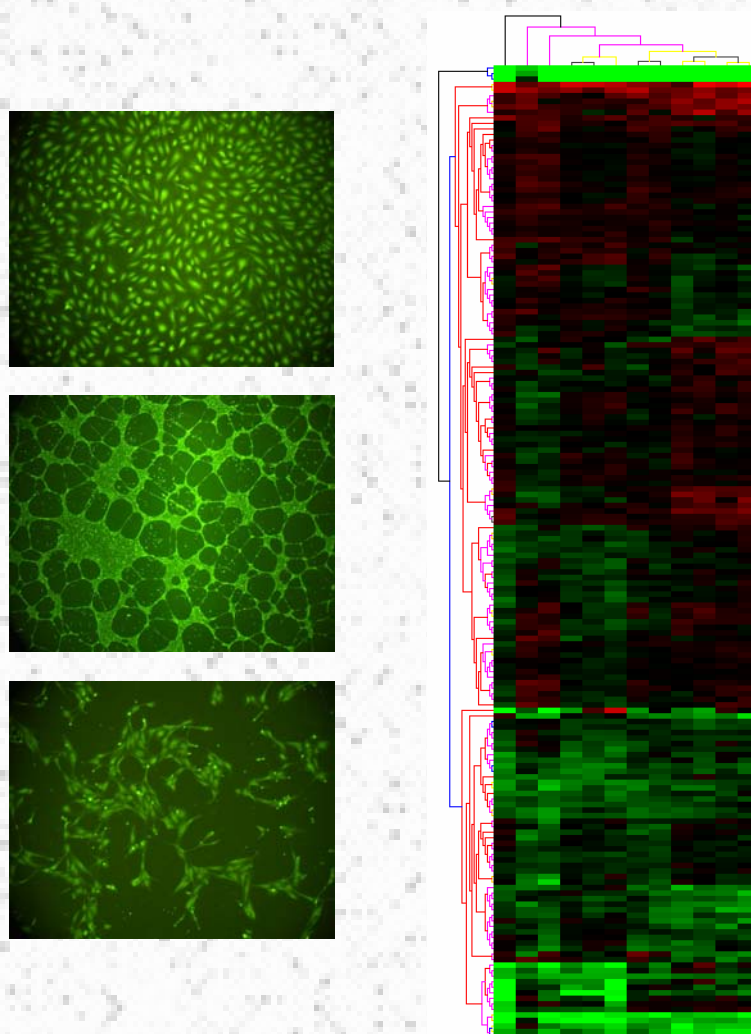


TESI DOCTORAL

**PAPER DEL RECEPTOR CD40 EN L'ACTIVACIÓ DE  
LES CÈL·LULES ENDOTELIALS.**

**RELLEVÀNCIA DE LA INTERACCIÓ CD40-CD40L  
EN PROCESSOS IMMUNOINFLAMATORIS**



**Raquel Pluvinet Ortega**

**2007**

**Paper del receptor CD40 en l'activació de les cèl·lules endotelials.  
Rellevància de la interacció CD40-CD40L en processos  
immunoinflamatoris**

Memòria presentada per

**Raquel Pluvinet Ortega**

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Josep M<sup>a</sup> Aran Perramon, al centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona. Programa de Genètica (bienni 2000-2002).

El director,

El tutor,

Dr. Josep M<sup>a</sup> Aran Perramon

Ricard Albalat Rodríguez

L'autora,

Raquel Pluvinet Ortega

Barcelona, 2007



<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>7</b>
1.1. Mecanisme d'inflamació: paper de les cèl·lules endotelials .....	9
1.1.1. Funcions de l'endoteli vascular .....	10
1.1.1.1. Immunitat innata .....	10
1.1.1.2. Immunitat adaptativa .....	11
1.1.1.3. Coagulació .....	11
1.1.1.4. Angiogènesi .....	11
1.1.1.5. Reclutament leucocitari en la resposta inflamatòria .....	11
1.1.1.6. Interacció plaquetes-endoteli .....	15
1.1.2. Activació endotelial en inflamació .....	15
1.1.2.1. Efectes de l'activació endotelial en el reclutament leucocitari .....	16
1.1.2.2. Estrès Oxidatiu.....	17
1.1.2.3. Sistema Renina-Angiotensina.....	19
1.2. CD40 I CD40L.....	20
1.2.1. CD40.....	20
1.2.1.1. Estructura de CD40.....	20
1.2.1.2. Expressió de CD40 .....	21
1.2.2. CD40L .....	21
1.2.2.1. Estructura de CD40L .....	21
1.2.2.2. Expressió de CD40L.....	22
1.3. Transducció de senyals de CD40 .....	24
1.3.1. TRAFs. Factors associats a la família de TNF-R .....	24
1.3.1.1. Inactivació de TRAFs.....	26
1.3.2. Senyalització de CD40 en cèl·lules B.....	27
1.3.2.1. Paper de STATs .....	27
1.3.2.2. Activació de quinases i fosfatases.....	27
1.3.2.3. Factors de transcripció .....	28
1.3.3. Senyalització de CD40 en altres tipus cel·lulars.....	29
1.4. Funcions biològiques de CD40-CD40L.....	33
1.4.1. Limfòcits T i B: Immunitat humoral .....	33
1.4.1.1. CD40-CD40L i activació de limfòcits T.....	34
1.4.2. Altres tipus cel·lulars: Inducció de mediadors inflamatoris .....	36
1.4.3. Funció CD40-CD40L en endoteli.....	38
1.4.3.1. Cèl·lules endotelials i expressió de CD40.....	38
1.4.3.2. Interacció leucòcit-endoteli.....	38
1.4.3.3. Interacció plaquetes-endoteli .....	39
1.5. CD40-CD40L i patologia humana .....	41
1.5.1. Malaltia cardiovascular: Aterosclerosi .....	41
1.5.1.1. Cèl·lules endotelials i lesió ateroscleròtica .....	41
1.5.1.2. CD40 en l'inici i progressió de l'aterosclerosi.....	41
1.5.1.3. CD40 i models animals d'aterosclerosi .....	43

1.5.1.4.	CD40 i estrès oxidatiu en malaltia cardiovascular .....	44
1.5.1.5.	Sistema Renina-Angiotensina .....	44
1.5.1.6.	CD40L com a marcador de malaltia cardiovascular .....	45
1.5.1.7.	Inhibició potencial de CD40-CD40L en inflamació vascular .....	46
1.5.2.	Malalties autoimmunes i CD40 .....	47
1.5.2.1.	Artritis reumatoide i lupus eritematós sistèmic .....	47
1.6.	Trasplantament renal .....	49
1.6.1.	Etapes en el rebuig mitjançat per cèl·lules T .....	49
1.6.1.1.	Activació de les cèl·lules T en la resposta al·loimmune .....	50
1.6.2.	Efectors i lesions de rebuig .....	50
1.6.3.	Expressió de CD40-CD40L en ronyó normal i trasplantat .....	51
1.6.4.	Drogues immunosupressores en trasplantament renal .....	52
1.6.5.	Bloqueig del senyal coestimulador en trasplantament .....	53
1.6.5.1.	Sistema CD28-B7 .....	53
1.6.5.2.	Sistema CD40-CD40L .....	55
1.6.5.3.	Combinació sistema CD28 i CD40-CD40L .....	57
1.7.	Silenciament gènic posttranscripcional .....	60
1.7.1.	Tecnologia antisentit: d'oligonucleòtids antisentit a siRNA .....	60
1.7.1.1.	Oligonucleòtids antisentit .....	60
1.7.1.2.	siRNA .....	61
1.7.2.	Interferència per RNA (RNAi) .....	62
1.7.2.1.	Història .....	62
1.7.2.2.	Funcions biològiques de RNAi .....	62
1.7.2.3.	Mecanisme de RNAi .....	63
1.7.2.4.	RNAi en mamífers .....	64
1.7.2.5.	RNAi estable .....	65
1.7.2.6.	Aplicacions terapèutiques de siRNA .....	66
1.8.	Microarrays .....	69
1.8.1.	Aplicacions dels microarrays en investigació bàsica i clínica .....	69
1.8.1.1.	Expressió gènica i descobriment de nous gens .....	69
1.8.1.2.	Predicció de funció gènica .....	70
1.8.1.3.	Connectant rutes metabòliques .....	71
1.8.2.	Microarrays i cèl·lules endotelials .....	72
<b>2.</b>	<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>77</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>81</b>
3.1.	Línies cel·lulars i cultius primaris .....	83
3.2.	Estimulació de ECV-304 amb citoquines proinflamatòries .....	83
3.3.	Estimulació de HUVEC amb cèl·lules Jurkat D1.1 .....	84
3.4.	Disseny i síntesi dels siRNAs anti-CD40 humà i de rata .....	84
3.5.	Transfecció de siRNAs .....	86
3.5.1.	Transfecció amb OligofectAMINA .....	86

3.5.2.	Transfecció amb Targefect siRNA transfection reagent.....	86
3.5.3.	Electroporació.....	87
3.6.	Assaig luciferasa .....	88
3.6.1.	Clonatge de CD40 de rata en el plasmidi pTarget-luc.....	88
3.6.2.	Transfecció de les cèl·lules HEK-293 .....	89
3.6.3.	Obtenció dels extractes proteics .....	90
3.6.4.	Determinació de l'activitat luciferasa.....	90
3.6.5.	Determinació de l'activitat $\beta$ -galactosidasa.....	90
3.7.	Citometria de flux .....	90
3.7.1.	Determinació de l'eficiència de transfecció .....	90
3.7.2.	Quantificació de l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular.....	91
3.7.3.	Assaig d'adhesió leucocitària.....	91
3.8.	Extracció de RNA total.....	92
3.9.	Retrotranscripció o Transcripció reversa (RT) .....	92
3.10.	PCR semiquantitativa a temps real .....	92
3.10.1.	Quantificació de l'expressió de CD40 humà i de rata .....	93
3.10.2.	Validació de l'expressió gènica obtinguda per microarrays.....	94
3.11.	Anàlisi per Western Blot.....	96
3.11.1.	Obtenció dels extractes proteics .....	97
3.11.2.	Valoració de la concentració de proteïnes .....	97
3.11.3.	Electroforesi en gel SDS-PAGE i electrotransferència .....	98
3.11.4.	Immunodetecció .....	98
3.12.	Activació Endotelial.....	100
3.12.1.	Expressió de molècules d'adhesió .....	100
3.12.2.	Adhesió Leucocitària.....	100
3.13.	Construcció d'un vector lentiviral.....	101
3.13.1.	Síntesi dels shRNAs .....	102
3.13.2.	Clonació dels shRNAs en el vector pLVTHM.....	103
3.13.3.	Producció de vectors lentivirals.....	106
3.13.4.	Titulació dels vectors lentivirals.....	107
3.14.	Transducció de HUVEC amb lentivirus .....	108
3.14.1.	Quantificació de l'eficiència de transducció en HUVEC .....	109
3.15.	Determinació de perfils d'expressió gènica .....	109
3.15.1.	Classes de microarrays d'expressió .....	109
3.15.2.	Disseny de l'experiment de microarrays .....	110
3.16.	Extracció de proteïnes nuclears.....	115
3.17.	Assaig d'activitat de Factors de Transcripció .....	115
3.17.1.	Factors de transcripció de la família NF $\kappa$ B .....	116

3.17.2. Factors de transcripció de la família AP-1 i MAPK.....	116
3.18. Assaig d'activació de la via de <i>Toll like receptor-3</i> .....	116
3.19. Anàlisi per Northern Blot.....	117
3.19.1. Electroforesi del RNA en gel d'agarosa/formaldehid.....	117
3.19.2. Preparació de la sonda de DNA.....	117
3.19.3. Marcatge radioactiu de les sondes de cDNA de doble cadena.....	118
3.19.4. Prehibridació de la membrana de Northern.....	118
3.19.5. Hibridació de la membrana amb la sonda radioactiva.....	119
3.19.6. Rentats de la membrana.....	119
3.19.7. Detecció del senyal.....	119
3.20. Estudis <i>in vivo</i> en un model animal.....	119
3.20.1. Sistema de bany d'òrgans.....	120
3.20.2. Perfusió del ronyó <i>in situ</i> .....	122
3.20.3. Electrotransferència de DNA en ronyó.....	122
3.21. Immunohistoquímica.....	123
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>125</b>
4.1. CARACTERITZACIÓ IN VITRO DE LA INHIBICIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE CD40 MITJANÇANT RNAi. EFECTES FUNCIONALS EN CÈL·LULES ENDOTELIALS.....	127
4.1.1. Anàlisi de l'expressió de CD40 humà per qRT-PCR.....	129
4.1.2. Disseny i síntesi de siRNAs anti-CD40 humà.....	129
4.1.3. Optimització del sistema de transfecció in vitro en ECV-304.....	131
4.1.4. Estimulació de l'expressió de CD40 per citoquines en ECV-304.....	132
4.1.5. Eficàcia inhibidora de CD40 per siRNA en ECV-304.....	133
4.1.6. Inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2 en ECV-304.....	134
4.1.7. Inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2 en HUVEC.....	135
4.1.8. Assaig d'adhesió leucocitària.....	136
4.1.8.1. Inhibició de l'expressió de CAM.....	136
4.1.8.2. Inhibició de l'adhesió leucocitària.....	137
4.1.9. Vectors lentivirals que expressen un shRNA anti-CD40.....	140
4.1.9.1. Síntesi dels shRNAs i clonació en el vector pLVTHM.....	140
4.1.9.2. Producció de lentivirus recombinants i titulació.....	140
4.1.9.3. Assaig de transducció de HUVEC amb lentivirus.....	141
4.1.9.4. Determinació de la eficàcia inhibidora del shRNA-2.....	142
4.2. ANÀLISI DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL EN CÈL·LULES ENDOTELIALS ACTIVADES VIA CD40 UTILITZANT MICROARRAYS.....	145
4.2.1. Anàlisi de la regulació de l'expressió gènica transcripcional mitjançant microarrays de DNA.....	147
4.2.1.1. Validació dels resultats de microarrays per qRT-PCR.....	153
4.2.1.2. Anàlisi de les dades de Microarrays.....	158
4.2.1.2.1. Anàlisi de <i>clustering</i> : K-means.....	158
4.2.1.2.2. Anàlisi per SAM.....	162

4.2.1.2.3.	Anàlisi d' anotació funcional .....	164
4.2.2.	Anàlisi funcional d' activació de vies de senyalització per CD40 .....	177
4.2.2.1.	Determinació de l' activitat de factors de transcripció.....	177
4.2.2.2.	Activació de MAPKs en resposta a CD40 .....	180
4.2.2.3.	Anàlisi de la via de senyalització de TLR-3 .....	185
4.2.2.4.	APELIN .....	190
4.3.	CONSEQÜÈNCIES DE LA INHIBICIÓ DE CD40 IN VIVO MITJANÇANT RNAi. APLICACIÓ PER A LA INDUCCIÓ DE TOLERÀNCIA EN UN MODEL D'AL-LOTTRASPLANTAMENT RENAL EN RATA .....	195
4.3.1.	Disseny i síntesi de siRNAs anti-CD40 de rata .....	197
4.3.2.	Anàlisi de l' expressió de CD40 de rata per qRT-PCR .....	198
4.3.3.	Optimització del sistema de transfecció de siRNAs <i>in vitro</i> .....	198
4.3.4.	Eficàcia inhibidora de CD40 de rata per siRNA en SMC .....	199
4.3.5.	<i>Gene Eraser luciferase gene supression system</i> .....	200
4.3.6.	Estudis <i>in vivo</i> .....	201
4.3.6.1.	Bany d'òrgans .....	202
4.3.6.2.	Perfusió <i>in situ</i> .....	203
4.3.6.3.	Electrotransferència .....	204
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>209</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>259</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>265</b>
<b>ANNEXOS .....</b>	<b>297</b>	
<b>Annex 1</b>		
	Taula resum dels 715 transcrits regulats almenys en un dels tres temps d' estimulació de la via CD40-CD40L en cèl·lules endotelials .....	299
<b>Annex 2</b>		
Article:		
"RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells"		
Pluvinet R, Petriz J, Torras J, Herrero I, Cruzado J.M, Grinyo J.M, and Aran J.M. 2004.		
	Blood; 104(12):3642-6. ....	313





---

## ***ABREVIATURES***



aa	aminoàcid	NFAT	factor nuclear de cèl·lules T activades
ADN	àcid deoxiribonucleic	NFκB	factor nuclear kappa B
ACE2	enzim convertidor d'angiotensina	NIK	quinasa induïble per NFκB
ACS	síndrome coronària aguda	NK	<i>Natural Killer</i>
AngII	angiotensina II	NO	òxid nítric
AP-1	proteïna activadora-1	NOS	òxid nítric sintasa
APC	cèl·lula presentador d'antigen	ODN	oligonucleòtid
APLN	apelin	PA	plasminogen
CAM	molècula d'adhesió cel·lular	PAI-1	inhibidor de l'activador del plasminogen-1
COX-2	ciclooxigenasa-2	PAF	factor activador de plaquetes
CREB	proteïna que uneix l'element de resposta a cAMP	PC	proteïna C
DNA	àcid desoxiribonucleic	PDGF	factor de creixement derivat de plaquetes
dsRNA	RNA de doble cadena	PGH2	prostaglandina H2
EDHF	factor hiperpolaritzant derivat d'endoteli	PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa
ELAM	molècula d'adhesió endotelial de leucòcits	PKC	proteïna quinasa C
ERK	quinasa regulada per senyals extracel·lulars	RAS	sistema renina angiotensina
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>	RNA	àcid ribonucleic
ET	endotelina	RNAi	interferència de RNA
FGF	factor de creixement fibroblàstic	ROS	espècies reactives d'oxigen
GM-CSF	factor de creixement de colònies granulo-macrofàgiques	SEL	selectina
IAP	proteïna inhibidora de l'apoptosi	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
ICAM-1	molècula d'adhesió intercel·lular	SMC	cèl·lules musculars llises
IFN	interferó	SOD	superòxid dismutasa
IRF	factor regulador d'interferó	STAT	transductor de senyal i activador de la transcripció
IGF-1	factor de creixement semblant a insulina	TCR	receptor de cèl·lules T
IP3	inositol trifosfat	THBD	trombomodulina
JAK3	<i>Janus kinase 3</i>	TIMP	inhibidor de metal·loproteases
JNK	quinasa c-Jun aminoterminal	TLR	<i>Toll like receptor</i>
LFA	antigen de funció limfocitària	TF	factor tissular
LPS	lipopolisacàrid	TGF	factor de creixement transformant
MAPK	proteïna quinasa activada per mitògens	TNF	factor de necrosi tumoral
MCP-1	proteïna quimiotàctica de monòcits	uPA	activador uroquinasa del plasminogen
MHC	complex d'histocompatibilitat major	uPAR	receptor de uPA
MIP	proteïna inflamatòria de macròfags	UTR	<i>untranslated region</i>
MKK	MAPK quinasa	vWF	factor von Willebrand
TRAF	<i>TNF-R associated factor</i>	VCAM-1	molècula d'adhesió vascular
MMP	metal·loproteasa	VEGF	factor de creixement d'endoteli vascular
NCA	nefropatia crònica de l'empelt	XO	xantina oxidasa