



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular**

Divisió de Ciències Experimentals i
Matemàtiques
Facultat de Biologia

**Programa de Doctorat en Bioquímica i
Biologia Molecular. Bienni 1998-2000**

**Clonaje y caracterización de una nueva forma soluble
de TNFR2 producida por splicing alternativo. Estudio
de su implicación en patologías asociadas a inflamación**

**Memoria presentada per
Begoña Láinez Más
per optar al grau de Doctor en Biologia**

Director de Tesi: Dr. José Manuel Fernández Real

Tutor: Dr. Francesc Lopez Soriano

Octubre 2004

Agradecimientos

Esta tesis se ha podido realizar gracias a la colaboración de muchas personas. Quisiera agradecer a todas ellas su participación

Quiero agradecer especialmente al Dr Pablo Engel por haberme acogido en su laboratorio durante el desarrollo de esta tesis, por todo lo que he aprendido allí y por su apoyo y ayuda en los momentos difíciles.

A mis queridos compañeros, amigos de laboratorio, Isa, Anna, Vicky, Núria, Sofia, Marga, Xavi, Lluís, Juani, Sandra, Ifi, Miriam, Vanessa; Raquel, Joan, Albert, Montse; Contxi M.; Irene... Al grupo de Neurofisiología de Medicina, Miguel, Xavi, Azu, Núria, David, Neus, Elena, Gracias por toda vuestra ayuda, por los buenos momentos y vuestra amistad. Me siento muy afortunada de haberos conocido.

Al servicio de Reumatología del Hospital Clínic, en especial a Dr Juan Cañete y a Carolina. Gracias por vuestra ayuda, ha sido un placer trabajar con vosotros.

Al Dr Vendrell y su grupo, en especial Mati y Antonio, gracias por el trabajo de RT-PCR con el Light Cyclor descrito en esta tesis.

A la Unidad de Diabetes, Endocrinología y Nutrición del Hospital Josep Trueta de Girona. Al Dr Ricart y a todo su equipo sin cuyo trabajo no hubiera sido posible esta tesis. Montse y Abel gracias por vuestra ayuda y amistad.

A mi director de tesis, José Manuel Fernández Real, gracias por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo y por toda la ayuda prestada en la realización del mismo. Muchísimas gracias

A mi familia (mis dos familias) gracias por todo.

A Enric

A mis padres

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína de activación 1
APRIL	Ligando inductor de proliferación
BlyS	Estimulador de linfocitos B
BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	DNA copia
DD	Dominio de muerte
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRC	Dominio rico en cisteína
DS-sTNFR2	Proteína soluble de TNFR2 producida por splicing alternativo
DS-sTNFR2(Δ 7,8)	cDNA de TNFR2 al que le faltan los exones 7 y 8
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESE	Elemento exónico potenciador del splicing
FADD	Proteína con dominio de muerte asociada a FAS
FASL	Ligando de FAS
FCS	suero de ternero fetal
GM-CSF	Factor estimulante de macrófagos y granulocitos
HRPO	peroxidasa de rábano
IL	Interleucina
LT- β	linfotóxina-beta
NCEP	Programa educacional nacional sobre colesterol
NF κ B	Factor nuclear estimulador κ de células B
PBS	Tampón salino de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PLAD	Dominio de asociación previa a ligando
RANKL	Ligando de receptor activador de NF κ B
RNA	ácido ribonucleico
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SSE	Elemento exónico silenciador del splicing
TACE	Enzima convertidor del TNF
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
TNFRSF	Superfamilia de los receptores de TNF
TNFSF	Superfamilia del TNF
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada al TNFR1
TRAF	Factor asociado al TNFR-1
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TWEAK	Inductor débil de apoptosis similar al TNF
valor M	ritmo de asimilación global de la glucosa

INTRODUCCIÓN

1.1.- SUPERFAMILIA DEL “TUMOR NECROSIS FACTOR”(TNF). LIGANDOS.....	6
1.2.- RECEPTORES DE LA SUPERFAMILIA DEL TNF	9
1.3.- EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF-α).....	11
1.4.- RECEPTORES DEL TNF-α	13
1.4.1.- Estructura génica y proteica del TNFR2	14
1.5.- DIFERENCIAS ENTRE LOS RECEPTORES DEL TNF-α	16
1.5.1. Interacción con el ligando.....	16
1.5.2. Señalización.....	17
1.5.3.- Función de los receptores del TNF- α	19
1.6.- IMPLICACIÓN DEL EJE TNF-α/TNFR EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES	20
1.7.- RECEPTORES SOLUBLES.....	22
1.8.- EL <i>SHEDDING</i>.....	23
1.9.- EL PROCESO DE <i>SPLICING</i>.	24
1.9.1.- Mecanismos de Splicing.....	24
1.9.2.- Splicing alternativo	27
1.9.2.1 Tipos de splicing alternativo.....	28
1.9.2.2.- Patrones de splicing	29
1.9.2.3.- Factores reguladores del splicing alternativo	30
1.9.2.4.-Miembros de la superfamilia de los receptores de TNF que sufren splicing alternativo.....	35
1.10.- IMPLICACIÓN DEL TNF-α EN PROCESOS INFLAMATORIOS.....	38
OBJETIVOS	44
MATERIAL Y MÉTODOS	48
CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL DS-sTNFR2	50
3.1.- Células.....	50
3.2.- Recolección de muestra.....	50
3.3.- Separación de las células mononucleares de sangre periférica.....	50

3.4.- Clonaje del cDNA del TNFR2 nativo y del DS-sTNFR2(Δ 7,8).....	51
3.5.- Secuenciación automática	52
3.6.- Purificación de los productos de secuenciación	53
3.7.- Comparación de las secuencias	54
3.8.- Determinación cualitativa de DS-sTNFR2 mediante RT-PCR.....	54
3.9.- Expresión del DS-sTNFR2 (Δ 7,8).....	55
3.10.- Detección de TNFR2 soluble en el sobrenadante de células en cultivo.....	57
3.11.- Inmunoprecipitación e inmunotransferencia de la Isoforma DS-sTNFR2.....	57
3.12.- Ensayo de citotoxicidad del TNF- α	58
3.13.- Producción de un anticuerpo monoclonal contra DS-sTNFR2.....	59
3.14.- Detección del TNFR2 soluble mediante ELISA cuantitativo	61
3.15.- Detección de TNFR2 soluble generado por splicing alternativo, mediante ELISA cuantitativo	61
3.16.- Sujetos.....	62
3.17.- Análisis estadístico.....	63
ESTUDIO DE DS-sTNFR2 Y RESISTENCIA A LA INSULINA.....	64
3.18.- Sujetos del Estudio de DS-sTNFR2 y resistencia a la insulina.....	64
3.19.- Medidas antropométricas y clínicas	65
3.20.- Estudio de la sensibilidad a la insulina	65
3.21.- Métodos analíticos.....	66
3.22.- Métodos estadísticos	67
ESTUDIO DEL RECEPTOR SOLUBLE PRODUCIDO POR SPLICING ALTERNATIVO DS-sTNFR2, EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	68
3.23. Estudio de las regiones limítrofes intrón-exón del TNFR2 implicadas en el splicing alternativo de los exones 7 y 8.....	68
3.24.- Determinación del polimorfismo 196M/R mediante restricción enzimática.	70
ESTUDIO DEL SIGNIFICADO CLÍNICO DE DS-sTNFR2 EN ARTRITIS REUMATOIDE.....	71
3.25.- Pacientes.....	71
3.26.- Definiciones de los parámetros utilizados en la artritis reumatoide.....	72

RESULTADOS	77
4.1.- CLONAJE DEL CDNA DE DS-sTNFR2 (Δ7,8)	79
4.2.- DS-sTNFR2(Δ7,8) CODIFICA UN RECEPTOR SOLUBLE	81
4.3.- DETECCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE DS-sTNFR2 (Δ7,8) EN CÉLULAS TRANSFECTADAS	83
4.4.- DETECCIÓN DE DS-sTNFR2(Δ7,8) MEDIANTE RT-PCR CUALITATIVA.	86
4.5.- DS-sTNFR2(Δ7,8) BLOQUEA LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL TNF-α	89
4.6.- DESARROLLO DE UN ELISA QUE CUANTIFICA EL RECEPTOR TNFR2 SOLUBLE PRODUCIDO POR SPLICING ALTERNATIVO	91
4.7.- DETECCIÓN DE TNFR2 SOLUBLE GENERADO POR SPLICING ALTERNATIVO EN SUERO DE SUJETOS SANOS CONTROL, PACIENTES CON SEPSIS Y PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	93
4.8.- EL RECEPTOR SOLUBLE TNFR2 PRODUCIDO POR SPLICING ALTERNATIVO ESTÁ ASOCIADO CON LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA Y CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO	95
4.8.1.- Población mediterránea	95
4.8.2.- Muestra del noroeste de España	100
4.8.3.- Población del centro de Europa.....	103
4.9.- ESTUDIO DEL RECEPTOR SOLUBLE PRODUCIDO POR SPLICING ALTERNATIVO DS-sTNFR2 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	105
4.9.1.- Concentraciones de DS-sTNFR2 y progresión radiológica después de 1 año de seguimiento	105
4.9.2.- Concentración de DS-sTNFR2 y respuesta terapéutica al tratamiento con fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad (FAME).	108
4.9.3.- Concentraciones de DS-sTNFR2 y respuesta terapéutica a infliximab.	111
4.10.- ESTUDIO GENÉTICO DEL TNFR2 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	114
4.10.1.- Estudio de las regiones limitrofes intrón-exón del TNFR2 implicadas en el splicing alternativo de los exones 7 y 8.....	114
4.10.2.- Estudio de la secuencia extracelular próxima a membrana donde se produce el shedding.....	119
4.10.3.- Estudio de los polimorfismos del Exón 6 y del Intrón 7 de TNFR2 en artritis reumatoide	119

DISCUSIÓN	125
5.1.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA FORMA DE RECEPTOR SOLUBLE DE TNFR2 PRODUCIDA POR <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO.	127
5.2.- EL RECEPTOR SOLUBLE DS-sTNFR2 Y SU ASOCIACIÓN CON LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA	132
5.3.- ESTUDIO DEL RECEPTOR SOLUBLE PRODUCIDO POR <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO DS-sTNFR2 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	135
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	148

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Superfamilia del “Tumor necrosis factor”(TNF). Ligandos.

La superfamilia del TNF está formada por al menos 19 genes que codifican 20 proteínas de membrana de tipo II (es decir, el extremo aminoterminal es intracelular y el extremo carboxiterminal extracelular) (Tabla 1) (Figura 1).

Los ligandos de la superfamilia del TNF ejercen su acción principalmente, aunque no exclusivamente, dentro del sistema inmune y modulan tanto la inmunidad innata como la adaptativa (Locksley et al., 2001) (Tabla1).

Algunos de los ligandos, por ejemplo el TNF- α , promueven la respuesta inflamatoria a las infecciones microbianas. Otros, como el LT- β , CD40L, LIGHT, RANKL and BAFF, regulan aspectos específicos de la inmunidad humoral y celular, como la formación de órganos linfoides, la activación de las células dendríticas y la estimulación o la supervivencia de las células T o las células B. Sin embargo, otros ligandos como el FASL (también llamado APO1L o CD95) y APO2L/TRAIL, regulan la apoptosis inducida por activación de los linfocitos periféricos y median las actividades inductoras de apoptosis de las células asesinas naturales (células NK) y los linfocitos citotóxicos contra las células oncogénicamente transformadas o infectadas por virus. Además, varios miembros de esta familia (p.ej TNF- α , FasL y TWEAK) juegan un papel importante en la comunicación entre el sistema inmune y los tejidos somáticos. Varios miembros de la superfamilia del TNF también tienen un papel importante en la diferenciación y

desarrollo de tejidos y órganos, como piel (ED1) y huesos (ligando de RANK y TNF- α), fuera del sistema inmune (Mackay et al., 2002).

Cada miembro de la superfamilia del TNF une a al menos un receptor de la superfamilia de receptores de TNF. Algunos de los ligandos unen varios receptores. El ejemplo más complejo es el APO2L/TRAIL, que puede unirse a 5 receptores diferentes. Además, muchos de los ligandos comparten receptor con otros ligandos. Por ejemplo, LIGHT comparte LT- β R con LT- β , pero también se une selectivamente a otro receptor llamado HVEM. BAFF comparte los receptores BCMA y TAC1 con APRIL, pero se une selectivamente a BR3/BAFFR.

Los ligandos de la superfamilia del TNF se expresan en la célula como proteínas transmembrana de tipo 2 (excepto LT- α , que se secreta directamente como proteína soluble). La región extracelular carboxiterminal de la mayoría de estos ligandos se procesan proteolíticamente dando lugar a una proteína soluble que es liberada al espacio extracelular. Esta región es la que se une a su/s receptor/es. Es la región más homóloga entre los ligandos, teniendo hasta un 30% de similitud en la secuencia aminoacídica.

Estudios cristalográficos, confirman la organización en subunidades de homotrímeros de los ligandos como TNF- α (Eck and Sprang, 1989; Jones and Selby, 1989), TNF- β (Banner et al., 1993; Eck et al., 1992), APO2L/TRAIL (Hymowitz et al., 1999), CD40L (Karpusas et al., 1995) y RANKL.

TABLA 1. Miembros de la superfamilia del TNF y sus receptores			
Superfamilia del TNF		Superfamilia de los receptores del TNF	
Nombre sistemático	Nombre funcional	Nombre sistemático	Nombre funcional
TNFSF1	LT, LT α , TNF- β	TNFRSF1A	TNF-RI, CD120a, TNFR1, TNFR60
		TNFRSF1B	TNF-RII, CD120b, TNFR2, TNFR80
TNFSF2	TNF- α	TNFRSF1A	TNF-RI, CD120a, TNFR1, TNFR60
		TNFRSF1B	TNF-RII, CD120b, TNFR2, TNFR80
TNFSF3	LT β , TNF- γ , p33	TNFRSF3	LT β R, TNF-RIII, TNF-Rrp, TNF-gR, CD18
TNFSF4	OX40L, gp34, TXGP1	TNFRSF4	OX40, ACT35, TXGP1L
TNFSF5	CD40L, CD154, TRAP, gp39, IMD3, HIGM1	TNFRSF5	CD40, p50
TNFSF6	FasL, Apo 1L	TNFRSF6	Fas, Apo 1, CD95, APT1
		TNFRSF6B	DcR3
TNFSF7	CD27L, CD70	TNFRSF7	CD27, Tp55, S152
TNFSF8	CD30L	TNFRSF8	CD30, Ki-1, D1S166E
TNFSF9	4-1BBL, CD137L	TNFRSF9	4-1BB, CD137, ILA
TNFSF10	TRAIL, Apo 2L, TL2	TNFRSF10A	TRAIL-R1, DR4, Apo 2
		TNFRSF10B	TRAIL-R2, DR5, KILLER, TRICK -2
		TNFRSF10C	TRAIL-R3, DcR1, TRID, LIT
		TNFRSF10D	TRAIL-R4, DcR2, TRUNDD
TNFSF11	RANKL, OPGL, ODF	TNFRSF11A	RANK
		TNFRSF11B	OPG, OCIF, TR1
TNFSF12	TWEAK, DR3L, Apo 3L	TNFRSF12	TRAMP, DR3, WSL -1, LARD, TR3, Apo 3
TNFSF13	APRIL	TNFRSF13	TACI, BCMA
TNFSF13B	BAFF, BLyS, TALL -1, THANK		TACI, BCMA, BAFF -R
TNFSF14	LIGHT, LTg, HVEML	TNFRSF14	LIGHT-R, HVEM, HVEA, ATAR, TR2
TNFSF15	TL1, VEGI	TNFRSF15	
TNFSF16		TNFRSF16	NGF-R, p75NTR
TNFSF17		TNFRSF17	BCMA
TNFSF18	AITRL, TL6, GITRL	TNFRSF18	AITR, GITR
TNFSF19		TNFRSF19	TAJ, TROY

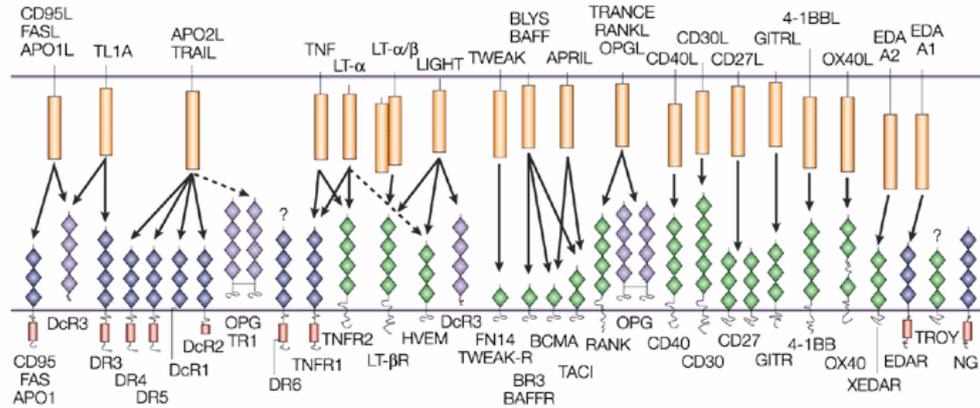
TNFRSF, superfamilia de los receptores de TNF; TNFSF, superfamilia del TNF

1.2.- Receptores de la Superfamilia del TNF

La superfamilia de los receptores de TNF está formada por un amplio número de proteínas de membrana, la mayoría de tipo I (es decir, el extremo aminoterminal es extracelular y el extremo carboxiterminal intracelular) (Tabla 1 y Figura 1).

Entre los miembros de la superfamilia del receptor del TNF la región aminoterminal extracelular es la más similar, llegando a tener hasta un 65% de identidad en la secuencia aminoacídica. La homología se encuentra principalmente en los dominios ricos en cisteínas (DRCs). El número de dominios ricos en cisteínas de un receptor está comprendido entre 1 y 6 aunque lo más frecuente es 3 ó 4.

Estudios cristalográficos muestran que la región extracelular presenta una forma elongada con los DRCs en tándem. Cada DRC tiene una estructura en helice- α que se estabiliza mediante 1-3 puentes disulfuro entre cisteínas internas. La unidad de señalización básica de la superfamilia de los receptores de TNF está formada por 3 receptores unidos mediante una molécula de ligando trimérico. Evidencias recientes indican, sin embargo, que TNFR1, TNFR2 y también FAS se pre-asocian en la membrana plasmática como homo-oligómeros, independientemente de ligando: la asociación ocurre a través de una región aminoterminal (situada en el DRC1) llamada dominio de asociación previa a ligando PLAD, en inglés) (Chan et al., 2000). Esto implica que al menos para algunos miembros de la superfamilia del TNF, el ligando no induzca trimerización,



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Superfamilia de los receptores de TNF y sus ligandos. (Ashkenazi, 2002)

sino que se une a un complejo de receptor trimérico preasociado y cambia la conformación de los receptores de tal manera que se facilite la señalización. La mayoría de los miembros de la superfamilia de los receptores de TNF funcionan como transductores de señalización transmembrana que responden a la unión de ligando. Algunos de los receptores, sin embargo, como son OPG y DcR3 no señalizan. En su lugar, actúan como receptores que compiten por la interacción de ligandos similares con sus receptores de señalización. Los miembros de la superfamilia de los receptores de TNF que sí señalizan se pueden dividir en dos subgrupos principales en base a su región citoplasmática, según posean o no un dominio de muerte (DD). El subgrupo que posee el dominio de muerte se denomina receptores de muerte (DR) (Ashkenazi, 2002).

1.3.- El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) se describió originalmente como una proteína capaz de eliminar células tumorales *in vitro* y causar necrosis hemorrágica de tumores trasplantados en ratón. (Carswell et al., 1975). La estructura proteica del TNF- α se conoció tras su clonaje y secuenciación a mediados de los 80 (Pennica et al., 1984; Beutler-B et al., 1985).

El TNF- α se produce como una proteína transmembrana de tipo II de 26KD, que se asocia en homotrómeros (Kriegler et al., 1988; Tang et al., 1996). La región extracelular se procesa proteolíticamente mediante el enzima denominada TACE (*Tumor necrosis factor- α converting enzyme*), dando lugar a una proteína soluble trimérica de 51kDa que es liberada al espacio extracelular (Black et al., 1997).

El TNF- α es una potente citocina que juega un importante papel en la respuesta inmune e inflamación. Está implicado en un amplio espectro de respuestas celulares y sistémicas tales como, fiebre, shock, daño tisular, necrosis tumoral, anorexia, inducción de otras citocinas y moléculas reguladoras del sistema inmune, así como proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Liu et al., 1996).

El TNF- α juega un papel esencial en la protección contra la infección de bacterias, hongos, parásitos y virus (Wallach et al., 1999). La principal función fisiológica del TNF- α es estimular el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección y activar estas células para eliminar microorganismos (Gamble et al., 1985). A nivel celular, la función de señalización principal es la inducción

transcripcional de citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina -2, -6, -8 y de moléculas de adhesión leucocitarias.

El TNF- α se produce principalmente por monocitos y macrófagos aunque también se puede producir en un amplio rango de tipos celulares que incluyen tanto células del sistema inmunitario como son células T, B, NK, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y mastocitos; como células no pertenecientes a él como son astrocitos, fibroblastos, células de la glia, células del músculo liso, queratinocitos, neuronas, osteoblastos y adipocitos, entre otras (Bazzoni et al., 1996).

Por otro lado, la sobreproducción de TNF- α es un factor patológico clave en muchas enfermedades del ser humano. En infecciones severas, el TNF- α se produce en grandes cantidades y causa anormalidades sistémicas clínicas y patológicas. Una complicación de la sepsis severa bacteriana es el shock séptico que se caracteriza por un colapso vascular, coagulación intravascular y disfunción metabólica.

El TNF- α se ha implicado en la patogénesis de procesos crónicos tales como la autoinmunidad, el rechazo de órganos trasplantados, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la caquexia que acompaña al cáncer y al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El TNF- α también se ha visto que está implicado en resistencia a la insulina, en el metabolismo lipídico, en el fallo cardíaco congestivo, en aterosclerosis, pancreatitis y en el daño hepático inducido por alcohol, entre otros (Ashkenazi, 2002; Yin et al., 1999).

1.4.- Receptores del TNF- α

El TNF- α ejerce su acción a través de dos receptores diferentes, el receptor 1 de TNF- α (otras nomenclaturas: TNF-RI, TNFR1, TNFR60, TNFR55; CD120a, TNFRSF1A) y el receptor 2 de TNF- α (otras nomenclaturas: TNF-RII, TNFR2, TNFR80, TNFR75; CD120b, TNFRSF1B) (Tartaglia and Goeddel, 1992; Vandenabeele et al., 1995). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF. Ambos son glucoproteínas transmembrana con 4 dominios DRCs en su región extracelular N- terminal y unen TNF- α con alta afinidad (Locksley et al., 2001). El TNFR1 y TNFR2 están presentes en prácticamente todos los tipos celulares excepto eritrocitos. El TNFR1 se expresa constitutivamente en un amplio espectro de tipos celulares. Por el contrario, TNFR2 se expresa principalmente en células endoteliales y células de origen hematopoyético y puede ser modulado por un abanico de estímulos (Santee and Owen-Schaub, 1996) .

Ambos receptores se pueden encontrar de forma soluble debido a corte enzimático de su región extracelular por miembros de la familia de las metaloproteasas de la matriz en respuesta a señales inflamatorias, como por ejemplo la unión del receptor a su ligando TNF- α (Van Zee et al., 1992). Los dominios extracelulares (“*shedados*”) solubles retienen la capacidad de unir TNF- α y así actúan como inhibidores naturales de la actividad del TNF- α . En el transcurso de condiciones inflamatorias agudas y crónicas la concentración de ambos receptores incrementa considerablemente, aunque la concentración de TNFR2 es generalmente más modulable que la de TNFR1. Ambos receptores solubles son eliminados a través del riñón y excretados a la orina (Seckinger et al., 1988),

inmunológicamente intacto (Seckinger et al., 1990). El *shedding* del receptor celular, su aumentada concentración en plasma y su capacidad de unir TNF- α ha llevado a la hipótesis de que los receptores solubles de TNF- α pueden servir tanto de antagonistas naturales como agonistas, péptidos transportadores que estabilizan el TNF- α y favorecen su acción, todo dependiendo de sus concentraciones relativas (Aderka et al., 1992).

1.4.1.- Estructura génica y proteica del TNFR2

El gen del TNFR2 se localiza en el cromosoma 1p36.2-p36.3 y tiene un tamaño de aprox 43 Kb. El gen del *tufr2* está formado por 10 exones, separados por 9 intrones (Figura 2). El tamaño de los exones oscila entre las 35 pb del exón 8 y las 2.5Kb del exón 10. El tamaño de los intrones va desde las 343 pb del intrón 5 hasta 19Kb del intrón 1 (Beltinger et al., 1996; Santee and Owen-Schaub, 1996). Esta estructura es similar a la que posee el TNFR2 murino (Hurle et al., 1998) así como el TNFR1 humano (Fuchs et al., 1992) y murino (Rothe et al., 1993; Takao et al., 1993).

La región 5'UTR posee regiones consenso de unión a factores de transcripción implicados en la activación y/o en el desarrollo linfoide tales como: el factor 1 de las células T (TCF-1), Ikaros, AP-1, CK-2, IL6RE, GAS, NF-kB, y Sp1 (Leiden and Thompson, 1994; Santee and Owen-Schaub, 1996).

El gen del TNFR2 codifica una proteína de membrana de tipo I (es decir, con el extremo N-terminal en la región extracelular y el C-terminal en la región intracelular) de 461 aminoácidos.

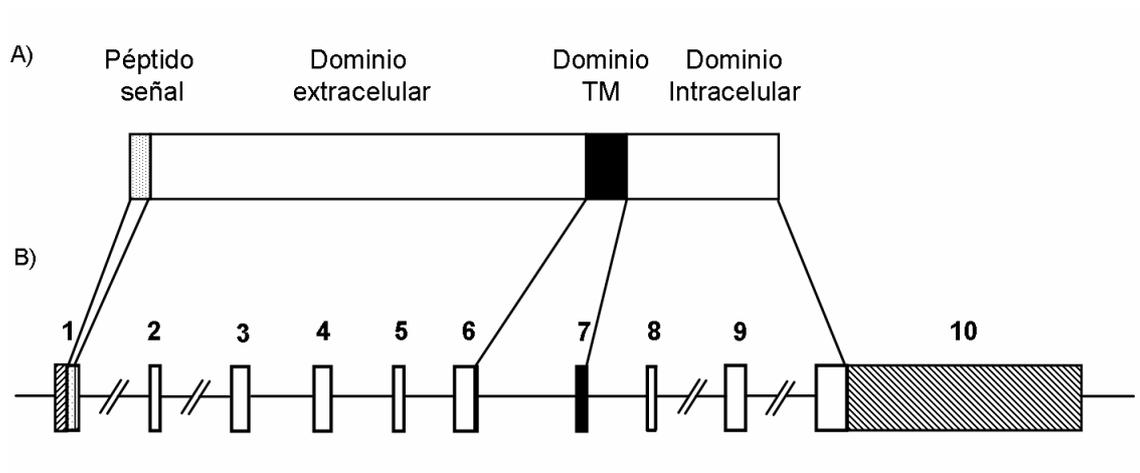


Figura 2. Estructura del gen del TNFR2. A) Dominios de la proteína TNFR2. TM: dominio transmembrana. B) Localización de exones e intrones. Los exones están numerados del 1 al 10. Los intrones se representan como líneas entre exones. Las regiones no traducidas 5' y 3' se encuentran ralladas en los exones 1 y 10 respectivamente.

En el extremo N-terminal, posee un péptido señal de 22 aminoácidos, codificado por el Exón 1. Su dominio extracelular, de 235 aminoácidos está compuesto por 4 dominios ricos en cisteínas (DRCs) de unos 40 aminoácidos cada uno, y una región yuxtamembrana de 57 aminoácidos. Estos dominios están codificados por los exones 2, 3, 4, 5 y la mayor parte del 6. A continuación posee un dominio transmembrana sencillo, formado por 30 aminoácidos, codificados por una pequeña parte del exón 6 y todo el exón 7. El receptor termina con un dominio citoplasmático de 174 aminoácidos codificado por los exones 7, 8, 9 y una pequeña parte del exón 10.

El TNFR2 humano está N-glicosilado y también O-glicosilado (Fiers, 1991) y posee un peso molecular de aproximadamente 80kDa.

1.5.- Diferencias entre los Receptores del TNF- α

1.5.1. Interacción con el ligando

Los dos receptores de TNF- α difieren significativamente de su afinidad por la unión a su ligando TNF- α y también en sus rutas de señalización intracelular. (Dinarello, 2002). Las diferencias en la afinidad y cinéticas de la unión a ligando sugieren diferencias en la función básica de los dos receptores. Los primeros estudios sugerían que la unión de TNF- α a sus receptores se daba con gran afinidad (Higuchi and Aggarwal, 1994). Experimentos de pulso y captura más recientes demuestran que la cinética por la que el TNF- α se une y se libera de sus dos receptores, difiere significativamente. El TNF- α se une a ambos receptores TNFR1 y TNFR2 con una rápida cinética de asociación (1.1 y $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Grell et al., 1998). Sin embargo, estos experimentos de pulso y captura sugieren que la unión de TNF- α a TNFR1 es casi irreversible debido a su lenta cinética K_{off} (0.021 min^{-1} , $T_{1/2} = 33 \text{ min}$) frente TNFR2, que tiene una cinética K_{off} más rápida (0.631 min^{-1} , $T_{1/2} = 1.1 \text{ min}$).

Las diferentes cinéticas de unión del TNF- α a sus dos receptores había hecho especular que *in vivo*, los dos receptores podían tener diferentes funciones.

El TNFR2 puede servir como pasador del ligando, es decir como un vehículo para repartir o pasar el TNF- α al TNFR1 para señalar cuando las concentraciones de TNF- α son bajas (Dinarello, 2002). Esta hipótesis la soporta el hecho de que en condiciones *in vivo*, la respuesta inflamatoria principal al TNF- α soluble de 17-KDa, está mediado por la señalización de TNFR1, en lugar de por la

de TNFR2. Por el contrario, se ha propuesto al TNF- α asociado a membrana celular como el ligando preferente del TNFR2 (Grell et al., 1995).

1.5.2. Señalización.

TNFR1

La unión del TNF- α homotrimérico a TNFR1 y TNFR2 induce un cambio conformacional de los dominios intracelulares, que lleva a la yuxtaposición y oligomerización de los mismos, y que es necesario para la transducción de señales. Se ha sugerido que la auto-asociación de los motivos intracelulares de TNFR1 contribuye a la iniciación y amplificación de la señal. Se ha visto que la sobreexpresión y oligomerización de receptor TNFR1 puede transducir una señal, incluso en ausencia de unión de ligando (Douni and Kollias, 1998).

La región intracelular de TNFR1 posee una secuencia altamente conservada de 70 aminoácidos, llamada dominio de muerte (en inglés, death domain, DD). Este dominio juega un papel clave en la capacidad del TNF- α para desencadenar la apoptosis celular. Los DDs intracelulares reclutan otras moléculas que contienen un dominio efector de muerte (DED) u otro DD y se inicia la cascada de señalización intracelular. El reclutamiento las moléculas de señalización intracelular hacia los dominios intracelulares de TNFR1 se produce mediante proteínas adaptadoras (o docking proteínas) que no poseen, la mayoría de ellas, actividad enzimática (cinasa) propia. Hay varias de estas proteínas adaptadoras, como sería la proteína que interacciona con el receptor (*receptor interacting protein*, RIP), que necesitan otra proteína que posea DD, como sería en este caso

la proteína con dominio de muerte asociada a TNFR-1 (TRADD) (Tewari and Dixit, 1996). TRADD también puede interactuar con otras dos proteínas, TRAF-1 y TRAF-2, pertenecientes a otra familia de proteínas transductoras de señal llamada Factores asociados al receptor de TNF- α (TRAFs) (Wallach et al., 1999). TRAF-2 es un intermediario en la activación de NF κ B y JNK y en la inducción de proinflamación producidas por TNF- α . TRADD estaría localizada en la bifurcación de los caminos de señalización apoptótica y proinflamatoria del TNF- α .

El DD de TNFR1 no es la única región del dominio intracelular implicado en la transducción de señal. Corriente arriba del DD, en la región próxima a la membrana, tres proteínas unen y están implicadas en la transducción de señales, FAN, TRAP2, y TRAP1. FAN parece jugar un papel en la activación de esfingomielinasa neutra, responsable de la generación de la ceramida (Adam-Klages et al., 1996; Segui et al., 2001). Las funciones de TRAP2 y TRAP1, no son bien conocidas, aunque TRAP2 puede estar implicada en la regulación de la función proteasa (Dunbar et al., 1997).

TNFR2

TNFR2 también puede participar en la señal proinflamatoria de TNF- α vía TRAF-2. Algunos investigadores, sin embargo, han observado que agonistas de TNFR2 son capaces de inducir apoptosis (Grell et al., 1998; Weiss et al., 1997) a pesar de la falta de una región de unión de TRADD/FADD (proteína con dominio de muerte asociada a FAS). La inducción de apoptosis mediante TNFR2 no sigue el mismo camino que con TNFR1, pero parece recaer en la inducción de TRAF. TNFR2, al igual que TNFR1 se ha visto que se asocia con el extremo

carboxiterminal de TRAF-2, el cual media la activación de NFκB. También se ha descrito una proteína quinasa, NIK, que se une a TRAF-2 y estimula la actividad NFκB (Malinin et al., 1997; Natoli et al., 1997).

La unión de TNF-α al TNFR1 o al TNFR2 induce el reclutamiento de diversas moléculas de señalización en los dominios citoplasmáticos de estos receptores lo cual activa varias cascadas de señalización que desencadenan la activación de las caspasas y los factores de transcripción AP-1 y NF-κB (Baud and Karin, 2001; Wallach et al., 1999).

1.5.3.- Función de los receptores del TNF-α.

Los experimentos realizados con anticuerpos específicos contra receptor de TNF-α (Shalaby et al., 1990; Sheehan et al 1995), con ligandos específicos de receptor (Van Ostade et al.,1993; Barbara et al., 1994) y con ratones deficientes genéticamente de los receptores TNFR1 o TNFR2 (Rothe et al 1993; Pfeffer et al 1993; Ericsson et al., 1994) indican que el TNFR1 es el principal receptor a través del cual se señala la mayoría de las respuestas inflamatorias clásicamente atribuibles al TNF-α.

Por otra parte, también se han descritos funciones mediadas por el TNFR2 como son la proliferación de timocitos inducida por TNF-α (Tartaglia et al., 1993, Grell et al 1998), la apoptosis de los linfocitos T maduros (Zheng et al., 1995), la secreción del factor estimulante de macrófagos y granulocitos, GM-CSF (Vandenabeele et al., 1992), la necrosis de la piel inducida por TNF-α (Sheehan et

al., 1995), la inhibición de la hematopoyesis temprana (Jacobsen et al., 1995) y la inactivación y eliminación del TNF- α a través del riñón (Bemelmans et al., 1993). El TNFR2 también juega un papel importante en los modelos de malaria cerebral y en el daño de la microvasculatura cerebral (Lucas et al., 1997; Lucas et al., 1998). Además se ha visto que el TNFR2 juega un papel crítico en la inflamación multiorgánica (Douni et al., 1998).

1.6.- Implicación del eje TNF- α /TNFR en la resistencia a la insulina y diabetes

El reconocimiento del papel del eje TNF- α /TNFR en la resistencia a la insulina se ha ido incrementado en la última década (Strackowski et al., 2001; Vassalli, 1992). La activación de la vía TNF- α /TNFR está unido a la inducción de la resistencia a la insulina (Hotamisligil et al., 1997). La resistencia a la insulina se define como una reducción de la acción biológica de la insulina, a una concentración dada de insulina. Después de unirse a su receptor, la insulina aumenta la actividad tirosina cinasa de la subunidad beta (Kasuga et al., 1982); esto lleva a la autofosforilación de múltiples tirosinas que, a su vez, promueve la actividad cinasa del receptor sobre otros sustratos celulares tales como el sustrato 1 del receptor de insulina, IRS-1 (Sun et al., 1991; White et al., 1985). IRS-1, es el principal sustrato de la actividad tirosin cinasa del receptor de la insulina. IRS-1 es una proteína citoplasmática con múltiples sitios de fosforilación y juega un papel clave en la transducción de señales a través del receptor de la insulina (Myers et al., 1992; Sun et al., 1991; White et al., 1985). Se ha demostrado que el TNF- α interfiere directamente con la acción de la insulina al disminuir la

actividad tirosin cinasa del RI, disminuyendo la autofosforilación del mismo y reduciendo los subsiguientes pasos de fosforilación del IRS-1 y así también la señalización posterior del receptor de insulina. La reducción en la acción de la insulina se debe en parte, a la capacidad del TNF- α para inducir fosforilación de serinas del IRS-1, por lo que se reduce la unión de este sustrato al dominio yuxtamembrana del receptor de la insulina (Hotamisligil et al., 1994).

El TNFR2 es esencial para la inhibición de la señalización de la insulina inducida por TNF- α en adipocitos humanos (Liu et al., 1998). No está claro si este efecto está mediado por una señalización directa a través del TNFR2 o si el TNFR2 está regulando el ritmo de asociación entre el TNF- α y TNFR1 (Tartaglia et al., 1993).

En los sujetos obesos, en los sujetos resistentes a la insulina y en los sujetos diabéticos existe una clara elevación de la producción de TNF- α en el músculo y en tejido adiposo, si lo comparamos con tejidos de individuos delgados (Locksley et al., 2001; Santee and Owen-Schaub, 1996; Tartaglia and Goeddel, 1992). Los ratones Knock out del gen del TNF- α o de ambos receptores del TNF (TNFR p55-/- y p75-/-) muestran una significativa mejora en la sensibilidad a la insulina (Tracey and Cerami, 1994). Los transcritos de RNA que codifican los receptores de TNFR2 están significativamente elevados en el tejido graso y en el músculo de animales obesos y diabéticos (Hotamisligil et al., 1994) y también juegan un papel clave en la regulación de la acción de la insulina en la obesidad humana (Vassalli, 1992).

Las concentraciones séricas de TNFR2 soluble se piensa que son un reflejo de la activación del sistema TNF- α (Tartaglia et al., 1991), y se han relacionado con el índice de masa corporal, los lípidos séricos, la adiponectina sérica y la sensibilidad a la insulina en sujetos sanos (Corica et al., 1999; Dzienis-Strackowska et al., 2003; Fernandez-Real et al., 1998; Fernandez-Real et al., 1999; Fernandez-Real et al., 2002; Fernandez-Real et al., 2003; Fernandez-Real et al., 1999; Hauner et al., 1998; Hotamisligil et al., 1997; Strackowski et al., 2001; Strackowski et al., 2002) (revisado en Fernandez-Real and Ricart, 2003). Además, determinantes genéticos del TNF- α y del TNFR2 se han asociado a diversas características del síndrome metabólico en estos sujetos (Fernandez-Real et al., 1997; Fernandez-Real et al., 2000; Vendrell et al., 2003).

1.7.- Receptores solubles

Los receptores solubles se encuentran en muchas clases y familias de receptores y son especialmente comunes entre la superfamilia de los receptores del TNF (como TNFR1, TNFR2, Fas, CD27, CD30) y en receptores de citoquinas (como IL1R, IL2R α , IL4R, IL5R α , IL7R, IL6R α). También se han descrito en algunos receptores de inmunoglobulinas (IgER, IgGR) y receptores de moléculas de adhesión (ICAM-1, ICAM-3) entre otros (Heaney and Golde 1998).

Los receptores solubles generalmente están formados por la parte extracelular de los receptores de membrana y retienen la capacidad de unir ligando. Los receptores solubles se producen mediante dos mecanismos conocidos: mediante *splicing* alternativo, dando lugar a un polipéptido al que le falta la región

transmembrana y es secretado directamente fuera de la célula (ej. IL4R, GM-CSFR, LIFR, IL-11R); o mediante *shedding* o corte proteolítico de la parte extracelular de los receptores de membrana (ej. CD62L, TGF- β R, PDGFR). Los dos mecanismos no son mutuamente excluyentes y se puede dar en un mismo receptor, como por ejemplo en el receptor de IL6, de IL4, en el receptor de la hormona de crecimiento y en el CD40, miembro de la familia del TNFR (Contin et al., 2003; Heaney and Golde, 1998; Jones et al., 2001; Tone et al., 2001).

1.8.- El *Shedding*

El *shedding* o liberación proteolítica del dominio extracelular de las proteínas de membrana al medio extracelular, es un proceso enzimático regulado principalmente por metaloproteasas. La función principal del *shedding* de los receptores de membrana es modular negativamente la señalización mediada a través de los mismos (Heaney 1998).

El corte proteolítico es el mecanismo descrito de generación de TNFR solubles. La activación celular por agentes como lipopolisacárido, GM-CSF, ionóforos de calcio, ester de forbol (PMA), fMLP, anticuerpos anti-CD3 y su ligando TNF- α , inducen el *shedding* de los TNFR en diferentes tipos celulares como monolitos/macrófagos, linfocitos T y granulocitos (Porteu F et al, 1990; Lantz et al 1994; Crowe et al, 1993; Aderka et al, 1998)

La enzima responsable del *shedding* del TNFR2 parece ser la enzima TACE (también llamada ADAM 17), responsable también del procesamiento del pro-TNF- α unido a membrana. Esta enzima pertenece a la familia de la adamalinas y posee dominios desintegrina y metaloproteasa (Black et al., 1997;

Moss et al., 1997). También se ha implicado a TACE en el procesamiento de otras moléculas como son el pro-TGF- α y L-selectina (Peschon et al., 1998).

1.9.- El proceso de *Splicing*.

1.9.1.- Mecanismos de Splicing

La mayor parte de los genes eucariotas que codifican proteínas, contienen las secuencias codificantes (exones) en segmentos discontinuos, interrumpidas por otras secuencias (intrones) generalmente más largas, y que no formarán parte del RNA maduro. Los intrones son eliminados del transcrito primario mediante un proceso bioquímico conocido como splicing, que tiene lugar en dos etapas y de una manera exacta y precisa entre los lugares de corte o splice sites. El proceso de splicing se lleva a cabo por el *spliceosoma*, un gran complejo macromolecular formado por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), llamadas U1, U2, U4, U5 y U6 y numerosas proteínas accesorias (>100) que se unen a estas secuencias conservadas y catalizan el proceso.

La selección de los extremos del intrón o sitios de splicing es básica para la fidelidad y efectividad del splicing, y por ello es un punto de control de la reacción. Clásicamente, se considera que esta selección viene determinada principalmente por tres señales del pre-mRNA (Mount, 1982). El sitio de splicing 5' o donador, la secuencia de punto ramificado (Branch site) o punto que se une al extremo 5' y que origina la estructura de lazo o lariar, y el sitio de splicing 3' o sitio aceptor.



Figura 3. Sitios de splicing 5' y 3'

a).- Sitio de splicing 5' o donador

El sitio de splicing 5' se reconoce en las etapas más tempranas del ensamblaje del spliceosoma. El sitio de splicing 5' presenta una secuencia consensus clásica que en eucariotas superiores presenta más variabilidad:

5' -- C A G G U R A G U -- 3'

El punto crucial de esta etapa es la unión de U1, mediante apareamiento de bases, a los primeros nucleótidos del intrón. Esta unión es desplazada en etapas más avanzadas de la reacción por la unión del U6, que llevará a cabo la actividad catalítica de la reacción.

b).- Secuencia de punto ramificado

La secuencia de punto ramificado (branch point ,BPS, en inglés), se sitúa a una distancia de entre 18-40 nucleótidos del AG del sitio de splicing 3' y es reconocida por complementariedad de bases con el snRNP U2 (Parker et al., 1987), fenómeno que tiene lugar en etapas precatalíticas de la reacción, generalmente después del reconocimiento del sitio de splicing 5'. Se ha propuesto que el apareamiento entre esta secuencia y U2 deja un nucleótido de adenina sin aparear, sobresaliente, cuyo grupo 2'-OH es el que ataca el extremo 5'P del intrón para formar el intermediario en forma de lazo o lariat (Ruskin et al., 1984).

La secuencia consensus se encuentra degenerada en eucariotas superiores:

Y N C U R A Y Y: (C,U) R:(A,G) N: cualquier nucleótido

c).- Sitio de splicing 3' o acceptor

La secuencia del sitio de splicing 3' se sitúa generalmente al lado del branch point (BPS) y consta de un tramo de polipirimidinas (Py)_n, seguido de un dinucleótido AG en el extremo 3' del intrón.

El ((Py)_n), es una secuencia de composición casi exclusiva de pirimidinas (C,T) y lo que es crítico para la función de este segmento es su longitud, aunque no se trata de una secuencia consensus rígida sino que la distancia entre el AG y el (Py)_n puede variar sin comprometer excesivamente la reacción. La distancia más frecuente entre el BPS y el AG es de 18 a 40 nt y el (Py)_n puede estar delante o detrás del AG, aunque es más frecuente que se encuentre delante (Reed, 1989).

Estas secuencias son sitios de unión de proteínas que forman el spliceosoma: al (Py)_n se le une la subunidad de 65-kDa del factor auxiliar dimérico U2 (U2AF⁶⁵) y la subunidad de 35-kDa se une al AG del límite intrón-exón.

La reacción de splicing consta de dos etapas, en cada etapa se da una reacción de transesterificación, catalizada por los snRNP. También intervienen enzimas con función ATPasa, helicasa etc (Staley and Guthrie, 1998), que ayudan a llevar a cabo los cambios conformacionales del spliceosoma necesarios para las reacciones bioquímicas. En el primer paso, el grupo hidroxilo 2' de un residuo especial del punto ramificado, ataca el fosfato del sitio de splicing 5'. Esto lleva al corte del exón 5' a partir del intrón y la ligación del extremo 5' del intrón al hidroxilo

2' de la A del punto de ramificación, formando de una estructura llamada lariat o lazo (Figura 4).

El segundo paso de transesterificación es el ataque del hidroxilo-3' del exón separado, al fosfato en el extremo 3' del intrón. De esta forma se ligan los dos exones y se libera el intrón, todavía en forma de lazo o lariat.

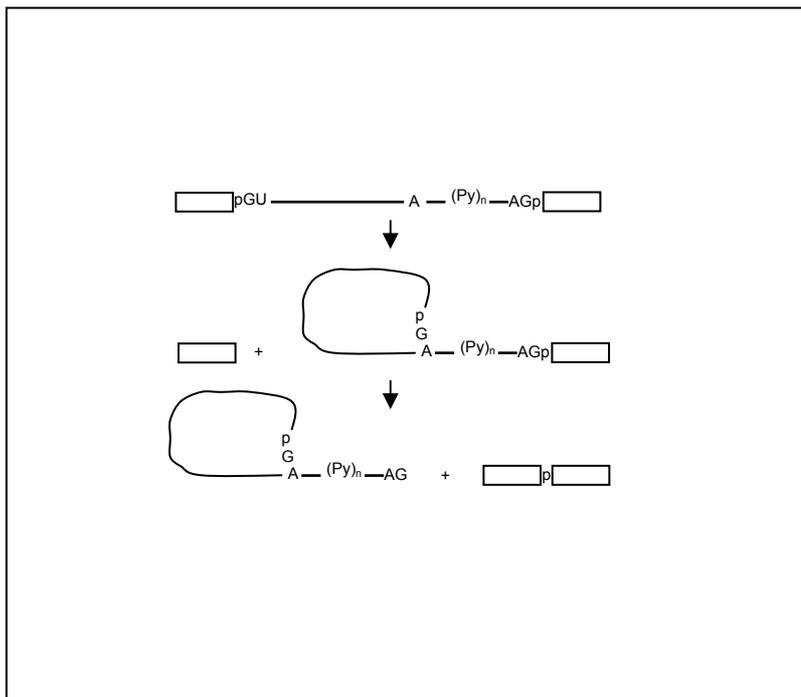


Figura 4. Esquema de las dos etapas de la reacción de splicing

1.9.2.- *Splicing* alternativo

El splicing alternativo del pre-RNA es uno de los mecanismos más importantes de regulación génica en eucariotas superiores. Se podría definir como el mecanismo que determina en unos contextos la inclusión y en otros la exclusión

de determinadas secuencias génicas transcritas en el RNAm maduro, produciendo proteínas que difieren de su secuencia peptídica y en consecuencia, en la mayoría de los casos, en su actividad química y biológica (Grabowski and Black, 2001).

El splicing alternativo contribuye de una manera principal a la diversidad proteica de los organismos. Se estima que alrededor del 60% de los productos de génicos humanos sufren splicing alternativo y aproximadamente el 80% de los splicing alternativos producen cambios en la proteína codificada (Modrek and Lee, 2002), revelándose probablemente como la principal fuente de diversidad proteómica humana. El splicing alternativo, genera segmentos de mRNA de gran variabilidad que pueden insertar o eliminar aminoácidos, cambiar la pauta de lectura, o introducir un codón de parada. También se trata en general de un punto de control reversible e inducible/reprimible y se cree que es especialmente importante en procesos complejos como el desarrollo embrionario, la diferenciación tisular y la transducción de señales extracelulares (Black, 2003).

1.9.2.1 Tipos de splicing alternativo

En un RNAm multiexón típico, el patrón de splicing puede verse alterado de muchas maneras (Figura 5). Entre los tipos de regulación que afectan a un único exón o a un fragmento de este, figuran: inclusión/exclusión de un exón variable o cassette, competición de sitios de splicing 5' ó 3'; uso de promotores y sitios de poliadenilación alternativos, la inclusión/no inclusión de un intrón. Para más de un exón variable podemos encontrar: dos exones mutuamente excluyentes, o bien inclusión/exclusión de dos o más exones a la vez. Este segundo tipo se conoce como splicing alternativo complejo y es un cajón de sastre donde se incluyen los

mecanismos de splicing alternativo que afectan a una secuencia génica con más de dos exones variables. En estos casos, podemos hablar de una regulación individual de cada exón, o bien de una regulación global de la región, o bien de los dos tipos de control.

Se ha de señalar que la regulación del splicing alternativo no acostumbra a ser un efecto de todo o nada, sino un efecto de proporciones entre las diferentes alternativas (Pikielny and Rosbash, 1985). Es esta proporción, la que puede ser diferente y modulable según el tejido, la etapa y las señales extracelulares.

1.9.2.2.- Patrones de splicing

- 1** Un exón cassette puede ser incluido o excluido del RNAm (Fig.5 A)
- 2** Exones mutuamente excluyentes, cuando dos o más cassettes de exones adyacentes son eliminados de tal forma que sólo se excluye un único exón al mismo tiempo (Fig.5 B).
- 3** Sitios de splicing 5' y 3' alternativos permiten el alargamiento o acortamiento de un determinado exón (Fig. 5C y D).
- 4** Promotores y sitios poliA alternativos cambian el extremo 5' o 3' de un transcrito (Fig.5 E y F).
- 5** Un intrón retenido puede ser eliminado de un preARNm o puede ser retenido en el RNAm traducido (Fig.5 G).
- 6** Un único pre-RNAm puede exhibir múltiples sitios de splicing alternativo (Fig.5 H).

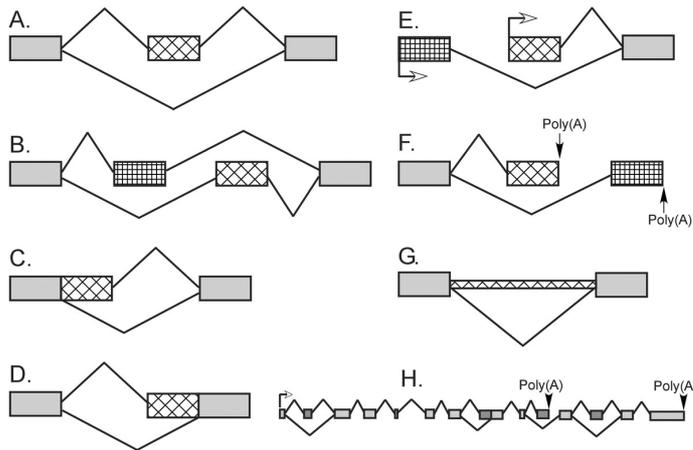


Figura 5 . Patrones de splicing (Black DL. Annu. Rev. Biochem. 2003. 72:291–33)

1.9.2.3.- Factores reguladores del splicing alternativo

Los cambios en la elección del sitio de splicing se deben a cambios en la unión del spliceosoma. En la mayoría de los sistemas, la elección del sitio de splicing se piensa que está regulado mediante la modificación de la unión de los factores iniciales al pre-RNAM y la formación del complejo temprano del spliceosoma.

Las secuencias consensus del sitio de splicing no son, en general, suficientes para determinar la unión de un spliceosoma y la producción del splicing. Se necesitan otras informaciones e interacciones para activar su uso (Berget, 1995; Black, 1995). El tamaño de los intrones que puede llegar a tener cientos de miles de nucleótidos contrasta con el tamaño de los exones, normalmente entre 50-300 nucleotidos. Normalmente, los componentes del spliceosoma que se unen ambos lados del exón pueden interaccionar para estimular la excisión de los intrones fanqueantes (Hoffman and Grabowski, 1992). Este proceso se denomina definición

del exón y aparentemente ocurre en la mayoría de los exones internos (Robberson et al., 1990). Por encima de este proceso, existen muchas secuencias reguladoras que no son sitios de splicing y que afectan de una manera importante la unión del spliceosoma.

En general se desconocen las vías y los mecanismos que rigen el splicing alternativo de un gen, con la excepción de algunos modelos. En cualquier caso se acepta que ha de haber dos tipos de elementos reguladores de cada segmento génico sometido a splicing alternativo, a parte de los implicados en el proceso de splicing constitutivo: los elementos en cis y los factores trans específicos. Los factores en cis son secuencias del mismo RNA que definen una diana de control necesaria para la modulación de un determinado segmento del pre-mRNA, y pueden estar situados en el mismo segmento regulado o bien a distancia. Los elementos en trans son factores ajenos al transcrito primario pero que de manera directa o indirecta interactúan con la secuencia en cis, e inducen la inclusión o exclusión del segmento génico regulado. Pueden ser factores con patrones de expresión regulados cualitativamente o cuantitativamente según la etapa de desarrollo, diferenciación y estado de activación.

Además podemos distinguir dos grandes tipos de regulación según el efecto del elemento regulador: la regulación positiva y la negativa. La regulación positiva es aquella en la cual el factor induce la utilización de un determinado sitio de splicing del mRNA en cuestión. En este caso, la unión del factor en trans (cuando está presente) al elemento en cis aumenta la eficiencia de aquel sitio de splicing para ser reconocido por la maquinaria del splicing general. La regulación negativa es aquella en la que el elemento regulador, en cis o en trans, promueve el no

reconocimiento de aquel exón o sitio de splicing, normalmente por impedimentos estéricos. En el caso de competición entre dos sitios de splicing, se puede dar regulación positiva o negativa en uno de los dos sitios, o bien los dos tipos, aunque se asume que uno de los lugares se utiliza por defecto y el otro se induce positivamente o bien por inhibición del primero. Si hablamos de exones variables, la regulación positiva implica la inclusión del exón variable, y la negativa implica que la actividad de los elementos reguladores determina su exclusión.

Las secuencias de RNA que son capaces de determinar, por sí solas o bien mediante factores proteicos, el splicing alternativo de un pre-mRNA, son de naturaleza diversa.

Existen secuencias de RNA que actúan positivamente estimulando la unión del spliceosoma, son los llamados potenciadores del splicing. Por el contrario, otras secuencias actúan como silenciadores o represores, bloqueando la unión del spliceosoma. Los potenciadores y los represores pueden encontrarse tanto en exones (potenciador y represor exónicos, en inglés ESE y ESS respectivamente) como en intrones (potenciadores y represores intrónicos, ISE y ISS respectivamente). Algunas secuencias reguladoras crean una estructura secundaria de RNA que afecta al reconocimiento del sitio de splicing (Jacquenot et al., 2001; Libri et al., 1991; Libri et al., 1995), pero la mayoría son sitios de unión de proteínas.

Elementos reguladores exónicos (ERE) y las proteínas que se unen a ellos

Los exones a menudo contienen elementos potenciadores o silenciadores (ESEs, SSE, respectivamente) que afectan a su capacidad de sufrir splicing. Estos

elementos reguladores poseen secuencias diversas y a menudo están embebidos en nucleótidos que también codifican proteína. Los potenciadores se han identificado mediante mutaciones de exones que bloquean el splicing, a través de comparación computacional de secuencias de exones, y a través de la selección de secuencias que activan el splicing o que se unen a proteínas reguladoras de splicing (Blencowe, 2000; Cartegni et al., 2002; Fairbrother et al., 2002; Hertel et al., 1997; Schaal and Maniatis, 1999; Schaal and Maniatis, 1999). Se han descrito dos clases principales de ESEs en base a su composición nucleotídica: Ricos en purinas y ricos en A/C. Las secuencias ricas en purinas, cuya secuencia consenso normalmente es (GAR)_n, son reconocidas por una familia de proteínas ricas en serina-arginina (SR) que recluta componentes del spliceosoma (como U2AF) a los sitios de splicing. Las proteínas SR forman la familia de reguladores de splicing mejor estudiada (Graveley, 2000). Los ESEs pueden también potenciar el splicing mediante la inhibición de SSE adyacentes.

Los ESEs ricos en A/C (ACEs) unen la proteína cold-box YB-1 y promueven el splicing mediante un mecanismo todavía no determinado (Coulter et al., 1997).

Se conocen también elementos represores o silenciadores exónicos, SSE. Los mejor caracterizados son los elementos que unen las proteínas hnRNP. Estas proteínas son un amplio grupo de moléculas identificadas por su asociación con precursores de mRNA (hnRNA). La proteína más estudiada es la proteína hnRNPA1 y se ha visto que se une a la secuencia UAGGG(A/U). También se han encontrado en intrones los elementos silenciadores a los que se une A1. Se conocen otras secuencias reguladoras exónicas represoras ricas en Gs que unen las proteínas hnRNP H y hnRNP F (Chen et al., 1999; Jacquenet et al., 2001). La

proteína hnRNp H se ha visto que puede actuar como un represor de splicing, o como un activador según el exón del gen sobre el que actúe (Caputi and Zahler, 2002; Chen et al., 1999).

Elementos reguladores intrónicos (ERI) y las proteínas que se unen a ellos

Muchas secuencias reguladoras de splicing se localizan en los intrones. Las secuencias reguladoras intrónicas suelen encontrarse en la secuencia de polipirimidinas o adyacentes al punto ramificado o bien al sitio de splicing 5'. Sin embargo, estas secuencias reguladoras intrónicas también se pueden encontrar a cientos de nucleótidos de distancia del exón regulado.

Existen dos tipos de secuencias reguladoras intrónicas, las secuencias potenciadoras del splicing y las silenciadoras o represoras (ISEs y ISSs respectivamente)

Se han descrito diversas secuencias que actúan como elementos intrónicos potenciadores del splicing pero las proteínas que median su efecto están menos caracterizadas que las de las secuencias ESE.

Se ha descrito que una secuencia rica en uridinas inmediatamente después del sitio de splicing 5', puede activar el splicing. A esta secuencia se le une la proteína llamada TIA-1. Se ha visto que TIA-1 estimula la unión de snRNP U1 al sitio de splicing 5' (Forch et al., 2000).

Un elemento común ISE es el hexanucleótido UGCAUG (TGCATG). La proteína que media el efecto no se ha identificado definitivamente.

Se ha descrito un conjunto de elementos reguladores llamado “*secuencia control downstream*” (DCS). Está formada por un elemento GGGGG necesario para una

actividad potenciadora completa, un elemento CUCUCU (CTCTCT) requerido para la represión del splicing y el elemento UGCAUG (TGCATG) esencial para la actividad potenciadora. Al DCS se ensambla un gran complejo de RNPs. Al elemento GGGGG se une hnRNPsH y F. Al elemento CUCUCU se une la proteína de unión de la secuencia de polipirimidinas o su homólogo neuronal (PTB/nPTB). Al elemento UGCAUG se une la llamada proteína reguladora de splicing tipo KH (KSRP) y al menos otro factor no identificado.

Con respecto a los ISS, algunos elementos intrónicos silenciadores del splicing unen proteínas que ya se han mencionado en los elementos exónicos. Por ejemplo la proteína hnRNP A1 que siempre actúa como factor represor del splicing (Blanchette and Chabot, 1999; Tange et al., 2001). Otras proteínas como las SR se ha visto que pueden actuar como factores activadores o represores dependiendo de donde se una en el pre-mRNA.

Otra proteína represora es la proteína de unión al tracto de polipirimidinas, proteína PTB. Esta proteína reconoce elementos UUCU situados en una región rica en pirimidinas. PTB está implicada en la represión de un amplio rango de exones específicos de tejidos en vertebrados (Smith and Valcarcel, 2000; Valcarcel and Gebauer, 1997; Wagner and Garcia-Blanco, 2001).

1.9.2.4 Miembros de la superfamilia de los receptores del TNF que sufren *Splicing* Alternativo

Dentro de la superfamilia del receptor del TNF existen diferentes miembros que producen receptores solubles por splicing alternativo. Un ejemplo puede ser Fas (Apo-1/CD95). Fas es una proteína transmembrana de tipo 1 que pertenece a

la familia de los receptores de TNF- α y que media apoptosis tras la unión a su ligando Fas (FasL) o anticuerpos específicos (Itoh et al., 1991; Yonehara et al., 1989). Los receptores solubles de CD95 se producen por splicing alternativo. A una forma le falta el exón que codifica el dominio transmembrana y no hay cambio en la pauta de lectura (Cheng et al., 1994). Se han descrito otros dos productos de CD95 derivados de splicing con cambios en la pauta de lectura por encima del dominio transmembrana, produciendo proteínas truncadas solubles (Cascino et al., 1996).

En el caso de CD137 (ILA/4-1BB) se han identificado dos formas de splicing que dan lugar a receptor soluble CD137 (Michel et al., 1998). El gen de CD137 se encuentra situado en el cromosoma 1p36, como el TNFR2. Se expresa en linfocitos T y B y monocitos activados y su expresión en células primarias es dependiente de activación (Schwarz et al., 1997). Posee una función reguladora de la activación, proliferación y muerte programada en linfocitos T (Schwarz et al., 1996). El cDNA de la forma más larga sufría una delección de 131 nucleótidos, los cuales codifican el segmento rico en serina/treonina/prolinas, situado en la región extracelular yuxtamembrana. La delección producía un cambio en la pauta de lectura y 96 nuevos aminoácidos, a los que le seguía un codón de parada. En el caso de la forma más corta producida por splicing, la delección comenzaba en el mismo punto pero se prolongaba incluyendo también el exón transmembrana; como consecuencia se producía un cambio en la pauta de lectura y un codón de parada tras 15 nuevos aminoácidos.

El CD40, otro miembro de esta familia, se expresa en un amplio abanico de tipos celulares, que incluyen células B, macrófagos, y células dendríticas. La

señalización a través de CD40 promueve el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células B, así como la regulación de la producción de IL-12 y el estado de activación de las células dendríticas. Tanto en humanos como en ratones, se han identificado varias isoformas de CD40 producidas por splicing alternativo. Su expresión está regulada y la isoforma más abundante, a la que le faltaba el exón 6, se caracterizaba por la falta de los dominios yuxtamembrana, transmembrana e intracitoplasmático (Tone et al., 2001).

Finalmente decir que, LARD (DR3, Wsl-1 o APO-3) se encuentra expresada predominantemente en linfocitos (T y Bs). Posee un DD (dominio de muerte), con una alta homología al DD del TNFR1 (47%). Se han descrito 11 isoformas distintas generadas por splicing alternativo. Todas excepto 4 se generan por la eliminación de uno o más exones completos. Todas excepto 1 codifican isoformas potencialmente solubles por falta del exón transmembrana, o por la aparición de un codón de parada previo al dominio transmembrana (Screaton et al., 1997). Estas isoformas se expresan principalmente en linfocitos T activados, lo que indica que LARD podría jugar un papel en la regulación de la proliferación de linfocitos.

1.10.- Implicación del TNF- α en procesos inflamatorios

Inflamación aguda: El paradigma de la Sepsis

En infecciones graves, el TNF- α se produce en grandes cantidades y causa alteraciones clínicas y patológicas sistémicas. Entre los efectos sistémicos del TNF- α está la inducción de fiebre, la estimulación de la secreción de proteínas de fase aguda por el hígado, la activación de la cascada de coagulación, la supresión de la contractibilidad miocárdial y del tono de la musculatura lisa vascular, catabolismo e hipoglucemia. Numerosos estudios han mostrado que la administración de TNF- α a animales de experimentación reproduce la respuesta inflamatoria observada en la sepsis.

Inflamación Crónica en enfermedades prevalentes

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es uno de las enfermedades autoinmunes humanas más comunes, con una prevalencia de 1% en la población mundial. Se caracteriza por una reacción inflamatoria crónica en el sinovio de las articulaciones y se asocia con una degeneración del cartílago y una erosión del hueso juxtaarticular. Muchas de las citocinas proinflamatorias entre las que se encuentra el TNF- α , quimiocinas y factores de crecimiento se expresan en las articulaciones afectadas. El TNF- α juega un papel central en la regulación de estas moléculas. El tratamiento de

poblaciones celulares extraídas de articulaciones inflamadas, con anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α , mostraron que inhibía la producción de proteínas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y GM-CSF (Brennan et al., 1989; Feldmann et al., 1996; Haworth et al., 1991). La administración de anticuerpos anti-TNF- α o de proteínas de fusión de TNFR2 soluble en modelos murinos de artritis reumatoide mostró un efecto antiinflamatorio y protector de la articulación (Thorbecke et al., 1992; Williams et al., 1992; Pigué et al., 1992).

Los ensayos clínicos multicéntricos con inhibidores de TNF- α humano (infiximab: un anticuerpo anti TNF- α quimérico, y etanercept: una proteína de fusión dimérica de la región extracelular del TNFR2) realizados en pacientes con artritis reumatoide han demostrado su consistencia y notoria eficacia en el control de los indicadores y síntomas de la enfermedad, en aproximadamente dos tercios de los pacientes y su capacidad para retardar el daño articular (Feldmann and Maini, 2001).

El síndrome metabólico y la resistencia a la insulina

La insulino-sensibilidad queda definida como el cambio en la desaparición de glucosa plasmática determinado por el cambio por unidad de concentración de insulina. Se habla de insulinoresistencia cuando se observa una respuesta biológica por debajo de lo normal a una concentración dada de insulina. Aunque los efectos de la insulina son pleiotrópicos, el término "insulino-resistencia" se refiere típicamente a las acciones de la insulina sobre la homeostasis de la glucosa. El espectro de la resistencia a la insulina es amplio, e incluye desde sujetos insulino-resistentes que mantienen glucemias prácticamente normales mediante la producción aumentada de insulina endógena a pacientes con diabetes

mellitus que requieren insulina y que persisten con hiperglucemia a pesar de grandes dosis de insulina exógena. La insulino-resistencia juega un papel evidente en determinados subgrupos de patologías altamente prevalentes como la obesidad, diabetes mellitus no insulino-dependiente, hipertensión esencial y aterosclerosis prematura, con vastas implicaciones en salud pública, por lo que la búsqueda de las causas de la insulino-resistencia es imperiosa. Se halla bien caracterizado que el envejecimiento y los factores asociados al "estilo de vida", como la ingesta de grasa saturada o de alcohol, el tabaquismo y la inactividad física, deterioran la sensibilidad a la insulina. No obstante, las variaciones en la sensibilidad insulina observadas entre diferentes etnias, y la evidencia de su transmisión familiar, sugieren que la "acción de la insulina" también se halla genéticamente determinada. Es muy probable que la insulino-resistencia sea el resultado de la interacción entre una compleja base genética y diferentes factores medioambientales.

En estudios recientes se está vislumbrando que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede desempeñar un papel importante (revisado en Fernández-Real y Ricart, 2003). El TNF- α se expresa en el tejido adiposo humano, se halla elevado en la mayoría de sujetos obesos, y su expresión se relaciona inversamente con la actividad de la lipoproteinlipasa, por lo que podría contribuir a limitar la obesidad. Además su expresión en el tejido adiposo se relaciona de forma robusta con la concentración plasmática de insulina y triglicéridos. Es bien conocido que la obesidad se asocia a insulino-resistencia e hiperinsulinemia. La pérdida de peso de los sujetos obesos conduce a una disminución de la expresión del TNF- α , paralelamente a un aumento en la insulino-sensibilidad. El TNF- α

quizás constituya un factor regulador que se sintetice en respuesta al aumento de tamaño del tejido adiposo, limitándolo a expensas de producir hiperinsulinemia.

Estudios genéticos en indios Pima han mostrado una asociación entre la cantidad de grasa corporal y un marcador próximo al locus del gen del TNF- α . También se ha encontrado que un polimorfismo del gen del TNF- α , en el que la adenina sustituye a la guanina en la posición -308, conocido como TNF2, podría determinar un mayor porcentaje de grasa corporal, acompañado de mayor resistencia a la insulina y mayores concentraciones de leptina sérica en comparación con individuos del mismo sexo, edad, índice de masa corporal y relación cintura/cadera que no lo poseen (Fernández-Real y Ricart, 2003). In vitro, este polimorfismo determina unas 6-7 veces mayor tasa de transcripción constitutiva e inducida por ácido forbol-mirístico de TNF- α en comparación con la forma TNF1. Dado que la tasa de transcripción es un importante regulador de la expresión del TNF- α , estas variaciones genéticas en las regiones reguladoras del gen del TNF- α podrían contribuir a una expresión alterada de las citoquinas en las células adiposas. El TNF- α no es un mero factor endocrino producido por el tejido adiposo y con acción sistémica. Probablemente el TNF- α interacciona con la cascada de señal inducida por la insulina en un microambiente inaccesible o intracelularmente.

Cada uno de los componentes del síndrome metabólico (obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y disminución de concentración de colesterol HDL) se asocia a alteraciones de la cascada inflamatoria y de la activación del TNF- α (Fernández-Real y Ricart, 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 1.- Identificación y caracterización de nuevas isoformas de receptor soluble de TNFR2 producido por *splicing* alternativo.**

- 2.- Determinación de las concentraciones de las isoformas del TNFR2 en el suero de sujetos sanos y pacientes con diversas patologías inflamatorias agudas y crónicas.
Estudio de su significado clínico.**

- 3.- Determinación de posibles variantes genéticas de TNFR2 asociadas a la presencia de isoforma.**

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- Material y Métodos

Clonaje y Caracterización del DS-sTNFR2

3.1.- Células

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron mediante un gradiente de densidad usando Ficoll Hystopaque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células COS-7, U937 y L929 se obtuvieron de la Colección Americana de Tejidos (Manassas, VA) y se mantuvieron en medio DMEM (Life Technologies Inc, Rockville, MD) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal inactivado (Life Technologies Inc.), 2mmol/l L-glutamina y 100U/ml Penicilina/Estreptomina (Life Technologies Inc.).

3.2.- Recolección de muestra

Las muestras de sangre periférica de los individuos estudiados se recogieron en tubos que contienen EDTA ó citrato sódico como anticoagulante. En ningún caso se utilizó heparina como anticoagulante puesto que puede inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3.- Separación de las células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de sangre anticoagulada utilizando un gradiente de densidad mediante Ficoll-Histopaque. La muestra de sangre anticoagulada diluida 1:2 con PBS, se coloca con

cuidado sobre el gradiente de Histopaque para evitar que se mezclen. Se centrifuga a 1.800 rpm durante 30 min a 22°C, habiendo quitado el freno a la centrifuga. Se recoge con una pipeta pasteur, la capa intermedia de células blancas, sin aspirar la capa inferior de ficoll. Se realiza un lavado con medio completo de estas células a 1.600 rpm ,10 min. Se resuspenden en medio para su recuento.

3.4.- Clonaje del cDNA del TNFR2 nativo y del DS-sTNFR2(Δ 7,8)

El RNA total se aisló a partir de células mononucleares de sangre periférica utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies Inc.). El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA total utilizando el kit comercial de síntesis de cDNA llamado 1st -strand cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Para la reacción de PCR, el oligonucleótido sense utilizado fue 5'-GCA CCC ATG GCG CCC GTC-3' y el oligonucleótido antisense fue 5'-CAG CCC ACA CCG GCC TGG-3'. El receptor TNFR2 nativo y el DS-sTNFR2(Δ 7,8) fueron subclonados en el vector de expresión pCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para su secuenciación se utilizó el Kit de secuenciación Big Dye Terminator (Perking Elmer, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Condiciones para la reacción de PCR

Reactivo	Volumen
Agua	Hasta 100 μ l
Tampón 10X	10 μ l
MgCl ₂ (25mM)	6 μ l
Nucleótidos (10mM)	2 μ l
Oligonucleótido 1(10 pmol/ μ l)	5 μ l
Oligonucleótido 2(10 pmol/ μ l)	5 μ l
Polimerasa	0.5 μ l
Muestra cDNA	9 μ l
Volumen final	100 μ l

3.5.- Secuenciación automática

Para la secuenciación automática de los plásmidos y/o productos de PCR de se utilizó el kit comercial Big Dye Terminator v3.0 y v3.1.

Reactivo	Concentración/ Cantidad	Volumen
Premezcla preparada de reacción BigDye		4 μ l
Tampón de secuenciación Big Dye		2 μ l
Primer	1 μ M	3.2 μ l
DNA molde: - doble cadena - producto de PCR	150-300 ng 10-40ng	3 μ l
Agua		7.8 μ l
Volumen final		20 μ l

La reacción se llevó a cabo en un termociclador tipo Gene Amp PCR System, 2400, con el siguiente programa:

	desnaturalización: 96°C durante 1 minuto
25 ciclos de:	desnaturalización: 96°C durante 30 segundos
	anillamiento: 50°C durante 15 segundos
	extensión: 60°C durante 4 minutos
	enfriamiento: 4°C

3.6.- Purificación de los productos de secuenciación

Los productos de secuenciación se limpiaron de terminadores no incorporados utilizando la precipitación con Etanol/EDTA. Para precipitar 20 µl de reacción se añaden 5 µl de 125mM EDTA y 60 µl de Etanol 100% a cada muestra, se mezcla bien y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 10.000g durante 15 minutos y eliminar el sobrenadante, se realiza un lavado con 250 µl de etanol 70%, y se centrifugar durante 5 minutos a 10.000 g, se retira el sobrenadante y se deja secar protegido de la luz. Este precipitado se envía al Servicio de Secuenciación de DNA de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona ó al Servicio de Secuenciación de DNA del Hospital Clínico de Barcelona, para la realización de la electroforesis y análisis de la secuencia.

3.7.- Comparación de las secuencias

Se utilizó el programa BLAST, opción blastn, para la comparación nucleotido-nucleótido de las secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.8.- Determinación cualitativa de DS-sTNFR2 mediante RT-PCR

El RNA total se aisló a partir de células mononucleares de sangre periférica utilizando el kit comercial Rnasy Mini Kit de Qiagen. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR fueron:

Oligo sense LC1: 5'-CGTTCTCCAACACGACTTCA-3'

Oligo antisense LC1: 5'-CTTATCGGCAGGCAAGTGAGG-3'

Los reactivos de la PCR, excluyendo los oligonucleótidos, formaban parte del kit LightCycler Master SYBR Green (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). La mezcla de reacción de la PCR fue la siguiente:

Reactivo	Volumen
Agua	10.6 μ l
Mezcla de reacción SYBR Green (Roche) contiene 1.5 mM MgCl ₂	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.4 μ l
Oligonucleótido LC1 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Oligonucleótido LC2 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
DMSO	1 μ l
cDNA	2 μ l
Volumen final	20 μ l

La reacción se llevó a cabo en un termociclador tipo Light Cycler (Roche), con el siguiente programa:

	desnaturalización: 95°C durante 5 minutos
55 ciclos de amplificación	desnaturalización: 95°C durante 10 segundos
	anillamiento: 63°C durante 5 segundos
	extensión: 72°C durante 10 segundos
	adquisición de fluorescencia: 84°C durante 2 segundos
ciclo de melting	95°C durante 5 segundos
	65°C durante 15 segundos
	De 70 a 95°C subiendo a 0.1°C/seg y medida continua de la fluorescencia
	enfriamiento: 40°C 30 segundos

El SYBR-Green se une específicamente a las dobles cadenas de DNA. Los productos de amplificación pueden visualizarse por un aumento de fluorescencia. El análisis de las curvas de melting se realizó mediante software del LightCycler.

3.9.- Expresión del DS-sTNFR2 ($\Delta 7,8$)

Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente, utilizando el reactivo Lipofectamina plus (Life Technologies Inc.), con 4 μ g de vector pCR3.1 vacío ó con 4 μ g de pCR3.1 que contenía el cDNA nativo de TNFR2 o el de

DS-sTNFR2(Δ 7,8). Tras 24 horas, las células transfectadas se transfirieron sobre cubres de cristal estéril en placas de cultivo de 6 pocillos (Costar, High Wycombe, UK). En determinados experimentos las células COS se trataron durante 4 horas (37°C, 5%CO₂), con 1 µg/ml de Brefeldina-A, un inhibidor del transporte proteico (Beckton Dickinson, San Jose, CA).

El análisis de inmunocitoquímica se llevó a cabo utilizando inmunofluorescencia indirecta. Brevemente, las células se lavaron una vez con PBS (2%FCS), se incubaron con solución bloqueante (3% BSA, 10% FCS en PBS) durante 30 minutos y se marcaron con un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado que reconocía el TNFR2 humano [anti- CD120b, clone 4D1B10 (MR2-1), IgG1] (Caltag, Burlingame, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS (2% FCS) durante 5 minutos, se incubaron las células con estreptavidina-indocarbocianina, Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de su lavado, las células se fijaron con metanol (enfriado a -20°C) durante 15 minutos. Los cubreobjetos con la células, se colocaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje y se examinaron utilizando un microscopio Nikon Optiphot-2 (Nikon, Kingston upon Thames, UK). Las fotomicrografías se tomaron con objetivos de 20x y 40x. La tinción citoplasmática se realizó previo tratamiento con metanol (enfriado a -20°C) durante 15 minutos para permitir la fijación y permeabilización de las células y a continuación se procedió como en la tinción de membrana. Se utilizó una IgG de ratón como control negativo.

3.10.- Detección de TNFR2 soluble en el sobrenadante de células en cultivo

Dos días después de la transfección de las células COS-7 con el cDNA del TNFR2 nativo o con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8), las células se lavaron y se incubaron con medio solo o con 50ng/ml de PMA durante diferentes tiempos. Se recogieron los sobrenadantes a los 30 min y a las 12 horas. Las células mononucleares de sangre periférica y las células U937 (5×10^6 /ml) se incubaron con o sin PMA (10 ng/ml) durante 24 horas a 37°C. Los sobrenadantes se recogieron, se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos y almacenados a -80°C.

3.11.- Inmunoprecipitación e inmunotransferencia de la Isoforma DS-sTNFR2

Las células transfectadas con el cDNA de TNFR2 nativo o con el de DS-sTNFR2 (Δ 7,8) se lavaron una vez con tampón PBS y se lisaron con 1 ml de tampón de lisis que contenía 1% (vol/vol) Nonidet P-40 (NP40) e inhibidores de proteasas (Complete de Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) . La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando 5 μ g de anticuerpo monoclonal. Los lisados celulares se prelavaron una vez durante 30 min utilizando bolas de Sefarosa recubiertas de proteína A, y dos veces durante 30 minutos, utilizando 40 μ l (50% vol/vol) de estas bolitas de sefarosa recubiertas con una inmunoglobulina murina. El lisado prelavado se incubó posteriormente con 40 μ l de bolitas de sefarosa recubiertas con un anticuerpo de ratón contra el CD120b humano o con bolitas recubiertas de una inmunoglobulina de ratón

del mismo isotipo como control negativo y se mantuvo en rotación constante a 4 °C durante 18 horas en noria giratoria. Los inmunoprecipitados se lavaron y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se corrieron en condiciones reductoras en presencia de β -mercaptoetanol a 80-100 V. El peso molecular se determinó utilizando marcadores de peso molecular coloreados (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las proteínas se transfirieron a una membrana de poliviniliden difloruro (PVDF) (Immobilon, Millipore, Boston, MA) durante 1 h a 100 V fijado el límite de amperaje máximo. Posteriormente, la membrana se incubó con solución bloqueante (3% de leche en polvo desnatada en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y tras un lavado con solución salina con 0,2 % de Tween-20 (PBS-T) se incubó con un anticuerpo de conejo contra CD120b humano (Monosan, Uden, The Netherlands) a una concentración de 1 μ g/ml en PBS-T. Después de 3 lavados de 5 minutos con PBS-T, la membrana se incubó con un anticuerpo contra conejo conjugado con HRPO (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, England) durante 30 minutos. La membrana se lavó como en el paso anterior y se reveló utilizando un substrato quimioluminiscente llamado, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL). La señal fue captada en películas de autoradiografía (Kodak).

3.12.- Ensayo de citotoxicidad del TNF- α

Para realizar el ensayo de citotoxicidad inducida por TNF- α se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón, L929. Las células se plaquearon a una

densidad de 3×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se trataron con 8 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D y se incubaron con diferentes concentraciones de TNF- α (0.1 y 1 ng/ml) (Sigma) en presencia de sobrenadante derivado de células COS transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2($\Delta 7,8$) o con el vector vacío. Después de 18 horas en un incubador a 37°C, 5%CO₂ las células se lavaron con PBS y se tiñeron con una solución de 0.05% de cristal violeta y 20% de etanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con agua fría y su secado durante la noche a temperatura ambiente, se añadió 100 μl de metanol a cada pocillo y se determinó la absorbancia a 595 nm. Se calcularon los porcentajes de la supervivencia celular mediante la fórmula:

$100 \times (\text{D.O.muestra} - \text{D.O.lisis máxima}) / (\text{D.O.medio control} - \text{D.O.lisis máxima})$, donde D.O.muestra es la Densidad Óptica ó absorbancia de la muestra. La D.O.lisis máxima se consiguió tratando las células con SDS y la D.O.medio control se obtuvo tratando las células con actinomicina D pero sin TNF.

3.13.- Producción de un anticuerpo monoclonal contra DS-sTNFR2

Ratones BALB/c se inmunizaron 3 veces, a intervalos de 2 semanas, con un péptido de 14 residuos (**PMGPSPPAEGSTGD**) conjugado con KLH. Este péptido sintético correspondía a la secuencia de la región extracelular próxima a la membrana del receptor TNFR2 y lo sintetizó el Servicio de Síntesis Péptidos de la Facultad de Químicas de la Universidad de Barcelona.

La primera inyección intraperitoneal consistía en 30 µg de péptido conjugado en 200 µl de PBS mezclado con 200 µl de adyuvante de Freund completo. La segunda inyección intraperitoneal consistía en 30 µg de péptido conjugado en 200µl de PBS y 200 µl de adyuvante de Freund incompleto. La dosis final consistía en una inyección intravenosa de 30 µg de péptido conjugado en 100 µl de PBS y sin adyuvante. Los ratones fueron sacrificados tres días después de la inmunización final. Las células del bazo de los animales sacrificados se fusionaron con células del mieloma NS-1 (Colección europea de cultivos celulares (ECCC), Salisbury, Wiltshire, UK) utilizando una solución de polietilenglicol (Sigma). Las células fusionadas se repartieron a razón de 1-2 células por pocillo. Tras 12 días, se comenzó a testar el sobrenadante de los pocillos. Se testaron 650 sobrenadantes de pocillos que contenían hibridomas mediante la técnica de ELISA. Para ello los pocillos de las placas de 96 pocillos eran recubiertos con 100 µl de péptido a una concentración de 4µg/ml en PBS, en una incubación durante la noche a 4°C. Tras un lavado con PBS-T (0.05% de Tween-20 en PBS), la placa se bloqueó con 250 µl de PBS con 2% de BSA durante 1 hora a 37°C. Los sobrenadantes diluidos 1:2 en PBS con 2% de BSA se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales unidos al péptido de la placa, se detectaron con un anticuerpo monoclonal contra ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) y la reacción se reveló mediante el substrato OPD (Sigma). Los hibridomas positivos fueron subclonados mediante dilución limitante. Los anticuerpos monoclonales fueron purificados con una columna de proteína A (Bio-Rad) a partir de sobrenadante concentrado obtenido del cultivo del hibridoma en frascos INTEGRA CL 350

(Integra Biosciences AG, Switzerland). Los anticuerpos monoclonales purificados se dializaron frente a un tampón salino (PBS), se midió su concentración, se alicuotaron y se almacenaron a -30°C. El isotipo de los anticuerpos se determinó utilizando un kit comercial de isotipaje de anticuerpos monoclonales de ratón (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

3.14.- Detección del TNFR2 soluble mediante ELISA

cuantitativo

El TNFR2 soluble se detectó mediante el ELISA denominado s-TNF-R (80KDA) Human ELISA Module Set (Bender MedSystems, Vienna, Austria). En resumen, cada pocillo de la microplaca se recubrió con 100 µl de un anticuerpo comercial dirigido contra TNFR2, se incubó durante la noche a 4°C, se bloqueó y se hizo reaccionar con 100 µl de suero diluido 1:10 ó 1:5 en PBS al 2% de BSA. La proteína unida se detectó con un anticuerpo monoclonal contra el TNFR2 humano, conjugado con HRPO. La reacción se reveló con un substrato cromogénico, tetrametilbencidina (TMB), y el desarrollo de color se detuvo con ácido sulfúrico 4N. La absorbancia se midió a 450nm.

3.15.- Detección de TNFR2 soluble generado por splicing

alternativo, mediante ELISA cuantitativo

Las concentraciones de proteína soluble producida por splicing alternativo, DS-sTNFR2, se determinaron utilizando una versión modificada del kit sTNF-R (80KDA) human ELISA module set (Bender MedSystems), descrito en el apartado anterior. El anticuerpo monoclonal anti-TNFR2 producido en este

estudio (clon 572) se utilizó como anticuerpo de captura a una concentración de 5µg/ml. La proteína soluble DS-sTNFR2 se detectó con un anticuerpo monoclonal contra el TNFR2 humano conjugado con peroxidasa proporcionado con el kit. Se pudo utilizar el mismo standard de kit comercial como estándar de este elisa puesto que el standard, que consistía en la parte extracelular completa del receptor de TNFR2 (del aminoácido 1 al 235) incluía la región que reconocía el anticuerpo monoclonal clon 572, comprendida entre el aminoácido 222 y 235.

La sensibilidad de los dos ELISAS era similar: 0.15 ng/ml el comercial y 0.25 ng/ml el ELISA desarrollado en este estudio. Puesto que el suero estaba diluido 1/5, el límite de detección fueron 0.75ng/ml y 1.25 ng/ml respectivamente.

3.16.- Sujetos

En este primer estudio se han utilizado muestras de suero obtenidas de voluntarios sanos, pacientes con sepsis y pacientes con artritis reumatoide.

Los sujetos sanos eran de origen caucásico; no habían tomado ninguna medicación ni habían sufrido ninguna enfermedad sistémica o infección en los 3 meses previos al estudio. Se analizaron 145 muestras de voluntarios sanos (93 hombres y 52 mujeres) con una media de edad de 39.7 ± 11.7 años, rango 19-69 años.

El número de pacientes con sepsis fue de 30 (21 hombres y 9 mujeres), con una edad media de 61.4 ± 23.1 , rango 1-86 años. El número de pacientes con artritis reumatoide fue de 39 (9 hombres y 30 mujeres) con una edad media de 52.2 ± 15.7 años, la duración media de la enfermedad fue de 9.5 ± 6.5 meses;

el factor reumatoide fue positivo en un 78.3% de los casos; HLA-DRB1-04 50%; enfermedad erosiva en un 21.7%. Estos pacientes fueron diagnosticados según los criterios de la American College of Rheumatology (ACR) para artritis reumatoide. Tanto el Comité ético del Hospital Josep Trueta de Girona, (en el caso de sujetos controles y pacientes con sepsis), como el del Hospital Clinic de Barcelona (en el caso de pacientes con artritis) aprobaron el protocolo. Se obtuvo el consentimiento firmado de cada uno de los sujetos sometidos a estudio y las muestras se obtuvieron de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki.

3.17.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las muestras de suero se expresaron como media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante el test ANOVA seguido de un análisis posterior utilizando la corrección de Dunn o Bonferroni. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$.

Estudio de DS-sTNFR2 y resistencia a la insulina

3.18.- Sujetos del Estudio de DS-sTNFR2 y resistencia a la insulina

Se estudiaron 568 individuos de raza caucásica, de tres áreas geográficas diferentes. Se fenotiparon extensivamente a través del análisis de la prueba de la tolerancia oral a la glucosa (TOG) y de sensibilidad a la insulina (técnica del *clamp* y del modelo mínimo, ver más adelante). Todos los sujetos no diabéticos tenían una glucosa plasmática en ayunas < 7.0 mM y una glucosa en plasma a las dos horas de la TOG <11.1 mM tras 75g de glucosa oral. La tolerancia a la glucosa y la diabetes de tipo 2 se diagnosticó de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes. Los pacientes diabéticos se incluyeron si su control metabólico, (definido por el valor de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})) había permanecido estable en los 6 meses previos y cumplían con los mismos criterios de inclusión para los sujetos sanos: 1) Índice de masa corporal (BMI)<40 kg/m², 2) ausencia de enfermedad sistémica, y 3) ausencia de infección en el mes previo. Ninguno de los sujetos control estaba bajo medicación o tenía evidencia de enfermedad metabólica aparte de obesidad. Todos los sujetos dieron su consentimiento firmado. El comité ético de las instituciones participantes aprobó el protocolo.

3.19.- Medidas antropométricas y clínicas

El índice de masa corporal (definido como el cociente entre el peso (kg) y la altura (m²), y la relación cintura/cadera, se calcularon en todos los sujetos. El porcentaje de grasa corporal, masa grasa y masa libre de grasa (FFM) se obtuvieron mediante el análisis de la impedancia bioeléctrica utilizando un analizador de la grasa corporal Tanita TBF-511 (Tanita Corp., Tokyo, Japan). Eran considerados fumadores los sujetos que fumaban al menos 1 cigarrillo al día en los 6 meses anteriores al comienzo del estudio.

3.20.- Estudio de la sensibilidad a la insulina

El índice del modelo homeostático de evaluación (HOMA) se calculó aplicando la fórmula $HOMA = \text{glucosa en ayuno (mmol/L)} \times \text{insulina en ayuno (mU/L)} / 22.5$.

HOMA correlaciona fielmente con el índice de la sensibilidad a la insulina (S_I) derivado del modelo mínimo ($r=0.79$, $p<0.0001$) (Fernandez-Real et al., 1999).

La sensibilidad a la insulina se realizó utilizando el test de la tolerancia a la glucosa intravenosa, con toma frecuente de muestras (Fernandez-Real et al., 1999) en la población del mediterránea de España. En la población del Centro de Europa, se utilizó la técnica del *clamp* (hiperinsulinémico euglicémico) de acuerdo con DeFronzo et al. (DeFronzo et al., 1979). La media de la glucosa infundida entre 80 a 120 minutos y normalizada para la masa libre de grasa fue el parámetro de acción de insulina (M) que se utilizó. Las muestras de sangre para la determinación de la forma soluble DS-sTNFR2 de nuestro estudio se recogió antes y después del *clamp* y el suero se congeló a -70°C.

La puntuación marcada por la NCEP (Programa de Educación Nacional sobre Colesterol, en inglés) se generó de acuerdo a la referencia Ford et al., 2002 para la definición de síndrome metabólico. Se otorgó un valor arbitrario de 0 a 1 a cada sujeto dependiendo de la ausencia (0) o presencia (1) de: diámetro de la cintura >102 cm en hombres ó 88 cm en mujeres; hiperglucemia (>110 mg/dl); triglicéridos en ayunas >150mg/dl; presión arterial sistólica y diastólica >130/85; y colesterol HDL < 40mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres.

3.21.- Métodos analíticos

La concentración de glucosa en suero se determinó por duplicado por el método de la glucosa oxidasa utilizando un analizador de glucosa Beckman II (Beckman Instruments, Brea, California). En las muestra del centro de Europa la glucosa se determinó inmediatamente utilizando un analizador de la glucosa YSI2300 STAT Plus (YSI Incorporates, Yellow Springs, Ohio). El colesterol sérico total se midió mediante la reacción de colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa. El colesterol HDL se cuantificó después de su precipitación con polietilen glicol a temperatura ambiente. Los triglicéridos sérico totales se determinaron mediante la reacción de glicerol-fosfatasa-oxidasa y peroxidasa. EL ácido úrico se determinó mediante ensayos rutinarios de laboratorio. En los sujetos del norte atlántico español y en los sujetos del centro de Europa, HbA1c se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (Bio-rad, Muenchen, Alemania) y autoanalizador Jokoh HS-10, respectivamente) y la proteína C reactiva sérica se midió mediante un ELISA (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas). Las concentraciones de insulina sérica durante

el FSIVGT (traducción) se midió en duplicado mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA, Medgenix Diagnostics). Los receptores solubles de TNFR1 y TNFR2 se analizaron utilizando Inmunoensayos (EASIA™) (BioSource Europe S.A, Zoning Industriel B-6220, Fleunes, Belgica). La adiponectina plasmática se midió con un radioinmunoanálisis (LINCO Research Inc. St Charles, Missouri). La forma DS-sTNFR2 de este estudio se midió mediante el ELISA específico generado descrito en el capítulo anterior.

3.22.- Métodos estadísticos

Los resultados descriptivos de variables continuas se expresaron como media \pm SD. Los parámetros que no siguieron la distribución normal (SI, triglicéridos, sTNFR2, DS-sTNFR2 y adiponectina) fueron transformados logarítmicamente. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de ANOVA seguido de la corrección de Dunn o Bonferroni según fuera conveniente. Las relaciones entre variables se analizaron por la t de Student para muestras no apareadas, correlación simple (prueba de Pearson y Spearman) y regresión múltiple. La significación estadística se estableció para una $p < 0.05$.

Estudio del receptor soluble producido por splicing alternativo DS-sTNFR2, en pacientes con artritis reumatoide

3.23. Estudio de las regiones limítrofes intrón-exón del TNFR2 implicadas en el splicing alternativo de los exones 7 y 8.

El estudio de las secuencias intrón- exón, se realizó, a partir de DNA genómico, mediante la amplificación por PCR de las zonas intrón exón del receptor de TNFR2 y su posterior secuenciación.

El DNA se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica aisladas mediante un gradiente de Ficoll. El DNA se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), basado en una versión mejorada del método Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987), y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las zonas limítrofes intrón- exón estudiadas, fueron: Intrón 5-exón 6; exón 6-intrón 6; intrón 6-exón 7; exón 7-intrón7; intrón 7-exón 8; exón 8-intrón 8; intrón 8-exón 9.

Para ello se diseñaron 3 pares de cebadores que amplificaban tres regiones diferentes que comprendían a estas zonas de estudio. Los cebadores fueron los siguientes:

P1: 5'-TCT CCA ACA CGA CTT CAT CCA C -3'

P2: 5'-ACA GGC AGA CAG AAG GAG TG -3'

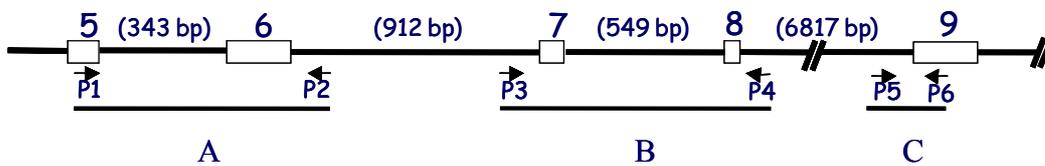
P3: 5'-TGG GTC CTG GCT TGC TGG CT -3'

P4: 5'-CGG GAA GGA GAC CAG GGG AA-3'

P5: 5'-TGG CTG GTG GGC TGA CTG CT-3'

P6: 5'-GCC CTT CTG TCC AAC GCA CTG-3'

Se denominó fragmento A, al obtenido con los oligos P1 y P2. Este fragmento comprendía desde mitad del exón 5 a principios del intrón 6 y tenía un tamaño de 667pb. Se denominó fragmento B, al obtenido con los oligos P3 y P4. Este fragmento comprendía desde finales del intrón 6 a principios de intrón 8 y tenía un tamaño de 794pb. Por último, se denominó fragmento C, al obtenido con los oligos P5 y P6. Este fragmento comprendía la zona próxima circundante a la intersección intrón 8-exón 9 y tenía un tamaño de 172pb.



Esquema del DNA genómico mostrando las regiones secuenciadas A, B y C.

La mezcla de reacción de PCR contenía

Agua	70,5 µl
Tampón 10X	10 µl
MgCl ₂ (25mM)	6 µl
Nucleótidos (10mM)	2 µl
Primer 1 ó 3 ó 5 (10µM)	5 µl
Primer 2 ó 4 ó 6 (10µM)	5 µl
Taq	0,5 µl
DNA genómico 100ng	2µl

Los programas de PCR fueron los siguientes, según los fragmentos a obtener:

A y B	C
95°C 3'	95°C 3'
95°C 30" } 65°C 30" } 72°C 45" } x 32	95°C 30" } 65°C 30" } 72°C 30" } x 32
72°C 10'	72°C 10'
4°C ∞	4°C ∞

3.24.- Determinación del polimorfismo 196M/R mediante restricción enzimática.

La determinación del polimorfismo 196M/R se realizó mediante restricción enzimática con NlaIII (New England Biolabs, UK) de un producto de PCR. El producto de PCR utilizado fue el fragmento A del apartado anterior. La restricción se llevó a cabo a 37°C durante dos horas. Los productos de la restricción se separaron en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. El alelo 196M (ATG) posee un punto de corte para NlaIII que se pierde en el 196R (AGG). El patrón de restricción esperado para cada genotipo se muestra en el esquema.

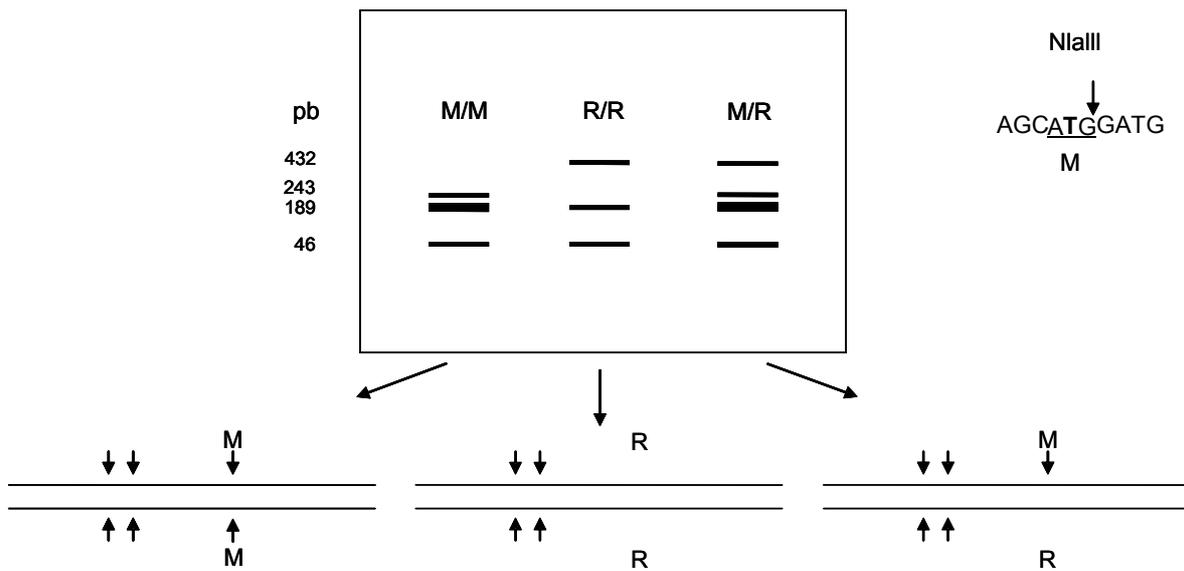


Figura 6. Esquema del patrón de restricción enzimática para la determinación del genotipo 196M/R

ESTUDIO DEL SIGNIFICADO CLÍNICO DE DS-sTNFR2 EN ARTRITIS REUMATOIDE

3.25.- Pacientes

El grupo de los pacientes con artritis reumatoide que participó en el estudio genético poseía las características principales siguientes: una duración media de la enfermedad de 12 ± 8 meses (media \pm ds), edad 58 ± 15 años; 80% mujeres y el 85% con factor reumatoide.

Los pacientes de artritis reumatoide de los estudios de respuesta a tratamiento fueron :

Grupo I, el cual incluía 52 pacientes con artritis reumatoide de reciente comienzo que no habían recibido tratamiento con fármacos antireumáticos

FAME. La edad media era 56 ± 13.5 años (media \pm desviación estandar), 52 (83 %) eran mujeres, 42 (81%) tenían positivo el factor reumatoide y la media de la duración de la enfermedad era de $8,5 \pm 6,2$ meses. Fueron tratados de acuerdo con un algoritmo terapéutico que comenzaba con sales de oro intramuscular y en el caso de no haber respuesta o si aparecían efectos adversos, se añadía o cambiaba a metotrexato.

Grupo II, formado por 28 pacientes de artritis reumatoide cuyas características principales eran: una duración media de la enfermedad de 166 ± 125 meses (media \pm ds), edad 55 ± 14 años; 96% mujeres; 79% Factor reumatoide +; 93% con enfermedad erosiva. Se incluyeron en el estudio antes de iniciar la terapia anti TNF- α con infliximab, de acuerdo con el consenso sobre el uso de terapias biológicas en artritis reumatoide de la Sociedad Española de Reumatología (SER). Todos los pacientes recibieron metotrexato (dosis media 17,5 mg/semana) e infliximab (en infusión endovenosa) a la dosis de 3 mg/kg a la semana 0, 2, 6, 14, 22 y 30.

3.26.- Definiciones de los parámetros utilizados en la artritis reumatoide

La evaluación de la actividad de la artritis reumatoide se apoya en la valoración de un conjunto de parámetros que incluyen: dolor e inflamación articular, dolor global evaluado por el paciente, afectación global de la enfermedad efectuada por el médico y el paciente, capacidad funcional física,

reactantes de fase aguda y evaluación del daño radiológico. A continuación se definen los diferentes parámetros utilizados en este estudio.

Medida del daño radiológico de la articulación

Índice modificado de Larsen. Tiene en cuenta la aparición de lesiones del cartílago y huesos articulares que llevan al pinzamiento de la articulación y a las erosiones (Kirwan et al., 2000). Es la media de la suma de la valoración de **32** articulaciones. Se valoran como grado 0,1,2,3,4 hasta grado 5 según una escala que va desde la articulación normal (0) hasta destrucción de la articulación (5).

Cuantificación de la actividad de la enfermedad

Número de articulaciones inflamadas (28). Se incluyen 28 articulaciones localizadas en manos, rodillas, cadera y codos. Se puntúa 1 ó 0 según esté o no inflamada la articulación.

Número de articulaciones dolorosas (28). Las mismas articulaciones del apartado anterior se puntúan 1 ó 0 según duelan o no al aplicarles una presión moderada.

Dolor VAS. El dolor de la articulación se mide mediante una escala visual análoga en mm cuyo valor está comprendido entre 0 (no hay dolor) y 100 (máximo dolor) (Scott et al., 1970)

Valoración global de la enfermedad por el médico y valoración global de la enfermedad por el paciente. Se realiza mediante la misma escala visual

análoga del apartado anterior con los extremos indicando muy bien (0) o muy mal (100).

Cuestionario para la valoración de la capacidad funcional física (mHAQ)

Es un cuestionario con 20 preguntas referentes a actividades diarias. Cada pregunta puntúa de 0 a 3 según se pueda realizar la actividad sin dificultad (0), con alguna dificultad (1), con gran dificultad (2), o exista incapacidad para realizarla (3). El valor promedio es el valor mHAQ (Pincus et al., 1983).

Medida de la actividad de la enfermedad (DAS28). El DAS28 es un índice combinado que tiene en cuenta el número de articulaciones dolorosas, el número de articulaciones inflamadas, la velocidad de sedimentación globular y la valoración global del paciente. Mediante una fórmula compleja se obtiene un valor comprendido entre 0 y 10, siendo 10 el valor de máxima actividad de la enfermedad.

Respuesta terapéutica DAS28. Es el criterio de respuesta terapéutica de la European League Against Rheumatology (EULAR). Para considerar que existe respuesta terapéutica tiene en cuenta no sólo la mejoría del paciente (expresado como la diferencia entre valor inicial y final de la actividad de la enfermedad) sino también el valor final de la actividad de la enfermedad.

Proteína C reactiva (PCR). Es un reactante de fase aguda. Se encuentra elevado en artritis reumatoide y su persistencia se asocia a mal pronóstico.

Velocidad de sedimentación globular (VSG) Es un marcador de fase aguda. Las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF- α e IL-6 en particular, incrementan la producción de proteínas plasmáticas como son la proteína C reactiva y el

fibrinógeno entre otras. A mayor concentración proteica plasmática, mayor velocidad de sedimentación de los eritrocitos.

Factor reumatoide: Son autoanticuerpos, normalmente IgMs contra la región Fc de la Inmunoglobulina IgG humana. Esta presente en el 80% de los pacientes con artritis reumatoide. Identifica un subgrupo de pacientes con peor pronóstico.

Anticuerpos anti peptido citrulinado (Anti- CCP). Son anticuerpos que se unen específicamente a péptidos que contienen el aminoácido citrulina, un residuo de arginina modificado. Es una prueba muy específica (97%) para artritis reumatoide.

Marcadores de destrucción articular

Factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF El proceso de neovascularización en AR implica a citocinas angiogénicas tales como el VEGF, un mitógeno específico endotelial que promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Colville-Nash et al.,1992) y aumenta la permeabilidad vascular (Ferrara et al., 1991).

MMP1 y MMP3. La destrucción del cartílago característico de la AR se debe principalmente a la actividad de unas enzimas conocidas como metaloproteasas de la matriz (MMPs), las cuales son sintetizadas por macrófagos activados y fibroblastos en respuesta a citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α y IL-1.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.- Clonaje del cDNA de DS-sTNFR2 (Δ 7,8)

A partir de RNA de células mononucleares de sangre periférica y utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar la forma nativa del TNFR2 mediante RT-PCR, se clonó una variante de un tamaño menor al esperado. Después de secuenciarla se observó que esta isoforma de TNFR2 más corta, se caracterizaba por la delección de 113 pares de bases (pb). Estas bases delecionadas comprendían desde el nucleótido 788 al 900 de la secuencia del cDNA del TNFR2 completo (figura 7A). Sorprendentemente, estas 113 pb delecionadas coincidían exactamente con la secuencia de los exones 7 y 8 del TNFR2 (Figura 7B). Esta delección produjo un cambio en la pauta de lectura, lo que llevó a la aparición de un nuevo codón de parada tras 6 nuevos aminoácidos (ASLACR). Así pues, como resultado de esta delección teníamos un cDNA que codificaba una proteína de TNFR2 con la misma región extracelular y con los 5 primeros (de los 30) aminoácidos del dominio transmembrana seguidos de 6 aminoácidos nuevos como extremo C terminal. (Figura 7B). Este producto generado por splicing diferencial era probable que codificara una isoforma soluble de TNFR2. Así pues, se llamó a esta isoforma, TNFR2 soluble producido por splicing diferencial de los exones 7 y 8. En inglés: Differential Splicing soluble TNFR2 (DS-sTNFR2 Δ 7,8).

A

```

... AGC CCC CCA GCT GAA GGG AGC ACT GGC GAC
TNFR2      S P P A E G S T G D
DS-sTNFR2(Δ7,8) S P P A E G S T G D

TTC GCT CTT CCA GTT GGA CTG ATT GTG GGT
TNFR2      F A L P V G L I V G
DS-sTNFR2(Δ7,8) F A L P V

GTG ACA GCC TTG GGT CTA CTA ATA ATA GGA
TNFR2      V T A L G L L I I G

GTG GTG AAC TGT GTC ATC ATG ACC CAG GTG
TNFR2      V V N C V I M T Q V

AAA 7/8 AAG AAG CCC TTG TGC CTG CAG AGA GAA
TNFR2      K K K P L C L Q R E

GCC 8/9 AAG GTG CCT CAC TTG CCT GCC GAT AAG ...
TNFR2      A K V P H L P A D K
DS-sTNFR2(Δ7,8) A S L A C R *

```

B

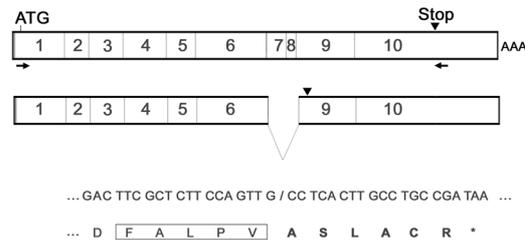


Figura 7.- Secuencia del cDNA de DS-sTNFR2(Δ7,8) producida por splicing diferencial. **A)** secuencia parcial de la forma producida por splicing diferencial del TNFR2 o DS-sTNFR2(Δ7,8) (número de acceso AY148473), comparada con la forma nativa del TNFR2 (número de acceso M32315). Los nucleótidos delecionados están en negrita. Los exones se indican con un número sobre la secuencia de cDNA. Los límites de los exones están deducidos de la secuencia genómica de TNFR2 (número de acceso U52165). El dominio transmembrana está encuadrado y el codón de parada se indica por un asterisco. **B)** Diagrama del cambio en la pauta de lectura producido por el splicing alternativo. Los primers usados se indican mediante flechas. También se indican el codón de inicio (ATG) y el codón de parada. Los 6 nuevos aminoácidos producidos se indican en negrita.

4.2.- DS-sTNFR2(Δ 7,8) codifica un receptor soluble

Para estudiar el producto de traducción del cDNA de la isoforma DS-sTNFR2(Δ 7,8), se midieron las concentraciones de TNFR2 soluble en el sobrenadante de células COS transfectadas (Figura 8). Se detectó receptor soluble de TNFR2 en el sobrenadante de células transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8) pero no en el sobrenadante de las células transfectadas con el cDNA del TNFR2 nativo (Figura 8). Sólo después del tratamiento con el PMA (ester de forbol inductor del shedding), se pudo detectar receptor soluble en el sobrenadante de las células transfectadas con el cDNA del receptor nativo. El PMA no afectó las concentraciones de TNFR2 soluble en las células transfectadas con DS-sTNFR2(Δ 7,8). Estos resultados mostraron que la proteína que codificaba el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8) no era retenida en la membrana plasmática, como la forma nativa de TNFR2, sino que era secretada directamente al medio extracelular.

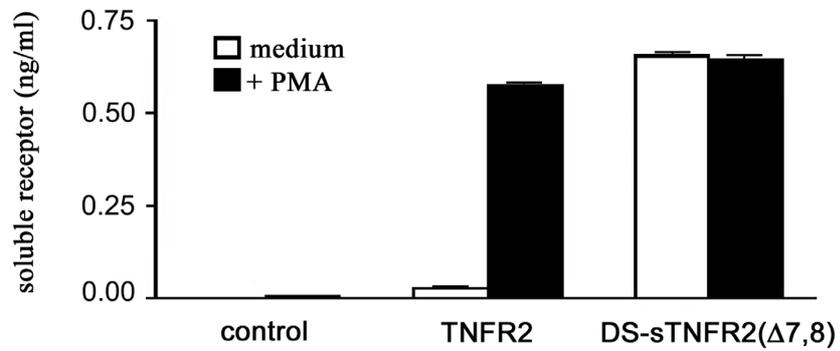


Figura 8. Niveles de receptor soluble de TNFR2 (sTNFR2), detectado en el sobrenadante de células transfectadas. Se testaron, mediante un ELISA para sTNFR2, los sobrenadantes de células COS-7 transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8), TNFR2 o con el vector sin inserto y tratadas (■) o sin tratar con PMA(□).

4.3.- Detección Inmunocitoquímica de DS-sTNFR2 (Δ 7,8) en células transfectadas

El análisis inmunocitoquímico de las células COS transfectadas con el cDNA del TNFR2 nativo reveló una intensa tinción tanto en la membrana celular, como en el citoplasma. No fue así en el caso de las células transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2 (Δ 7,8), cuyo marcaje era prácticamente inexistente. Sin embargo, cuando las células se pretrataron con Brefeldina A (inhibidor del transporte de proteínas), también se pudo detectar el receptor de TNF en estas células transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8) (Figura 9).

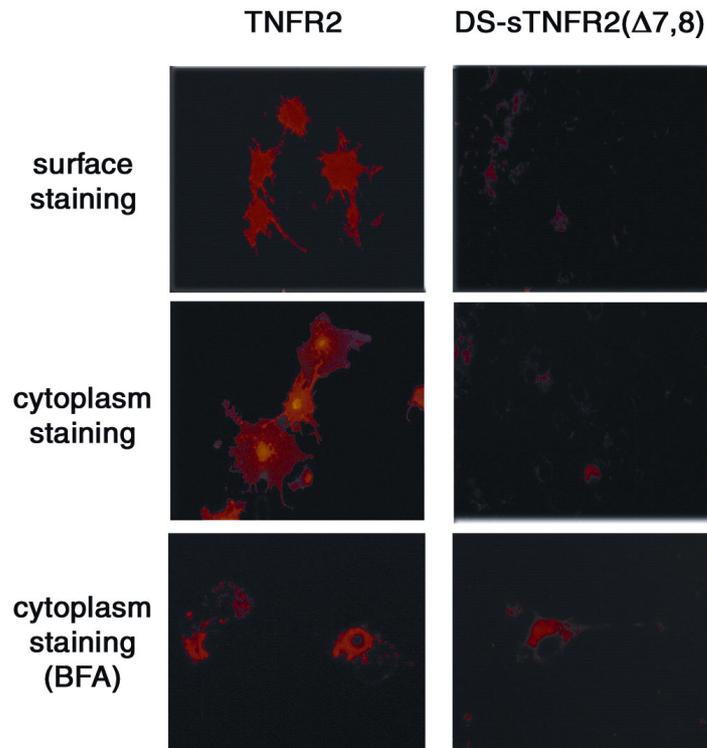


Figura 9.- Immunocitoquímica del TNFR2 de células transfectadas. Las células COS-7 se transfectaron con el cDNA de TNFR2 (paneles de la izquierda) o con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8) (paneles de la derecha). Para el marcaje de membrana (paneles superiores), las células transfectadas se detectaron con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-TNFR2 dirigido contra el dominio extracelular, y revelado con el fluorocromo Cy-3 conjugado con avidina. Para el marcaje intracelular (panel intermedio e inferior), las células se fijaron y permeabilizaron antes del marcaje. En los paneles inferiores, las células se pretrataron con Brefeldina-A (BFA) durante 4 horas antes de realizar la tinción. Las fotos mostradas se obtuvieron mediante microscopía confocal.

Además, la proteína codificada por el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8) se inmunoprecipitó a partir de extractos de células COS transfectadas y tratadas con Brefeldina, utilizando un anticuerpo anti-TNFR2. El peso molecular calculado era aproximadamente de 40 - 45 kDa. (Figura 10)

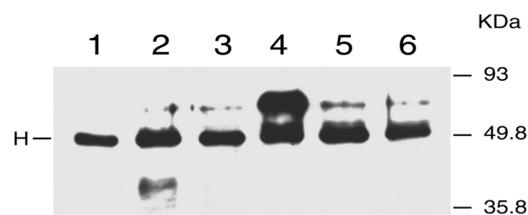


Figura 10.- Inmunoprecipitación del DS-sTNFR2(Δ 7,8). Las células COS-7 transfectadas con DS-sTNFR2(Δ 7,8) (carrera 1, 2) o con el cDNA de TNFR2 nativo (3,4) o con células no transfectadas (5,6) se lisaron y los lisados lavados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo de ratón anti-TNFR2 humano (carrera 2,4,6) o con una IgG control (1,3,5) y sometidos a cromatografía al 15%PAGE-SDS en condiciones reductoras. La membrana se detectó con un anticuerpo de ratón contra TNFR2 humano. La cadena pesada de la inmunoglobulina se indica mediante H

4.4.- Detección de DS-sTNFR2(Δ 7,8) mediante RT-PCR cualitativa.

La reacción de amplificación con los oligos específicos Lc1 produjo dos fragmentos de PCR de diferente tamaño, uno de 419 pb y otro de 306 pb que correspondían a la forma nativa TNFR2 wt ó a la producida por splicing alternativo DS-sTNFR2(Δ 7,8), respectivamente (Fig 11 A y B).

En el análisis de las curvas de melting, se obtuvieron 2 picos de melting correspondientes a los dos fragmentos amplificados. Las temperaturas de melting de la DS-sTNFR2(Δ 7,8) y de la forma TNFR2 nativa fueron de 87.91°C y 91.81°C, respectivamente. (Figura 11 C).

Se ensayaron diferentes tipos de muestras, monocitos, monocitos activados con LPS, PBL's de pacientes con artritis reumatoide y PBL's de controles sanos. En todas las muestras utilizadas se pudo detectar el pico de melting correspondiente a la forma producida por splicing alternativo (Figura 11 C).

Los productos de PCR de ambas formas se verificaron mediante secuenciación.

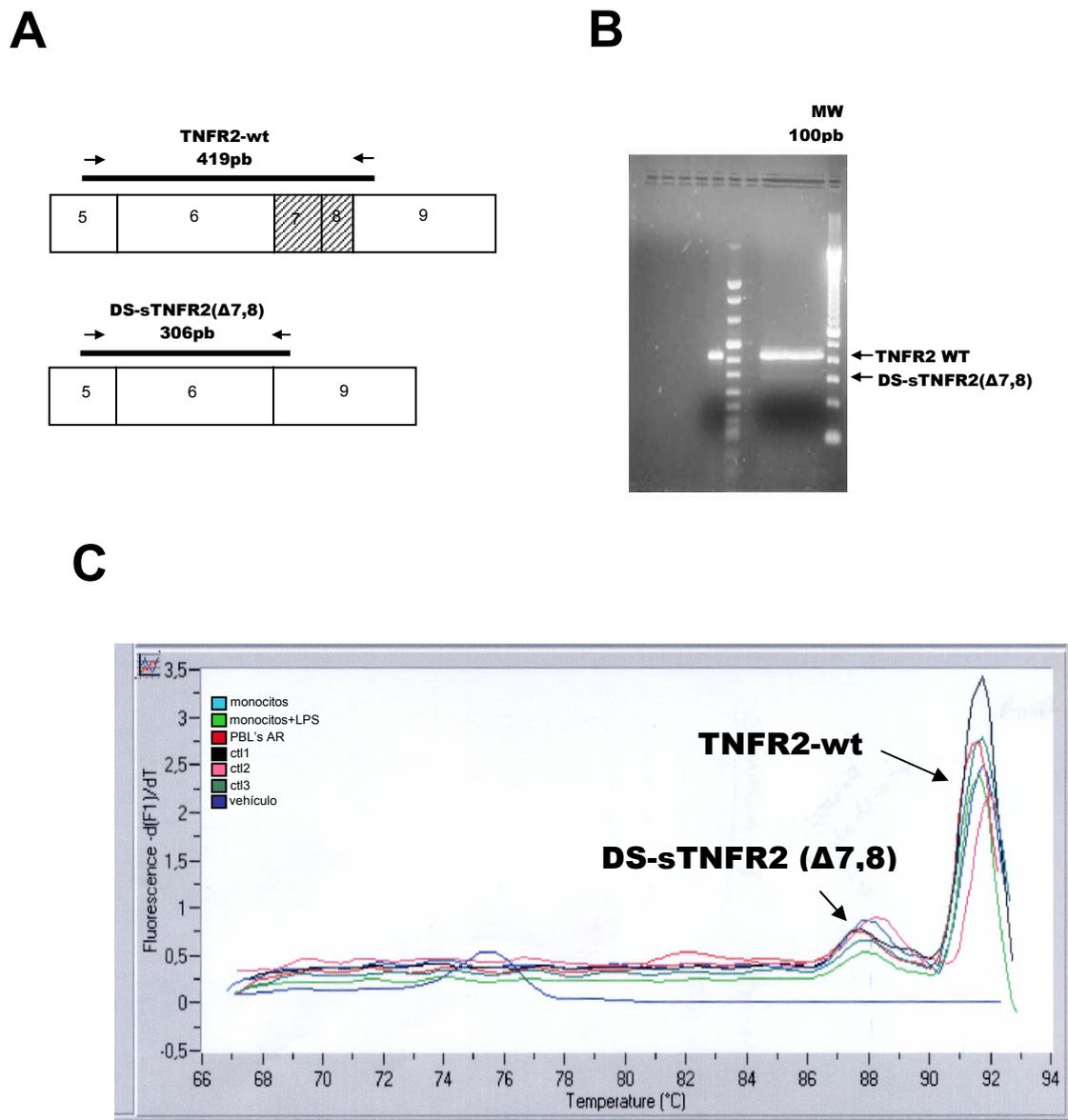


Figura 11.- Determinación cualitativa de la forma DS-sTNFR2(Δ 7,8) mediante tecnología LightCycler. A) Representación esquemática del cDNA del TNFR2 nativo y de la forma producida por splicing diferencial DS-sTNFR2(Δ 7,8). Se indican los exones y el tamaño de la región amplificada. Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados. B) Visualización en gel de agarosa de los fragmentos amplificados. C) Análisis de las curvas de melting de los productos de amplificación de diversos tipos de muestras.

4.5.- DS-sTNFR2(Δ 7,8) bloquea la actividad biológica del TNF- α

Mediante un ensayo de citotoxicidad celular inducida por TNF- α , se estudió la capacidad de la proteína DS-sTNFR2(Δ 7,8) para unir y neutralizar la actividad del TNF- α humano. Los resultados indicaban que el sobrenadante de las células transfectadas con el cDNA de DS-sTNFR2(Δ 7,8), inhibía la muerte celular inducida por el TNF- α y no se daba esta inhibición con el sobrenadante de las células transfectadas con el vector sin cDNA insertado (vector control) (figura 12A). También se realizó un ensayo dosis-respuesta y se observó que la inhibición de esta citotoxicidad era dependiente de la dosis de DS-sTNFR2 (Δ 7,8) utilizada. Así pues, se determinó que una concentración de sólo 4 ng/mL, era capaz de inhibir el 100% de la citotoxicidad inducida por 1ng/mL de TNF- α (Figura 12B).

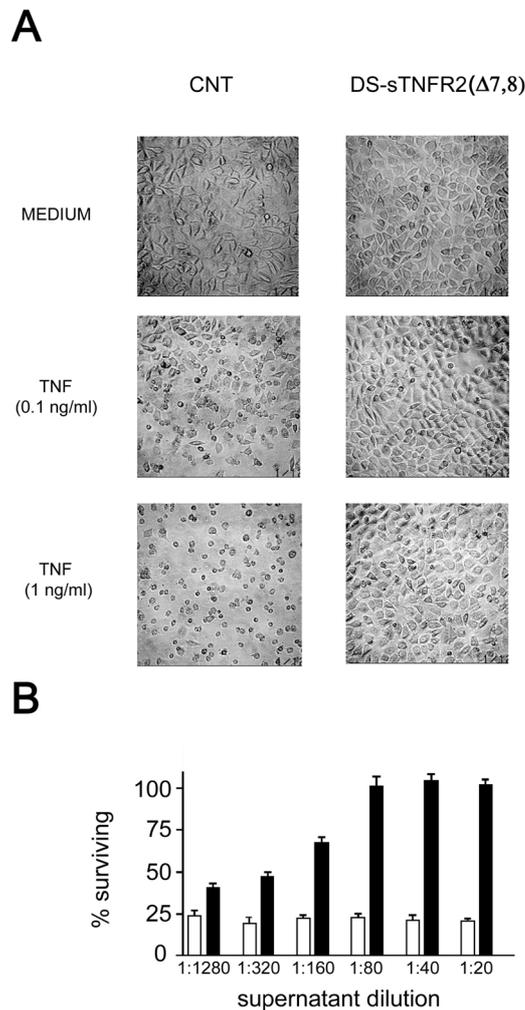


Figura.12. La proteína DS-sTNFR2(Δ 7,8) protege contra la citotoxicidad inducida por TNF- α en células L-929. A) Las fotografías se tomaron 18h después del tratamiento. En los paneles de la izquierda, las células se incubaron con el sobrenadante de las células transfectadas con el vector vacío; en los paneles de la derecha, con el sobrenadante de DS-sTNFR2(Δ 7,8) (10ng/ml). Los paneles superiores muestran los controles incubados con su correspondiente sobrenadante; los paneles intermedios e inferiores, las células se trataron con TNF- α a las concentraciones indicadas y con los correspondientes sobrenadantes. B) Los efectos del DS-sTNFR2(Δ 7,8) sobre la citotoxicidad inducida del TNF- α (1ng/ml) es dependiente de la dosis. La dilución del sobrenadante se indica en abcisas. La dilución 1:20 del sobrenadante DS-sTNFR2 (Δ 7,8) corresponde a 16ng/ml, medido por ELISA. Las células incubadas DS-sTNFR2(Δ 7,8) o sobrenadante control, se representan en negro y blanco respectivamente.

4.6.- Desarrollo de un ELISA que cuantifica el receptor TNFR2 soluble producido por *splicing* alternativo

Se desarrolló un ELISA capaz de cuantificar el receptor soluble de TNFR2 generado por *splicing* alternativo. Los ELISAs convencionales que cuantifican el TNFR2 soluble no diferencian entre el receptor soluble producido por *splicing* alternativo (DS-sTNFR2) y el producido por corte enzimático (PC-sTNFR2). Para cuantificar específicamente el DS-sTNFR2, se generó un anticuerpo monoclonal contra un epítipo presente en el TNFR2 pero que no se encontraría en el receptor soluble producido por corte enzimático. El péptido utilizado para inmunizar el ratón correspondía a los primeros 14 residuos de la región extracelular próxima a la membrana. Se obtuvo un anticuerpo monoclonal, el clon 572. Este anticuerpo se usó como anticuerpo de captura en el ELISA para DS-sTNFR2 descrito en materiales y métodos. Para mostrar que este ELISA no detectaba el receptor soluble producido por corte proteolítico, PC-sTNFR2, se realizó la inducción del shedding de TNFR2 *in vitro* con PMA en diferentes células, tales como células COS transfectadas con el TNFR2 nativo, células mononucleares de sangre periférica y la línea celular monocítica U937. El ELISA DS-sTNFR2 no detectó forma proteolíticamente procesada del TNFR2 en el sobrenadante de ninguna de estas células (Figuras 13A y 13B). Por otra parte, tanto el ELISA DS-sTNFR2 como el ELISA convencional detectaban receptor soluble, sTNFR2, en el sobrenadante de células COS transfectadas con DS-sTNFR2(Δ 7,8) (Figura 13C).

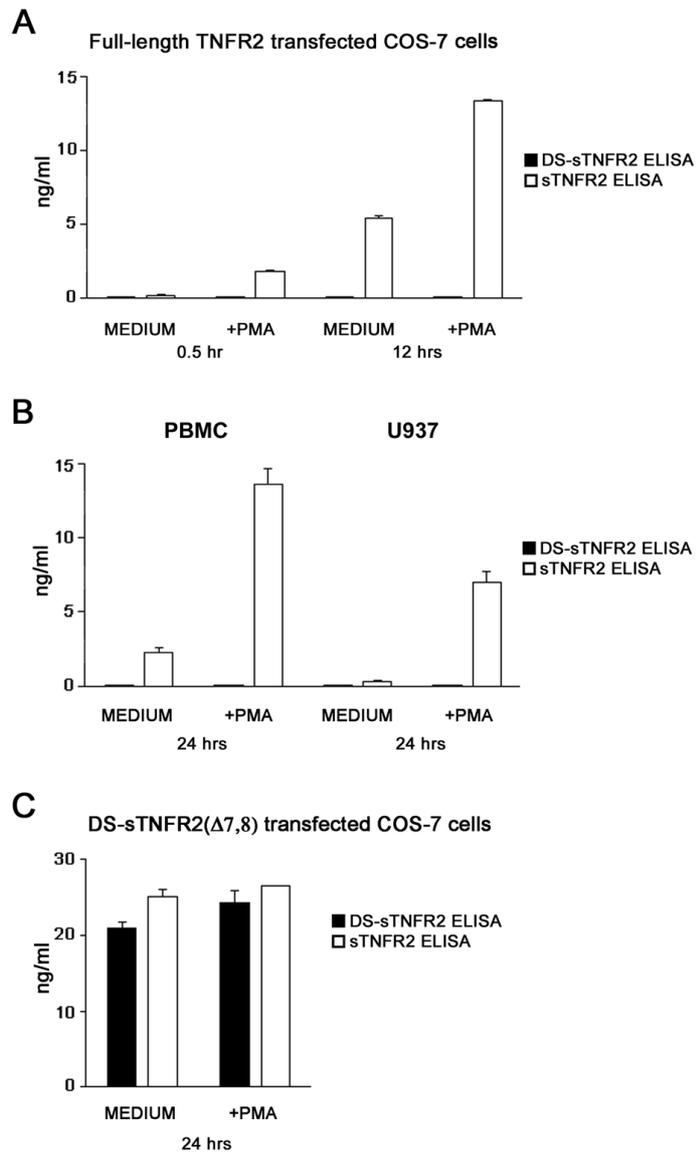


Figura.13. Especificidad del ELISA DS-sTNFR2. Células COS-7 transfectadas con la forma nativa del TNFR2 (A) y otros tipos celulares (B) se estimularon con 50ng/ml y 10ng/ml de PMA respectivamente y el sobrenadante se testó con el ELISA para DS-sTNFR2 y con el ELISA comercial para sTNFR2. C, el sobrenadante de las células transfectadas con DS-sTNFR2(Δ 7,8) se ensayó con ambos ELISAs

4.7.- Detección de TNFR2 soluble generado por *splicing* alternativo en suero de sujetos sanos control, pacientes con sepsis y pacientes con artritis reumatoide.

En los sujetos controles sanos se encontraron niveles bajos de receptor soluble producido por *splicing*. En una muestra de n=145, el valor medio \pm SEM fue de 1.7 ± 0.3 ng/ml (figura 14). El 50% de los sujetos control tenían valores indetectables de DS-sTNFR2. El porcentaje medio de la forma DS-sTNFR2 frente la forma soluble total TNFR2 era de $21.1 \pm 2.4\%$ y sólo en un 18% de sujetos control DS-sTNFR2 representaba más de un 50% del TNFR2 soluble total.

En los pacientes con sepsis (n=30), las concentraciones en suero de sTNFR2 estaban significativamente elevados con respecto a los controles (35.4 ± 5.9 ng/ml, rango 6.3-147.5 ng/ml $p < 0.0001$). Estos pacientes tendían a tener niveles de DS-sTNFR2 más elevados que los controles: 8.6 ± 3.0 ; rango 0-65.0, sin embargo, estos valores no alcanzaron una diferencia estadística significativa, $p = 0.1$ (figura 14). Los pacientes con artritis reumatoide presentaban niveles más elevados de sTNFR2 total que los sujetos control, 36.9 ± 7.9 ng/ml, rango 1.8-161.5 ng/ml, $p < 0.001$ (figura 14). Además estos pacientes tenían niveles más elevados de DS-sTNFR2 que los sujetos control: 17.2 ± 5.5 , rango 0-143.6, n=39, $p < 0.001$ (figura 14). Estos datos muestran que el receptor soluble sTNFR2 producido por shedding era predominante en el suero de sujetos sanos y pacientes con sepsis. En pacientes con altos niveles de receptor soluble (>30 ng/ml), la forma DS-sTNFR2 representa un 24,4 % del

total de forma soluble en el suero de los pacientes con sepsis y un 44.8 % en el suero de artritis reumatoides.

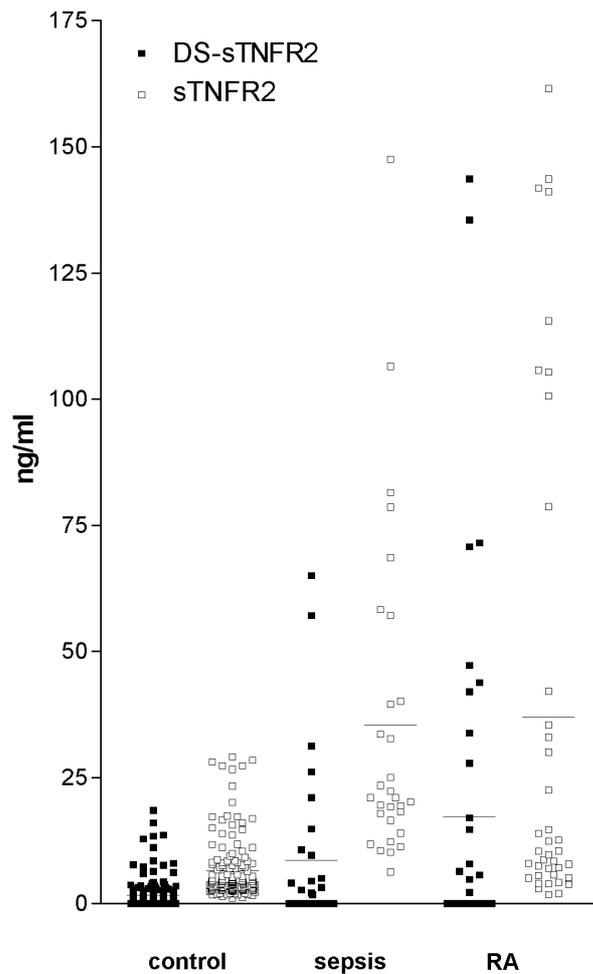


Figura 14. Concentraciones de receptor soluble de TNFR2 en sujetos sanos, con sepsis o con artritis reumatoide. Las concentraciones de DS-sTNFR2(■) y sTNFR2 (□) se determinaron mediante su correspondiente test de ELISA.

4.8.- El receptor soluble TNFR2 producido por *splicing* alternativo está asociado con la sensibilidad a la insulina y características del síndrome metabólico.

Se estudio la posible asociación entre las concentraciones de DS-sTNFR2, sensibilidad a la insulina y diferentes componentes del síndrome metabólico en tres poblaciones de individuos diferentes: población mediterránea, del noroeste de España y del centro de Europa.

4.8.1.- Población mediterránea

La isoforma DS-sTNFR2 fue detectada en el suero del 40% de los sujetos estudiados. La concentración media en suero fue significativamente mayor en mujeres que en hombres (2.3 ± 3.8 ng/ml vs 1.6 ± 4.2 , $p=0.03$) (Tabla 1). DS-sTNFR2 también estaba aumentada significativamente en sujetos no diabéticos comparado con sujetos diabéticos de tipo 2 (2.1 ± 4.4 vs 0.73 ± 2.5 ng/ml, $p=0.004$), y en no fumadores comparado con fumadores (2.3 ± 4.6 ng/ml vs 1.1 ± 3.1 , $p=0.03$).

Cuando los sujetos diabéticos y no diabéticos fueron considerados en conjunto, DS-sTNFR2 se asociaba con la edad ($r=-0.19$, $p=0.004$) y con componentes del síndrome de la resistencia a la insulina, BMI ($r=-0.15$, $p=0.02$), cintura ($r=-0.20$, $p=0.004$), ratio cintura-cadera ($r=-0.21$, $p=0.003$), presión sanguínea sistólica y diastólica ($r=-0.14$ and -0.16 , $p=0.05$ and $p=0.02$, respectivamente). La DS-sTNFR2 se asoció también a las concentraciones en ayuno de glucosa ($r=-$

0.15, $p=0.02$), triglicéridos ($r=-0.18$, $p=0.008$) y ácido úrico ($r=-0.18$, $p=0.008$). En sujetos no diabéticos la asociación con cintura ($r=-0.17$, $p=0.03$), ratio cintura-cadera ($r=-0.20$, $p=0.01$), presión sanguínea diastólica ($r=-0.15$, $p=0.04$) así como triglicéridos ($r=-0.19$, $p=0.02$) y ácido úrico en ayuno ($r=-0.18$, $p=0.03$) se mantenía estadísticamente significativa.

Es importante destacar que las concentraciones de adiponectina sérica se correlacionaban con las concentraciones de DS-sTNFR2 en los sujetos no diabéticos ($r=0.20$, $p=0.01$, $n=145$) y la concentración de adiponectina estaba aumentada significativamente en aquellos sujetos cuya DS-sTNFR2 era detectable (14.3 ± 6.6 vs 11.8 ± 7.4 $\mu\text{g/ml}$, $p=0.02$). Además, las concentraciones séricas de DS-sTNFR2 estaban asociadas al valor de HOMA ($r=-0.19$, $p=0.03$, $n=124$) y a la sensibilidad a la insulina medida utilizando el método de minimal model ($r=0.33$, $p=0.03$, $n=41$). Además, la DS-sTNFR2 disminuía con el aumento del número de componentes de NCEP del síndrome de la resistencia a la insulina (Figura 15). Aquellos sujetos con 3 o más componentes tenían las concentraciones de DS-sTNFR2 más bajas (0.91 ± 2.8 ng/ml vs 2.13 ± 4.4 , $p=0.002$) (Figura 16)

Tabla 1. Estudio de las concentraciones séricas de DS-TNFR2 en población Mediterránea

	DS-sTNFR2 indetectable	DS-sTNFR2 detectable	P
N	134	89	-
Sexo (Hombre/mujer)	100/34	38/51	0.006
Control	94 (56%)	74 (44%)	
Diabetes de tipo 2	40 (74%)	14 (26%)	0.01
SUJETOS NO DIABÉTICOS			
Edad (años)	41.4 ± 11.1	38.5 ± 11.9	NS
BMI (kg/m²)	25.6 ± 4.4	24 ± 3.9	0.01
índice cintura/cadera	0.93 ± 0.07	0.91 ± 0.07	0.058
Glucosa plasmática (mmol)	5.02 ± 0.6	4.88 ± 0.6	0.1
Insulina plasmática (pmol/l)	94 ± 42	89 ± 37	NS
Colesterol (mmol/l)	5.01 ± 0.76	4.93 ± 0.63	NS
Triglicéridos (mg/dl)	111 ± 69	85.7 ± 42	0.0007
HDL-C (mmol/l)	1.17 ± 0.29	1.09 ± 0.3	NS
LDL-C (mmol/l)	3.01 ± 0.91	2.95 ± 0.85	NS
sTNFR1*(ng/ml)	1.7- 2.4	1.7- 2.3	NS
sTNFR2* (ng/ml)	2.75- 3.87	2.92- 4.15	NS
adiponectina (ng/ml)	11.8 ± 7.4	14.3 ± 6.6	0.02
DS-sTNFR2*	0	1.01- 5.88	0.00001

*rango intercuartil

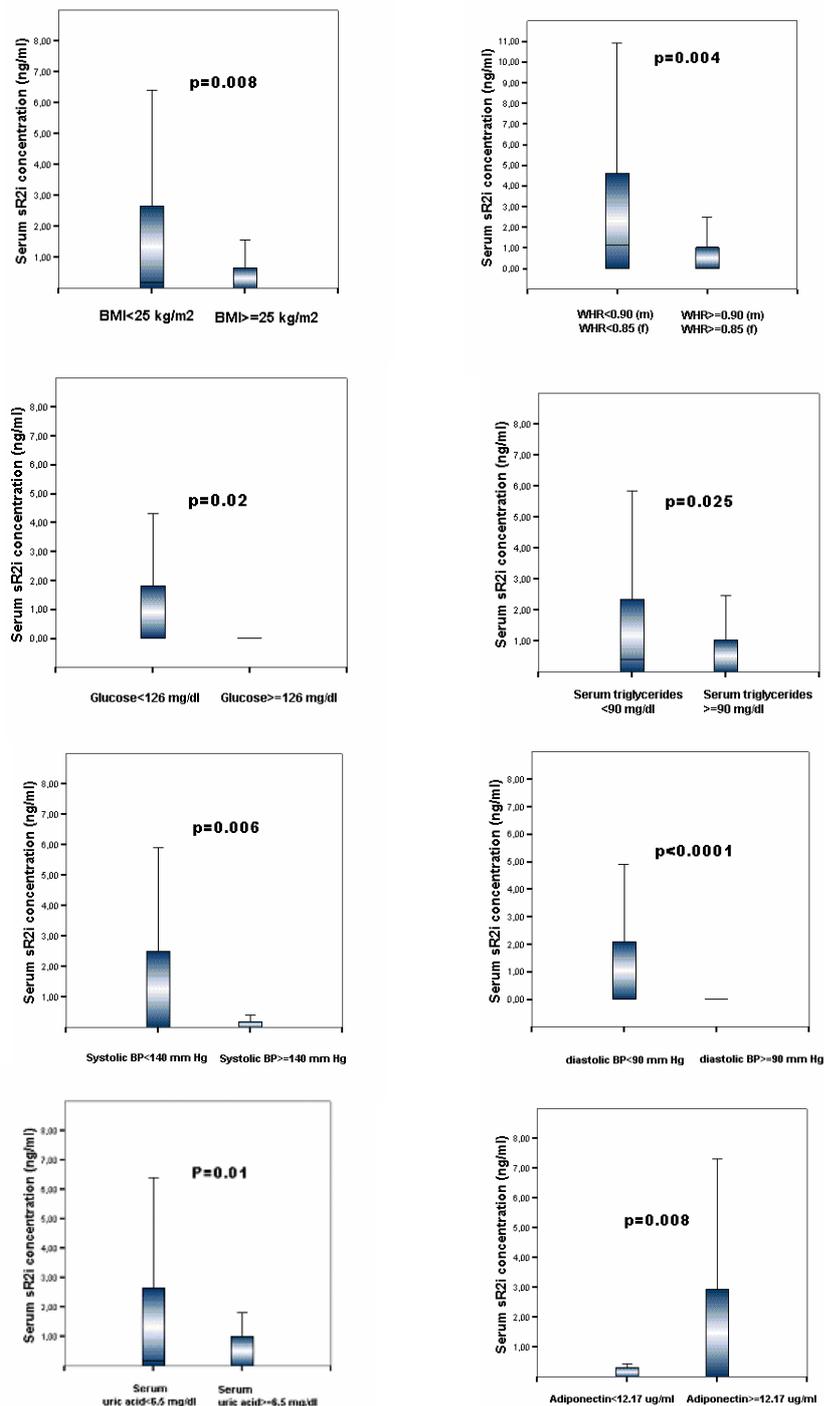


Figura 15. Asociación de DS-sTNFR2 con componentes del síndrome metabólico en población mediterránea. Las barras indican el percentil 50 y 95 de DS-sTNFR2 para cada categoría. Los sujetos estaban divididos en variables categóricas correspondientes a criterios estándar. Para los triglicéridos y adiponectina, los sujetos se dividieron de acuerdo al percentil 50 de la muestra. Para el ácido úrico, 6.5 mg/dl corresponde al percentil 50 en hombres y al percentil 75 en mujeres. BMI, índice de masa corporal; WHR, ratio cintura cadera; m, hombres; f, mujeres.

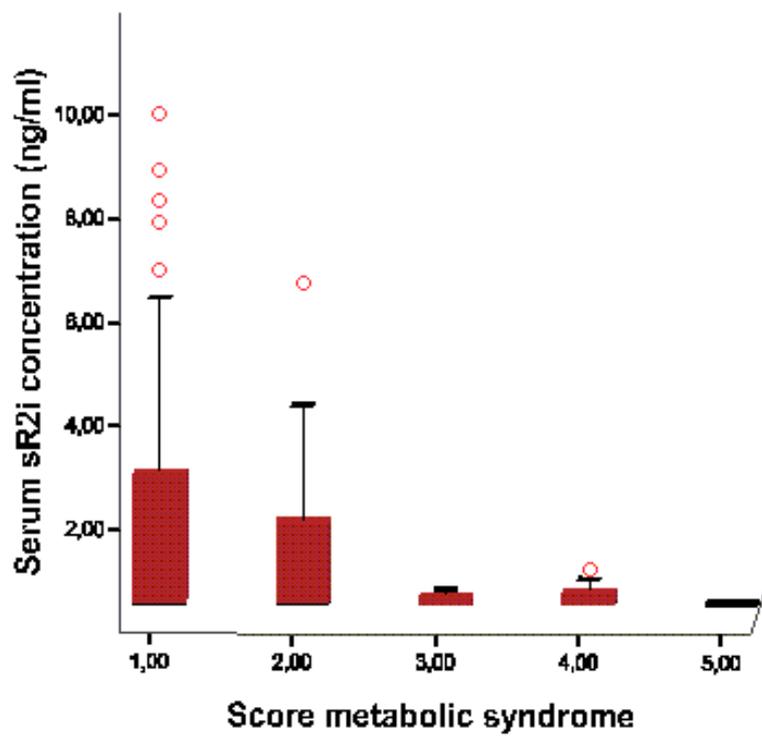


Figura 16. Niveles de DS-sTNFR2 (ordenadas) en relación con la presencia de un determinado número de componentes del síndrome metabólico en población mediterránea.

4.8.2.- Muestra del noroeste de España

La forma soluble DS-sTNFR2 sérica se detectó en el 23% de los sujetos (tabla 2). La concentración media en suero fue también mayor en mujeres que en hombres (1.56 ± 2.8 ng/ml vs 1.03 ± 2.6 , $p=0.045$) y en no diabéticos frente a sujetos intolerantes a la glucosa o sujetos diabéticos de tipo 2 (1.51 ± 30 vs 0.8 ± 1.9). $p=0.026$). Las mujeres normotolerantes con DS-sTNFR2 detectable ($n=33$) tenían disminuído significativamente las concentraciones de glucosa post-sobrecarga oral de glucosa con respecto al resto de mujeres ($n=80$) (91.8 ± 20 vs 100.1 ± 19.6 mg/dl, $p=0.04$).

Tomando la muestra completa, DS-sTNFR2 tendía a estar asociado con la glucosa en ayuno y postcarga (ambas $r=-0.11$, $p=0.054$), y con la presión sanguínea diastólica en hombres ($r=-0.16$, $p=0.07$, $n=124$). La concentración de DS-sTNFR2 estaba significativamente asociada con el colesterol LDL($r=0.28$, $p=0.002$), ácido úrico ($r=-0.13$, $p=0.04$) y con hemoglobina glicosilada sanguínea ($r=-0.13$, $p=0.04$).

DS-sTNFR2 disminuía con el aumento del número de los componentes modificados NCEP del síndrome de la resistencia a la insulina (Figura 17). Aquellos sujetos con 2 o más componentes tenían disminuidos significativamente las concentraciones de DS-sTNFR2 (0.96 ± 2.2 versus 1.7 ± 3.2 , $p=0.033$) (Figura 16).

Tabla 2. Estudio de las concentraciones de DS-sTNFR2 en la población del noroeste de España

	DS-sTNFR2 indetectable	DS-sTNFR2 detectable	P
N	207	62	-
Sexo (Hombre/mujer)	103/104	21/41	0.03
Control	138 (73.5%)	50 (36.5%)	
IGT or diabetes tipo 2	69 (85%)	12 (15%)	0.03
SUJETOS NO DIABÉTICOS			
Edad (años)	50.5 ± 12.1	48.4 ± 14.4	NS
BMI (kg/m²)	26.8 ± 3.5	26.2 ± 3.6	NS
Glucosa plasmática (mg/dl)	94.1 ± 9.1	93 ± 8.5	NS
HbA_{1c} (%)	4.85 ± 0.4	4.68 ± 0.4	0.038
Colesterol (mg/dl)	233 ± 45	213.8 ± 40.2	0.008
Triglicéridos (mg/dl)	102.2 ± 62.4	95.4 ± 48.7	NS
HDL-C (mmol/l)	59 ± 15	57.1 ± 14.4	NS
LDL-C (mg/dl)	153.7 ± 41	137.5 ± 34	0.013
DS-sTNFR2	0	5.94 ± 3	0.0000

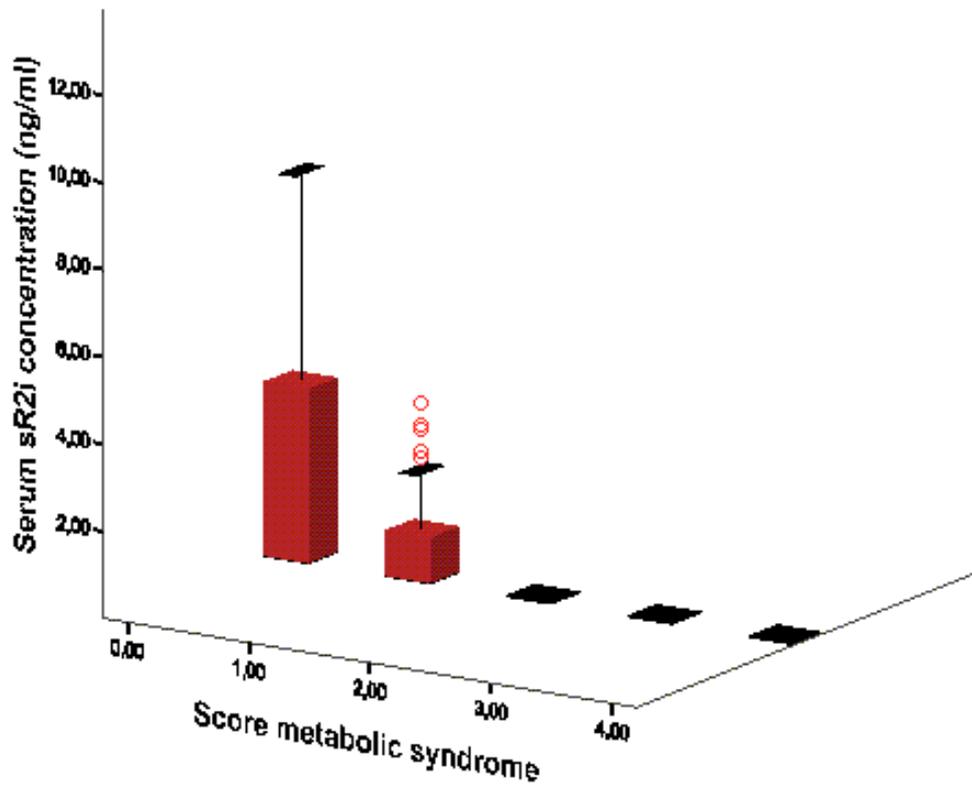


Figura 17. Concentraciones de DS-sTNFR2 (ordenadas) en relación con la presencia de un determinado número de componentes del síndrome metabólico en sujetos del noroeste de España.

4.8.3.- Población del centro de Europa.

Para confirmar los resultados, estudiamos la DS-sTNFR2 sérica de una población caucasiana diferente, en un estudio a doble ciego. Del total de 76 sujetos, DS-sTNFR2 estaba presente en 21 sujetos (27.63%). En individuos normoglicémicos, DS-sTNFR2 era significativamente más frecuente en mujeres ($p=0.015$). Las concentraciones de DS-sTNFR2 estaban relacionadas positivamente con la sensibilidad a la insulina tanto en basal como después del clamp ($r=0.25$, $p=0.032$ y $r=0.24$, $p=0.038$, respectivamente).

Cuando los individuos normotolerantes fueron analizados por separado, también encontramos correlaciones positivas de la sensibilidad a la insulina con los valores de DS-sTNFR2 tanto antes ($r=0.44$, $p=0.002$) y después del clamp ($r=0.48$, $p=0.0005$).

Los sujetos con DS-sTNFR2 detectable eran más sensibles a la insulina que los que la tenían indetectable (42.12 ± 22.08 vs $31.71 \pm 16.95 \mu\text{molx kg}^{-1}\text{xmin}^{-1}$, $p=0.039$). Esta diferencia estaba también presente en los individuos normotolerantes a la glucosa ($p=0.01$) (Tabla 3).

Tabla 3. Estudio de las concentraciones de DS-TNFR2 en sujetos del centro de Europa con tolerancia normal a la glucosa.

	DS-sTNFR2 indetectable	DS-sTNFR2 detectable	P
N	36	15	-
Sexo (hombre/mujer)	23/13	4/11	0.015
Edad (años)	33.56 ± 7.35	34.33 ± 8.15	NS
BMI (kg/m²)	26.86 ± 5.28	26.65 ± 6.81	NS
WHR	0.85 ± 0.08	0.81 ± 0.07	NS
Porcentaje grasa corporal	24.94 ± 11.28	26.12 ± 13.57	NS
HbA1c (%)	5.49 ± 0.51	5.59 ± 0.43	NS
Glucosa plasmática (mmol)	5.14 ± 0.65	4.97 ± 0.39	NS
Insulin plasmática (pmol/l)	86.32 ± 59.59	82.45 ± 65.02	NS
M (μmol x kg_{ffm}⁻¹ x min⁻¹)	38.22 ± 16.29	53.01 ± 17.79	0.01
Colesterol (mmol/l)	4.89 ± 0.93	4.53 ± 0.80	NS
Triglicéridos (mmol/l)	1.30 ± 0.86	1.18 ± 0.61	NS
HDL-C (mmol/l)	1.36 ± 0.39	1.23 ± 0.35	NS
LDL-C (mmol/l)	2.97 ± 0.87	2.82 ± 0.74	NS
TNF-α (pg/ml)	0.43 ± 0.42	0.30 ± 0.43	NS
sTNFR1 (ng/ml)	2.17 ± 0.46	2.20 ± 0.43	NS
sTNFR2 (ng/ml)	4.27 ± 1.10	4.76 ± 1.20	NS
DS-sTNFR2	0	6.63 ± 5.88	0.0000
PCR (mg/l)	4.77 ± 2.72	4.36 ± 1.96	NS

Datos presentados como media ± SD. PCR, proteína C reactiva.

4.9.- Estudio del receptor soluble producido por *splicing* alternativo DS-sTNFR2 en pacientes con artritis reumatoide

4.9.1.- Concentraciones de DS-sTNFR2 y progresión radiológica después de 1 año de seguimiento

Este estudio se realizó con los pacientes del grupo I, descritos en el apartado 3.25 de Material y Métodos, los cuales presentaban una artritis reumatoide de reciente comienzo y fueron tratados con fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad. Con el fin de estudiar efectos de fenotipos extremos, se dividió la muestra en dos subgrupos según el valor de DS-sTNFR2 era mayor o menor que 50 ng/ml.

De los 52 pacientes, 21 (40,4%) tenía la concentración de DS-sTNFR2 >50 ng/ml al inicio del tratamiento. Después de un año de tratamiento, 9 de los 21 pacientes disminuyeron la concentración de DS-sTNFR2 a <50ng/ml. Se observó que en este subgrupo, el porcentaje de pacientes con progresión radiológica era mayor que el observado en los 12 pacientes cuya concentración de DS-sTNFR2 se mantuvo por encima de 50ng/ml al final del estudio (33% frente a 8.3%), aunque no alcanzó la significación estadística (Tabla 4). Por lo demás, no se observaron diferencias significativas en el cambio medio de las variables clínicas y biológicas antes y después del tratamiento entre los pacientes en los que se reducía su concentración de DS-sTNFR2 a <50 ng/ml y los que mantenían la concentración > 50 ng/ml (tabla 4).

Tomados en conjunto todos los pacientes, el 23% (12/52) sufría progresión radiológica. Aunque, no se encontró una relación significativa entre la progresión radiológica y la concentración en suero de DS-sTNFR2 a la semana cero, los pacientes con progresión radiológica tenían la concentración de DS-sTNFR2 a la semana cero más baja que los pacientes sin progresión radiológica (67 ± 132 vs 177 ± 270 ng/ml, respectivamente). Por otra parte, la concentración en suero de MMP-1, correlacionaba con el número de erosiones ($p=0.02$), con la valoración de Larsen ($p=0.04$) y con la progresión radiológica al final del seguimiento. La concentración sérica inicial de VEGF mostraba una tendencia a correlacionar con la erosión tras un año de seguimiento ($p=0.09$).

Tabla 4. Pacientes con DS-sTNFR2 >50 al inicio del estudio. Comparación entre los 9 pacientes que disminuyeron la concentración de DS-sTNFR2 por debajo de 50 ng/ml y los 12 pacientes que mantenían la concentración por encima de 50, al año de seguimiento.

tiempo 0= t0	DS-sTNFR2(t0)>50	DS-sTNFR2(t0)>50	
tiempo 12 meses=t12	DS-sTNFR2(t12)<50	DS-sTNFR2(t12)>50	
	n=9	n=12	p
Factor Reumatoide positivo n (%)	9 (100%)	12(100%)	
Daño VAS (0-100mm)	17(31.8)	30.5 (26)	0.3
Valoración global del paciente	13.3 ± 26.5	11.7 ± 13.4	0.7
Valoración global del facultativo	11.1 ± 30.2	18.3 ± 18	0.7
Articulaciones dolorosas	3.6 ± 4.6	5.4 ± 6	0.3
Articulaciones inflamadas	4.6 ± 4.8	5.3 ± 4.3	0.9
Índice HAQ diferencia(0-12)	0.2 ± 0.8	0.5 ± 0.7	0.5
VSG (mm/h)	12.7 ± 17.3	13 ± 22.3	1
PCR diferencia (0-12) (mg/dl)	0.6 ± 0.7	1.8 ± 3.2	0.2
MMP-1 diferencia (0-12) (ng/ml)	-2.9 ± 4.5	-1 ± 3.5	0.3
MMP-3 diferencia (0-12) (ng/ml)	10.6 ± 55.3	17 ± 49.5	1
VEGF diferencia (0-12) (pg/ml)	102 ± 277	138 ± 370	0.4
sTNFR2 diferencia (0-12) (ng/ml)	171 ± 127	256 ± 242	0.5
DS-sTNFR2diferencia(0-12) (ng/ml)	148 ± 117	244 ± 224	0.4
PC-sTNFR2diferencia (0-12) (ng/ml)	23.3 ± 25.6	11.8 ± 53	0.2
Progresión radiográfica al año,n (%)	3 (33.3%)	1 (8.3%)	
Valoración Larsen	1.2 ± 2.2	1.7 ± 4.4	0.5
Erosion en articulaciones	0.6 ± 1.1	0.2 ± 0.6	0.3
Índice de actividad DAS28 dif(0-12)	1.6 ± 1.5	1.8 ± 1.3	0.8
Respuesta DAS28 al año nº(%)	7 (77.8%)	10 (83.3%)	0.9

VAS: medido mediante escala analógica visual, HAQ: Cuestionario para valoración de la salud, VSG: velocidad de sedimentación globular, PCR: proteína C reactiva, MMP-1,-3: metaloproteasa -1,-3 de la matriz, VEGF: Factor del crecimiento endotelial vascular, sTNFR2: receptor 2 del TNF, PC-sTNFR2: TNFR2 soluble producido por corte proteolítico, DS-sTNFR2: TNFR2 soluble producido por splicing alternativo, DAS: valor de la actividad de la enfermedad

4.9.2- Concentración de DS-sTNFR2 y respuesta terapéutica al tratamiento con fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad (FAME).

Para estudiar la influencia de las concentraciones muy elevadas de DS-sTNFR2 en la respuesta terapéutica a los fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad, se estudiaron los pacientes del grupo I, los cuales presentaban una artritis reumatoide de reciente comienzo. En este grupo, el 76,9% (40/52) de los pacientes alcanzaron el criterio de respuesta DAS28. Todos los parámetros clínicos y biológicos de la enfermedad, disminuyeron significativamente al final del estudio, a excepción de las concentraciones de MMP1, el índice Larsen y el número de erosiones articulares que incrementaron significativamente ($p=0.002$, $p=0.02$, $p=0.01$).

Con el fin de detectar efectos de fenotipos extremos, se dividió la muestra en dos subgrupos según el valor de DS-sTNFR2 era mayor o menor que 50 ng/ml (Tabla 5). Cuando se analizó la respuesta al tratamiento de manera separada, en el grupo DS-sTNFR2>50 no se detectó un cambio significativo después de un año de tratamiento de los valores de MMP-3, del índice de Larsen ni del número de erosiones articulares, en comparación con el grupo DS-sTNFR2<50.

Para evaluar la respuesta terapéutica se utilizó el criterio de respuesta DAS28, que tiene en cuenta el número de articulaciones dolorosas, el número de articulaciones inflamadas, la valoración global de la enfermedad desde el punto de vista del paciente y la velocidad de sedimentación globular. Según este

criterio, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de respondedores y no respondedores entre pacientes con DS-sTNFR2 > 50 y < 50 ng/ml en la semana cero y después de un año de seguimiento. Sin embargo, la concentración en suero de DS-sTNFR2 a la semana cero se correlacionó con el número de articulaciones dolorosas, con el número de articulaciones inflamadas y con la concentración de factor reumatoide ($p < 0.001$). También vimos que tendía a ser significativa la correlación de la concentración de DS-sTNFR2 con la velocidad de sedimentación globular ($p = 0.07$) y con la concentración de VEGF en suero ($p = 0.07$). Existía una correlación entre la concentración de DS-sTNFR2 y la concentración de sTNFR2 en la semana cero y a los 12 meses ($p < 0.001$). También se halló una correlación significativa entre la concentración de sTNFR2 y el número de articulaciones inflamadas ($p = 0.026$) y también con la concentración de MMP1 ($p < 0.001$) antes del comienzo del tratamiento.

Resultados

Tabla 5. Características del grupo I de 52 pacientes con artritis reumatoide inicial, al inicio y después de 1 año de terapia con anti-inflamatorios FAME, en relación a la concentración basal de DS-sTNFR2 (mayor y menor que 50ng/ml)

Mes	DS-sTNFR2 >50 ng/ml			DSsTNFR2 <50 ng/ml		
	(n=21)		P	(n=31)		p
	0	12		0	12	
Sexo Mujer, n° (%)	14 (66.7%)			29 (94%)		
Edad (años)	57.1 ± 12.1			55.5 ± 14.5		
Duración enfermedad (meses)	8.5 ± 6.8			8.4 ± 6		
Pacientes con FR positivo n (%)	21(100%)			21(68%)		
Daño VAS (0-100mm)	50.7(24.7)	26.8(23.6)	0.001	54.4 (25.9)	32.3 (23.9)	<0.001
Valoración global del paciente	51 ± 18.4	39.5 ± 15	0.03	57.7 ± 13.3	39.7 ± 19.2	<0.001
Valoración global del facultativo	50 ± 16.7	33.8 ± 17.5	0.008	55.2 ± 15.5	36.5 ± 18.9	<0.001
Articulaciones dolorosas	7.2 ± 4.6	2.6 ± 3.8	0.002	9.4 ± 6	4 ± 5.6	<0.001
Articulaciones inflamadas	7 ± 3.7	2 ± 2.8	<0.001	8.2 ± 4.1	2.6 ± 3.4	<0.0001
índice HAQ	0.9 ± 0.6	0.5 ± 0.6	0.04	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.5	0.008
VSG (mm/h)	41.2 ± 23.3	28.3 ± 23.1	0.01	33.2 ± 19.2	25.6 ± 14.2	<0.05
PCR (mg/dl)	2.6 ± 2.9	1.3 ± 1.4	0.005	1.6 ± 1.4	0.9 ± 1	0.02
MMP-1 (ng/ml)	5.8 ± 5	7.6 ± 5.2	0.02	5 ± 4.1	5.8 ± 4.5	0.04
MMP-3 (ng/ml)	76 ± 53.3	61.7 ± 39	0.3	77.2 ± 39.4	49.2 ± 35	<0.001
VEGF (pg/ml)	518 ± 287	445 ± 246	0.2	546 ± 474	394 ± 283	0.1
sTNFR2 (ng/ml)	405 ± 304	185 ± 198	<0.001	13.8 ± 16	6.1 ± 5.9	0.02
DS-sTNFR2 (ng/ml)	363 ± 280	160 ± 178	<0.001	8.1 ± 10.5	2 ± 4.6	0.002
PC-sTNFR2 (ng/ml)	41.7 ± 58.3	25 ± 40	0.07	5.7 ± 6.4	4.1 ± 3.6	0.4
Con enfermedad erosiva	19%	29%		16%	26%	
Valoración Larsen	1.8 ± 4.2	3.2 ± 6.9	0.07	1 ± 1.9	5.3 ± 10.4	0.01
Erosión en articulaciones	0.3 ± 0.6	0.6 ± 1.1	0.1	0.3 ± 0.7	1 ± 1.8	0.04
Índice de actividad DAS28	5.3 ± 1.1	3.6 ± 1.5	<0.001	5.5 ± 0.9	3.9 ± 1.4	<0.001
Respuesta DAS28 n°(%)		16 (76%)			24(77.4%)	

4.9.3.- Concentraciones de DS-sTNFR2 y respuesta terapéutica a infliximab.

Este estudio se realizó con los pacientes del grupo II (descritos en el apartado 3.25 de Material y Métodos), los cuales fueron tratados con infliximab y metotrexato durante 30 semanas. Con el fin de estudiar efectos de fenotipos extremos, se dividió la muestra en dos grupos según el valor de DS-sTNFR2 era mayor o menor que 50 ng/ml. No observamos diferencias significativas en otras variables clínicas o biológicas a nivel basal entre los dos grupos.

De los 28 pacientes estudiados, 9 (32%) tenían la concentración de DS-sTNFR2 >50ng/ml a la semana cero. De estos 9 pacientes con niveles elevados, 6 (67%) alcanzaron la respuesta terapéutica (según criterio EULAR DAS28) a la semana 30 (Tabla 6). Sólo 1 de estos pacientes (con factor reumatoide -) redujo las concentraciones de DS-sTNFR2 por debajo de 50 ng/ml en la semana 30 (semana cero: 180 ng/ml; semana 30: 15 ng/ml) y no tuvo respuesta terapéutica a la semana 30. Si tenemos en cuenta los pacientes con DS-sTNFR2>50 y con factor reumatoide positivo a la semana cero, el 75% (6/8) de los pacientes tuvieron respuesta DAS a la semana 30, frente a un 37% (7/19) con DS-sTNFR2<50. Por otro lado, hubo más pacientes con respuesta terapéutica en el grupo con DS-sTNFR2>50ng/ml a la semana 30 que en el grupo con DS-sTNFR2<50 (75% respondedores frente a 35%, respectivamente p=0.09)

Analizados por separado, los pacientes con concentración basal de DS-sTNFR2>50 no mostraron cambios significativos antes y después del

tratamiento de los parámetros clínicos / biológicos de la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva (PCR), anticuerpos antipéptido citrulinado (anti-CCP), MMP-3 y VEGF, comparados con el grupo de DS-sTNFR2<50.

Resultados

Tabla 6. Características demográficas y parámetros de actividad de la enfermedad del Grupoll al inicio y tras 30 semanas de tratamiento con infliximab en 28 pacientes con artritis reumatoide en relación a las concentraciones de DS-sTNFR2

Semana:	DS-sTNFR2			DSsTNFR2		
	>50 ng/ml			<50 ng/ml		
	n=9		p	n=19		p
	0	30		0	30	
Edad (años)	57.4 ± 15.6			55.5 ± 13.5		
Sexo Mujer, n° (%)	9 (100%)			18 (95%)		
Duración enfermedad (meses)	114.8 ± 71.3			190.5 ± 138.8		
Pacientes con FR positivo n (%)	8 (89%)			14 (74%)		
Daño VAS (0-100mm)	63.3(31.6)	52.6(29.4)	0.6	64.2 (19.3)	58 (249)	0.4
Valoración global del paciente	70 ± 14	47.8 ± 21	0.02	60.5 ± 13.9	47.9 ± 14.8	0.01
Valoración global del facultativo	67.8 ± 12	50 ± 10	0.02	65.8 ± 8.4	50 ± 13.3	0.002
Articulaciones dolorosas	8.1 ± 8.8	3.3 ± 3.5	0.03	6.7 ± 6	6.7 ± 6.8	0.8
Articulaciones inflamadas	11.4 ± 6	4.3 ± 4.4	0.03	10.9 ± 6	5 ± 3.7	0.003
índice HAQ	1.5 ± 0.6	1 ± 0.6	0.04	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.04
VSG (mm/h)	61.6 ± 34.7	63.9 ± 37.5	1	51.2 ± 22.9	38.9 ± 22.4	0.001
PCR (mg/dl)	4.2 ± 3.5	3.4 ± 4.6	0.4	2.8 ± 1.9	1.9 ± 1.8	0.03
Anti-CCP (UI/ml)	798 ± 606	838 ± 696	0.8	600 ± 584	444 ± 486	0.008
MMP-1 (ng/ml)	5.3 ± 1.8	4.8 ± 3.2	0.2	4.8 ± 2.7	5.1 ± 3.5	0.6
MMP-3 (ng/ml)	85 ± 51	56.1 ± 33	0.3	70.1 ± 27.4	51.9 ± 25.6	0.008
VEGF (pg/ml)	753 ± 531	457 ± 154	0.2	751 ± 413	552 ± 383	0.001
sTNFR2 (ng/ml)	802 ± 919	548 ± 655	0.1	11.3 ± 10.9	11.4 ± 9.9	0.9
DS-sTNFR2 (ng/ml)	667 ± 749	409 ± 562	0.3	6 ± 9.4	5 ± 7.5	0.6
PC-sTNFR2 (ng/ml)	225 ± 336	139 ± 285	0.2	5.6 ± 8.1	6.4 ± 6.9	0.8
Índice de actividad DAS28	6 ± 1.1	4.8 ± 0.9	0.007	5.7 ± 1.1	5 ± 1.2	0.007
Respuesta DAS28 n°(%)		6 (66.7%)			7 (37%)	0.22

FR: factor reumatoide, VAS: escala visual, HAQ: Cuestionario para valoración de la salud VSG: velocidad de sedimentación globular, PCR: proteína C reactiva, anti-CCP: anticuerpo anti péptido citrulinado, MMP-1,-3: metaloproteasa -1,-3 de la matriz, VEGF: Factor del crecimiento endotelial vascular, sTNFR2: receptor 2 del TNF, PC-sTNFR2: TNFR2 soluble producido por corte proteolítico, DS-sTNFR2: TNFR2 soluble producido por splicing alternativo, DAS: valor de la actividad de la enfermedad

4.10.- Estudio genético del TNFR2 en pacientes con artritis reumatoide

Una vez visto las concentraciones tan elevadas de receptor soluble de TNFR2 en pacientes con artritis reumatoide, nos propusimos estudiar si existía alguna variación en la secuencia genética que pudiera explicar los valores tan elevados de receptor soluble producido tanto por *splicing* como por *shedding*. Así pues, nos centramos en el estudio genético de las secuencias consensus intrón –exón del gen, implicadas en el *splicing*. Por otro lado, analizamos la secuencia de la región yuxtamembrana donde se produce el corte enzimático del receptor en el proceso de *shedding*.

4.10.1.- Estudio de las regiones limítrofes intrón-exón del TNFR2 implicadas en el splicing alternativo de los exones 7 y 8.

Para el estudio de posibles mutaciones implicadas en el *splicing* alternativo de los exones 7 y 8, se realizó la secuenciación de los tres fragmentos, A, B, C en muestras de 17 pacientes con artritis reumatoide. Con la secuenciación de estos fragmentos se pudo estudiar tanto los sitios consenso de splicing 5' y 3' como otras zonas próximas a ellos que pudieran afectar a la unión de proteínas reguladoras del *splicing* (figura 18).

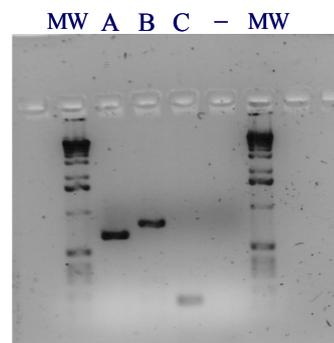
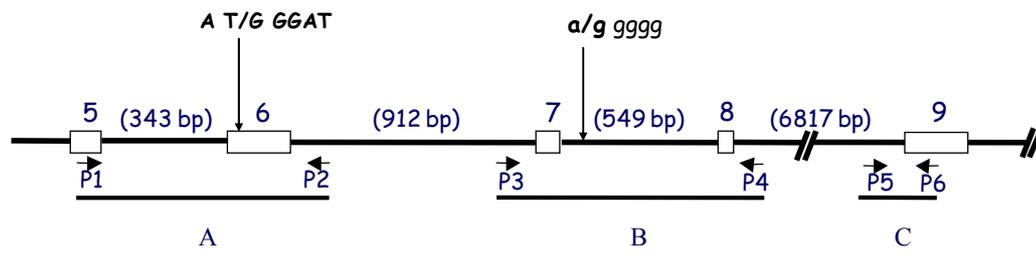


Figura 18. Esquema de los fragmentos A,B,C sometidos a secuenciación.

Visualización en gel de agarosa de los tres productos de PCR

Resultados

El análisis de las secuencias de los fragmentos A, B, C no reveló diferencias en los sitios consenso de *splicing* 5' y 3' estudiados con respecto a la secuencia patrón utilizada (gi29725899). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	←		→		←		→			
	intron 5 3'acep	exon 6	intron 6 5' doner	intron 6 3'acep	exon7	intron 7 5' doner	intron 7 3'acep	exon 8	intron 8 5' doner	intron 8 3'acep
1	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
2	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
3	nc		nc	nc		nc	sd		nc	nc
4	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
5	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
6	nc		nc	nc		nc	sd		sd	nc
7	nc		sd	nc		nc	nc		nc	nc
8	nc		nc	Sd		nc	nc		nc	nc
9	sd		sd	nc		nc	nc		nc	nc
10	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
11	nc		nc	nc		nc	nc		nc	sd
12	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
13	nc		nc	nc		nc	sd		sd	sd
14	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
15	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
16	nc		nc	nc		nc	nc		nc	nc
17	nc		nc	nc		nc	sd		sd	nc

Tabla 7. Resultado de la secuenciación de los sitios consenso de *splicing* 5' y 3'. La secuencia consenso sin ningún cambio con respecto al patrón se indica con **nc** (ningún cambio). Las siglas **sd** (sin determinar), indican que no se pudo obtener la secuencia de una determinada zona.

Si se detectó un polimorfismo, el cambio de una G por una A, a 112 nucleótidos del sitio de *splicing* 5' del intrón 7 (Tabla 8). La G mutada era la primera de un grupo de 5 Gs. Se han descrito secuencias ricas en G que son zonas de unión a proteínas reguladoras del *splicing*.

También observamos que en el grupo con una concentración de DS-sTNFR2 mayor de 30ng/ml había una mayor proporción de esta mutación comparado con el grupo de valores menores de 30 ng/ml, 71% frente a 22% respectivamente.

Se consideró que esta mutación merecía un estudio más amplio. Con la comparación de la secuencia del fragmento A se determinó el polimorfismo del exón 6 que modifica el codón 196 M/R. Se pudo observar que existía una coincidencia entre la presencia del alelo G en el exón 6 (presencia de R en el codón 196) y la presencia del alelo A en el intrón 7. El 86 % (6 de 7) de los portadores del alelo G en el exón 6 también portaban A en el intrón 7. Y el 100% (6 de 6) de los portadores de A en el intrón 7 portaban G en el exón 6. Los dos alelos parecían estar en desequilibrio de ligamiento.

muestra	112n Intron 7	Exón 6 196M/R	DS-sTNFR2	TNFR2 total
1	G/A	T/G	72.9	163.9
2	G/A	T/G	3000	3000
3	G/A	T/G	55,9	104.7
4	G/G	T/T	62.9	640
5	G/G	T/T	82.8	635.5
6	G/A	T/G	292.6	459.8
7	G/A	T/G	31.9	78.9
8	G/G	T/T	10.6	29.2
9	G/G	T/T	18.4	66.1
10	G/G	T/T	1.8	42
11	G/G	T/G	3.3	10.6
12	G/G	T/T	0	73
13	G/G	T/T	0	10
14	G/G	T/T	0	13.2
15	G/A	T/G	0	1.4
16	G/A	T/G	0	9,5
17	G/G	T/T	0	3.5

Tabla 8. Determinación del polimorfismo del Intrón 7, exón 6 y las concentraciones de receptor soluble de TNFR2 en estudio preliminar con 17 pacientes.

4.10.2.- Estudio de la secuencia extracelular próxima a membrana donde se produce el shedding

La región extracelular yuxtamembrana se estudió analizando la secuencia del producto de amplificación A.

La única variación observada con respecto a la secuencia patrón utilizada fue el polimorfismo 196M/R, ampliamente estudiado en la bibliografía, observado en 8 (47%) de las 17 muestras secuenciadas de pacientes con artritis.

4.10.3.- Estudio de los polimorfismos del Exón 6 y del Intrón 7 de TNFR2 en artritis reumatoide

Para un mejor estudio de estos polimorfismos y su relación con la DS-sTNFR2 se amplió el número de muestras de pacientes con artritis reumatoide y se incluyeron controles sanos. Se analizaron un total de 48 muestras de pacientes con artritis reumatoide y 58 controles sanos. En las tablas siguientes se resumen las frecuencias de los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados.

Con respecto al polimorfismo del intrón 7 (cambio de G por A a 112 bases del intrón 7), las frecuencias del genotipo GA, AA y del alelo A de nuestro grupo de artritis son ligeramente superiores a las del grupo control (33.3%, 6.3% y 0.23 frente a 27,6%, 1.7% y 0.15 respectivamente), si bien estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Tablas 9 y 10). Las

frecuencia genotípicas y fenotípicas del grupo control eran similares a las descritas en población norte-americana (GG:73.3, GA: 25.6, AA: 1,1; G 0.86, A 0.14) y japonesa (G: 0.88, A: 0.12). No se ha estudiado previamente este polimorfismo en artritis reumatoide.

Con respecto al polimorfismo del exón 6 (cambio de T por G a 36 bases del exón 6), las frecuencias del genotipo TG, GG y del alelo G de nuestro grupo de artritis son ligeramente superiores a las del grupo control (39.6%, 6.2% y 0.26 frente a 31%, 1.7% y 0.17, respectivamente) si bien estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos en sujetos sanos y en pacientes con artritis reumatoide

polimorfismo	Genotipo	Controles (n=58)			Artritis Reumatoide (n=48)	
		n (%)	alelo	Frecuencia alélica	N (%)	Frecuencia alélica
Intron 7	GG	41 (70.7)	G	0.84	29 (60.4)	0.77
	GA	16 (27.6)			16 (33.3)	
	AA	1 (1.7)	A	0.15	3 (6.3)	0.23
Exón 6	TT	39 (67.2)	T	0.83	26 (54.2)	0.74
	TG	18 (31.0)			19 (39.6)	
	GG	1 (1.7)	G	0.17	3 (6.2)	0.26

Tabla 10. Frecuencia de la presencia de polimorfismo en sujetos sanos y en pacientes con artritis reumatoide

		población				p-value
		Control (n=58)		AR (n=48)		
		n	%	n	%	
Intrón 7	GG	41	70.7	29	60.4	0.266
	GA,AA	17	29.3	19	39.6	
Exón 6	TT	39	67.2	26	54.2	0.169
	TG,GG	19	32.8	22	45.8	

Se estudió la relación de las concentraciones de isoforma con los polimorfismos. Para ello, se obtuvieron los valores de DS-sTNFR2 (Figura 19). Se dividió el grupo de artritis en dos grupos, según tenían concentraciones bajas o altas de DS-sTNFR2. Se consideró el punto de corte en 14,6 ng/mL. Este corresponde al valor medio de los controles (n=203) + 3 desviaciones estándar. Con respecto al polimorfismo del intrón 7, se observó que la frecuencia de tener el alelo A era superior en el grupo con concentraciones de DS-sTNFR2 > 14,6 comparado con los de < 14,6 (52.2% frente a 28%), aunque no se alcanzó la significación estadística (p=0.087) (Tabla 11). Cuando se estudió el polimorfismo del exón 6 196M/R, la frecuencia de tener el alelo G (tener al menos una R) era también superior en el grupo con niveles de DS-sTNFR2 > 14,6 (61% frente a 32%) y la diferencia era significativa p=0.045. (Tabla 11).

Se observó que el grupo con valores de DS-sTNFR2 < 14.6 ng/mL poseía una distribución de frecuencias similares al grupo control para los dos tipos de

polimorfismos (Intrón 7: tener A, 28% frente a 29,3%; Exón 6: tener G, 32% frente a 32,8).

Tabla 11. Frecuencia de la presencia del polimorfismo según niveles de DS-sTNFR2

		Población AR				p-value
		DS-sTNFR2 <14.6 (n=25)		DS-sTNFR2 >14.6 (n=23)		
		n	%	n	%	
Intrón 7	GG	18	72	11	47.8	0.087
	GA,AA	7	28	12	52.2	
Exón 6	TT	17	68	9	39	0.045*
	TG,GG	8	32	14	61	

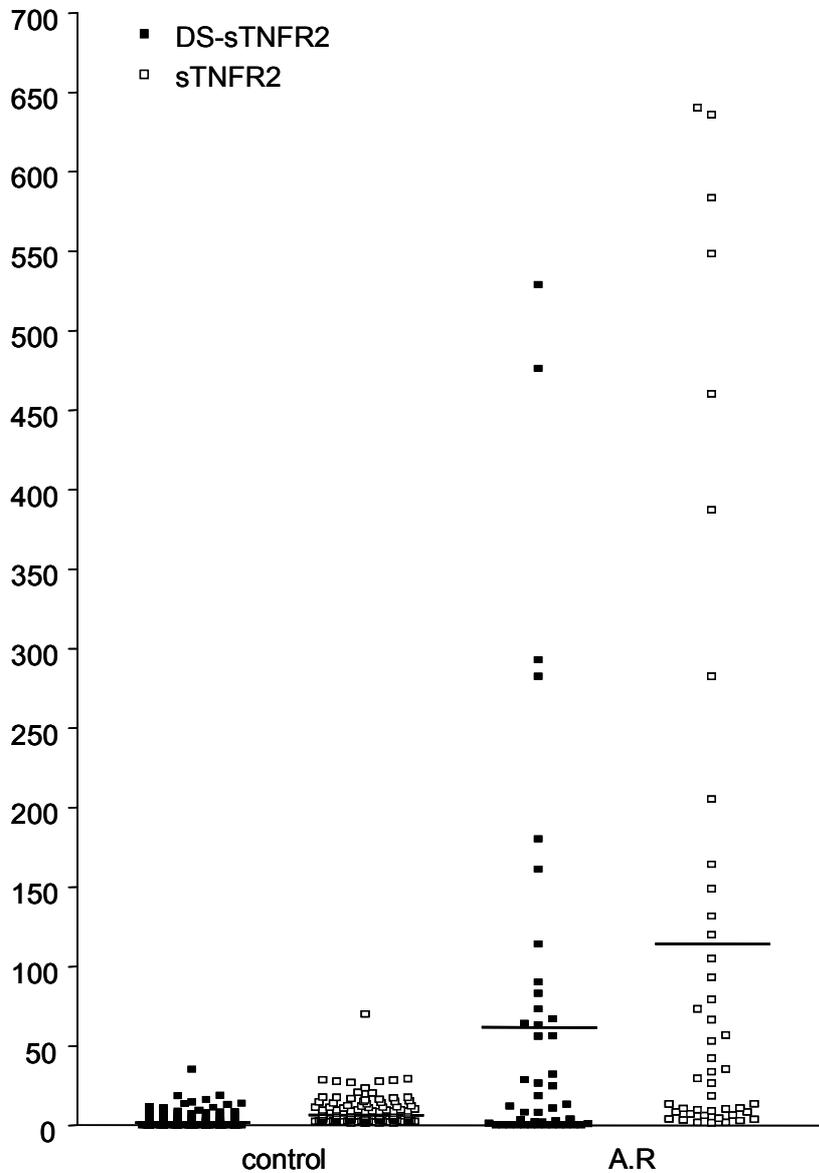


Figura 19. Concentraciones de receptor soluble de TNFR2 en sujetos sanos control y pacientes con artritis reumatoide. Las concentraciones de DS-sTNFR2(■) y sTNFR2 (□) se determinaron mediante su correspondiente test de ELISA. Se ha excluido de la gráfica tres valores extremos de DS-sTNFR2 de 3000, 1400 y 700ng/mL con valores similares para sTNFR2

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1.- Identificación y caracterización de una nueva forma de receptor soluble de TNFR2 producida por *splicing* alternativo.

En este estudio, se han identificado y caracterizado por primera vez una nueva isoforma de mRNA de TNFR2 humano producida por *splicing* alternativo. Esta isoforma codifica una proteína soluble, a la que se ha llamado DS-sTNFR2(Δ 7,8), la cual se ha demostrado que inhibe la actividad biológica del TNF- α . Como consecuencia del *splicing*, los exones 7 y 8 se han eliminado del cDNA que codifica DS-sTNFR2(Δ 7,8). El mRNA aislado tenía una delección de 113 pb que producía un cambio en la pauta de lectura y como consecuencia se generaba un codón de parada unas pocas bases después de la delección. Como producto final del fenómeno de *splicing* se observa una proteína cuyo extremo amino terminal, que corresponde al dominio extracelular, se mantiene como en el TNFR2 nativo, así como los 5 primeros aminoácidos del dominio transmembrana a los que le siguen 6 aminoácidos nuevos como único extremo carboxilo terminal. El hecho de que la mayor parte del dominio transmembrana esté deleccionado hace pensar que la proteína DS-sTNFR2 no quede retenida como proteína transmembrana y sea soluble. Existen evidencias de su naturaleza soluble por su detección en el sobrenadante de células COS transfectadas transitoriamente con el cDNA de esta isoforma. Por el contrario en las células COS transfectadas con el cDNA de TNFR2 nativo, sólo se

detectó el receptor soluble después del tratamiento con PMA, el cual es un potente inductor de shedding. Además la inmunocitoquímica sobre células transfectadas con esta isoforma, mostró un marcaje característico de una proteína soluble, con un marcaje de membrana inexistente y un marcaje intracitoplasmático que aumentaba significativamente después del tratamiento con el inhibidor del transporte proteico, Brefeldina A. El análisis por Western blot mostraba que esta isoforma es una proteína de aproximadamente 42 kDa. Los datos del bioensayo de TNF- α indican que esta isoforma neutraliza la actividad del TNF- α , hecho que no es sorprendente puesto que el dominio extracelular, que es el que une al ligando, se mantiene idéntico a la forma nativa del TNFR2. Así pues, estos datos evidencian la existencia de otro mecanismo, aparte del shedding, capaz de generar receptor soluble de TNFR2: el splicing alternativo. Aunque no hay evidencia experimental, una isoforma de mRNA de TNFR2 a la que le falte sólo el exón 7, podría codificar también un receptor soluble de este receptor. Por otro lado, se han descrito dos mRNA de TNFR2 de ratón mediante el método de Northern Blot. Se ha observado la existencia de un transcrito mayoritario de 4.1-4.5 Kb y otro minoritario de 3.2-3.6 Kb (Hurle et al., 1998; Lewis et al., 1991). Falta estudiar qué exon o exones se han deleccionado, pero cabe la posibilidad que este mRNA minoritario se produzca por splicing alternativo de la misma forma que pasa con el mRNA del DS-sTNFR2 humano.

El *splicing* alternativo es un mecanismo regulador potente y versátil que afecta el control cuantitativo de la expresión génica y la diversificación funcional

de las proteínas (Modrek et al., 2001). Existen también otros miembros de la superfamilia del TNFR (CD95 y CD137) que generan sus receptores solubles mediante splicing alternativo (Cascino et al., 1996; Cheng et al., 1994; Michel et al., 1998). Sin embargo, el splicing alternativo y el shedding, los dos mecanismos de producción de receptor soluble, no son mutuamente excluyentes. Así pues, el receptor soluble de IL-6, IL-4, los receptores de la hormona de crecimiento y del CD40, son ejemplos de receptores generados por ambos mecanismos (Contin et al., 2003; Heaney and Golde, 1998; Jones et al., 2001; Tone et al., 2001).

En este estudio, se describe el desarrollo de un ELISA que reconoce específicamente el receptor soluble generado por splicing alternativo. Para ello se generó un anticuerpo que reconoce la proteína DS-sTNFR2. De acuerdo con las observaciones aquí descritas, el DS-sTNFR2 está presente, a bajas concentraciones, en el suero de individuos sanos y esta concentración representa el 21% del total de receptor 2 soluble, sTNFR2. Se analizó la presencia de sTNFR2 en dos entidades donde ya se han descrito concentraciones elevadas de este receptor soluble: sepsis y artritis reumatoide (Cope et al., 1992; Schroder et al., 1995). Las concentraciones de DS-sTNFR2 fueron más elevadas en el suero de los pacientes con sepsis respecto a individuos control. Sin embargo, DS-sTNFR2 representaba sólo el 22% de todo el sTNFR2, lo que indicaba que, al menos en esta condición patológica, la mayor parte de receptor soluble se generaba por *shedding*. Estos datos son consistentes con las observaciones aquí efectuadas, donde se ve que los leucocitos, estimulados *in vitro* con lipopolisacárido (LPS) producían

principalmente la forma generada por *shedding*, PC-sTNFR2. Así pues, en una respuesta inflamatoria aguda, como es la sepsis, la mayoría de receptor de TNFR2 soluble correspondería al receptor soluble producido por *shedding*.

Por otro lado, se encontraron concentraciones elevadas de DS-sTNFR2 en el suero de pacientes con artritis reumatoide. A diferencia de los pacientes con sepsis, en los pacientes con artritis reumatoide con concentraciones elevadas de sTNFR2, aproximadamente la mitad de receptor soluble era generado por *splicing* alternativo. Se observó que no existía correlación entre las concentraciones de DS-sTNFR2 y PC-sTNFR2, lo que sugiere la existencia de dos vías reguladoras independientes de la producción de receptor soluble, posiblemente con diferentes consecuencias para la regulación de la bioactividad del TNF- α .

La implicación de sTNFR2 en la patogénesis de enfermedades sigue siendo controvertida. Se ha sugerido que sTNFR2 puede actuar como antagonista de la acción del TNF- α al competir con los receptores de membrana. Aunque también se ha dicho que puede funcionar como agonista, protegiendo al TNF- α de su degradación, dando estabilidad a la estructura trimérica del TNF- α y prolongando así la capacidad del TNF- α para unirse a los receptores de membrana (Heaney and Golde, 1998). Su actividad biológica depende probablemente de las concentraciones relativas de ligando y receptor soluble. Se ha visto que bajas concentraciones de sTNFR2 potencian la acción del TNF- α , pero altas concentraciones de receptor soluble bloquean los efectos del TNF- α (Aderka et al., 1998).

Los ratones transgénicos de TNFR2 que expresan 3-4 veces más TNFR2 humano que los ratones control, desarrollan inflamación multiorgánica (Douni and Kollias, 1998). Aunque estos ratones expresaban concentraciones elevadas de sTNFR2, la patogénesis en estos animales puede no estar relacionada con el receptor soluble sino con la sobreexpresión del receptor de membrana.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se ha sugerido que las concentraciones elevadas de receptor producido por shedding, como se ha visto en enfermedades humanas, es un reflejo del aumento de la concentración del receptor en la membrana plasmática, lo que puede afectar a la homeostasis del sistema inmunológico. Los datos mostrados abren la posibilidad de que, en ciertas patologías, una parte importante del receptor de TNFR2 soluble no esté relacionada con el shedding de los receptores de membrana sino con la inducción de DS-sTNFR2. El conocimiento de la contribución relativa de cada una de las dos isoformas solubles en el total de TNFR2 soluble en suero en pacientes con enfermedades inflamatorias, podría dar información adicional de su relevancia biológica y patológica.

Cada vez más, existe la evidencia de la implicación de la disfunción en la regulación de la expresión y/o señalización del TNF- α en la patología de muchas enfermedades, como ocurre en la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y en neuropatologías como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer (Balkwill et al., 2000). Además, se ha visto recientemente que, una enfermedad humana llamada síndrome periódico asociado a TNFR se debe a

mutaciones de herencia dominante en el gen que codifica el TNFR1 y que afecta a su shedding en la superficie celular (Galon et al., 2000). También, se ha visto que una proteína de fusión TNFR2-Fc, se ha mostrado muy útil en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (Feldmann, 2002). Esta proteína de fusión fue, de hecho, el primer receptor soluble de citoquina que recibió la aprobación como agente terapéutico de uso en seres humanos. Se necesitarán más estudios para elucidar si el DS-sTNFR2 se puede utilizar como factor pronóstico o diagnóstico de determinadas enfermedades. Se necesitará un mejor conocimiento de la regulación de la producción de TNFRs, para comprender el papel fisiopatológico del TNF- α en un amplio espectro de enfermedades.

5.2.- El receptor soluble DS-sTNFR2 y su asociación con la sensibilidad a la insulina

En este trabajo se ha estudiado la asociación de la forma soluble del receptor 2 de TNF- α producida por splicing alternativo (DS-sTNFR2) y la sensibilidad a la insulina. Se ha observado que esta isoforma está presente en el 23-40% del total de los sujetos estudiados (según el origen de la población). Es interesante destacar el hecho que la concentración de DS-sTNFR2 estaba inversamente asociada a varios componentes del síndrome metabólico (índice de masa corporal, cintura, relación cintura-cadera, presión arterial diastólica, y la concentración de glucosa sérica, de triglicéridos y de ácido úrico) y también

con la resistencia a la insulina. Es importante señalar que estos resultados eran consistentes en tres poblaciones diferentes: la población mediterránea, la población del noroeste de España y población centroeuropea, lo que sugiere que no se debían a la casualidad. La relación de DS-sTNFR2 con medidas directas de la sensibilidad a la insulina, utilizando 3 metodologías diferentes (clamp, minimal model y HOMA), y la asociación con la molécula antiinflamatoria adiponectina, refuerza el posible papel de DS-sTNFR2 en la modulación de la acción de la insulina y la actividad inflamatoria. Se ha demostrado que DS-sTNFR2($\Delta 7,8$) inhibe la actividad biológica del TNF- α en estudios *in vitro* (Lainez et al, 2004) y en este segundo trabajo, el posible papel antiinflamatorio del DS-sTNFR2 se sugiere mediante una correlación positiva del DS-sTNFR2 con adiponectina en la muestra del Noreste de España.

Se ha descrito que bajas concentraciones de receptores solubles de TNF, potencian la acción del TNF- α , pero concentraciones altas de receptores solubles, bloquean la acción del TNF (Aderka, 1996; Heaney and Golde, 1996; Locksley et al., 2001).

Una parte de la concentración en suero de los receptores solubles de TNF- α , que se encuentra aumentada en el suero de sujetos obesos y sujetos resistentes a la insulina, puede no estar relacionada con el shedding de los receptores expresados en la membrana celular, si no con la inducción de DS-sTNFR2.

La activación del sistema TNF- α está asociado con un aumento del gasto energético y pérdida de peso en humanos (Toomey et al., 1995; Tracey and Cerami, 1994). Esto parece estar en contraste con una expresión aumentada

del mRNA del TNF- α en tejido adiposo, y una mayor concentración en sangre de TNF- α , sTNFR1 y sTNFR2 en sujetos obesos en los que no se observa pérdida de peso (Hotamisligil et al., 1995; Saghizadeh et al., 1996). Los resultados del presente estudio, pueden ayudar a explicar la paradoja de la relación discrepante entre sTNFR1, sTNFR2 y medidas de adiposidad encontradas en la bibliografía (Corica et al., 1999; Dzienis-Straczowska et al., 2003; Fernandez-Real et al., 1998; Fernandez-Real et al., 1999; Fernandez-Real et al., 2002; Fernandez-Real et al., 2003; Fernandez-Real et al., 1999; Hauner et al., 1998; Hotamisligil et al., 1997; Straczowski et al., 2001; Straczowski et al., 2002). Esta aparente discrepancia podría estar atribuida a la inclusión de sujetos con diferentes proporciones de DS-sTNFR2. Será necesaria más investigación para elucidar si DS-sTNFR2 puede ser utilizado como una herramienta diagnóstica y terapéutica para una mejor caracterización de la actividad inflamatoria asociada a la resistencia a la insulina. El conocimiento de cómo se regula la producción de isoforma soluble del receptor de TNF- α , será de mucho valor para comprender el papel fisiopatológico del TNF- α en el síndrome de la resistencia a la insulina.

5.3.- Estudio del receptor soluble producido por *splicing* alternativo DS-sTNFR2 en pacientes con artritis reumatoide

5.3.1 Detección de isoforma circulante

La artritis reumatoide es una enfermedad inmunoinflamatoria poliarticular que suele provocar destrucción articular y discapacidad funcional. La patogénesis de la artritis reumatoide no se conoce totalmente, pero se sabe que las citocinas y quimiocinas proinflamatorias juegan un papel fundamental en el inicio y persistencia de la enfermedad.

Existe una evidencia cada vez mayor de la implicación de la expresión del TNF- α y/o su señalización en la patogénesis de la artritis reumatoide (Feldmann, 2002). El TNF- α es una citocina proinflamatoria con un papel relevante en el establecimiento y desarrollo de la artritis reumatoide a través de la inducción de otras citocinas proinflamatorias, quimiocinas, la activación de células sinoviales y la inducción de osteoclastogénesis. Las terapias que bloquean el TNF- α han mostrado una alta eficacia en la capacidad de reducir la sinovitis, los reactantes de fase aguda (VSG y PCR) y la actividad clínica de la enfermedad, así como una reducción espectacular de la lesión de la articulación, valorada por radiografías. Estas terapias anti-TNF- α han conseguido mejorar la calidad de vida del paciente con artritis reumatoide.

La implicación real del TNFR2 en la patogénesis de la artritis reumatoide es controvertida. Polimorfismos del receptor TNFR2 se ha asociado a la susceptibilidad y la severidad de la artritis reumatoide (Constantin A et al,

2004). Las concentraciones de receptor soluble de TNFR2 se han asociado con la actividad de la enfermedad en artritis reumatoide y las concentraciones sinoviales de receptor soluble TNFR2 se han sugerido como útiles en el diagnóstico diferencial de sinovitis. Se ha sugerido que las altas concentraciones de receptor soluble de TNFR2 era reflejo de un aumento del receptor en membrana, el cual puede afectar la homeostasis del sistema inmunitario.

En el trabajo aquí expuesto se ha analizado la relevancia clínica de la concentración de receptor soluble DS-sTNFR2 en pacientes con artritis reumatoide. Los resultados muestran que DS-sTNFR2 está presente en el suero a una concentración muy elevada. Aproximadamente un 80% de la concentración de receptor soluble de TNFR2 corresponde a la forma soluble producida por *splicing* alternativo, DS-sTNFR2, en el subgrupo de pacientes de artritis reumatoide con altas concentraciones de DS-sTNFR2.

Este estudio también sugiere que los pacientes con una concentración muy elevada de DS-sTNFR2 podrían tener una mejor respuesta terapéutica a la terapia anti-TNF- α , pero no al tratamiento con antireumáticos modificadores de la enfermedad (FAME), comparados con los pacientes con artritis reumatoide con una concentración baja de DS-sTNFR2. Aunque la concentración sérica de DS-sTNFR2 antes del inicio del tratamiento no se correlacionaba con el daño de la articulación determinado radiológicamente al final del estudio, los pacientes con concentraciones muy elevadas de DS-sTNFR2 antes del comienzo del tratamiento manifestaron menos progresión radiológica que los pacientes con bajas concentraciones. Este hecho es

especialmente relevante porque no se encontraron diferencias significativas en los parámetros clínicos y biológicos de la actividad de la enfermedad en el brote agudo entre los pacientes de artritis reumatoide con concentraciones altas y bajas de DS-sTNFR2.

Estos resultados están de alguna manera limitados por el número de muestras relativamente pequeño del estudio con infliximab (28 pacientes en el grupo de infliximab, 9 de los cuales poseen DS-sTNFR2>50). Se puede considerar este estudio como el punto de partida de un estudio más amplio a realizar.

Basados en la hipótesis de que concentraciones muy elevadas de TNFR2 soluble podrían bloquear la acción del TNF- α , nosotros hipotetizamos que los pacientes con artritis reumatoide con concentraciones detectables de isoforma podrían tener una enfermedad menos grave, en términos de menor destrucción articular, y su respuesta a las terapias anti-TNF- α podría ser diferente a la que presentarían los pacientes con concentraciones bajas de receptor soluble. De hecho, estos resultados también sugieren que concentraciones muy altas de DS-sTNFR2 podían predecir una buena respuesta al infliximab en la semana 30 de la terapia.

La observación de concentraciones elevadas de receptor soluble producido por *splicing* alternativo en pacientes con artritis reumatoide, abre la posibilidad de que, en ciertas patologías, una parte importante de los receptores solubles de TNFR2 pueden no estar relacionados con el corte proteolítico ó *shedding* del receptor de membrana, sino con la inducción de DS-sTNFR2. El conocimiento de la contribución relativa de cada una de las

isoformas solubles en el valor total de los receptores solubles de TNFR2 en pacientes de artritis reumatoide puede aportar nuevo conocimiento sobre su relevancia clínica y biológica.

5.3.2. Estudio preliminar de polimorfismos que puedan contribuir a la presencia de isoforma

Diferentes polimorfismos del gen del TNFR2 se han asociado con la susceptibilidad a padecer artritis reumatoide y con la severidad de la misma (Barton et al., 2001; Dieude et al., 2002).

Se ha estudiado si la presencia de isoforma detectable podría atribuirse a la presencia de variantes genéticas en los sitios de *splicing*. En una muestra reducida de pacientes con artritis reumatoide se realizó la secuenciación de las regiones limítrofes intrón –exón del TNFR2 implicadas en el *splicing* alternativo de los exones 7 y 8 del mRNA del TNFR2 y se ha observado que no existen cambios en los sitios de *splicing* consenso 5' y 3' que determinan el *splicing* alternativo.

En este mismo estudio, se ha confirmado la presencia del polimorfismo del exón 6 en el codón 196 (ATG-AGG) que da lugar a un cambio de aminoácido de metionina a arginina (196M/R). También se observó un polimorfismo intrónico, un cambio de una guanina (G) por una adenina (A), a 112 nucleótidos del extremo 5' del intrón 7. Se observó que estos dos polimorfismos se transmiten juntos y están en desequilibrio de ligamiento.

Se comprobó una relación significativa entre la presencia del polimorfismo 196R y una concentración de DS-sTNFR2 superior a la media de concentración de la muestra control.

El polimorfismo 196M/R es el polimorfismo más estudiado del TNFR2. En todos los estudios en los que se ha demostrado una asociación entre este polimorfismo de TNFR2 y la incidencia o pronóstico de una enfermedad inflamatoria crónica, el alelo R está asociado con el genotipo de alto riesgo. Así, se ha asociado en población caucásica a la susceptibilidad de padecer artritis reumatoide en aquéllos individuos que padecen una artritis reumatoide familiar (Barton et al., 2001; Dieude et al., 2002). Se ha relacionado esta variante con la susceptibilidad a padecer periodontitis (Shimada et al., 2004) y colitis ulcerosa (Pierik et al., 2004). Existen diversos estudios que muestran también una asociación entre el alelo R y un aumento en la susceptibilidad de padecer lupus eritematoso (SLE) en población japonesa (Somata et al., 1999; Morita et al., 2001). Sin embargo, otros estudios no han podido confirmar estas observaciones (Takahashi et al., 2001; Lee et al., 2001; Al-ansari et al., 1999).

El significado funcional del polimorfismo 196 TNFR2 aún no se ha esclarecido por completo. Existen consideraciones estructurales que otorgarían un significado funcional a este polimorfismo. En primer lugar, el exón 6, donde se encuentra el polimorfismo, codifica el sitio del corte proteolítico que dará lugar al receptor soluble (Mac Ewan et al., 2002). En segundo lugar, el polimorfismo se localiza dentro de uno de los 4 dominios ricos en cisteínas que son importantes para la unión óptima del TNF- α (Hsu et al., 1993). Sin embargo, se

ha demostrado que el polimorfismo 196R no influye ni sobre la unión del TNF- α a su receptor ni sobre el shedding del receptor (Morita et al., 2001). Existen algunas evidencias *in vitro* que indican que la transducción de señal del TNFR2 196R puede ser más eficiente que la del 196M (Morita et al., 2001). En este estudio, se mostraba que las células HeLa transfectadas con el receptor TNFR2 196R producían 2.5 veces más IL-6 y poseían una sensibilidad citotóxica mayor que las transfectadas con el TNFR2 196M. Se ha propuesto que este polimorfismo podría modular el ensamblaje y el cambio conformacional del TNFR2. De hecho, la posición del aminoácido 196 está próximo al dominio yuxtamembrana del TNFR2 que se sabe es importante para la dimerización o trimerización del receptor (Bazzoni et al., 1996).

Con respecto al polimorfismo del intrón 7, el nucleótido guanina que se ha estudiado es el primero de un grupo de 5 Gs. Se han descrito secuencias ricas en Gs como secuencias consenso de unión a proteínas reguladoras del splicing, como por ejemplo la proteína hnRNPH (Ladd et al., 2002). Se ha visto que muchos de los polimorfismos detectados en intrones o exones pueden estar incluidos en secuencias reguladoras del *splicing*. Se podría hipotetizar que los cambios que implican el polimorfismo del exón 6, así como el polimorfismo del intrón 7, produjeran un cambio en estas secuencias y esto afectara al *splicing* alternativo del mRNA. Una forma de confirmar o rebatir esta hipótesis sería construir un minigen, es decir, una construcción que incluyera los exones e intrones implicados en el proceso de *splicing* a estudiar, y determinar tras su transfección en células eucariotas y análisis mediante RT-PCR, la proporción de cada forma de mRNA producida.

En conclusión, en este trabajo se describe por primera vez una forma soluble de receptor de TNFR2 producida por splicing alternativo. Esta isoforma se ha encontrado en el suero de sujetos sanos, y a concentraciones disminuidas en sujetos con síndrome metabólico. Asimismo, se detecta isoforma en pacientes con procesos inflamatorios agudos (sepsis) y crónicos (artritis reumatoide). En este último grupo, su presencia podría estar relacionada con la respuesta al tratamiento médico.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1.- Se ha identificado una forma nueva de mRNA del receptor TNFR2 producido por splicing alternativo, denominada DS-sTNFR2(Δ 7,8). Esta forma alternativa de mensajero, codifica una proteína soluble de TNFR2, a la que se ha denominado DS-sTNFR2, de aproximadamente 42 KDa, caracterizada por la falta del dominio transmembrana e intracitoplasmático, que es capaz de unirse al TNF- α y bloquear su acción.

6.2.- La proteína DS-sTNFR2 está presente en el suero de sujetos sanos a bajas concentraciones, y a concentraciones elevadas en el suero de pacientes con procesos inflamatorios como sepsis y artritis reumatoide.

6.3.- La concentración de DS-sTNFR2 está inversamente asociada a varios componentes del síndrome metabólico y también con la resistencia a la insulina. La asociación con la molécula antiinflamatoria adiponectina refuerza el papel de DS-sTNFR2 en la modulación de la acción de la insulina y la actividad inflamatoria.

6.4.- Los pacientes de artritis reumatoide con valores elevados de DS-sTNFR2 presentan, probablemente, una mejor respuesta a la terapia

con anticuerpos anti -TNF- α , infliximab, pero no a la terapia con FAME, que los pacientes con valores más bajos.

6.5.- Existe una asociación entre la presencia del polimorfismo del exón 6 del TNFR2, 196M/R, y concentraciones elevadas de isoforma, DS-sTNFR2. La presencia del polimorfismo estudiado del intrón 7 del TNFR2 tiende a asociarse con concentraciones elevadas de isoforma.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., and Kronke, M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937-947.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. (1992). Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* **175**, 323-9.

Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 231-240.

Aderka, D., Sorkine, P., Abu-Abid, S., Lev, D., Setton, A., Cope, A. P., Wallach, D., and Klausner, J. (1998). Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J Clin Invest* **101**, 650-659.

Al-Ansari AS, Ollier WE, Villarreal J, Ordi J, Teh LS, Hajeer AH. (2000). Tumor necrosis factor receptor II (TNFRII) exon 6 polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **55**, 97-9.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**, 420-430.

Balkwill, F., Foxwell, B., and Brennan, F. (2000). TNF is here to stay! *Immunol Today* **21**, 470-471.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.

Barbara JA, Smith WB, Gamble JR, Van Ostade X, Vandenaabeele P, Tavernier J, Fiers W, Vadas MA, Lopez AF. (1994). Dissociation of TNF-alpha cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-alpha mutants. *EMBO J.* **13**, 843-50.

Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J. (2001). Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* **44**, 61-5.

Baud, V., and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**, 372-377.

- Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334, 1717-1725.
- Beltinger, C. P., White, P. S., Maris, J. M., Sulman, E. P., Jensen, S. J., LePaslier, D., Stallard, B. J., Goeddel, D. V., de Sauvage, F. J., and Brodeur, G. M. (1996). Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics* 35, 94-100.
- Bemelmans, M. H., Gouma, D. J., and Buurman, W. A. (1993). Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol* 150, 2007-2017.
- Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270, 2411-2414.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A.(1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552-4.
- Beutler, B., and Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7, 625-655.
- Black, D. L. (1995). Finding splice sites within a wilderness of RNA. *Rna* 1, 763-771.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Blanchette, M., and Chabot, B. (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *Embo J* 18, 1939-1952.
- Blencowe, B. J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25, 106-110.
- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2(8657), 244-7.
- Botas Cervero P, Delgado Alvarez E, Castano Fernandez G, Diaz De Grenu C, Prieto Santiago J, Diaz Cadorniga FJ. (2002). [Prevalence of diabetes mellitus and glucose intolerance in the population aged 30 to 75 years in Asturias, Spain] *Rev Clin Esp* 202, 421-9.

- Caputi, M., and Zahler, A. M. (2002). SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *Embo J* 21, 845-855.
- Carswell S. (1975) Proceedings: Changes in aerobic power in patients undergoing elective surgery. *J Physiol* 251, 42P-43P.
- Cartegni, L., Chew, S. L., and Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.
- Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R., and Ruberti, G. (1996). Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 156, 13-17.
- Chen, C. D., Kobayashi, R., and Helfman, D. M. (1999). Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev* 13, 593-606.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263, 1759-1762.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Colville-Nash PR, Scott DL. (1992). Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis.* 51, 919-25.
- Constantin A, Dieude P, Lauwers-Cances V, Jamard B, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cornelis F, Cantagrel A..(2004). Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Mar;50(3):742-7.
- Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2003). Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278, 32801-32809.
- Cope, A. P., Aderka, D., Doherty, M., Engelmann, H., Gibbons, D., Jones, A. C., Brennan, F. M., Maini, R. N., Wallach, D., and Feldmann, M. (1992). Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 35, 1160-1169.
- Corica, F., Allegra, A., Corsonello, A., Buemi, M., Calapai, G., Ruello, A., Nicita Mauro, V., and Ceruso, D. (1999). Relationship between plasma leptin levels

and the tumor necrosis factor-alpha system in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 355-360.

Coulter, L. R., Landree, M. A., and Cooper, T. A. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17, 2143-2150.

Crowe PD, VanArsdale TL, Goodwin RG, Ware CF. (1993). Specific induction of 80-kDa tumor necrosis factor receptor shedding in T lymphocytes involves the cytoplasmic domain and phosphorylation. *J Immunol* 151, 6882-90

DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237, E214-23

Dieude P, Petit E, Cailleau-Moindrault S, Osorio J, Pierlot C, Martinez M, Faure S, Alibert O, Lasbleiz S, De Toma C, Bardin T, Prum B, Cornelis F; European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families. (2002). Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum* 46, 2039-44

Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.

Douni, E., and Kollias, G. (1998). A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha, or the p55TNF-R. *J Exp Med* 188, 1343-1352.

Dunbar, J. D., Song, H. Y., Guo, D., Wu, L. W., and Donner, D. B. (1997). Two-hybrid cloning of a gene encoding TNF receptor-associated protein 2, a protein that interacts with the intracellular domain of the type 1 TNF receptor: identity with subunit 2 of the 26S protease. *J Immunol* 158, 4252-4259.

Dzienis-Straczkowska, S., Straczkowski, M., Szelachowska, M., Stepien, A., Kowalska, I., and Kinalska, I. (2003). Soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in young obese subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 26, 875-880.

Eck, M. J., and Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-17605.

Eck, M. J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A. M., and Sprang, S. R. (1992). The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J Biol Chem* 267, 2119-2122.

Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, Moore MW. (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372, 560-3.

Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A., and Burge, C. B. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007-1013.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*.14:397-440.

Feldmann M, Maini RN. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*.;19:163-96.

Feldmann, M. (2002). Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364-371.

Fernandez-Real, J. M., Broch, M., Ricart, W., Casamitjana, R., Gutierrez, C., Vendrell, J., and Richart, C. (1998). Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47, 1757-1762.

Fernandez-Real, J. M., Gutierrez, C., Ricart, W., Casamitjana, R., Fernandez-Castaner, M., Vendrell, J., Richart, C., and Soler, J. (1997). The TNF-alpha gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46, 1468-1472.

Fernandez-Real, J. M., Gutierrez, C., Ricart, W., Castineira, M. J., Vendrell, J., and Richart, C. (1999). Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are independent determinants of plasma cholesterol and LDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis* 146, 321-327.

Fernandez-Real, J. M., Lainez, B., Vendrell, J., Rigla, M., Castro, A., Penarroja, G., Broch, M., Perez, A., Richart, C., Engel, P., and Ricart, W. (2002). Shedding of TNF-alpha receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E952-959.

Fernandez-Real, J. M., Lopez-Bermejo, A., Casamitjana, R., and Ricart, W. (2003). Novel interactions of adiponectin with the endocrine system and inflammatory parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2714-2718.

Fernandez-Real, J. M., Molina, A., Broch, M., Ricart, W., Gutierrez, C., Casamitjana, R., Vendrell, J., Soler, J., and Gomez-Saez, J. M. (1999). Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy. *Diabetes* 48, 1108-1112.

Fernandez-Real, J. M., and Ricart, W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24, 278-301.

Fernandez-Real, J. M., Vendrell, J., Ricart, W., Broch, M., Gutierrez, C., Casamitjana, R., Oriola, J., and Richart, C. (2000). Polymorphism of the tumor

necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 23, 831-837.

Fiers, W. (1991). Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285, 199-212.

Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P., and Valcarcel, J. (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 6, 1089-1098.

Ford, E. S., Giles, W. H., and Dietz, W. H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287, 356-359.

Fuchs, P., Strehl, S., Dworzak, M., Himmler, A., and Ambros, P. F. (1992). Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. *Genomics* 13, 219-224.

Galon, J., Aksentijevich, I., McDermott, M. F., O'Shea, J. J., and Kastner, D. L. (2000). TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol* 12, 479-486.

Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., and Vadas, M. A. (1985). Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8667-8671.

Grabowski, P. J., and Black, D. L. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* 65, 289-308.

Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6, 1197-1211.

Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 570-575.

Grell M, Becke FM, Wajant H, Mannel DN, Scheurich P.(1998). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* 28, 257-63.

Hauner, H., Bender, M., Haastert, B., and Hube, F. (1998). Plasma concentrations of soluble TNF-alpha receptors in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 1239-1243.

Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 21, 2575-9.

Heaney, M. L., and Golde, D. W. (1996). Soluble cytokine receptors. *Blood* 87, 847-857.

Heaney, M. L., and Golde, D. W. (1998). Soluble receptors in human disease. *J Leukoc Biol* 64, 135-146.

Hertel, K. J., Lynch, K. W., and Maniatis, T. (1997). Common themes in the function of transcription and splicing enhancers. *Curr Opin Cell Biol* 9, 350-357.

Higuchi, M., and Aggarwal, B. B. (1994). TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol* 152, 3550-3558.

Hoffman, B. E., and Grabowski, P. J. (1992). U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. *Genes Dev* 6, 2554-2568.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4854-8.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Atkinson, R. L., and Spiegelman, B. M. (1997). Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 46, 451-455.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., and Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415.

Hsu KC, Chao MV. (1993). Differential expression and ligand binding properties of tumor necrosis factor receptor chimeric mutants. *J Biol Chem* 268, 16430-6

Hurle, B., Segade, F., Rodriguez, R., Ramos, S., and Lazo, P. S. (1998). The mouse tumor necrosis factor receptor 2 gene: genomic structure and characterization of the two transcripts. *Genomics* 52, 79-89.

Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A., and de Vos, A. M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 4, 563-571.

- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24, 683-9.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Jacobsen, F. W., Dubois, C. M., Rusten, L. S., Veiby, O. P., and Jacobsen, S. E. (1995). Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Regulation of c-kit and p53 expression. *J Immunol* 154, 3732-3741.
- Jacquet, S., Ropers, D., Bilodeau, P. S., Damier, L., Mougin, A., Stoltzfus, C. M., and Branlant, C. (2001). Conserved stem-loop structures in the HIV-1 RNA region containing the A3 3' splice site and its cis-regulatory element: possible involvement in RNA splicing. *Nucleic Acids Res* 29, 464-478.
- Jones, A. L., and Selby, P. (1989). Clinical applications of tumour necrosis factor. *Prog Growth Factor Res* 1, 107-122.
- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., and Fuller, G. M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb J* 15, 43-58.
- Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Tokunaga K. (1999). Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 53, 527-33
- Karpusas, M., Hsu, Y. M., Wang, J. H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., and Thomas, D. (1995). 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 3, 1426.
- Kasuga, M., Karlsson, F. A., and Kahn, C. R. (1982). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215, 185-187.
- Kirwan JR. (2000). Using the Larsen index to assess radiographic progression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27, 264-8.
- Kohno, T., Brewer, M. T., Baker, S. L., Schwartz, P. E., King, M. W., Hale, K. K., Squires, C. H., Thompson, R. C., and Vannice, J. L. (1990). A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8331-8335.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53.

Leiden, J. M., and Thompson, C. B. (1994). Transcriptional regulation of T-cell genes during T-cell development. *Curr Opin Immunol* 6, 231-237.

Ladd AN, Cooper TA. (2002). Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol* 3(11):reviews0008

Lainez B, Fernandez-Real JM, Romero X, Esplugues E, Canete JD, Ricart W, Engel P. (2004). Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *Int Immunol* 16, 169-77.

Lantz M, Bjornberg F, Olsson I, Richter J. (1994). Adherence of neutrophils induces release of soluble tumor necrosis factor receptor forms. *J Immunol* 152, 1362-9.

Lee EB, Yoo JE, Lee YJ, Choi YJ, Park KS, Song YW. (2001). Tumor necrosis factor receptor 2 polymorphism in systemic lupus erythematosus: no association with disease. *Hum Immunol* 62, 1148-52

Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y., and Goeddel, D. V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2830-2834.

Libri, D., Piseri, A., and Fiszman, M. Y. (1991). Tissue-specific splicing in vivo of the beta-tropomyosin gene: dependence on an RNA secondary structure. *Science* 252, 1842-1845.

Libri, D., Stutz, F., McCarthy, T., and Rosbash, M. (1995). RNA structural patterns and splicing: molecular basis for an RNA-based enhancer. *Rna* 1, 425-436.

Liu, L. S., Spelleken, M., Rohrig, K., Hauner, H., and Eckel, J. (1998). Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47, 515-522.

Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.

Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Lucas R, Juillard P, Decoster E, Redard M, Burger D, Donati Y, Giroud C, Monso-Hinard C, De Kesel T, Buurman WA, Moore MW, Dayer JM, Fiers W,

- Bluethmann H, Grau GE. (1997). Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27, 1719-25.
- Lucas R, Garcia I, Donati YR, Hribar M, Mandriota SJ, Giroud C, Buurman WA, Fransen L, Suter PM, Nunez G, Pepper MS, Grau GE. (1998). Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 28, 3577-86.
- MacEwan DJ. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14, 477-92.
- Mackay F, Kalled SL (2002). TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol* 14, 783-90.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544.
- Michel, J., Langstein, J., Hofstadter, F., and Schwarz, H. (1998). A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 28, 290-295.
- Modrek, B., and Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30, 13-19.
- Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., and Lee, C. (2001). Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 29, 2850-2859.
- Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K, Niho Y. (2001). Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum* 44, 2819-27
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., *et al.* (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733-736.
- Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10, 459-472.
- Myers, M. G., Jr., Backer, J. M., Sun, X. J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., and White, M. F. (1992). IRS-1 activates

phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10350-10354.

Natoli, G., Costanzo, A., Moretti, F., Fulco, M., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 26079-26082.

Old, L. J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230, 630-632.
Parker, R., Siliciano, P. G., and Guthrie, C. (1987). Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* 49, 229-239.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-9.

Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., *et al.* (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-67.

Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. (1992). Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 77, 510-4.

Pierik M, Vermeire S, Steen KV, Joossens S, Claessens G, Vlietinck R, Rutgeerts P. (2004). Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther* 20, 303-10.

Pikielny, C. W., and Rosbash, M. (1985). mRNA splicing efficiency in yeast and the contribution of nonconserved sequences. *Cell* 41, 119-126.

Pincus T, Summey JA, Soraci SA Jr, Wallston KA, Hummon NP. (1983). Assessment of patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire. *Arthritis Rheum* 26, 1346-53.

Porteu F, Brockhaus M, Wallach D, Engelmann H, Nathan CF. (1991). Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor

necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 266, 18846-53.

Reed, R. (1989). The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. *Genes Dev* 3, 2113-2123.

Robberson, B. L., Cote, G. J., and Berget, S. M. (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 10, 84-94.

Rothe, J., Bluethmann, H., Gentz, R., Lesslauer, W., and Steinmetz, M. (1993). Genomic organization and promoter function of the murine tumor necrosis factor receptor beta gene. *Mol Immunol* 30, 165-175.

Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.

Ruskin, B., Krainer, A. R., Maniatis, T., and Green, M. R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 38, 317-331.

Sacca, R., Cuff, C. A., Lesslauer, W., and Ruddle, N. H. (1998). Differential activities of secreted lymphotoxin-alpha3 and membrane lymphotoxin-alpha1beta2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. *J Immunol* 160, 485-491.

Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R., and Kern, P. A. (1996). The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97, 1111-1116.

Santee, S. M., and Owen-Schaub, L. B. (1996). Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem* 271, 21151-21159.

Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4615-4619.

Schaal, T. D., and Maniatis, T. (1999). Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol Cell Biol* 19, 261-273.

Schaal, T. D., and Maniatis, T. (1999). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* 19, 1705-1719.

Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., Schade, F. U., and Kremer, B. (1995). Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* 23, 143-148.

Schwarz, H., Arden, K., and Lotz, M. (1997). CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 699-703.

Schwarz, H., Blanco, F. J., von Kempis, J., Valbracht, J., and Lotz, M. (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* 87, 2839-2845.

Seckinger, P., Isaaz, S., and Dayer, J. M. (1988). A human inhibitor of tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 167, 1511-1516.

Seckinger, P., Vey, E., Turcatti, G., Wingfield, P., and Dayer, J. M. (1990). Tumor necrosis factor inhibitor: purification, NH₂-terminal amino acid sequence and evidence for anti-inflammatory and immunomodulatory activities. *Eur J Immunol* 20, 1167-1174.

Segui, B., Cuvillier, O., Adam-Klages, S., Garcia, V., Malagarie-Cazenave, S., Leveque, S., Caspar-Bauguil, S., Coudert, J., Salvayre, R., Kronke, M., and Levade, T. (2001). Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* 108, 143-151.

Serrano Rios M, Ascaso Gimilio JF, Blazquez Fernandez E, Cabezas Cerraro J, Carmena Rodriguez R, Escobar Jimenez F, Fernandez-Real JM, Gabriel Sanchez R, Gomis de Barbera R, Grande Aragon C, Herrera Pomba JL, Pallardo Sanchez LF, Potau Vilalta N, Ricart Engel W, Rovira Loscos A, Zorzano Olarte A; Grupo de Trabajo Resistencia a la insulina de la Sociedad Espanola de Diabetes. (2002). [Insulin resistance and its involvement in multiple risk factors associated with type 2 diabetes mellitus] *Med Clin (Barc)* 119, 458-63.

Shalaby MR, Sundan A, Loetscher H, Brockhaus M, Lesslauer W, Espevik T. (1990). Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors. *J Exp Med* 172, 1517-20

Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD. (1995). Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* 181, 607-17.

- Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K. (2004). Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 31, 463-9.
- Smith, C. W., and Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 25, 381-388.
- Staley, J. P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Straczkowski, M., Kowalska, I., Dzienis-Straczkowska, S., Stepien, A., Skibinska, E., Szelachowska, M., and Kinalska, I. (2001). Changes in tumor necrosis factor-alpha system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 145, 273-280.
- Straczkowski, M., Kowalska, I., Stepien, A., Dzienis-Straczkowska, S., Szelachowska, M., and Kinalska, I. (2002). Increased plasma-soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 2 level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 25, 1824-1828.
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.
- Takahashi M, Hashimoto H, Akizuki M, Sasazuki T, Nishikimi N, Ouchi H, Kobayashi Y, Numano F, Kimura A. (2001). Lack of association between the Met196Arg polymorphism in the TNFR2 gene and autoimmune diseases accompanied by vasculitis including SLE in Japanese. *Tissue Antigens* 57, 66-9.
- Takao, S., Mykytyn, K., and Jacob, C. O. (1993). Novel DNA polymorphism in the mouse tumor necrosis factor receptors type 1 and type 2. *Immunogenetics* 37, 199-203.
- Tang, P., Hung, M. C., and Klostergaard, J. (1996). Length of the linking domain of human pro-tumor necrosis factor determines the cleavage processing. *Biochemistry* 35, 8226-8233.
- Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcarcel, J., and Kjems, J. (2001). The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *Embo J* 20, 5748-5758.
- Tartaglia, L. A., and Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today* 13, 151-153.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., and Palladino, M. A., Jr. (1993). Stimulation of human T-cell proliferation

by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 151, 4637-4641.

Tartaglia, L. A., Pennica, D., and Goeddel, D. V. (1993). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268, 18542-18548.

Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A., Jr., and Goeddel, D. V. (1991). The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9292-9296.

Tewari, M., and Dixit, V. M. (1996). Recent advances in tumor necrosis factor and CD40 signaling. *Curr Opin Genet Dev* 6, 39-44.

Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. (1992). Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7375-9.

Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P. J., Wykes, M., and Waldmann, H. (2001). Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1751-1756.

Toomey, D., Redmond, H. P., and Bouchier-Hayes, D. (1995). Mechanisms mediating cancer cachexia. *Cancer* 76, 2418-2426.

Tracey, K. J., and Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45, 491-503.

Valcarcel, J., and Gebauer, F. (1997). Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol* 7, R705-708.

Van Ostade X, Vandenabeele P, Everaerd B, Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavernier J, Brouckaert P, Fiers W. (1993). Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 361, 266-9.

Van Zee, K. J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C. S., Moldawer, L. L., and Lowry, S. F. (1992). Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4845-4849.

Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fiers, W. (1995). Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5, 392-399.

Vandenabeele, P., Declercq, W., Vercammen, D., Van de Craen, M., Grooten, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., and Fiers, W. (1992).

Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma. *J Exp Med* 176, 1015-1024.

Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411-452.

Vendrell, J., Fernandez-Real, J. M., Gutierrez, C., Zamora, A., Simon, I., Bardaji, A., Ricart, W., and Richart, C. (2003). A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 167, 257-264.

Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. (2001). Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol* 21, 3281-3288.

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., and Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17, 331-367.

Weiss, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Muller, G., Scheurich, P., and Wajant, H. (1997). Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol* 158, 2398-2404.

White, M. F., Maron, R., and Kahn, C. R. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318, 183-186.

Williams RO, Feldmann M, Maini RN. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9784-8.

Yin, M., Wheeler, M. D., Kono, H., Bradford, B. U., Gallucci, R. M., Luster, M. I., and Thurman, R. G. (1999). Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117, 942-952.

Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169, 1747-1756.

