de RNAi requeria una complementaritat gairebé perfecta al llarg de tota la seqüència, però s'ha vist que la presència de només 7 parells de bases complementaris contigus poden dirigir el silenciament a través de RNAi, especialment reprimint la traducció, com té lloc a la via endògena de microRNAs [315]. En alguns casos, el complex RISC pot seleccionar preferentment la cadena sentit del

dúplex siRNA en comptes de la cadena antisentit, la qual cosa també pot ocasionar la inhibició de gens no desitjats. S'ha descrit la inducció d'una resposta interferó, que podria ocasionar potencialment la supressió global de la traducció proteica i altres efectes no específics, per siRNAs sintètics i siRNA expressats en forma de shRNA en línies cel·lulars sensibles a elevades concentracions de siRNAs [316]. Els efectes no específics dels siRNAs sobre l'expressió gènica depenen de la concentració utilitzada de siRNA i de la seva seqüència específica. Per tant, és molt important identificar la seqüència de siRNA més potent i assegurar-se que aquesta seqüència sigui específica del gen d'interès. Amb aquesta finalitat, un cop dissenyat un siRNA, i abans d'utilitzar-lo en els experiments *in vitro*, es comprova la seva especificitat mitjançant una anàlisi de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

En aquest treball s'ha obtingut un siRNA potent i específic capaç de reduir l'expressió del receptor de CD40 humà en un 80-90% en cèl·lules endotelials HUVEC. Aquest siRNA bloqueja l'activació endotelial via CD40L impedit la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina) i inhibint l'adhesió leucocitària en aquestes cèl·lules en un 87%. L'especificitat d'aquest siRNA per a la via de senyalització de CD40 ha quedat demostrada ja que aquest siRNA només té efecte sobre l'expressió de les molècules d'adhesió i l'adhesió leucocitària quan les cèl·lules endotelials són activades via CD40L (ancorat a la superfície dels limfòcits T). Les mateixes cèl·lules tractades amb el siRNA anti-CD40 i estimulades en presència de la citoquina proinflamatori TNF- $\alpha$ , no presenten alteracions en els nivells l'expressió de les molècules d'adhesió anteriors ni en l'adhesió leucocitària en comparació amb cèl·lules control.

La principal limitació de l'ús de siRNA sintètics per a aconseguir silenciament gènic és la naturalesa transitòria de l'efecte del siRNA. Per tant, la potencial aplicació de la tecnologia de RNAi com a eina de teràpia gènica per a suprimir l'expressió gènica, implica que el siRNA sigui administrat de manera contínua dins les cèl·lules o bé que siguin les pròpies cèl·lules les que produeixin aquest siRNA. Una alternativa és utilitzar **shRNA** expressat en un vector víric ja sigui derivat d'adenovirus, virus adenoassociats, retrovirus, o lentivirus. En aquest cas el precursor de siRNA ha de ser processat per Dicer abans d'introduir-se al complex RISC.

En aquest treball es mostra un sistema alternatiu a l'ús de siRNAs per bloquejar l'expressió del CD40 utilitzant shRNA expressat de forma estable amb vectors lentivirals. El principal avantatge de l'ús de vectors lentivirals, és que permeten assolir un efecte de silenciament gènic a llarg plaç, ja que són virus integratius i el transgen s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste per recombinació. Els lentivirus pertanyen a la família de

retrovirus i presenten una bona eficiència de transducció i permeten obtenir títols virals elevats. A més, són capaços d'infectar cèl·lules que estan en repòs o presenten una baixa taxa de proliferació. A diferència d'altres retrovirus que per travessar la membrana plasmàtica requereixen que la cèl·lula estigui en mitosi, els lentivirus no requereixen que les cèl·lules estiguin en divisió per a infectar-les.

L'eficiència de silenciament gènic de CD40 utilitzant shRNA en cèl·lules endotelials ha estat inferior a l'obtinguda fent servir el siRNA anti-CD40 sintètic. Les cèl·lules transduïdes amb lentivirus que expressen shRNA anti-CD40 presentaven uns nivells de transcrit de CD40 del 52% comparat amb cèl·lules tractades amb siRNA control. Aquests resultats concorden amb altres dades publicades en la literatura. S'ha estudiat i comparat l'eficàcia d'aquests dos sistemes i s'ha vist que en general s'assoleix una major eficiència de silenciament gènic amb l'ús de siRNA sintètics que amb shRNA, tot i que en alguns casos el seu efecte és dependent del tipus cel·lular [317]. Tot i així, la utilització d'aquest shRNA codificat en un vector lentiviral permet que la inhibició de l'expressió de CD40 en aquest cultiu primari es mantingui fins a 120 hores posttransducció. Per tant, la utilització de shRNA codificat per un vector d'expressió lentiviral permet assolir una reducció sostinguda de l'expressió d'aquest receptor en les cèl·lules endotelials transduïdes.

La finalitat de la generació de lentivirus que expressen el shRNA anti-CD40 era la seva aplicació per a estudis funcionals *in vitro* en cèl·lules endotelials. Una alternativa a l'ús de lentivirus per a estudis *in vivo*, és la utilització de vectors virals no integratius, com els adenovirus, que tot i que són més immunogènics que els lentivirus, no integren el seu material genètic en la cèl·lula hoste. Encara que s'ha progressat molt en el desenvolupament de vectors de teràpia gènica, existeixen cert nombre d'obstacles per vèncer [318]. Aquests inclouen la possibilitat de mutagènesi insercional i transformació maligna, així com el problema de l'hoste que desenvolupa una resposta immunitària a proteïnes expressades pels vectors vírics o una resposta inflamatòria intrínseca i resposta interferó a aquests vectors vírics. A més, es desconeix el possible efecte d'una expressió a llarg termini del shRNA.

En aquest treball s'ha caracteritzat la inhibició de l'expressió de CD40 mitjançant RNAi i s'han estudiat els efectes funcionals del bloqueig del senyal coestimulador CD40-CD40L en cèl·lules endotelials *in vitro*. Dels resultats d'aquest treball, es desprèn que aquest siRNA anti-CD40 podria considerar-se com a una alternativa a l'ús d'anticossos bloquejants o oligonucleòtids antisentit per interferir de manera específica amb aquesta via de senyalització en processos immunoinflamatoris.

## Anàlisi del perfil d'expressió gènica en cèl·lules endotelials activades via CD40L utilitzant microarrays

La ruta de transducció de senyals de CD40 s'ha estudiat àmpliament en els últims anys, especialment en cèl·lules immunes. De la mateixa manera que altres membres de la família del receptor de TNF, CD40 activa, entre altres, les rutes JNK/SAPK, NFkB, PI-3K i p38/MAPK [40]. Tot i així, es desconeixen encara molts dels efectors de les diferents etapes de l'activació induïda per la interacció CD40-CD40L. Utilitzant microarrays de genoma complet, s'ha pogut constatar la complexitat i cooperació de múltiples rutes de transducció de senyals que contribueixen a la regulació del patró d'expressió gènica en resposta a CD40, tant en limfòcits B [319], com entre limfòcits B d'individus sans i limfòcits B de pacients amb leucèmia limfocítica crònica [320]. En el primer estudi, es va analitzar el perfil d'expressió gènica en limfòcits B primaris de ratolí a diferents temps d'estimulació amb CD40L. A més de gens implicats en supervivència i creixement cel·lular, els quals també són induïts per altres mitògens com el LPS, es va veure que CD40L activava específicament gens involucrats en la formació del centre germinal i l'expressió de molècules coestimuladores que faciliten la resposta immune humoral dependent de cèl·lules T. Examinant el paper individual de les vies de transducció de senyals activades, es va veure que p38/MAPK jugava un paper important en la regulació gènica pel que fa referència a la disminució de l'expressió de gens en resposta a l'activació per CD40L, mentre que la via de NFkB era important en la inducció de l'expressió dels gens de resposta primària. En el segon estudi, es van comparar els perfils d'expressió gènica de limfòcits B d'individus sans i limfòcits B de pacients amb leucèmia limfocítica crònica (CLL), un cop activades via CD40, i es va observar una regulació diferencial de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular i apoptosi. La senyalització per CD40 en cèl·lules CLL incrementava la seva susceptibilitat al reconeixement immune, promovent la supervivència i l'arrest del cicle cel·lular, fent que aquestes cèl·lules fossin potencialment més resistents a la quimioteràpia.

D'aquests i altres estudis realitzats fins al moment en diferents tipus cel·lulars fent servir diferents metodologies, es desprèn que la interacció CD40-CD40L desencadena un patró d'expressió gènica específic i únic per cadascun dels tipus cel·lulars que expressen CD40 (limfòcits B, cèl·lules endotelials, macròfags, fibroblasts). Així, la funció de CD40 sembla ser la d'un "activador" cel·lular [321].

Donat que la majoria de vies activades en resposta a CD40 s'ha demostrat que són específiques de tipus cel·lular, en aquest treball s'ha utilitzat el potencial antiinflamatori d'un siRNA específic dirigit contra CD40 humana prèviament caracteritzat, per realitzar una anàlisi

d'expressió gènica a gran escala i estudiar el paper de CD40 en l'expressió gènica (primerenca i tardana) en cèl·lules endotelials en inflamació. L'objectiu de l'estudi del bloqueig de la interacció CD40-CD40L en aquestes cèl·lules, és aprofundir en el coneixement molecular de les rutes de senyalització activades exclusivament via CD40 en les cèl·lules endotelials on el paper del receptor CD40 és molt menys conegut que en altres cèl·lules immunes, i identificar noves dianes implicades en la resposta molecular a la senyalització via CD40 en aquest tipus cel·lular.

La tecnologia de microarrays ha estat utilitzada anteriorment en cèl·lules endotelials per a assignar patrons d'expressió gènica específics a determinades vies de senyalització a partir del bloqueig selectiu d'aquestes vies [322].

La majoria d'estudis de la via de transducció de senyals de CD40 han fet servir el CD40L soluble (sCD40L), en canvi, en aquest treball s'ha volgut estudiar aquesta via de senyalització a un nivell més fisiològic utilitzant el CD40L particulat ancorat a la membrana dels limfòcits T activats, en el context de la interacció entre la cèl·lula endotelial activada i el limfòcit T, com a primer pas en el procés immunoinflamatori.

En el treball presentat en aquesta tesi s'ha utilitzat la tecnologia de microarrays per a estudiar el perfil global d'expressió gènica en cèl·lules endotelials activades via CD40L ancorat a la membrana dels limfòcits T. S'han fet servir microarrays comercials d'oligonucleòtids d'Agilent i es van considerar només els canvis en l'abundància de mRNA que van ser reproduïbles en dos experiments independents, a tres temps de tractament i amb rèpliques tècniques per tal de compensar artefactes de *dye bias*. Aquesta anàlisi ha permès identificar un total de 715 transcrits, dels continguts en el microarray, com a regulats transcripcionalment en silenciar específicament el receptor CD40 en cèl·lules endotelials activades via CD40L almenys en un dels 3 temps d'estimulació, representant prop d'un 3% de gens regulats respecte el total de gens expressats en les HUVEC (transcriptoma). Encara que la magnitud global de la regulació no sembla massa elevada, s'ha de tenir en compte que s'està analitzant els efectes d'una inhibició parcial de l'expressió gènica del receptor i no d'una pèrdua absoluta de funció. Aproximadament unes  $\frac{3}{4}$  parts d'aquests gens estarien induïts per CD40L i una  $\frac{1}{4}$  part estarien inhibits. Aquests resultats són consistents amb el paper de CD40 com a "activador" cel·lular. L'activació de CD40 estaria modulant positivament la transcripció d'un nombre significatiu de gens de resposta primerenca en cèl·lules endotelials, donat que a 4 hores s'ha observat una major inducció gènica en resposta a l'activació per CD40L comparat amb 16 hores d'estimulació.

Entre els principals gens que es van observar induïts per CD40 en cèl·lules endotelials,



es troben molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1), molècules relacionades amb apoptosi (BIRC-3, CASP-1), citokines i quimioquines proinflamàtories (CCL-2, CXCL1, IL-8), factors de creixement (CSF2), factors de transcripció (NFκB p50, Rel B), gens implicats en la presentació d'antígens (TAP-1), i gens involucrats en angiogènesi (VEGF). Gran part d'aquests gens involucrats en l'activació de diferents processos implicats en la resposta immunoinflamatòria ja havien estat identificats prèviament com a dianes de CD40 en cèl·lules endotelials.

A més de l'expressió de gens proinflamatoris que s'indueixen en resposta a l'estímul, existeix un nombre considerable de gens amb funció inhibidora que també veuen incrementada la seva expressió. Es tracta de gens que actuen a diferents nivells inhibint de manera específica certs factors de transcripció, vies de senyalització i les seves funcions cel·lulars associades. En resposta a l'activació endotelial per CD40 es troben induïts, per exemple, IκBα (NFκBIA) i NFκBIE, els principals inhibidors del factor de transcripció NFκB. També s'activa el gen DSCR1, un factor de transcripció inhibidor de la via de senyalització per calcineurina, l'expressió del qual s'ha descrit que s'indueix en cèl·lules endotelials en resposta a estímuls proinflamatoris i proangiogènics, causant la inhibició de NFAT [323]. En resposta a l'estimulació via CD40 també estaria activat Zfp36 (*zinc finger protein 36*), un gen que s'expressa en cèl·lules endotelials en resposta a mediadors proinflamatoris i està implicat en el control de l'estabilitat de mRNA i la traducció proteica. S'ha demostrat que Zfp36 incrementa el procés de degradació de mRNA (*mRNA decay*) a través de la seva unió a elements AU-rich en la regió 3' de mRNAs de longitud curta. Alguns mRNAs diana de Zfp36 expressats en cèl·lules endotelials són TNF-α, GM-CSF i Cox-2 [324, 325]. Un altre gen que es troba induït en resposta a l'activació per CD40 és A20, també anomenat TNFAIP3, un gen antiapoptòtic que s'ha descrit que controla la senyalització per NFκB inhibint l'activació d'aquest factor de transcripció i l'expressió de gens proinflamatoris. La inducció de l'expressió de tots aquests gens amb potencial inhibitori, tindria lloc en les primeres etapes de l'activació endotelial per CD40 i estaria implicada en el control de la regulació de la resposta inflamatòria.

Per altra banda, entre els gens regulats per CD40 en endoteli, l'anàlisi de microarrays ens ha permès identificar un nombre considerable d'ESTs i gens no anotats per GO amb funció desconeguda. Per tal d'esbrinar la rellevància biològica dels ESTs diferencialment expressats en la via de senyalització de CD40, seria necessària la identificació del cDNA complet codificant per a aquests gens.

La detecció de gens ja coneguts involucrats en processos immunoinflamatoris com a regulats per CD40 entre els gens amb expressió canviant en els experiments de microarrays, va permetre establir que l'efecte del siRNA-2 era prou específic. Tot i així, donat que la metodologia de microarrays té un alt grau de variabilitat que pot introduir un cert nombre de falsos positius, es van fer validacions a quatre nivells: 1) validació experimental, mitjançant la tècnica de qRT-PCR; 2) validació mitjançant contrast amb dades ja publicades a la literatura, 3) validació *in silico* mitjançant anàlisis sofisticades de sobrerrepresentació de categories d'ontologia gènica (GO), enriquiment de conjunts de gens i de vies de senyalització (GSEA); i 4) validació funcional, tot avaluant l'estat d'activació o inhibició de factors de transcripció o vies de senyalització, i els nivells d'expressió proteica de gens de les vies alterades.

Per tal de validar les dades de microarrays per una metodologia alternativa, es va mesurar l'expressió d'alguns d'aquests gens per qRT-PCR a temps real. Tot i que existeixen diferències en el valor absolut de *fold change* utilitzant les dues metodologies, els resultats de qRT-PCR correlacionen bé amb l'expressió gènica diferencial obtinguda en els experiments de microarrays. Tots els gens validats van donar canvis dels nivells de mRNA en el mateix sentit. Això permet tenir un alt grau de confiança en els resultats de tots els altres gens analitzats en el microarray amb taxes de canvi iguals o superiors a 1.2, aplicant els criteris estadístics establerts. La confirmació de la regulació de l'expressió de tots aquests gens per la via de senyalització CD40-CD40L en cèl·lules endotelials concorda amb les propietats antiinflamatòries del siRNA anti-CD40.

Existeix una gran quantitat d'informació a la literatura sobre gens i vies regulades per CD40 en diferents tipus cel·lulars. D'altra banda, està àmpliament descrit que l'activació endotelial desencadena un fenotip proinflamatori, protrombòtic, i de proadhesió en aquestes cèl·lules. Els resultats derivats d'aquest estudi d'expressió gènica global i l'anàlisi sistemàtica de la dinàmica de la senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials, ens han permès confirmar que la senyalització per CD40 contribueix a tots aquests fenotips i participa en la major part de les etapes del procés immunoinflamatori vascular (Figura 105).

L'aplicació de la tecnologia de microarrays en combinació amb l'anàlisi de l'efecte del siRNA anti-CD40 a diferents temps d'estimulació de la via, ha permès determinar diferents components moleculars afectades a nivell transcripcional i formular hipòtesis sobre el seu paper en l'activació de les cèl·lules endotelials via CD40. De l'estudi a nivell global per anàlisi d'enriquiment de categories d'ontologia gènica (GO) i subconjunts de gens (GSEA), es desprèn que en aquest procés tant complex hi intervenen diferents vies de senyalització, a més de les ja descrites, i processos biològics que actuen diferencialment i de manera

seqüencial en el temps, posant en evidència la regulació coordinada de conjunts de transcrits funcionalment relacionats, més que la regulació de transcrits individuals.

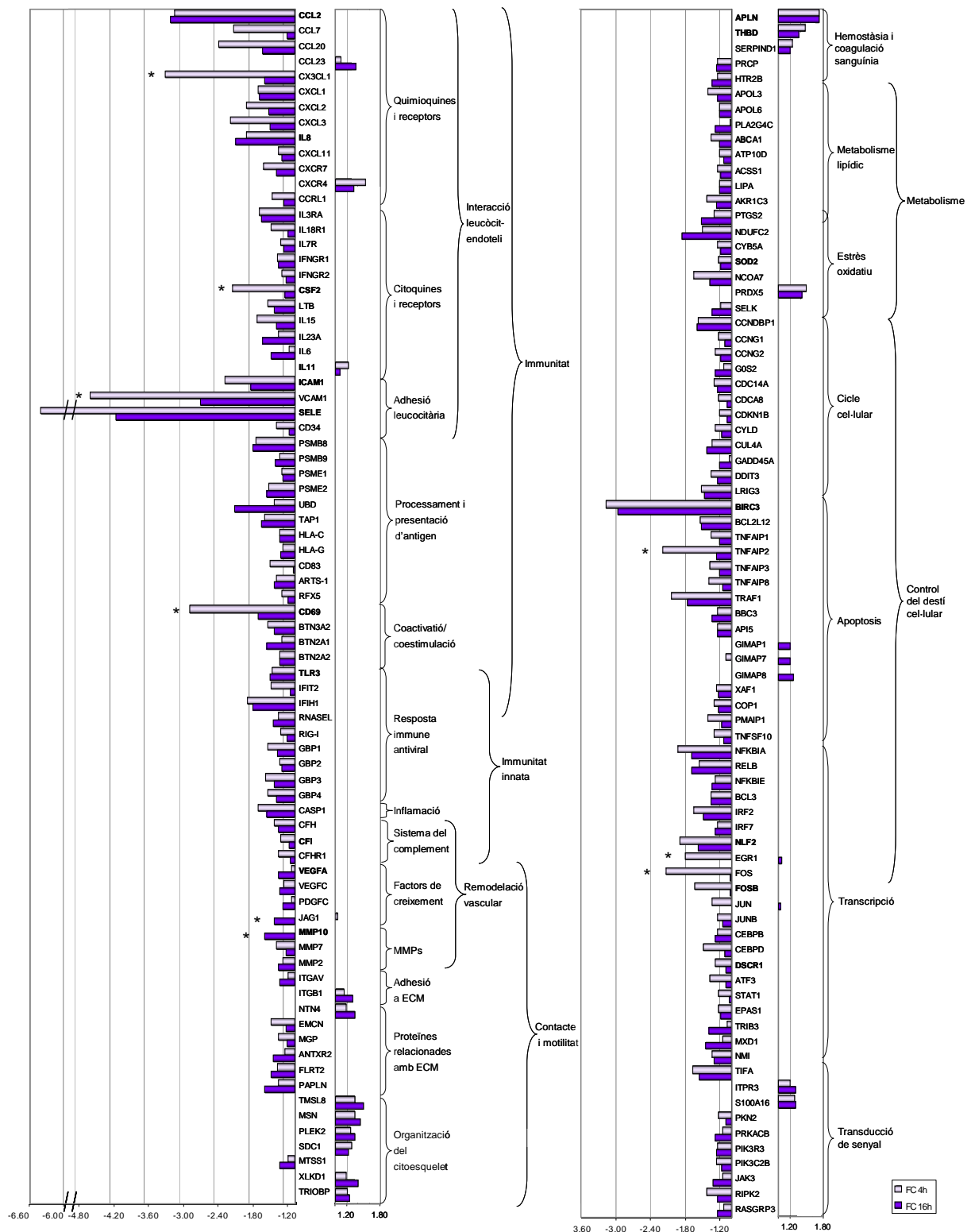


Figura 105. Gens regulats al silenciar la via de CD40 i agrupats segons la seva funció biològica. En negra es mostren els gens validats per qRT-PCR. (\*) indica els gens diferencialment regulats per SAM comparant 4 i 16 hores d'estimulació (FDR=0). FC, fold change.

### **Senyalització per CD40: activació de molècules efectores i factors de transcripció**

La senyalització per CD40 indueix algunes de les seves pròpies molècules efectores, com per exemple la proteïna adaptadora TRAF1; ITRAF/TANK que inhibeix la funció de proteïnes TRAF mantenint-les en estat inactiu en el citoplasma; i TIFA (*TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain*) que regula la via de NFκB per activació de IKK.

Per altra banda, l'anàlisi de GO indicava que la inducció de factors de transcripció i altres gens involucrats en el control de l'expressió gènica dependent de CD40, era un procés que tenia lloc de manera primerenca. Entre els factors de transcripció induïts de manera primerenca en resposta a CD40L en cèl·lules endotelials es troben membres de la família NFκB (RelB) i membres de la família AP-1 (FosB, c-Fos, c-Jun, JunB). Aquesta inducció primerenca de factors de la família NFκB i AP-1, és un tret comú de l'activació de la cèl·lula endotelial a través de mediadors proinflamatoris.

Inicialment s'havia descrit que l'estimulació de les cèl·lules B mitjançant l'activació de la via de senyalització de CD40 induïa l'expressió dels factors de transcripció NFκB, AP-1 i NFAT [61]. També s'havia descrit que la regulació transcripcional de la citoquina IL-6 per la via de senyalització de CD40 en limfòcits B i cèl·lules dendrítiques, implica els factors de transcripció de la família NFκB (p50:p65) i AP-1 (c-Jun, JunB, JunD, i c-Fos) [326, 327]. Tot i així, fins ara existia poca informació sobre la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials. Pel que fa a estudis en HUVEC, se sabia que la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina per CD40 està regulada transcripcionalment i depèn de l'activació de factors de transcripció de la família NFκB (NFκB p65 (RelA)), ATF-2/c-Jun, IRF-1 i JNK.

En relació amb la via de senyalització per NFκB, trobem dos transcrits induïts en resposta a CD40 que codifiquen per a gens que formen part de la família de proteïnes I-kappa-B i mantenen el complex NFκB inactiu en el citoplasma: NFκBIA i NFκBIE. Prèviament només NFκBIA, havia estat implicat en la resposta a CD40. S'havia descrit que CD40 participa en la regulació de la transcripció en resposta a NFκB, essent necessari per a la fosforilació i posterior degradació del factor NFκBIA, també anomenat IκBα, que permet l'activació del complex NFκB i la seva translocació a nucli.

A més de NFκB i AP-1, aquest estudi mostra que té lloc la inducció de molts altres factors de transcripció posant de manifest la complexitat de les múltiples vies de senyalització que cooperen en la regulació de l'expressió gènica per CD40 en la cèl·lula endotelial.

En resposta a la lligació per CD40L, també s'indueix l'expressió de la proteïna EGR1

(*Early growth response 1*), que controla la transcripció de gens requerits per mitogènesi i diferenciació cel·lular. Prèviament ja s'havia descrit que, juntament amb NFκB i AP-1, EGR1 estava implicat en la regulació transcripcional de l'expressió de TF desencadenada per CD40L en cèl·lules endotelials [328].

Entre els factors de transcripció no relacionats anteriorment amb la via de senyalització per CD40 hi ha CEBPB i CEBPD, factors de transcripció que actuen formant homodímers o heterodímers amb altres proteïnes de la mateixa família (CEBP-alpha, CEBP-beta, i CEBP-gamma) i intervenen en la regulació de gens involucrats en resposta immune i inflamatòria, unint-se a regions reguladores de diverses citoquines, entre elles IL-6. Altres gens inclouen: BCL3, un coactivador transcripcional que controla la localització subcel·lular de proteïnes NFκB a través de la seva associació amb homodímers NFκB, inhibint la translocació nuclear de la subunitat NFκB p50; NFIA (*Nuclear factor I/A*) que pertany a una família de proteïnes que s'uneixen al DNA i que actuen com a factors de transcripció; i IRF2 i IRF7 (*Interferon regulatory factors 2 and 7*) que formen part de la família de factors de transcripció que regulen l'activació d'interferó. Recentment, s'ha descrit que IRF2 participa en la inducció de l'expressió de TAP-1 unint-se al seu promotor associat a STAT-1 i regulant també la funció presentadora d'antigen de classe I [329].

Altres gens implicats en la regulació de l'expressió gènica que no s'havia descrit que estaven induïts en resposta a CD40 serien ATF3, DSCR1, NMI (*N-myc and STAT interactor*), un coactivador transcripcional de c-Myc, i els corepressors MDXI (*MAX dimerization protein 1*) i TRIB3 (*tribbles homolog 3 (Drosophila)*). TRIB3 a més de regular l'activitat transcripcional de ATF i NFκB p65, és capaç d'interaccionar amb MAPKKs modulant la seva especificitat d'activació per les MAPKs.

Tots aquests factors de transcripció estarien implicats en l'activació endotelial induïda per CD40 en condicions inflamatòries. A més dels anteriors factors de transcripció, en aquest treball es descriu per primera vegada la forta inducció dependent de CD40 d'una nova família de gens que codifiquen per factors nuclears involucrats en inflamació. NLF1 i NLF2 (*nuclear localised factors*) van ser identificats en un estudi de microarrays realitzat en cèl·lules endotelials humanes de microvasculatura per caracteritzar la regulació transcripcional en resposta a l'estimulació per IL-1β [330]. NLF1 i NLF2 s'expressen predominantment en cèl·lules endotelials, encara que també s'ha detectat expressió en SMC, fibroblasts, cèl·lules epitelials i monòcits. Les proteïnes codificades per aquests gens es localitzen en el compartiment nuclear de la cèl·lula endotelial, la qual cosa suggereix un paper en la regulació de la transcripció. Actuarien potencialment en la regulació de gens que tenen control de

l'arquitectura i l'adhesió cel·lular per incrementar la permeabilitat vascular de les cèl·lules endotelials en condicions proinflamatòries [330].

### **Interacció entre cèl·lules endotelials i limfòcits**

Entre els transcrits més fortament induïts en resposta a CD40L en cèl·lules endotelials hi ha molècules d'adhesió, citocines i factors de creixement.

Durant el procés d'inflamació, el primer pas per a la infiltració dels monòcits circulants cap al subendoteli és la seva adhesió a l'endoteli vascular. Aquest procés està mediat per la interacció d'una sèrie de **molècules d'adhesió** expressades a la superfície d'aquests dos tipus cel·lulars. Entre les molècules d'adhesió expressades en les cèl·lules endotelials i implicades en aquest el procés es troben E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1. Aquestes tres molècules d'adhesió es troben entre els gens més fortament induïts en cèl·lules endotelials en resposta a l'activació via CD40, la qual cosa confirma el paper central d'aquestes molècules en l'inici del procés inflamatori a través de la interacció entre la cèl·lula endotelial i els leucòcits.

La inducció de l'expressió d'aquestes molècules d'adhesió en cèl·lules endotelials activades via CD40-CD40L havia estat descrita en nombrosos estudis [97-99]. De fet, l'eficàcia i especificitat del siRNA anti-CD40 obtingut en aquest treball es va determinar inicialment mesurant el seu efecte inhibidor sobre la inducció de l'expressió d'aquestes tres molècules d'adhesió en resposta a CD40L a nivell proteic per citometria de flux i mitjançant un assaig funcional d'adhesió leucocitària [331]. L'adhesió leucocitària a l'endoteli és un procés clau que té lloc durant les primeres etapes del transcurs de la inflamació. D'acord amb aquest fet, l'estudi de microarrays va posar de manifest que l'expressió del transcrit de E-selectina i VCAM-1 en resposta a l'estimulació per CD40L està molt més incrementada a 4 hores que a 10 i 16 hores d'estimulació.

Juntament amb les molècules d'adhesió, les quimioquines i les citocines també regulen l'homeòstasi immune tot controlant l'activació i atracció dels leucòcits i la seva migració a través de l'endoteli vascular cap al lloc d'inflamació. El nostres resultats mostren que entre les citocines i quimioquines regulades transcripcionalment, després de l'estimulació per CD40L en cèl·lules endotelials, es troben **quimioquines proinflamatòries** de la subfamília CC, com CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3) i CCL20 (MIP3 $\alpha$ ), implicades en el reclutament de monòcits i limfòcits; i quimioquines de la família CXC, com CXCL1, CXCL2, CXCL3, i CXCL8 (IL-8), importants en l'atracció de neutròfils; i CXCL11 i CX3CL1, que promouen l'adhesió de limfòcits T i monòcits. L'activitat de CD40 també és responsable de la inducció de diverses **citocines** com IL-6, IL-11, IL-15 i IL-23A, i **receptors de citocines** com IL-

7R, IL-18R1, i IL-3RA. Fins ara, únicament s'havia relacionat amb CD40 la inducció de l'expressió de CXCL1, IL-8, CX3CL1, CCL20, CCL2, i IL-6 en cèl·lules endotelials.

Per qRT-PCR s'ha validat la inducció de l'expressió, en resposta a l'activació per CD40L, de les quimioquines IL-8, CCL-2 i del factor de creixement CSF2.

La inhibició de l'expressió de la quimioquina IL-8 en les cèl·lules endotelials on s'ha silenciada la via de senyalització de CD40 concorda amb dades publicades anteriorment. Prèviament ja s'havia descrit que l'expressió de la quimioquina IL-8 s'indueix en cèl·lules endotelials activades via CD40-CD40L [332]. Aquesta interleuquina és sintetitzada per les cèl·lules endotelials en resposta a diferents estímuls proinflamatoris, entre ells IL-1 i TNF- $\alpha$ , i intervé en l'inici del procés inflamatori, ja que està implicada en l'activació i migració d'eosinòfils i neutròfils a través de l'endoteli cap al lloc d'inflamació.

La quimioquina CCL2, també anomenada proteïna-1 quimioattractant de monòcits o MCP-1, juga un paper important en el reclutament de monòcits al lloc de inflamació. CSF2, també anomenat factor estimulador de la formació de colònies granulo-macrofàgiques (GM-CSF) és un factor de creixement que augmenta l'activitat quimiotàctica i la producció de citokines IL-1 i TNF pels monòcits. La interacció entre els monòcits circulants i les cèl·lules endotelials de la vasculatura induïx la síntesi de GM-CSF per aquests dos tipus cel·lulars i contribueix al reclutament de monòcits i a la seva activació i diferenciació en macròfags al lloc d'inflamació [333].

Anteriorment ja s'havia descrit la implicació de la via de senyalització de CD40 en la síntesi de citokines i quimioquines proinflamatòries per diferents tipus cel·lulars, entre elles les cèl·lules endotelials. L'estimulació de la via CD40-CD40L induïx l'expressió de la citokina proinflamatòria GM-CSF en el cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC [334] i causa un increment de la secreció de la quimioquina MCP-1 en cèl·lules endotelials de microvasculatura de cervell [335]. En condicions proinflamatòries, les cèl·lules endotelials responen a l'estímul activant funcions associades amb un increment de la immunogenicitat (GM-CSF) i el reclutament de leucòcits (MCP-1). La inhibició de l'expressió de MCP-1 i GM-CSF en les cèl·lules endotelials on s'ha silenciada la via de senyalització de CD40, concorda amb la funció de la CD40 com a "activador" cel·lular contribuint a l'adquisició d'un fenotip proinflamatori.

Aquests resultats corroboren la importància de les molècules anteriors en la comunicació directa entre les cèl·lules endotelials de la vasculatura i les cèl·lules immunes del torrent circulatori, que s'activen recíprocament generant un estat proadhesiu que regula el reclutament de cèl·lules immunes de manera primerenca en el procés inflamatori.

Pel que fa a l'expressió d'aquestes citokines a nivell proteic, fent servir un array d'anticossos, s'ha detectat la presència de les citokines proinflamatòries IL-8, MCP-1 i IL-6 en el sobrenadant de cèl·lules endotelials activades via CD40L. Aquests resultats confirmen que en condicions proinflamatòries les cèl·lules HUVEC sintetitzen i alliberen aquestes citokines involucrades en el reclutament i activació de leucòcits.

### **Immunitat**

Està àmpliament descrit que CD40 és un activador de la resposta immune adaptativa. Els resultats d'aquest treball indiquen que la senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials dóna lloc a la inducció transcripcional d'algunes molècules relacionades amb immunitat com per exemple l'antigen d'activació de cèl·lules T (CD69). CD69, és una glicoproteïna de membrana que es va detectar inicialment a la superfície de limfòcits T activats. La inducció de la seva expressió té lloc en etapes inicials de l'activació de limfòcits T i ràpidament disminueix en absència d'estímul. Els senyals intracel·lulars induïts a través de CD69 en cèl·lules T desencadenen la síntesi de citokines i receptors de citokines [336]. S'han detectat limfòcits T CD69<sup>+</sup> en infiltrats cel·lulars de diverses malalties inflamatòries cròniques com l'artritis reumatoide [337]. L'expressió de CD69 no està restringida a limfòcits T activats, sinó que també l'expressen de manera constitutiva plaquetes, monòcits i cèl·lules NK regulant la seva proliferació. La inducció de l'expressió d'aquest gen ja s'havia relacionat prèviament amb la via de senyalització de CD40, concretament s'havia descrit que l'estimulació via CD40L incrementa l'expressió de CD69 en limfòcits B de leucèmia limfocítica [338]. Algunes observacions clíniques i experimentals suggereixen que, a més de CD40L, l'expressió de CD69 està regulada, almenys en part, per les citokines MCP-1 i TGF- $\beta$ . La inhibició de l'expressió de CD69 en cèl·lules endotelials on s'ha silenciada la via de senyalització de CD40, suggereix que aquesta proteïna tindria un paper sostenint la resposta inflamatòria de les cèl·lules endotelials activades via CD40.

Per altra banda, alguns membres de la família de butirofilines BTN2A1, BTN2A2, BTN3A1 i BTN3A2, també estan induïts en resposta a l'activació per CD40. La funció dels membres d'aquesta família de glicoproteïnes no està del tot clara. Donada l'elevada homologia que comparteixen amb les molècules coestimuladores B7, recentment s'ha proposat la funció d'alguns membres d'aquesta família com a reguladors negatius del sistema immune, pel que fa a l'activació de cèl·lules T.

L'activació endotelial via CD40-CD40L dóna lloc a la inducció de gens implicats en el processament i presentació d'antigen. Algunes molècules rellevants involucrades en el **processament d'antigen** induïdes per CD40 són la UBD, TAP1, i components del



proteasoma com PSME1, PSME2, PSMB8 i PSMB9.

Ubiquitina D (UBD o FAT10) va ser identificada com a un membre de la família de *Ubiquitin-like proteins* (UBL) amb dos dominis *ubiquitin-like*, que s'expressava de manera constitutiva en cèl·lules dendrítiques madures i cèl·lules B [339]. Posteriorment s'ha descrit que la seva expressió pot ser induïble per les citokines proinflamàtòries IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  en cultiu primari de cèl·lules endotelials [340]. S'ha suggerit que UBD participa en la presentació d'antígens o altres processos cel·lulars controlats per aquestes dues citokines, entre ells el mecanisme d'apoptosi. A diferència d'altres UBLs sense funció proteolítica, UBD s'ha descrit que dirigeix les proteïnes conjugades per a ser degradades a través del proteasoma constituint una senyal proteica de degradació de substrats tant potent com la ubiquitina en accelerar la seva proteòlisi [341]. La unió amb UBD representaria un mecanisme independent d'ubiquitina per a la degradació proteica per part del proteasoma, que a diferència de la poliubiquitinació, seria un procés induïble per citokines i reversible.

A més de UBD, també s'observa la inducció del transcrit del gen TAP1 (*Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B* (MDR/TAP)) que codifica per una proteïna involucrada en el transport d'antígens des del citoplasma cap a la membrana del reticle endoplasmàtic per associar-se a les molècules MHC-I.

Les subunitats catalítiques del proteasoma PSMB8 (*Proteasome subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)*) i PSMB9 (*Proteasome subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)*), i les subunitats reguladores PSME1 i PSME2 (*Proteasome activator subunit 1 and 2 (PA28 alpha and beta)*) estan implicades en el processament d'antígens per tal de generar pèptids de classe I.

Una altra subunitat reguladora del proteasoma implicada en el processament d'antígens de classe I, que, a diferència de les anteriors, es troba inhibida en resposta a l'activació per CD40, és PSMD10 (*Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 10*). La regulació en sentit contrari de components del complex proteasoma podria ser indicativa de que CD40 exerceix un control fi d'aquesta via de degradació proteica. Tot i així, recentment s'ha descrit que aquest component del proteasoma, també anomenada *Gankyrin*, intervé en el control del cicle cel·lular com a regulador negatiu de Retinoblastoma (Rb) i p53 [342].

Per altra banda, també s'ha observat la inducció de l'expressió de transcrits de gens implicats en la **presentació d'antigen**. Estarien induïts per CD40 les molècules MHC classe I HLA-A, HLA-B, HLA-F i HLA-G (*major histocompatibility complex, class I*), ARTS-1 (*adipocyte-derived leucine aminopeptidase*), i RFX5 (*regulatory factor, 5*), un factor de transcripció que influencia l'expressió de molècules HLA de classe II.

Ja s'havia descrit prèviament que la interacció CD40-CD40L induïa l'expressió de TAP-1 i de molècules de HLA de classe I en limfòcits B, incrementant la immunogenicitat cel·lular [343], tot i així, la senyalització per CD40 no s'havia relacionat amb la regulació d'altres molècules implicades en processament i presentació d'antigen.

L'anàlisi per GSEA indicava que l'activació endotelial desencadenada per interacció amb els limfòcits T CD40L<sup>+</sup>, induïa alguns sistemes d'alerta cel·lulars. Els més rellevants són els que formen part del sistema de vigilància de la immunitat innata. Així, també es troben induïts en resposta a CD40 alguns gens implicats en la regulació del **sistema del complement** com el Factor I del complement (CFI), el factor H del complement (CFH) i CFHR1 (*Complement factor H-related 1*). CFI intervé en la degradació dels components C4b i C3b en presència dels cofactors C4BP (*complement component 4 binding protein*) i CFH respectivament [344]. La regulació de l'expressió de CFI per CD40 ha estat confirmada per qRT-PCR. Fins ara no hi havia evidències del paper de CD40 en el control de la regulació de la cascada de complement. S'ha descrit que la proteïna C4BP, un component regulador negatiu de la via clàssica del complement sintetitzat pels monòcits activats [345], és un lligand alternatiu de CD40, que seria capaç d'unir-se al receptor CD40 i activar els limfòcits B, suggerint que CD40 podria actuar en la resposta immune innata i adaptativa [346].

També estan induïts per CD40 components de la immunitat innata que intervenen en **resposta a infecció viral**, com TLR-3, IFIH1 (*interferon induced with helicase c domain protein 1*), també anomenat MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), i RIG-I (*retinoic acid-inducible gene i*), també anomenat DDX58 (*dead/h box 58*), dues helicases de RNA estructuralment relacionades que constitueixen un mecanisme sensor de virus independent de TLR, i estan implicades en el reconeixement citoplasmàtic de RNA viral. Per altra banda, també es troben induïts en resposta a CD40 la RNASEL (*ribonuclease L*), i el factor de transcripció IRF7, un regulador comú *downstream* de la resposta immune antiviral, que, juntament amb IRF3, està involucrat en la inducció de l'expressió d'interferó de tipus I.

Al mateix temps, en resposta a l'activació via CD40 té lloc la inducció dels receptors de IFN $\gamma$  (IFNGR1 i IFNGR2), i algunes proteïnes d'unió a guanilat induïbles per interferó (GBP1, GBP2, GBP3, GBP4). De manera relacionada, també s'observa una significativa inhibició de gens que codifiquen per receptors involucrats en l'entrada de virus, com FAM89B, també anomenat MTRV1 (*Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 1*), i CXCR4, un receptor de quimioquines involucrat en l'entrada de HIV. De manera conjunta, aquests resultats posen de manifest el paper clau de CD40 en la regulació de diferents sistemes de vigilància immunes que s'activen en la cèl·lula endotelial per interacció amb els

---

limfòcits T CD40L<sup>+</sup>.

### **Apoptosi i cicle cel·lular**

Prèviament ja s'havia descrit la importància de l'activació mediada per CD40 de vies de senyalització que regulen la supervivència, proliferació i diferenciació de limfòcits T. De manera similar, les dades obtingudes en aquest treball mostren que CD40 també afecta aquests processos en cèl·lules endotelials.

Pel que fa al mecanisme d'**apoptosi**, l'anàlisi per GSEA indicava que a 4 hores d'estimulació, les cèl·lules adquiririen un fenotip antiapoptòtic amb la inducció de l'expressió de membres de la família d'inhibidors de l'apoptosi (IAPs). El que defineix els membres d'aquesta família és la presència d'un motiu anomenat *Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat* (BIR) [347]. A més de BIRC-3 (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 3*, c-IAP2) (validat per qRT-PCR), els resultats de l'anàlisi de microarrays mostren que un altre membre d'aquesta família de supressors apoptòtics, BIRC-2 (c-IAP1), també està activat per CD40 en cèl·lules endotelials. Prèviament ja s'havia descrit que CD40 incrementava la transcripció del gen BIRC-3 en limfòcits B [348]. Els productes d'aquests gens impedirien la mort cel·lular programada inhibint l'activitat caspasa via els factors TRAFs probablement interferint en l'activació de *ICE-like proteases*. S'ha descrit que el domini BIR d'aquesta família de proteïnes facilita l'associació física amb els factors TRAF1/2 [347]. També s'ha descrit que aquest domini podria unir-se directament a les caspases bloquejant físicament la seva unió al substrat [349].

S'havia descrit que BIRC-2 i BIRC-3, juntament amb BIRC-4 (*XIAP inhibitor of apoptosis, X-linked*), s'indueixen fortament en cèl·lules endotelials en resposta a citoquines proinflamàtòries TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i LPS [350]. La inducció de l'expressió d'aquestes proteïnes en resposta a l'activació via CD40 protegiria les cèl·lules endotelials de la mort cel·lular per apoptosi durant inflamació.

També es troben induïts per CD40 els transcrits dels gens antiapoptòtics API5 (*apoptosis inhibitor 5*), i BBC3 (*BCL2 binding component 3*), un inhibidor de l'activitat de caspases per interacció amb la proteïna apaf-1 (*apoptosis-activating factor*). A més, CD40 induïx significativament components d'una família important de gens involucrats en el control de la supervivència cel·lular: TNFAIP1, TNFAIP3 i TNFAIP8 (*Tumor necrosis factor, alpha-induced protein*). TNFAIP3 és un gen induït en resposta a estímuls proinflamatoris que s'ha descrit que protegeix les cèl·lules endotelials de la mort per apoptosi induïda per TNF, inhibint l'activació de caspases [351]. Excepte BIRC-3 i TNFAIP3, la resta de gens implicats en el control del mecanisme d'apoptosi no havien estat relacionats

prèviament amb la via senyalització de CD40. Aquestes dades concorden amb el que s'ha descrit en cèl·lules endotelials HMEC, on la interacció CD40-CD40L confereix resistència al mecanisme d'apoptosi desencadenant un fenotip proangiogènic que implica la proliferació i migració d'aquestes cèl·lules per activació de via PI3/Akt [352].

També s'indueix per CD40 el gen HSPA5 (*Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)*), un membre de la família de hsp70, també anomenat BiP, que està involucrat en l'acoblament de complexos proteics en el reticle endoplasmàtic i presenta propietats antiapoptòtiques.

Finalment, CD40 regula l'expressió d'una nova família de GTPases anomenada IMAP/IAN AIG1-like (GIMAP1, GIMAP7 i GIMAP8). Alguns membres d'aquesta família, que en aquest cas es troben inhibits per CD40, s'ha suggerit que podrien regular el mecanisme d'apoptosi. En concret GIMAP8, el més significativament inhibit per CD40 s'ha descrit que exerceix un efecte antiapoptòtic en el sistema immune en resposta a infecció [353].

Tot i que la senyalització de CD40 induïx majoritàriament gens antiapoptòtics, CD40 també intervé en el control de la mort cel·lular per apoptosi a través de la regulació de l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes amb característiques proapoptòtiques, com per exemple COP1 (*caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE*), RIPK2 (*receptor-interacting serine-threonine kinase 2*) i XAF1 (*XIAP associated factor* o BIRC4-BP). Els resultats de microarrays indicaven que tots tres transcrits estaven induïts per CD40 a 4 hores d'estimulació. RIPK2 codifica per una proteïna que forma part del complex del receptor CD40 associant-se a proteïnes TRAF (TRAF1, TRAF2, TRAF5 i TRAF6). S'ha descrit que RIPK2 intervé en la regulació de l'apoptosi interaccionant amb proteïnes membres de la família IAPs com BIRC-2 i BIRC-3 i és necessària per a l'activació de procaspasa 1 i procaspasa 8. Per altra banda, XAF1 codifica per una proteïna que uneix BIRC-4 i antagonitza la seva activitat anticaspasa.

Un altre gen proapoptòtic induït per CD40 és TNFSF10 (*Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10*), també anomenat TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), una citocina que desencadena apoptosi a través de la seva unió amb *death* receptors de la superfície cel·lular.

Segons aquestes dades, la inducció de transcrits codificants per gens antiapoptòtics i, al mateix temps, de transcrits amb propietats proapoptòtiques indicaria que el control de la mort cel·lular per apoptosi és un procés altament regulat per CD40 que, en resposta a un determinat estímul, podria activar la via en un sentit o en un altre.

En limfòcits B, l'efecte de la resposta de CD40 en proliferació cel·lular és complex.

Mentre que la senyalització per CD40 indueix supervivència en limfòcits B normals, en limfoma de cèl·lules B s'ha descrit tant inhibició com inducció d'apoptosi, depenent de l'estat de maduració de la cèl·lula [354]. Està ben establert que CD40 pot promoure supervivència de cèl·lules a través de la inducció de l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes IAPs. Tanmateix, la senyalització de CD40 està implicada en la progressió a través del cicle cel·lular. En aquest procés hi participen la PI3K, i les vies de senyalització activades per MAPKs i el factor de transcripció NFκB. Recentment ha sorgit un interès creixent en esbrinar els mecanismes de senyalització que promouen la progressió de cicle cel·lular en cèl·lules B en resposta a CD40. L'efecte de la interacció CD40-CD40L en apoptosi pot explicar-se per un increment en la transcripció de gens que codifiquen per membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, com Bcl-xL (BCL2L1) i BCL2A1, que s'ha descrit que promouen la supervivència de cèl·lules B [355]. De manera concordant, l'estudi de microarrays en cèl·lules endotelials indicava que el transcrit de BCL2L12 (*BCL2-like 12 (proline rich)*), un membre de la família de proteïnes BCL-2 amb funció desconeguda, estava induït en resposta a l'activació per CD40 a 4 hores d'estimulació.

Es creu que CD40 regula la supervivència i proliferació de cèl·lules B immadures a través de diferents vies. Així, independentment de la regulació de proteïnes de la família Bcl-xL i IAPs, la senyalització de CD40 s'ha descrit que promou la progressió del **cicle cel·lular** incrementant els nivells de Cdk4 i Cdk6, essencials per a la progressió de la fase de G1 del cicle cel·lular [356], i reduint l'expressió del gen que codifica per la quinasa dependent de ciclina CDKN1B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)*) [357]. La inducció del mRNA de ciclina D i Cdk4 i la disminució de l'expressió de CDKN1B requerida per tal que les cèl·lules B entrin a fase G1, son dependents de l'activació de caspasa-6 i la disminució de l'activitat de caspasa-3 [358]. Els inhibidors d'apoptosi c-IAP, induïts en resposta a l'activació per CD40, com BIRC-4, poden promoure la degradació per proteasoma de caspasa-3, però no de caspasa-6. Aquest fet explicaria el mecanisme pel qual CD40 regula diferencialment l'activitat de caspases. El reclutament primerenc d'IAPs explicaria com la senyalització de CD40 pot inhibir l'activitat proapoptòtica mentre estimula l'activitat de caspases necessàries per a l'entrada i progressió del cicle cel·lular.

L'anàlisi de microarrays en aquest estadi d'activació endotelial primerenc indicava una inducció de l'expressió de gens essencials per al control del cicle cel·lular en el procés de transició de la fase G1 a S del cicle cel·lular. Es troba induït el gen G0S2 (*G0/G1switch 2*), implicat en progressió a través del cicle cel·lular i associat amb arrest en G0/G1. També té lloc una inducció del transcrit de ciclina G1 i G2 (CCNG1 i CCNG2) i de CDKN1B,

implicades en la regulació negativa de la progressió del cicle cel·lular. Concretament, CDKN1B actua inhibint els complexos formats per CCNE-CDK2, CCNA-CDK2 i CCND1-CDK4 donant lloc a un arrest en fase G0/G1. Per altra banda, també es troba induït el gen CCNDBP1 (*Cyclin D-type binding-protein 1*) que interacciona amb CCND1 i s'ha descrit que inhibeix la fosforilació del Rb mediada per CDK4 i l'activitat transcripcional de E2F1 *in vitro*, suggerint un paper en el control de la diferenciació i proliferació cel·lulars [359].

Aquestes dades indicarien que, en resposta a l'estimulació per CD40, s'activen els primers senyals moleculars per a un arrest en G0/G1 del cicle cel·lular. De la mateixa manera, els efectes que promouen supervivència de la família de proteïnes de Bcl-2 es relacionen amb l'arrest en fase G0/G1 del cicle cel·lular que ocasiona un retard en l'entrada a fase S [360]. Aquest efecte primerenc implicaria un estat de despesa metabòlica menor que contribuiria a la prevenció de mort cel·lular i un increment de la supervivència.

Per altra banda, després de la interacció CD40-CD40L, s'indueix l'expressió de gens d'arrest del cicle cel·lular i reparació al DNA com GADD45A (*Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*), un gen de resposta tardana que s'activa per factors d'estrès i altres agents perjudicials per la cèl·lula, i el corepressor transcripcional DDIT3 (*DNA-damage-inducible transcript 3*) també anomenat GADD153.

Pel que fa al control del cicle cel·lular i proliferació a temps més llargs, l'anàlisi per GSEA indicava que a 16 hores d'estimulació les cèl·lules endotelials iniciarien un estat proliferatiu. Segons l'anàlisi de microarrays té lloc la inducció de l'expressió de CUL4A (*Cullin 4A*), un membre de la família de proteïnes Cullin, que participen en la ubiquitinació i posterior degradació de proteïnes involucrades en la progressió del cicle cel·lular. La família de proteïnes *Cullin* són un component essencial del complex SCF (*Skp1-Cullin-F-box*), implicades en la degradació de les proteïnes reguladores negatives CDKN1B i CDKN1A, necessària per tal que tingui lloc la transició d'un estat quiescent a un estat proliferatiu. Anteriorment s'havia descrit que l'increment de l'activitat transcripcional de c-Myc en resposta a l'activació de NFκB per CD40, causava la inducció de l'expressió d'un altre membre d'aquesta família, CUL1 [361], i la progressió de G1 a fase S del cicle cel·lular.

### **Estrès oxidatiu i inflamació**

El CD40L dels limfòcits T activats actua com a un estímul proinflamatori en les cèl·lules endotelials a través de CD40, induint l'expressió de molècules amb característiques proinflamatòries. Per exemple, en resposta a l'activació per CD40 a 4 hores, té lloc la inducció de Caspasa 1 (CASP-1, *apoptosis-related cysteine protease*), concretament, la variant *alpha* del transcrit de CASP-1 és la que està regulada transcripcionalment per CD40.

Casp-1 és una proteïna que juga un paper important en l'activació seqüencial de caspases i la inducció d'apoptosi cel·lular, actuant en diferents estadi de desenvolupament. Aquesta proteasa va ser descoberta originàriament per la seva activitat proteolítica activadora del precursor inactiu de IL1. Per aquest motiu també se l'ha anomenat *interleukin 1-B converting enzyme* (ICE). En cèl·lules endotelials prèviament ja s'havia descrit que en resposta a CD40L té lloc un increment de la forma activa de IL-1 $\beta$  que correlaciona amb un augment dels nivells de la proteïna immunoreactiva Casp-1 [362]. CASP-1 té un paper ben establert en desencadenar inflamació, a través de l'activació de citoquines proinflamàtòries IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33 per processament de les formes precursors [363], i en el procés de mort cel·lular per apoptosi, com a mecanisme de defensa en front a la infecció per organismes patògens [364].

Segons l'anàlisi per GSEA en els diferents temps d'estimulació de la via, en resposta a la lligació de CD40 tenia lloc un increment en la síntesi d'eicosanoids (prostaglandina, prostaciclina, tromboxà, leucotriè). En aquest sentit, l'anàlisi de microarrays mostrava una inducció de l'expressió de ciclooxigenasa-2 (COX-2), un enzim clau per a la biosíntesi de prostaglandina a partir de l'àcid araquidònic. També anomenada PTGS2 (*Prostaglandin-endoperoxide synthase*), aquesta proteïna presenta un paper important com a medidora de la resposta inflamatòria. S'ha descrit que la síntesi d'aquest mediador d'inflamació està regulada per CD40 en monòcits on s'ha observat que la lligació de CD40 estimula la síntesi de PGE(2) a través de l'expressió induïble del gen COX-2 [365]. A 16 hores d'estimulació s'observa una major inducció de l'expressió de COX-2 comparat amb 4 hores d'estimulació de la via. COX-2 catalitza la síntesi de prostaglandines proinflamàtòries, principalment prostaglandina E. Tanmateix, s'ha descrit que en les últimes etapes d'inflamació, COX2 dirigeix la síntesi de prostaglandines antiinflamàtòries com *cyclopentenone* 15dPGJ<sub>2</sub>, que actuen a través de la inhibició de l'activitat de IKK2 responsable de l'activació de NF $\kappa$ B [366], suggerint un paper d'aquestes molècules en la resolució del procés inflamatori.

L'estrès oxidatiu és un tret característic de la resposta inflamatòria. L'acció de CD40 també regula l'expressió d'enzims involucrats en la generació de ROS com el citocrom CYB5A (*cytochrome b5 type A (microsomal)*), i NDUFC2 (*NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, subunit C2*) una subunitat del complex I de la cadena de transport d'electrons de la mitocondria. Per altra banda, en resposta a CD40, també té lloc la regulació de gens implicats en la destoxificació de ROS, com SOD2 (validat per qRT-PCR), amb efecte antioxidant i induït de manera prematura; i el transcrit de Peroxiredoxina 5 (PRDX5), un enzim antioxidant amb paper protector en processos inflamatoris, que a diferència de SOD2, veu disminuïda la seva expressió a 4 hores d'estimulació.

### **Metabolisme lipídic**

En resposta a l'activació primerenca de CD40 té lloc un augment de la despesa energètica cel·lular que implicaria també un increment del metabolisme d'àcids grassos. L'anàlisi per GSEA indicava que l'activació endotelial dependent de CD40 causava alteracions en el metabolisme lipídic i en la homeòstasi de glucosa, probablement a través de la regulació de la via de PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*). PPAR $\alpha$  és un factor de transcripció nuclear que pertany a la superfamília de receptors d'hormones esteroidees PPARs. PPAR $\alpha$  intervé en el control transcripcional del metabolisme lipídic regulant diferents aspectes del metabolisme d'àcids grassos així com del contingut o homeòstasi intracel·lular dels lípids. Molts gens amb un paper crucial en el metabolisme lipídic presenten un element de resposta a PPAR (PPRE) en la seva seqüència reguladora. Tot i així, l'anàlisi de microarrays no ha permès detectar regulació de l'expressió de PPAR $\alpha$ , PPAR $\zeta$  o PPAR $\gamma$ .

Alguns transcrits que codifiquen per proteïnes que intervenen en el metabolisme lipídic i estarien induïts a 4 hores d'estimulació de la via CD40 són els membres de la família d'apolipoproteïnes L, APOL3 i APOL6, que regulen el moviment de lípids en el citoplasma. S'ha descrit que l'expressió de APOL3 es troba incrementada en condicions proinflamatòries (TNF- $\alpha$ ) en cèl·lules endotelials que recobreixen les artèries ilíaca i aorta [367]. També es troben induïts a 4 hores d'estimulació els transcrits de la Lipasa A (LIPA), un enzim lisosomal que catalitza la hidròlisi dels èsters de colesterol i triglicèrids presents en les apolipoproteïnes; el transportador ABCA1 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 1*), que intervé en el transport de colesterol des del citoplasma a la superfície de la membrana on s'unirà a les apolipoproteïnes per tal de ser conduït al fetge; la PLA2G4C, una fosfolipasa A2 citosòlica independent de calci; i l'enzim ACSS1 (*acetyl-CoA synthetase 2 like*).

Pel que fa a alguns membres de la família de butirofilines regulades per CD40, recentment s'ha descrit que BTN2A1 podria estar involucrada en el metabolisme d'àcids grassos, concretament en el transport i la secreció de lípids [368].

### **Remodelació vascular, citoesquelet i migració cel·lular**

La reconstrucció de la matriu extracel·lular (ECM) contribueix a la reparació tissular durant el procés inflamatori i posteriorment. En aquest treball es demostra la contribució de CD40 en aquest procés mitjançant la inducció de gens implicats en remodelació tissular, gens relacionats amb el citoesquelet i gens proangiogènics.



Segons l'anàlisi per GSEA, a 16 hores 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 gens que afavoreixen el procés de **migració cel·lular i remodelació vascular**. En aquestes condicions proinflamatòries la interacció CD40-CD40L donava lloc a la inducció tardana de factors de creixement proangiogènics com VEGF-A, VEGF-C, PDGFC (*platelet derived growth factor*) que promouen la migració i la formació de nous vasos sanguinis, i la proliferació cel·lular en etapes posteriors del procés inflamatori que dona lloc a angiogènesi.

Hi ha evidències que indiquen que la via CD40-CD40L juga un paper en el procés d'angiogènesi amb la inducció de l'expressió de VEGF. S'ha descrit que la unió de CD40L al seu receptor indueix l'expressió de VEGF en cèl·lules endotelials i monòcits [369]. Aquest fet és consistent amb l'observació que el bloqueig de la via CD40-CD40L *in vivo* atenua el desenvolupament de malalties vasculares associades amb inflamació i angiogènesi, com l'aterosclerosi i el rebuig en trasplantament. En cèl·lules endotelials, VEGF indueix l'expressió de molècules d'adhesió i té propietats quimioattractants, la qual cosa suggereix que podria promoure directament el reclutament de leucòcits [370]. El VEGF estimula la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials. A més, incrementa la permeabilitat microvascular i l'angiogènesi mitjançant un efecte promigratori en les cèl·lules endotelials [371]. Per tant, independentment del seu efecte en l'angiogènesi, VEGF funciona com a una citocina proinflamatòria intermediària entre la inflamació immune mediada per cèl·lules i el procés d'angiogènesi. La inhibició de l'expressió de VEGF observada en els experiments de microarrays on s'ha bloquejat la via de senyalització del receptor de CD40 per RNAi a 16 hores d'estimulació de la via (validat per qRT-PCR), indica que CD40 podria induir a través de VEGF que l'endoteli vascular adquireixi un fenotip proangiogènic.

A més de VEGF, s'ha descrit que la lligació de CD40 resulta en la producció d'altres factors implicats en angiogènesi, com metal·loproteases [372] i *fibroblast growth factor* (FGF) [373]. Les metal·loproteases de matriu (MMPs) són enzims proteolítics dependents de Zinc que intervien en la remodelació dels components de la matriu extracel·lular. Les MMPs estan implicades en la regulació de molts processos fisiològics, entre ells l'angiogènesi, que requereix la degradació de la membrana basal vascular i la remodelació de la matriu extracel·lular per permetre a la cèl·lula endotelial migrar i envair el teixit circumdant. La seva alteració està implicada en processos patològics com l'artritis reumatoide, l'aterosclerosi i malalties del SNC com l'esclerosi múltiple i malaltia d'Alzheimer. Actualment es coneixen més de 20 metal·loproteases humanes i les seves homòlogues en altres espècies. Històricament, les MMPs es dividien en col·lagenases, gelatinases, estromelisinines i

matrilisines en base a l'especificitat amb el component de la matriu extracel·lular que degraden. Actualment s'agrupen segons la seva estructura. A més de contribuir en el procés d'angiogènesi degradant els components de la matriu extracel·lular, les MMPs intervenen en el procés inflamatori. Igual com altres factors inflamatoris, l'expressió de MMPs incrementa durant la conversió de l'endoteli d'un estat inactiu a un estat activat. En cèl·lules endotelials s'havia establert que la interacció CD40-CD40L indueix l'expressió de MMP-1, MMP-2, MMP-3 i MMP-9, implicades en la inestabilitat de la placa ateroscleròtica i ruptura d'aquesta [372]. En els nostres experiments de microarrays només es va veure induïda l'expressió de la metal·loproteasa MMP2 (anomenada Gelatinasa A) en resposta a CD40 a 16 hores d'estimulació de la via, mentre que MMP9 estava al límit de detecció de la tècnica.

Particularment rellevant és la inducció tardana de MMP10, també anomenada estromelisina-2 o transina-2, involucrada en la degradació dels col·lagens tipus III, IV, V, IX, X, i de l'elastina, la fibronectina, la gelatina, la laminina i el proteoglicà. La inhibició de l'expressió de MMP-10, observada en els experiments de microarrays en cèl·lules endotelials on s'ha silenciat CD40 per siRNA a 10 i 16 hores d'estimulació de la via, indica que la regulació d'aquest gen també estaria mediada per CD40. Aquestes dades han estat validades per qRT-PCR i concorden amb la inhibició de l'adquisició d'un fenotip proinflamatori i proangiogènic per RNAi. A diferència de MMP-2, fins ara no s'havia descrit cap efecte de la via de senyalització de CD40 en la regulació de l'expressió de la MMP10 implicada en el manteniment de la integritat vascular. Donat que s'han observat canvis en l'activitat d'AP1 deguts a CD40, la regulació de l'expressió de MMP10 podria estar mediada pels dos llocs d'unió AP-1 en la seva regió promotora responsables de seva inducció en inflamació [374].

MMP10 activa altres MMPs, com per exemple MMP1 [375]. S'ha descrit que un increment en l'expressió de MMP10 causa defectes cardiovasculars que inclouen dilatació i ruptura dels vasos sanguinis i una disminució del diàmetre de la paret del miocardi. Aquest increment de MMP10 va acompanyat de defectes en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula [376]. El balanç entre MMPs i l'activitat de inhibidors endògens de MMPs (TIMP), altament expressats en cèl·lules endotelials, és crític pel manteniment de la integritat del sistema cardiovascular. Canvis en l'expressió de MMPs i TIMPs estan associats amb insuficiència cardíaca i dilatació ventricular [377]. En concret, MMP10 i TIMP1 han estat associats a aneurisme de l'aorta, que es caracteritza per un remodelatge destructiu de la matriu extracel·lular vascular i la ruptura de la paret dels vasos sanguinis. De fet, s'ha suggerit l'ús potencial de inhibidors de MMP10 en el restabliment de la funció cardíaca en aquests desordres. En aquest sentit, la inhibició de MMP10 per siRNA anti-CD40 tindria conseqüències antiangiogèniques. Aquest fet suggereix

que CD40 regula la permeabilitat vascular, en part modulant l'expressió de MMP10. Aquests resultats poden ajudar a entendre la implicació del sistema CD40-CD40L en el procés d'angiogènesi i remodelació de la vasculatura en la malaltia cardiovascular.

Un altre gen que es troba induït en resposta a CD40 és la uroquinasa o activador de plasminogen uPA (també anomenat PLAU). Prèviament ja s'havia descrit que la interacció CD40-CD40L induïx la síntesi i producció de plasmina incrementant l'expressió dels enzims uPA i t-PA, també implicats en la remodelació de la matriu extracel·lular.

A més, la inducció del lligand de Notch JAG1 per CD40, suggereix que l'activació autocrina de la via de Notch podria jugar un paper durant la formació de la vasculatura.

El manteniment de l'homeòstasi del sistema cardiovascular requereix d'interaccions entre cèl·lules endotelials i les fibres musculars llises. L'endoteli vascular en condicions normals manté la integritat vascular i expressa CD40. L'anàlisi per GSEA indicava que a 16 hores d'estimulació tenia lloc una inhibició de la via de senyalització per integrines i l'expressió de molècules de matriu extracel·lular, necessària per al desenvolupament de nous vasos sanguinis durant el procés d'angiogènesi i la remodelació vascular en el desenvolupament de malaltia cardiovascular. En concordància amb aquest fet, l'anàlisi de microarrays a 16 hores d'estimulació mostrava la inhibició dels transcrits corresponents a les integrines ITGB1 i ITGB4. En canvi, ITGAV es trobava induïda en resposta a CD40.

Per altra banda, la repressió dependent de CD40 de proteïnes associades amb l'**organització del citoesquelet i l'adhesió cel·lular** en cèl·lules endotelials, suggereix la regulació dels processos de migració i unió a la matriu extracel·lular per aquesta via de senyalització. Entre els gens involucrats en la organització del citoesquelet inhibits per CD40 es troben MSN (*moesin*), TMSL8 (*thymosin-like 8*), PLEK2 (*pleckstrin 2*) i SDC1 (*syndecan 1*). A més, en resposta a l'activació per CD40 s'observa la inducció tardana d'altres metal·loproteases com PAPLN (*papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein*), un enzim implicat en la degradació de la matriu extracel·lular, juntament amb la inhibició tardana de gens involucrats en unió a la matriu extracel·lular com NTN4 (*netrin 4*).

Cap d'aquests gens no s'havia relacionat prèviament amb CD40. Tots aquests canvis observats en l'expressió d'integrines, molècules d'adhesió i gens relacionats amb el citoesquelet d'actina deguts a CD40, reflexen una transició fenotípica des d'un estat de proadhesió a un estat migratori en les cèl·lules endotelials al llarg del procés inflamatori.

### **Hemostàsia i coagulació sanguínia**

Després de la seva activació, les cèl·lules endotelials adquireixen un estat procoagulant i vasopressiu característic del procés inflamatori. Els resultats d'aquest estudi indiquen que

CD40 influeix també aquests processos regulant l'expressió de gens involucrats en el manteniment de l'homeòstasi vascular com APLN, involucrada en el control de la pressió sanguínia, i THBD i SERPIND1, involucrades en la unió a trombina i en la seva inhibició respectivament.

Les cèl·lules de l'endoteli vascular participen en el control de l'homeòstasi. Durant el procés inflamatori, té lloc la conversió de l'endoteli d'un estat inactiu anticoagulant a un estat activat protrombòtic. En aquest estadi, l'endoteli activat promou la coagulació sanguínia regulant els nivells d'expressió de trombomodulina (THBD). La trombomodulina és una glicoproteïna de la superfície de cèl·lules endotelials que controla la cascada de la coagulació catalitzant l'activació de la proteïna C, i tindria propietats anticoagulants i una acció antiagregant plaquetària bloquejant l'activació de les plaquetes per la trombina. En la cèl·lula endotelial activada té lloc una reducció de l'expressió de trombomodulina i un increment en la síntesi de TF [378]. La regulació d'aquests factors està mediada per la interacció CD40-CD40L que induïx un fenotip procoagulant en les cèl·lules endotelials vasculars.

La inducció de l'expressió del transcrit del gen de la trombomodulina observada en cèl·lules HUVEC on es bloqueja la interacció CD40-CD40L per RNAi, concorda amb la inhibició del procés inflamatori. El silenciament de la via de senyalització de CD40 impediria que l'endoteli vascular adquirís un fenotip protrombòtic i procoagulant desfavorint la formació de trombina, el procés de coagulació i la deposició de fibrina a la paret vascular.

Pel que fa a la contribució de THBD en el sistema del complement, s'ha descrit que THBD modula aquest sistema interferint en l'activació i la generació dels seus components proinflamatoris. THBD actua per activació d'una carboxipeptidasa amb propietats antiinflamatòries TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*), que inactiva els factors de complement C3a i C5a [379]. Per tant, la THBD també tindria un paper protector en inflamació, prevenint l'activació de factors de complement i la seva deposició en la superfície de la cèl·lula endotelial. Per tant, la THBD a través de la seva interacció amb diferents lligands, modula la coagulació, l'activació del complement i la inflamació.

Donat que l'anàlisi de microarrays no ha permès detectar l'expressió de TF, per trobar-se per sota el límit de detecció, no hem pogut confirmar la seva regulació en resposta a l'activació per CD40 en cèl·lules endotelials.

Segons l'estudi de microarrays en cèl·lules endotelials, a més de la THBD, en resposta a CD40 també es troba reprimint el transcrit de la SERPIND1 (*Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1*), una serina proteasa amb acció anticoagulant que actua com a cofactor de la heparina.

Un gen que prèviament no havia estat relacionat amb la via de senyalització de CD40 i que es va veure regulat en resposta al tractament amb siRNA en cèl·lules endotelials és Apelin (APLN), *APJ endogenous ligand*, el transcrit més diferencialment induït pel tractament amb siRNA anti-CD40.

El gen del receptor APJ, un receptor transmembrana acoblat a proteïna G (GPCR), va ser inicialment identificat l'any 1993 [380] com a un gen que presentava certa homologia amb el gen del receptor d'Ang-II 1 (AT1), tot i que no unia Ang-II. El receptor APJ va romandre "orfe" fins al 1998, quan es va identificar el seu lligand endogen: Apelin-36.

El gen que codifica per l'Apelin es troba localitzat en el cromosoma humà Xq25-26.1, i codifica per a un prepropèptid de 77 aa que es troba altament conservat en totes les espècies analitzades, essent els 23 aa de l'extrem C-terminal idèntics en rata, ratolí, i humà [299]. S'ha descrit que pèptids sintètics d'Apelin que comprenen els 17 o 13 aa de l'extrem C-terminal del prepropèptid també presenten activitat biològica [298] (Figura 106).

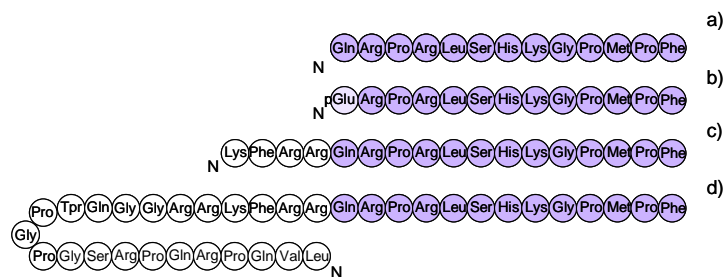


Figura 106. Seqüència d'aminoàcids de (a) Apelin-13, (b) p[Glu] apelin-13, (c) Apelin-17, i (d) Apelin-36.

A més del lligand endogen Apelin-36, s'ha descrit la presència de quantitats significatives d'un pèptid de 13 aa que posseeix un residu característic de piroglutamat a l'extrem N-terminal (Pyr1)apelin-13 en rata i calostre boví [306]. Aquest grup és una modificació posttraduccional comuna en cert nombre de pèptids biològicament actius, que evita la degradació enzimàtica d'aquests, fent que conservin la seva activitat biològica [381]. Es creu que Apelin-36 funcionaria com a precursor amb una activitat biològica limitada fins a patir una proteòlisi i modificació posttraduccional que donaria lloc al pèptid biològicament més actiu, la (Pyr1)apelin-13. L'existència de certa homologia entre l'estructura de l'Apelin i APJ, i la molècula d'Ang-II i el seu receptor AT1, van proporcionar les primeres pistes sobre les funcions fisiològiques d'aquest nou sistema de transducció de senyals. A més, l'APJ i AT1 així com l'Apelin i Ang-II mostraven una distribució similar en els teixits analitzats [299], la qual cosa suggeria que l'Apelin i Ang-II podien afectar els mateixos processos biològics i tenir un paper important en la regulació de l'homeòstasi cardiovascular.

A més de la seva funció en la regulació de la funció cardiovascular, Apelin està implicada en altres processos fisiològics. En pulmó, cor i glàndula mamària, on és present a nivells elevats, regularia l'homeòstasi de fluids [299]. L'Apelin també es secreta al calostre on tindria una funció reguladora de la resposta immune [382]. En teixit adipós, l'Apelin funciona com a una hormona que és secretada pels adipòcits. S'ha descrit que els nivells d'Apelin en plasma es troben incrementats en obesitat i estan associats a resistència a insulina i hiperinsulinèmia [383].

Un estudi de la distribució d'Apelin humà en diferents teixits descriu l'Apelin en cèl·lules endotelials d'endocardi, artèries i venes [384]. Dins la cèl·lula endotelial, l'Apelin està present al reticle endoplasmàtic, complex de Golgi, i vesícules de secreció. Apelin no es localitza als cossos de *Weibel-Palade*, ni als orgànuls endotelials de secreció de pèptids induïbles, suggerint un alliberament constitutiu d'Apelin des de la cèl·lula endotelial [385].

Prèviament ja havia estat descrit que el cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC expressa tant Apelin com el seu receptor de forma endògena. En cèl·lules endotelials s'ha descrit el paper d'Apelin com a agent mitogènic, quimiotàctic, antiapoptòtic i proangiogènic [386]. Pel que fa a la via de transducció de senyals, la forma de l'Apelin-13 estimularia la proliferació i migració d'aquestes cèl·lules *in vitro* a través d'una via de senyalització que implica PI3K, PKB/Akt, PKC, i Erk/MAPK [387].

Fins ara no s'havia descrit que CD40 estigués implicat en la regulació de l'expressió d'Apelin en cèl·lules endotelials. Aquests resultats impliquen la senyalització de la via CD40-CD40L en la regulació dels nivells del precursor d'Apelin i altres pèptids biològicament actius en cèl·lules endotelials i, per altra banda, confirmen la rellevància d'aquest pèptid en els processos immunoinflamatoris.

La inhibició de l'expressió del pèptid Apelin en aquestes cèl·lules es produeix via CD40 en interaccionar amb les dues isoformes del lligand, CD40L ancorat a membrana i CD40L soluble, i en entrar en contacte amb les citoquines proinflamàtores TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Per tant, a més de CD40L, altres estímuls proinflamatoris com TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , causarien una disminució de l'expressió d'Apelin en cèl·lules endotelials. En canvi, s'ha descrit que la citoquina TNF- $\alpha$  regula l'expressió d'Apelin en teixit adipós humà i de ratolí, causant un increment de l'expressió d'Apelin en aquest teixit i un augment dels nivells del pèptid en plasma [388]. Aquest efecte contraposat posaria de manifest una resposta diferencial a TNF- $\alpha$  del gen de l'Apelin específica de tipus cel·lular.

El paper de l'Apelin i el seu receptor APJ en la regulació del sistema cardiovascular va ser suggerit després de l'observació que tant el mRNA de APJ com el del seu lligand

s'expressaven de manera abundant en teixits perifèrics de rata i humà, incloent el cor i la vasculatura [389]. El descobriment de l'expressió del receptor APJ i Apelin en cor de rata i humà i en cèl·lules endotelials de la vasculatura [390], suggeria un paper d'aquest sistema en la regulació cardiovascular. Aquesta idea va ser recolzada per la presència de quantitats importants d'Apelin en cèl·lules endotelials de rata [306] i en cèl·lules endotelials al llarg de la vasculatura humana, vasos sanguinis petits, artèries i venes [384].

La primera evidència funcional del paper de l'Apelin en el sistema cardiovascular va ser descrita en observar que la infusió intravenosa d'Apelin-13 en rates causava una disminució significativa i transitòria de la pressió sanguínia sistòlica i diastòlica [299]. En un estudi similar, un altre grup va observar l'efecte hipotensiu dels 3 pèptids d'Apelin (Apelin-12, Apelin-13 i Apelin-36), la potència dels quals era inversament proporcional al seu pes molecular. L'efecte del pèptid més potent, Apelin-12, era dosi dependent i podia ser anul·lat pretractant les rates amb un inhibidor de l'òxid nítric sintasa (NOS) [306].

Evidències de que l'acció cardiovascular de l'Apelin era mediada per APJ provenen d'un estudi en què es mostrava que la infusió intravenosa de (Pyr)apelin-13 causava una disminució de la pressió sanguínia en ratolins *wild type* (wt), mentre que la mateixa infusió en ratolins *knockout* per APJ no causava alteracions en els paràmetres cardíacs. Aquesta acció hipotensiva observada en ratolins wt s'eliminava completament pretractant els animals amb l'inhibidor de la NOS, en concordança amb estudis previs que suggerien un mecanisme dependent d'endoteli que exerciria l'efecte hipotensiu de l'Apelin en rates [300].

Per altra banda, en cèl·lules endotelials de ratolins deficientes en el receptor APJ, no es va observar l'activació de eNOS per l'Apelin, demostrant altra vegada que Apelin actua a través de APJ [300].

En humans, l'únic estudi funcional de l'efecte cardiovascular de l'Apelin descriu una acció potent vasoconstrictora de l'Apelin en endoteli de la vena safena aïllada. La vasoconstricció observada probablement representa un efecte immediat de l'absència d'endoteli funcional en la musculatura llisa vascular [391]. Igual com altres pèptids vasoactius com la bradiquinina, l'Apelin causa vasodilatació dependent d'endoteli, desencadenant l'alliberament de vasodilatadors, com l'òxid nítric, des de les cèl·lules endotelials. Apelin causa la fosforilació i activació de l'enzim endotelial eNOS en cèl·lules endotelials aïllades de ratolins wt, causant l'alliberament de NO per part d'aquestes cèl·lules. NO activa la guanilat ciclasa soluble de cèl·lules de la musculatura llisa vascular, causant un increment en els nivells de cGMP que afavoriria la dilatació de les cèl·lules de la musculatura llisa vascular [392] (Figura 107). Per tant, en absència d'endoteli funcional, l'Apelin podria

activar directament APJ de cèl·lules de la musculatura llisa vascular per induir vasoconstricció. Aquestes dades suggereixen que Apelin podria exercir efectes bifàsics en els vasos sanguinis a través d'una vasodilatació dependent d'endoteli i una vasoconstricció dependent de les cèl·lules de la musculatura llisa vascular. Tot i així, el paper fisiològic d'Apelin i el seu receptor no està del tot clar.

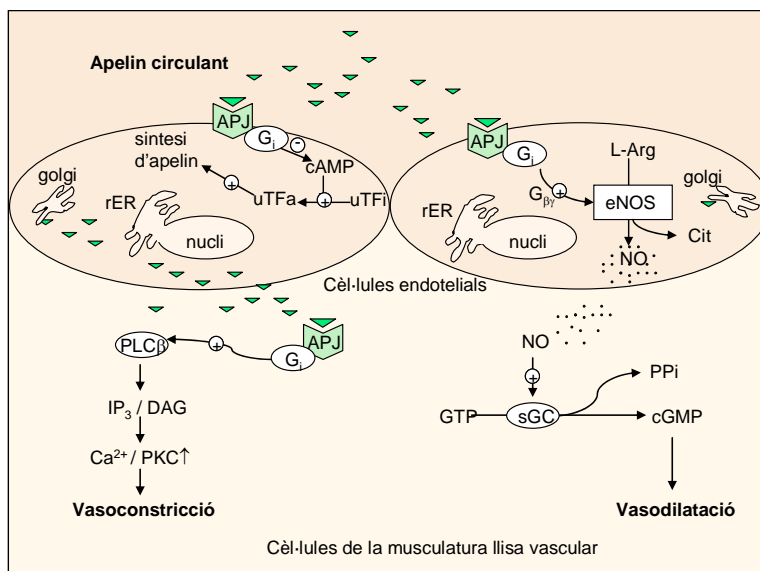


Figura 107. Mecanismes de control del to vascular per l'Apelin sistèmica i Apelin endotelial. cAMP, adenosin monofosfat ciclic; cGMP, guanosin monofosfat ciclic; Cit, citrulina; DAG, diacilglicerol; GTP, guanosina trifosfat; IP<sub>3</sub>, inositol 4, 3, 5 trifosfat; PKC, proteïna quinasa C; PLCβ, fosfolipasa C; PPI, pirofosfat; rER, reticle endoplasmàtic rugós; sGC, guanilat ciclase soluble; uTFa, factor de transcripció no identificat (actiu); uTFi, factor de transcripció no identificat (inactiu). Modificat de [392].

Apelin s'ha detectat en plasma en diversos estudis, tot i que els seus nivells són més baixos del que s'esperaria en comparació amb la concentració d'altres pèptids presents en circulació sanguínia que funcionen com a hormones. Els nivells d'Apelin en plasma serien comparables als d'altres mediadors endotelials que actuen de forma local com l'endotelina-1 [393]. Una font d'Apelin immunoreactiva en plasma podria ser resultat de l'alliberació per part de la cèl·lula endotelial vascular. No està clar si hi ha alguna altra contribució d'Apelin diferent de la cèl·lula endotelial. D'acord amb aquesta hipòtesi, en un estudi realitzat a més de 60 pacients, els nivells d'Apelin circulant en plasma augmentaven en les primeres etapes d'insuficiència cardíaca, en comparació amb individus sans, i en etapes posteriors de la malaltia o en casos de insuficiència cardíaca severa, tenia lloc una disminució dels nivells d'Apelin [394], possiblement reflectint una disfunció de l'endoteli que allibera el pèptid. En aquest sentit, la disminució dràstica dels nivells d'expressió del pèptid Apelin observada en aquest treball en cèl·lules endotelials activades per CD40L, confirma la importància d'aquest



pèptid en la regulació dels processos immunoinflamatoris d'origen cardiovascular.

En preparacions de cor de rata, s'ha descrit que Apelin-16 és un potent agent inotrópic que incrementa la contractibilitat cardíaca amb una  $EC_{50}$  30pM [304]. En humans, el sistema Apelin/APJ seria capaç d'exercir temporalment accions inotrópiques positives per ajudar a compensar el mal funcionament cardíac. D'acord amb estudis en rates, quan la situació es prolonga, l'existència d'un mal funcionament cardíac podria excedir la capacitat compensatòria d'aquest sistema [395].

Els resultats obtinguts en aquest treball permeten proposar que el gen d'Apelin participa en la modulació de la resposta inflamatòria mediada per CD40 en cèl·lules endotelials. Fins ara no hi hauria evidències conegudes d'un possible mecanisme de regulació de l'expressió d'Apelin per CD40.

En adults, l'expressió d'Apelin està principalment restringida a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis. En condicions fisiològiques normals, aquest pèptid endotelial entraria en circulació on tindria un paper com a mediador paracrí. Seria secretat localment i actuaria sobre la musculatura llisa vascular i els cardiomiòcits [384] i es mantindria en un rang de concentracions amb efecte fisiològic. Per tant, l'expressió d'aquest pèptid estaria regulada per l'endoteli vascular, però existeix poca informació sobre la regulació dels nivells de mRNA d'Apelin en cèl·lules endotelials. En un estudi recent utilitzant extractes nuclears *in vitro*, s'han caracteritzat les regions promotores del gen d'Apelin humana, i s'ha suggerit la presència d'elements repressors de la transcripció en una regió distal a 5' del seu promotor amb la interacció de les dues proteïnes USF1 i USF2 (*upstream stimulating factor 1 and 2*) [396]. Aquests factors de transcripció participarien en la regulació de l'expressió d'Apelin, tot i així, es desconeixen molts aspectes de la seva regulació a nivell transcripcional. En un futur seria interessant estudiar les bases moleculars de la regulació del gen d'Apelin via CD40 en cèl·lules endotelials. L'objectiu seria determinar la contribució de la senyalització via CD40 en aquesta regulació i identificar els llocs d'unió dins el promotor del gen de l'Apelin, de les proteïnes repressores que causen la inhibició de l'expressió d'aquest gen sota estímuls proinflamatoris.

### Anàlisi funcional de l'activació de CD40 en cèl·lules endotelials

A la Taula 30 es mostren algunes funcions biològiques que s'ha descrit que estarien regulades per CD40 en diferents tipus cel·lulars. També es resumeixen algunes noves funcions que segons aquest treball estarien regulades en resposta a CD40 i nous gens representatius associats a aquesta via de senyalització en cèl·lules endotelials.

**A**

	Adhesió leucocitària	Reclutament leucocitari	Coactivació/coestimulació	Angiogènesi i remodelació vascular	Coagulació sanguínia	Apoptosi	Proliferació i cicle cel·lular	Processament i presentació d'antigen	Regulació de la transcripció
relacionats	SELE VCAM-1 ICAM-1	IL6 IL8 CCL2 CCL20 CXCL1 CX3CL1 GM-CSF	CD69	VEGF MMP1 MMP2 MMP3 MMP9 uPA	THBD TF	BIRC-2 BIRC-3 CASP1 TNFAIP3	CDKN1B CCND1 CDK4 CDK6	TAP1 HLA-classe I	NFKB p65 NFKB p50 c-Fos FosB c-Jun JunB NFKBIA STAT1 EGR1
		IL11 IL15 CCL7 CXCL2 CXCL3 CXCL11 IL23A IL7R IL18R1 IL23A	BTN2A1 BTN2A2 BTN3A1 BTN3A2	MMP10 PDGFC JAG1	SERPIND1	XAF1 TNFAIP8 RIPK2 BCL2L12 BBC3 API5 COP1 TNFSF10 HSPA5	CCNG1 CCNG2 CUL4A CCNDBP1 G0S2 GADD45A PSMD10	UBD PSMB8 PSMB9 PSME1 PSME2 FBX025 UBE2D1 ARTS-1 RFX5	NFKBIE CEBPB CEBPD BCL3 IRF2 IRF7 NFIA DSCR1 NLF2
prèviament no relacionats									

**B**

Sistema del complement	Metabolisme lipídic	Citoesquelet i adhesió a ECM	Estrès oxidatiu	Resposta Immune antiviral	Homeòstasi cardiovascular
CFI CFH CFHR1	APOL3 APOL6 BTN2A1 LIPA ABCA1 ACSS1 PLA2G4C	MSN TMSL8 PLEK2 SDC1 NTN4 PAPLN ITGB1 ITGB4 ITGAV	SOD2 NCOA7 NDUFC2 CYB5A PRDX5	TLR3 IFIH1 RIG-I RNASEL GBP1-4 FAM89B CXCR4	APLN

Taula 30. A). Funcions biològiques conegudes regulades per CD40 en diferents tipus cel·lulars i gens que no havien estat prèviament relacionats amb CD40. B). Noves funcions biològiques regulades per CD40 en cèl·lules endotelials i els seus gens associats segons els experiments de microarrays. En verd es mostren els gens reprimits i en vermell els gens induïts transcripcionalment al silenciar la via de CD40.

El darrer nivell de validació de les dades de microarrays seria determinar les conseqüències que els canvis a nivell transcripcional tindrien a nivell de funció. Es d'aquesta manera que es pot passar de la mera comprovació de les observacions i la formulació d'hipòtesis i elaboració de models, a identificar els mecanismes moleculars a través dels quals CD40 exerceix la seva acció sobre l'endoteli. Amb aquest objectiu es va analitzar l'activitat de factors de transcripció regulats per CD40 a nivell transcripcional, i de vies de senyalització amb components aparentment dependents de CD40, segons l'anàlisi de GO i GSEA.

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

En aquest treball s'ha analitzat l'activitat d'unió al DNA de factors de transcripció pertanyents a la família NFκB, factors de transcripció de la família AP-1 i factors de transcripció regulats per MAPKs.

Els resultats d'aquest estudi a nivell proteic indiquen que entre els factors de transcripció de la família NFκB activats per la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials es troben NFκB p50 i NFκB p65 (RelA), confirmant a nivell funcional l'activació de la via de NFκB en el nostre sistema, com la principal via de senyalització involucrada en l'inici i amplificació de la resposta immunoinflamatòria. NFκB p50 i NFκB p65, juntament amb NFκBIA, participen en la via clàssica d'activació de NFκB. Tot i així, la inducció de l'expressió del transcrit de RelB observada per microarrays suggereix que també podria estar activada la via alternativa d'activació de NFκB.

Els factors de transcripció de la família AP-1 pertanyen a una àmplia família de factors de transcripció relacionats estructuralment que inclou ATF1-4, c-Fos, c-Jun, c-Myc i C/EBP. AP-1 està format per una barreja de complexos heterodimèrics de proteïnes derivades de la família Fos (c-Fos, FosB, Fra1, i Fra2) i Jun (c-Jun, JunB, i JunD). Les formes predominants d'AP-1 en la majoria de les cèl·lules són heterodímers Fos/Jun que tenen una elevada afinitat per unir-se al lloc AP-1, mentre que homodímers de Jun/Jun s'uneixen al lloc AP-1 amb baixa afinitat [397]. Els factors de transcripció Fos, FosB, i uns altres membres de la família AP-1 són regulats principalment a nivell transcripcional a través d'elements sensibles de sèrum (SREs) en els seus promotors [398]. A més del sèrum, l'expressió de AP-1 pot ser induïda per múltiples factors com TGF-β, TNF, IFNs, factors de creixement, èsters de forbol, oncogens i estrès cel·lular [399]. Les proteïnes AP-1 juguen un paper important en el control de l'expressió de gens implicats en proliferació i progressió del cicle cel·lular i apoptosi.

Segons els resultats d'aquest estudi a nivell proteic, entre els factors de transcripció de la família AP-1 activats per la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials es troben ATF-2, c-Jun, c-Fos, FosB, JunB, JunD.

Els factors de transcripció NFκB i AP-1 estan considerats com a marcadors moleculars de l'activació endotelial ja que coordinen l'expressió d'una àmplia varietat de gens implicats en l'activació d'aquestes cèl·lules. L'activitat de tots dos factors de transcripció pot induir-se per diferents factors proinflamatoris contribuint així a l'inici de la resposta inflamatòria.

El siRNA anti-CD40 bloqueja la inducció de l'expressió de diversos factors implicats en inflamació que estan regulats a nivell transcripcional i presenten regions d'unió a elements AP-1 en la seva regió promotora. S'han identificat seqüències d'unió específica a elements NFκB i motius d'unió a AP-1 en les regions promotores de molts gens proinflamatoris, incloent molècules d'adhesió endotelial, diverses citoquines i factors de creixement i proliferació cel·lular. Per exemple, s'ha identificat motius d'unió a AP-1 (c-Fos i c-Jun) dins de la seqüència promotora de gens necessaris per a que les cèl·lules endotelials inactives

adquireixin un estat proinflamatori i procoagulant, com ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, CCL2 i TF [400]. La família de factors de transcripció AP-1, entre ells ATF-2, juguen un paper important en la resposta inflamatòria desencadenant l'activació transcripcional de gens de citoquines com TNF- $\alpha$  i IFN- $\beta$  [401]. A més l'activitat AP-1 també es requereix per a la inducció de l'expressió d'enzims degradadors de la matriu extracel·lular com la col·lagenasa (MMP-1) [402].

El mecanisme pel qual elements AP-1 indueixen l'expressió d'aquests gens en cèl·lules endotelials seria independent de NF $\kappa$ B en la majoria de casos. De totes formes, s'ha proposat també que els factors de transcripció de la família AP-1 poden interactuar amb NF $\kappa$ B per tal de modular la seva activitat transactivadora. De fet, en la regió promotora de molts gens que codifiquen per molècules d'adhesió vascular existeixen elements d'unió a tots dos factors de transcripció. Molts gens, entre ells la citoquina IL-8, requereixen l'activació simultània d'aquests dos factors de transcripció que treballen cooperativament [403]. S'ha demostrat que les regions de bZIP de c-Fos i c-Jun poden interaccionar físicament amb NF $\kappa$ B p65 a través del domini d'homologia Rel, la qual cosa incrementa la capacitat d'unió al DNA i per tant la seva funció biològica [404].

L'activació de la via de transducció de senyals de MAPK és responsable de la fosforilació d'una sèrie de factors de transcripció necessària per tal de que aquests puguin desenvolupar la seva activitat transactivadora. A la Taula 31 es descriuen alguns factors de transcripció que estan regulats per cascades de senyalització de MAPKs.

MAPK	Activador	Substrat nuclear
Erk1/2	Factors de creixement, Sèrum Hormones, Citoquines	ATF-2, Elk-1, c-Fos, c-Myc, SAPs, c-Jun, NeuroD1, PDX-1, STAT-3, RSKs, Mnks, MSK
p38	Hormones, Citoquines Estrès osmòtic, <i>Heat shock</i>	ATF-2, Elk-1, MEF-2, SAPs, STAT-1, STAT-3, Mnks, MSK, MAPKAPs
JNK	Hormones, Citoquines Inhibidors de la síntesi proteica i de DNA Estrès osmòtic	ATF-2, c-Jun, Elk-1, STAT-1, STAT-3

Taula 31. Factors de transcripció regulats per les proteïnes MAPK.

L'activació de l'expressió gènica dependent de factors de transcripció membres de la família AP-1 com ATF-2, c-Jun, c-Myc, MEF-2 i STAT-1, s'assoleix per l'activació de proteïnes MAPKs. Entre els factors de transcripció regulats per MAPKs analitzats en aquest estudi es troben: c-Myc, substrat d'Erk, un factor de transcripció que regula el creixement i

diferenciació cel·lular, la glicòlisi i l'apoptosi; MEF-2, que s'activa per la via de p38/MAPK i Erk5 [405], i està involucrat en la regulació del desenvolupament dels vasos sanguinis i és necessari per a la diferenciació de les cèl·lules endotelials [376]; STAT-1, implicat en l'activació dels gens de IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  i activat tant per la via de p38/MAPK com per JNK [406]; c-Jun, regulat per Erk1/2 i JNK [407] i controla l'expressió de gens involucrats en proliferació i progressió del cicle cel·lular; i ATF-2, un membre de la família ATF/CREB que s'uneix a CRE (*cAMP response element*) i és activat per Erk1/2, JNK i p38/MAPK [408].

De tots aquests factors de transcripció regulats per MAPKs inclosos en l'anàlisi, només c-Jun, STAT-1 i ATF-2 estan activats per fosforilació en resposta a l'activació per CD40, d'acord amb el que s'havia descrit prèviament en cèl·lules endotelials.

### **Activació de MAPKs en resposta a CD40**

S'ha descrit la implicació dels membres de la família MAPKs en la regulació de la resposta cel·lular en inflamació, sobretot en el cas de les vies de JNK i p38/MAPK que són les més fortament lligades al procés inflamatori. Recentment s'ha descrit que les vies Erk, JNK i p38/MAPK controlen de manera directa la transcripció i síntesi de TNF- $\alpha$ , citoquina amb un paper clau com a medidora d'inflamació.

Per altra banda, s'ha estudiat extensament el paper d'aquestes MAPKs en l'activació endotelial mediada per diferents citoquines proinflamatòries. S'ha descrit que la citoquina TNF- $\alpha$  pot induir una activació ràpida i transitòria d'Erk, JNK i p38/MAPK en endoteli. La citoquina IL-1 també indueix l'activació de JNK i p38/MAPK regulant l'expressió de diferents molècules efectores proinflamatòries com E-selectina [409] i MCP-1 [410].

Pel que fa a l'activació de MAPKs per CD40, s'ha descrit que els diferents tipus cel·lulars difereixen en la seva resposta a CD40. A més, l'efecte biològic d'aquesta estimulació varia en diferents estadis d'activació i diferenciació cel·lular i seria conseqüència de l'activació de diferents vies de transducció de senyals. En limfòcits B la senyalització per CD40 causa l'activació de les tres principals vies de MAPKs: p38, JNK i Erk, donant lloc a l'activació dels factors de transcripció NF $\kappa$ B, AP-1 i NFAT. En aquest estudi es volia determinar l'efecte de l'estimulació per CD40 en l'activació d'Erk, JNK i p38/MAPK en cèl·lules endotelials. Prèviament ja s'havia descrit que la interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials desencadenava la fosforilació i activació de la proteïna JNK i la seva translocació al nucli i la inducció de factors de transcripció de la família NF $\kappa$ B i AP-1 [44]. Els resultats d'aquest estudi confirmen l'activació d'aquesta MAPK en resposta a l'estimulació per CD40 en cèl·lules endotelials activades amb Jurkat D1.1. S'havia descrit que l'activitat JNK està

fortament induïda en resposta a l'estímul proinflamatori, i hi ha evidències de que la inhibició de l'activitat JNK pot retardar o, fins i tot, prevenir el dany tissular en models animals d'artritis reumatoide [411]. JNK va ser identificat inicialment per la seva habilitat de fosforilar i activar el factor de transcripció c-Jun [401]. JNK fosforila i activa a més del factor de transcripció c-jun, altres factors de transcripció de la família AP1, com ATF-2, regulant l'expressió de gens associats a inflamació com citoquines, receptors de superfície, molècules d'adhesió cel·lular i MMPs. En quant a la regulació de l'expressió de citoquines, s'ha descrit que JNK indueix la transcripció gènica de TNF- $\alpha$  [401].

Els resultats d'aquest treball indiquen que, a més de JNK, les cèl·lules endotelials també incrementen l'activació de Erk1/2 en resposta a CD40, la qual cosa es tradueix en un augment dels nivells de la forma fosforilada de la proteïna. Aquest mecanisme regulador de fosforilació-desfosforilació permetria un major control de la regulació de l'activitat d'aquestes MAPKs, garantint una inducció dels nivells de proteïna en resposta a CD40 flexible, ràpida i transitòria. Tot i així, a diferència de JNK, Erk es troba regulada tant a nivell de la forma fosforilada com en la forma total de la proteïna. Donat que per microarrays no s'observaven canvis d'expressió a nivell de transcrit de Erk, aquest increment en l'abundància de la proteïna total de Erk en resposta a l'activació per CD40, podria explicar-se per una modulació de l'estabilització de la proteïna induïda per CD40 més que per una activació transcripcional.

Erk1/2 juga un paper important en el control de la proliferació [412] promovent el creixement cel·lular i la supervivència. S'ha descrit que les quinases Erk1/2, són activades per fosforilació de MEK1/2 en resposta a l'estimulació per diferents mitògens com els factors de creixement PDGF i NGF (*Nerve growth factor*). Un cop activades, es transloquen al nucli per fosforilar i activar transcripcionalment diferents substrats com els factors de transcripció Elk1 i c-Myc, i proteïnes quinasa, com RSK (*ribosomal S6 kinase*). També s'ha descrit que l'activació primerenca dels factors de transcripció c-Fos i c-Jun en resposta a sèrum i factors de creixement té lloc per activació de la quinasa Erk [413] que es transloca al nucli per fosforilar i activar transcripcionalment una subfamília de factors de transcripció coneguts com factors de complexos ternaris (TCFs), que s'uneixen al promotor de Fos [414].

Comparat amb les cascades de MAPK que donen lloc a l'activació de p38 i JNK, existeix relativament poca informació pel que fa al paper de la cascada d'Erk en inflamació. Se sap que Erk regula el transport de mRNA de TNF- $\alpha$  del nucli al citoplasma, però no té efecte en la transcripció gènica ni en l'estabilització del mRNA [415], encara que es desconeix el substrat d'Erk que controla l'exportació nuclear del mRNA de TNF- $\alpha$ .

Els resultats d'aquest estudi mostren que, a diferència d'Erk i JNK, p38/MAPK es troba

en estat fosforilat en condicions basals en el cultiu primari de cèl·lules endotelials, indicant que la transducció de senyals per p38/MAPK es manté activa sense haver estimulat la via de CD40-CD40L. Donat que p38/MAPK es troba constitutivament activada en aquestes cèl·lules, no hem pogut determinar cap efecte en l'activitat de la via d'aquesta MAPK en resposta a l'estimulació per CD40L.

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

El TLR-3 és un receptor per dsRNA viral involucrat en immunitat innata que pertany a la família de *Toll like receptors*. La unió de dsRNA a aquest receptor constitueix un sistema potent per detectar el material genètic dels virus de RNA i desencadenar una resposta immunoinflamatòria. La via de senyalització utilitzada per TLRs és similar a la del IL-1R. El domini citoplasmàtic dels TLRs presenta homologia amb el IL-1R, s'anomena Toll/IL-1R (TIR domain) [416] i és responsable d'iniciar la cascada de senyalització a través de la proteïna adaptadora *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). Aquesta proteïna adaptadora actua activant proteïnes quinasa IRAKs (*Interleukin-1 receptor-associated kinases*) que s'associen amb el factor TRAF-6 i activen la proteïna quinasa TAK-1 (*transforming growth factor beta-activated kinase-1*), la qual, a través de la fosforilació de I $\kappa$ B $\alpha$ , causa l'activació del factor de transcripció NF $\kappa$ B que regula la transcripció de gens involucrats en inflamació, diferenciació cel·lular i activitat antimicrobiana i antiviral (Figura 108).

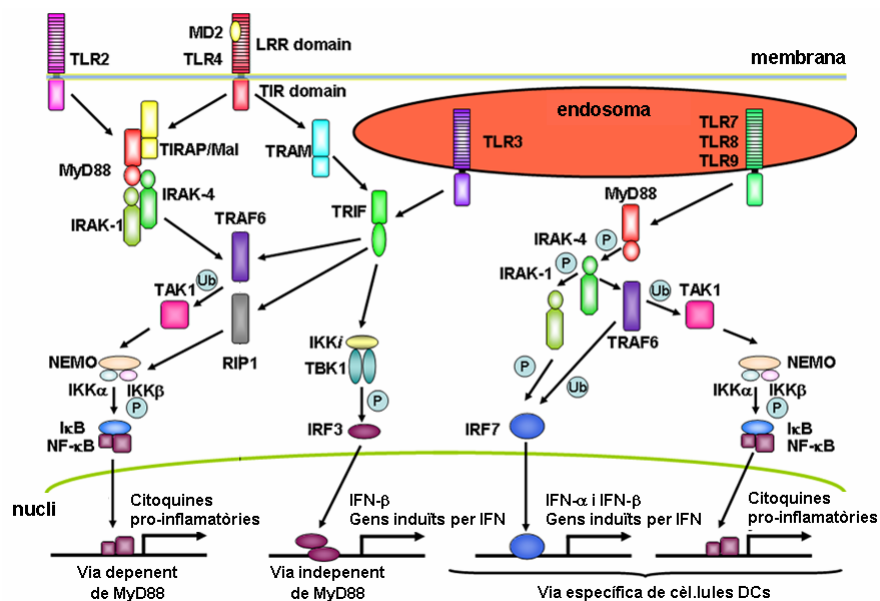


Figura 108. Via de senyalització per TLRs. La via dependent de MyD88, compartida per tots els membres de la família de TLRs excepte TLR-3, dona lloc a la inducció de citoquines proinflamatòries. TLR-3 i TLR-4, presenten una via dependent de TRIF (*adaptor-inducing IFN-β*) que causa la inducció de IFN.

En el cas de TLR-3 i TLR-4, existeix una via alternativa de senyalització independent de MyD88, que implica IRF-3 i desencadena una resposta antiviral principalment a través de la producció de IFNs tipus I [417].

A més de les cèl·lules del sistema immune, les cèl·lules endotelials de la vasculatura també són dianes importants de la infecció vírica. Aquestes cèl·lules, altament susceptibles a una infecció vírica sistèmica, en resposta a la infecció produeixen citoquines i quimioquines implicades en el reclutament de cèl·lules del sistema immune per desencadenar una resposta immune adquirida adequada per a l'eliminació del patogen.

TLR-3 està present en cèl·lules endotelials en condicions basals. L'expressió de TLR-3 en aquestes cèl·lules està induïda, no només després del tractament amb l'anàleg de dsRNA poly (I:C), sinó també per altres estímuls proinflamatoris com IFN- $\alpha/\beta$  [295]. L'estimulació de la via TLR-3 per dsRNA, a més d'induir la síntesi de les citoquines immunoreguladores IFN- $\beta$  i IFN- $\alpha$ , indueix l'activació del factor de transcripció NF $\kappa$ B, el qual juga un paper important en la senyalització de TLR, donant lloc a la producció d'altres citoquines inflamatòries com IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha/\beta$  (Figura 109).

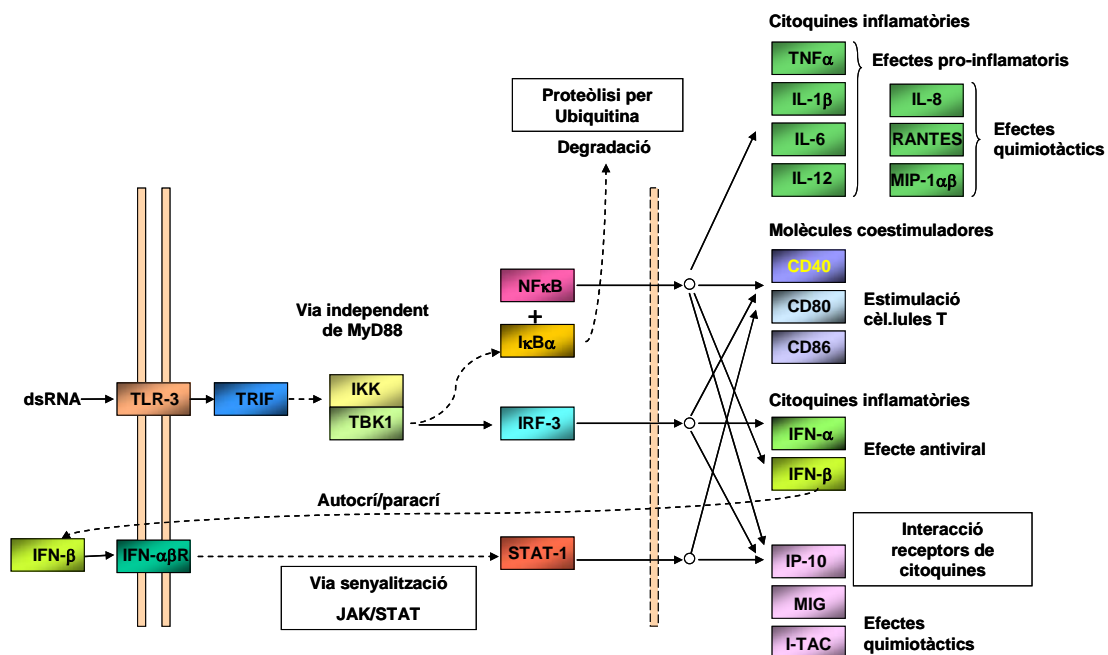


Figura 109. Via de senyalització per TLR-3.

L'anàlisi per GSEA mostrava que CD40 podia estar activant alguns mecanismes d'alerta en cèl·lules endotelials estimulades amb Jurkat D1.1. De manera similar l'anàlisi d'anotació funcional mostrava l'activació de via de senyalització de TLR en aquestes cèl·lules. L'estudi d'expressió gènica per microarrays indicava que el transcrit de TLR-3 estava induït per activació de la via de senyalització de CD40, suggerint que la interacció



CD40-CD40L en aquestes cèl·lules activava la resposta immune innata a dsRNA induint l'expressió de gens sensors d'infecció viral. A més de la regulació transcripcional de TLR-3 per CD40, el factor de transcripció IRF7, un regulador *downstream* de la resposta immune antiviral també estava induït després de la interacció CD40-CD40L.

CD40 és una de les molècules efectores de la via de senyalització de TLR-3 a través de l'activació del sistema NFκB (Figura 109). Tot i així, prèviament no s'havia associat CD40 amb la regulació transcripcional de l'expressió de TLR-3. A nivell de transcrit, la demostració de la inducció de l'expressió de TLR-3 en aquestes cèl·lules activades via CD40L dóna suport a la idea de l'important paper que jugaria el TLR-3 expressat en cèl·lules endotelials en condicions proinflamatòries. Les cèl·lules de l'endoteli vascular que constitueixen una barrera física per a les infeccions, tindrien un paper molt important en la resposta immune innata. El receptor TLR-3, expressat en aquestes cèl·lules, regularia la resposta immune a virus invasors, productes virals o altres senyals endògens potencialment perillosos en resposta a l'activació per CD40.

Per tant, segons aquest estudi, CD40 i TLR-3 es podrien estar regulant mútuament en un circuit de retroalimentació positiva, en el que CD40 causaria un increment en el nombre de receptors TLR-3 de la superfície cel·lular, fent la cèl·lula endotelial més sensible per respondre a estímuls específics d'aquesta via de senyalització.

A través de l'activació de TLR-3, el dsRNA viral producte de la replicació vírica indueix l'expressió de la quimioquina proinflamatòria IL-8 participant, juntament amb altres citoquines, en l'atracció dels leucòcits cap al lloc d'inflamació. TLR-3 també indueix la producció i alliberament de IFN de tipus I, entre ells IFN-β, que representa la primera línia de defensa contra patògens virals i és crucial per impedir la seva replicació [418]. En aquest estudi, a més de la regulació transcripcional de TLR-3, es volia confirmar el paper de CD40 en la resposta immune innata desencadenada per TLR-3 en cèl·lules endotelials en resposta a infecció viral. Es va observar que en absència del receptor CD40, tenia lloc una menor resposta cel·lular a l'activació per un anàleg sintètic de dsRNA, la qual cosa es traduïa en una disminució de l'expressió de IL-8 i de la síntesi de IFN-β per aquestes cèl·lules.

Dels resultats d'aquest estudi es desprèn que l'activació endotelial via CD40-CD40L per interacció amb Jurkat D1.1, desencadena un increment de la resposta immune innata a virus de RNA. La inducció de l'expressió del transcrit de TLR-3 podria contribuir a una resposta antiviral dependent de CD40 en aquestes cèl·lules. Aquesta resposta antiviral mediada per CD40 proporcionaria un enllaç directe entre immunitat adaptativa desencadenada per interacció entre la cèl·lula endotelial i el limfòcit T, i immunitat innata.

La majoria de TLRs que s'uneixen a components virals com TLR-3, indueixen la síntesi de IFN bloquejant la replicació vírica dins les cèl·lules infectades i estimulen la producció de citokines desencadenant la defensa immune innata, que representa una resposta immediata contra l'organisme invasor. Tot i així, s'ha descrit que el paper dels TLRs va més enllà del reconeixement d'organismes patògens. Els TLRs participen en la resposta immune adaptativa desencadenant diverses senyals secundàries necessàries per tal que tingui lloc la immunitat humoral, amb la producció d'anticossos, i la immunitat mediada per cèl·lules, amb producció de limfòcits T citotòxics i citokines addicionals. La secreció de IFN de tipus I, IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-12 induïda per TLR dirigeix la maduració de cèl·lules que participen en la resposta immune adaptativa [419]. Per exemple, IFN de tipus I incrementa la resposta antígen-específica de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, i indueix l'expressió de molècules coestimuladores en cèl·lules dendrítiques [420]. Els IFN de tipus I juntament amb IL-12, incrementen la citotoxicitat mediada per cèl·lules NK i, juntament amb IL-6, dirigeixen la diferenciació de cèl·lules B i secreció d'immunoglobulines [94, 421, 422].

TLR-3 podria actuar com a una molècula sensora que faria d'enllaç entre els senyals inflamatoris i el posterior reclutament de cèl·lules inflamatòries cap al teixit diana modulant la resposta immune innata i la resposta immune específica d'antigen. Aquest fet indica el possible paper de TLR-3 en la patogènesi de malalties inflamatòries cròniques com l'artritis reumatoide, psoriasi, espondilitis anquilosant, malaltia de Crohn, colitis ulcerativa i l'aterosclerosi [423].

### Contribució de la isoforma de sCD40L a l'activació endotelial

L'objectiu principal d'aquest estudi era caracteritzar a nivell molecular la contribució del sistema CD40-CD40L en l'activació de l'endoteli i l'adquisició d'un estat procoagulant i proinflamatori. Els resultats mostrats fins ara en aquest estudi s'han obtingut activant les cèl·lules endotelials amb el CD40L ancorat a la membrana de les Jurkat D1.1, un clon de limfòcits T que sobreexpressa el lligand fisiològic del receptor CD40. A més de la forma transmembrana de CD40L, es creu que la principal font de CD40L soluble plasmàtic prové de les plaquetes activades i també seria capaç d'unir-se a CD40 de la superfície de cèl·lula endotelial i desencadenar respostes biològiques. S'ha establert que el sCD40L present en el sistema circulatori pot representar un biomarcador de processos inflamatoris com l'infart de miocardi i ACS, tot i així, es desconeix la seva funció biològica.

Per tal de determinar la funció biològica de la isoforma soluble de CD40L i si aquesta difereix de la que presenta la isoforma de CD40L ancorada a membrana de limfòcits T, es va

comparar el perfil global d'expressió gènica resultant de la interacció de la isoforma soluble sCD40L i la isoforma unida a membrana amb el receptor CD40 en cèl·lules endotelials.

Pel que fa al nombre total de gens regulats transcripcionalment, resultats preliminars a 4 hores d'estimulació, indiquen que l'activació de les cèl·lules endotelials per sCD40L és menor que la induïda per CD40L ancorat a la membrana de limfòcits T (Figura 110).

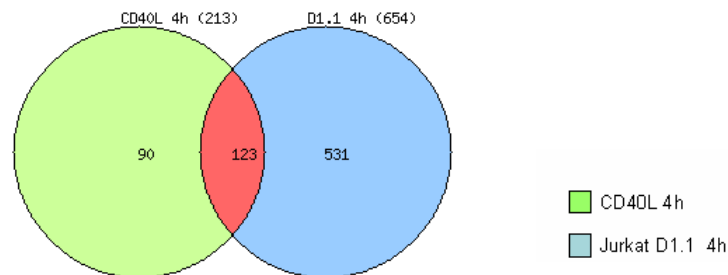


Figura 110. Diagrama de Venn mostrant la regulació gènica induïda per sCD40L i CD40L ancorat a la membrana de limfòcits T a 4 hores d'estimulació en cèl·lules endotelials, amb un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ .

El sCD40L regula l'expressió d'un total de 213 gens a 4 hores d'estimulació, respecte als 654 gens regulats per CD40L ancorat a membrana, fent servir un criteri de tall de  $|\text{fold change}| \geq 1.2$  i B rank  $\geq 95\%$ . Les dues isoformes de CD40L presentarien diferent capacitat per interaccionar amb el receptor CD40, sent molt més potent la unió de CD40L ancorat a la membrana de limfòcits T activats. La unió de CD40 endotelial a sCD40L desencadenaria l'activació de vies de senyalització similars a les de CD40L ancorat a membrana. Entre els gens conjuntament regulats per les dues isoformes de CD40L trobem l'Apelin, les molècules d'adhesió E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1, gens involucrats en apoptosi BIRC-3 i CASP-1, la quimioquina MCP-1, CD69, i els factors de transcripció STAT-1 i Rel B.

Recentment s'ha descrit que la força i persistència de la senyalització per CD40 determina el tipus de resposta immune induïda en cèl·lules dendrítiques i macròfags [424] [425]. Aquesta diferent capacitat d'interacció amb el receptor CD40, podria traduir-se en l'activació de vies de transducció de senyals i funcions biològiques alternatives entre el sCD40L i el CD40L unit a membrana. D'acord amb aquesta hipòtesi, entre els gens regulats de manera específica per CD40L de membrana es troben: el TLR-3, les citokines i quimioquines proinflamatòries IL8, IL1A, CXCL1, CXCL3, el factor de creixement CSF2, els factors de transcripció Fos, FosB, JunB, CEBPB i CEBPD, gens relacionats amb la regulació del cicle cel·lular com BCL3 i CCNG1, i gens involucrats en coagulació com la trombomodulina i la SERPIND1.

### Inhibició de CD40 *in vivo* mitjançant RNAi i aplicació per a la inducció de tolerància en un model de trasplantament renal en rata

Una de les potencials aplicacions de la teràpia gènica pel tractament de les malalties renals és la prevenció del rebuig en el trasplantament renal. En aquest cas, la possibilitat de poder tractar l'òrgan donant *ex vivo* resulta avantatjós per tal de poder minimitzar els efectes secundaris provocats per una administració sistèmica del material terapèutic. A més, aquest procés és més econòmic, precís i eficaç, ja que es requereix una quantitat més petita d'aquest material que anirà dirigida exclusivament al ronyó, permetent assolir una concentració local més gran i aconseguir l'efecte terapèutic desitjat.

El ronyó es un òrgan amb característiques òptimes per dur a terme estratègies de transferència gènica amb finalitat terapèutica. Tradicionalment s'han utilitzat tres rutes principals per transferir material genètic al ronyó. La introducció 1) a través de l'artèria renal, 2) per via retrògrada a partir de l'urèter, o 3) per injecció parenquimal. Aquestes rutes poden utilitzar-se individualment o en combinació, de manera *ex vivo* i *in vivo*. S'han descrit diferents assaigs preclínic de transferència gènica a ronyó en models experimentals utilitzant diferents vectors recombinants vírics basats en els retrovirus [426] i adenovirus [427], així com vectors no vírics: liposomes [428] i policones, com la polietilenimina [429]. S'ha observat que els vectors més eficients són els adenovírics i els no vírics, a causa del baix índex mitòtic del ronyó. Utilitzant aquests sistemes s'ha detectat l'expressió dels diferents gens transferits (gens marcadors com la  $\beta$ -galactosidasa o citoquines com TGF $\beta$ 1 o PDGF) en les cèl·lules glomerulars i tubulars del ronyó tractat.

Les estratègies de teràpia gènica per bloquejar el rebuig en trasplantament renal es troben en les etapes inicials d'experimentació en models animals. Aquestes estratègies es basen fonamentalment en el bloqueig de l'activació o en la destrucció de les cèl·lules T de l'individu receptor, a fi de combatre el rebuig de l'al·loempelt i induir la seva tolerància immunològica.

Fa uns anys es va generar gran interès davant la possibilitat de bloquejar la via coestimuladora d'activació de les cèl·lules T mitjançant **anticossos neutralitzants**, tal com s'ha detallat anteriorment. Una via alternativa que es va assajar amb èxit va ser la transducció hepàtica del cDNA que codificava per la molècula híbrida CTLA4-Ig, a partir d'adenovirus recombinants. Aquesta estratègia de teràpia gènica va protegir al fetge trasplantat del rebuig immunològic [430]. La immunoteràpia amb anticossos monoclonals humanitzats i neutralitzants pot representar un avenç important en el tractament del rebuig en el

trasplantament d'òrgans sòlids. Tot i així, existeixen limitacions i desavantatges derivats de l'ús sistèmic d'anticossos per al bloqueig temporal de molècules de la superfície cel·lular que dificulten la seva potencial aplicació clínica. Alguns d'aquests efectes són la inducció, per part del individu receptor, de respostes immunològiques contra els anticossos terapèutics administrats (encara que els anticossos s'hagin humanitzat), i la manifestació d'efectes secundaris com problemes trombòtics.

Una alternativa a la immunoteràpia per assolir tolerància de l'empelt al·logènic, és la utilització d'**oligonucleòtids antisentit** per bloquejar l'expressió gènica a nivell transcripcional, abans que es sintetitzin les molècules efectores. Estudis farmacocinètics de distribució suggerien que òrgans com el fetge, el pulmó i el ronyó podien ser bones dianes per una tecnologia antisentit eficaç, ja que un elevat percentatge d'oligonucleòtids administrats per qualsevol de les vies habituals semblava que s'acumulava en aquests teixits [431]. Existeixen diferents estudis que han utilitzat la tecnologia antisentit pel tractament de malalties renals, com la glomerulonefritis, mitjançant inhibició de TGF- $\beta$  [432, 433]. Altres grups han aplicat directament oligonucleòtids dirigits contra la síntesis de l'òxid nítric (iNOS) pel tractament de la isquèmia renal [434] o han administrat oligonucleòtids antisentit contra ICAM-1 conjugats a liposomes, aconseguint l'atenuació del dany causat per isquèmia-reperfusió [435].

En quant a l'ús de la tecnologia de **siRNA** pel tractament de malalties renals, el nombre d'estudis és menor que en el cas dels oligonucleòtids antisentit. Recentment s'ha descrit la transferència de siRNA en ronyó mitjançant la injecció directa per l'artèria renal de siRNA sintètics seguit d'electroporació. La transfecció d'un siRNA dirigit contra TGF- $\beta$ 1 inhibia significativament l'expressió d'aquest gen principalment en cèl·lules glomerulars mesangials, tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna, causant una reducció en l'expansió de la matriu extracel·lular i, per tant, una millora de la progressió de la glomerulonefritis en aquest model experimental. El mateix resultat s'obtenia en utilitzar aquest siRNA expressat en forma de shRNA a partir d'un vector tant *in vitro* com *in vivo* [436].

Estudis recents demostren que la teràpia basada en siRNA pot promoure la supervivència del ronyó trasplantat evitant el rebuig causat pel dany per isquèmia-reperfusió. En dos d'aquests estudis, un shRNA dirigit contra Fas i Caspasa-8 administrat a través de la vena cava inferior [437] o un siRNA dirigit contra la proteïna 3 del Complement o Caspasa-3 administrat per injecció hidrodinàmica [438] han mostrat ser efectius protegint el ronyó i disminuint el dany tubular causat per isquèmia.

Encara que els siRNAs són relativament estables en cultiu cel·lular, quan han

d'utilitzar-se *in vivo* es requereix que tinguin una major estabilitat. Amb aquest objectiu, alguns estudis han utilitzat siRNAs modificats químicament per millorar les seves propietats farmacocinètiques. A causa que els siRNAs tenen una vida mitja en sang molt baixa, aquests han de ser químicament modificats per fer-los resistents a degradació per RNAses del sèrum, sense causar una disminució significativa de la seva activitat [439]. Aquestes modificacions poden millorar les propietats farmacocinètiques dels siRNAs *in vivo* impeding la seva unió a altres components sanguinis i fent que incrementi així el temps de circulació d'aquests siRNAs en sang. Finalment, aquestes modificacions químiques poden ajudar a dirigir siRNAs a certs teixits i cèl·lules, i certs conjugats poden millorar la captació d'aquests siRNA per part de determinats tipus cel·lulars. L'encapsidació de siRNAs en complexos lipídics i la unió d'aquests a pèptids fusogènics, anticossos o a lligands de receptors de superfície cel·lular permeten una millora en aquest sentit.

La interacció CD40-CD40L juga un paper clau en el desenvolupament de processos immunoinflamatoris com malalties autoimmunes, aterosclerosi i rebuig en trasplantament. Amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia del silenciament gènic de CD40 mitjançant RNAi per prevenir el rebuig en trasplantament s'ha fet servir un model experimental de trasplantament renal al·logènic en rates. La finalitat de l'aplicació d'aquest model *in vivo* és silenciar temporalment l'expressió del receptor de CD40 en cèl·lules renals i bloquejar la interacció CD40-CD40L essencial per a la inducció del procés immunoinflamatori que causa el rebuig en el ronyó trasplantat.

Per tal d'establir l'efecte del bloqueig del senyal coestimulador CD40-CD40L en el procés de rebuig en aquest model experimental, calia obtenir un siRNA eficient dirigit contra CD40 de rata. Fent servir un sistema de cribatge *in vitro* basat en el gen de la luciferasa, s'han obtingut 3 siRNAs anti-CD40 de rata amb una eficiència silenciadora comparable a la del siRNA humà. El siRNA més eficient, que causava una inhibició de l'expressió de CD40 del 80%, va ser l'escollit per portar a terme els assaigs *in vivo*.

Utilitzant diferents sistemes de transferència gènica en el ronyó a trasplantar, es va optimitzar la incorporació d'aquest material genètic a ronyó causant la mínima toxicitat a l'òrgan. Es van fer servir tres sistemes de transferència gènica: el sistema de bany d'òrgans, la perfusió *in situ*, i l'electrotransferència, essent aquest últim mètode el que va donar millors resultats.

Darrerament l'electrotransferència de DNA ha estat un dels mètodes més utilitzats en teràpia gènica *in vivo*. Els avantatges de l'electrotransferència *in vivo* comparat amb altres tècniques és que s'evita l'ús de vectors virals i els problemes de bioseguretat i els derivats de

la generació d'anticossos contra el virus. A més, la transferència gènica pot dirigir-se a una determinada àrea del teixit, la qual ve delimitada per la posició dels elèctrodes. L'electroporació ha estat emprada en experiments de transferència gènica *in vivo* des de 1991. Es tracta d'un mètode físic de transferència gènica que consisteix en l'aplicació local d'un o més polsos elèctrics després de la injecció de DNA. Tot i que aquesta tècnica pot ser utilitzada en diferents teixits animals, la majoria d'estudis s'han centrat en l'electrotransferència de DNA plasmídic a múscul esquelètic i les seves possibles aplicacions en estudis funcionals i de teràpia gènica [440-442]. La majoria d'estudis s'han realitzat aplicant polsos elèctrics de curta durada (100-300 ms) a 100-400 V, on el producte gènic o transgen era detectable en sèrum com a màxim després de 9 mesos [440]. S'han publicat diferents estudis demostrant l'eficàcia i reproductibilitat de l'electroporació *in vivo* en diferents teixits incloent tumors [443], pell [444], fetge [445], testicle [446], cor [447], ronyó, retina, còrnia i cervell. A més, en els últims anys s'han descrit diferents protocols d'electrotransferència que han aconseguit un increment en l'eficiència d'incorporació i el nivell d'expressió gènica, així com una minimització del dany tissular. El dany tissular observat en aplicar l'electrotransferència en l'òrgan es deu principalment al procediment d'injecció, més que a l'aplicació del camp elèctric, i desapareix poques setmanes després del tractament.

En aquest estudi es va escollir la tècnica d'electrotransferència com a una alternativa a la perfusió *ex vivo* i *in vivo*, ja que es va veure que aquests dos sistemes causaven toxicitat i el ronyó presentava dany tissular i cert grau de necrosi tubular. En canvi, l'electrotransferència del ronyó *in vivo* va permetre assolir una elevada eficiència d'incorporació d'aquest material genètic a l'òrgan sense causar dany a les estructures renals.

Es va fer servir l'electrotransferència del siRNA anti-CD40 com a una aproximació de teràpia gènica per tal de millorar la supervivència de l'empelt i prevenir o reduir la incidència de rebuig agut en al·lotrasplantament. En aquest model experimental de rebuig, el trasplantament renal al·logènic es feia utilitzant rates Wistar-Agouti binefrectomitzaades com a receptores de ronyons electroporats provinents de rates Brown-Norway.

Resultats preliminars fent servir aquest sistema de transferència en el model experimental de trasplantament renal, indiquen una major supervivència dels animals trasplantats amb els ronyons tractats amb siRNA anti-CD40 en comparació amb els animals tractats amb siRNA-control. L'anàlisi per qRT-PCR dels nivells del mRNA de CD40, mostra que en tractar els animals amb siRNA té lloc una disminució significativa de l'expressió de CD40. L'increment en la taxa de supervivència i la reducció en els nivells de transcrit de

CD40 és més pronunciada quan el tractament amb siRNA s'associa amb l'administració de rapamicina a dosis baixes, on s'assoleixen nivells d'expressió similars als observats en el cas d'un trasplantament singènic.

Aquests resultats encara que preliminars, demostren l'efectivitat del siRNA anti-CD40 i indicarien que la teràpia gènica local amb siRNA anti-CD40 seria efectiva bloquejant el senyal coestimulador *in vivo*. La teràpia anti-CD40 pretransplantament disminuiria l'aparició del rebuig agut allargant el temps de supervivència dels animals tractats, sent encara més efectiva en combinació amb l'administració de rapamicina. Aquests resultats encoratgen la potencial aplicabilitat del bloqueig de la via amb siRNA anti-CD40 en clínica com a una nova forma de tractament per prevenir el procés immunoinflamatori de rebuig en trasplantament renal.

### Perspectives futures

El silenciament gènica potent i específic del receptor CD40 obtingut mitjançant siRNA en cèl·lules endotelials, juntament amb el potencial i informació dels microarrays per la determinació i comparació dels perfils globals d'expressió gènica, ha permès determinar noves dianes implicades en la resposta molecular a la senyalització per CD40 en l'activació endotelial. Aquest treball es el primer estudi global de la regulació gènica en resposta a l'activació per CD40 en cèl·lules endotelials. Els resultats d'aquest estudi confirmen el que ja se sabia en relació al paper de CD40 en l'activació endotelial en inflamació, la qual cosa implica, al mateix temps, validació dels nous resultats derivats de l'estudi.

A més de l'aplicació directa de siRNA anti-CD40 en teràpia, els resultats d'aquesta anàlisi global del transcriptoma plantegen noves vies d'estudi com per exemple, l'anàlisi de gens desconeguts i les seves vies de senyalització regulades per CD40 en cèl·lules endotelials.

Una altra potencial aplicació del nou coneixement generat en aquest estudi global d'expressió gènica seria el disseny racional d'estratègies terapèutiques o farmacològiques. La determinació de noves dianes específiques de la via de CD40 en endoteli podria aplicar-se al desenvolupament de nous agents antiinflamatoris segurs i efectius que interfereixin amb elements específics de la via CD40 exclusivament en aquest tipus cel·lular rellevant per a determinades patologies.

Per altra banda, els resultats d'aquest treball poden donar peu a l'estudi del potencial valor diagnòstic de noves molècules implicades en l'activació de la resposta inflamatòria i regulades per la interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials. Aquesta aproximació podria ser d'utilitat per al diagnòstic de malalties amb un component inflamatori important com les



malalties vasculars. Es podrien avaluar nous gens activats via CD40-CD40L com a biomarcadors de diagnòstic i/o pronòstic de malalties immunoinflamatòries, per exemple, correlacionant alteracions moleculars i bioquímiques identificades en les proteïnes codificades pels gens candidats amb canvis histopatològics en pacients amb la malaltia. En el cas de l'Apelin, la contribució de la via de senyalització de CD40 a la regulació dels nivells d'aquesta proteïna en cèl·lules endotelials del sistema vascular, podria ser rellevant per futures accions terapèutiques basades en la funció d'aquest pèptid en processos immunoinflamatoris.

Finalment, la possibilitat de realitzar una metaanàlisi global comparant bioinformàticament les dades d'aquest estudi amb altres estudis de microarrays on hi ha els mateixos gens regulats, de la mateixa via o teixit, podria aportar nova informació i permetria relacionar els gens regulats per CD40 amb altres processos o patologies. Per tant, la informació derivada d'aquest treball aporta noves possibles línies de recerca per a avançar en el coneixement de la biologia bàsica i rellevància biomèdica de la via de senyalització de CD40.