

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CD200R EN
CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO:
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR ANOIKIS**

M^a OLGA FERNÁNDEZ NAVARRO

GRANADA, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: M^a Olga Fernández Navarro
D.L.: GR 2309-2009
ISBN: 978-84-692-3125-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CD200R EN CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR ANOIKIS

Memoria presentada por la Licenciada M^a Olga Fernández Navarro para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Fdo.: M^a Olga Fernández Navarro

V^o B^o de los directores:

Fdo.: Antonio Suárez García

Fdo.: Raúl de la Torre Medina



ugr

Universidad
de Granada

Antonio Suárez García, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la expresión del gen *CD200R* en células epiteliales de intestino: regulación transcripcional por anoikis”, de la que es autora Dña. M^a Olga Fernández Navarro, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por la interesada para optar al grado de Doctora.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de Marzo de 2009.

Campus de Cartuja

Facultad de Farmacia

18071 Granada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Tfno. +34 958 243 838

Fax. +34 958 248 960



ugr

Universidad
de Granada

Raúl de la Torre Medina, Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la expresión del gen *CD200R* en células epiteliales de intestino: regulación transcripcional por anoikis”, de la que es autora Dña. M^a Olga Fernández Navarro, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por la interesada para optar al grado de Doctora.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de Marzo de 2009.

Campus de Cartuja

Facultad de Farmacia

18071 Granada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Tfno. +34 958 243 838

Fax. +34 958 248 960

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación denominado: “Estudio molecular de la relación entre la expresión del gen *cd200r* y la enfermedad de Crohn”. Investigador responsable: Dr. Antonio Suárez García.

Entidad financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS); PI021513

Entidades participantes: Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada. Duración: desde: 2003 hasta: 2005

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los XXVII y XXVIII Congresos de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (2004, 2005 respectivamente) y en el LXV Congreso de la SED (Semana de Enfermedades Digestivas, 2006).

ÍNDICE

Indice general

1. Introducción	1
1.1. Morfología del intestino	1
1.1.1. Eje Vertical	1
1.1.2. Eje Horizontal	2
1.2. Células intestinales	3
1.3. Membrana basal	5
1.4. Fisiología del intestino	6
1.4.1. Proliferación y diferenciación	6
1.4.2. Expresión génica en la proliferación y en la diferenciación del intestino	7
1.5. Apoptosis	11
1.5.1. Mecanismo	12
1.5.1.1. Ruta intrínseca	14
1.5.1.2. Ruta extrínseca	15
1.5.2. Mecanismo independiente de caspasas	16
1.5.3. Marcadores de apoptosis (micropartículas)	18
1.6. Anoikis	20
1.6.1. Contacto por integrinas	20
1.6.2. Rutas implicadas en la supervivencia y en la anoikis	22
1.7. Enfermedad inflamatoria intestinal	27
1.7.1. Colitis ulcerosa	27
1.7.2. Enfermedad de Crohn	28
1.7.3. Apoptosis en ibd	29
1.8. CD200R y CD200	31
1.8.1. Estructura de CD200R y CD200. Caracterización del gen. .	31
1.8.2. Función de CD200R y CD200	35
2. Materiales y métodos	39
2.1. Materiales	39
2.1.1. Bacterias	39
2.1.2. Animales	40
2.1.3. Anticuerpos monoclonales	41
2.1.4. Enzimas	41

2.1.5. Productos químicos	42
2.1.6. Soluciones generales	42
2.1.6.1. Medios de cultivos para bacterias	42
2.1.6.2. Medios de cultivo para células.	44
2.1.7. Equipamientos generales	44
2.2. Métodos.....	46
2.2.1. Procedimientos generales de trabajo con líneas celulares de mamíferos.....	46
2.2.1.1. Materiales	46
2.2.1.2. Cultivo	46
Subcultivo y expansión	47
Trypsinización.....	47
Contaje	47
2.2.1.3. Congelación y descongelación.....	47
2.2.1.4. Transfección transitoria de células	48
2.2.1.5. Establecimiento de clones estables	49
2.2.1.6. Inducción de apoptosis	49
2.2.1.7. Inducción de diferenciación	50
2.2.1.8. Análisis de actividad de la región promotora	52
2.2.1.9. Medición de la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP).	52
2.2.2. Procedimientos de trabajo con <i>Escherichia coli</i>	52
2.2.2.1 Cultivo de bacterias.....	52
Preparación de bacterias competentes	53
Electroporación.....	54
Screening de colonias.....	55
2.2.3. Procedimientos de trabajo con RNA	56
Extracción de RNA	56
Tratamiento con TURBO DNAsa	57
2.2.4. Cuantificación de DNA y RNA	58
2.2.5. Reacción de transcripción inversa (RT).....	59
2.2.6. Extensión de cebadores (Primer Extension).....	60
2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	63

2.2.7.1. Estudio de la expresión de genes por RT-PCR	65
2.2.7.2. Estudio de la expresión de genes por PCR a tiempo real (Real Time PCR).....	66
2.2.7.3. Preparación de DNA plasmídico	70
2.2.7.4. Preparación de DNA genómico	71
2.2.7.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	72
2.2.7.6. Purificación de DNA de geles de agarosa	73
2.2.7.7. Empleo de enzimas de restricción	74
2.2.7.8. Clonación de fragmentos de DNA.....	74
2.2.8. Análisis de proteínas	76
2.2.8.1. Extracción de proteínas	76
2.2.8.2. Medición de la concentración de proteínas.....	76
2.2.8.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS- poliacrilamida (SDS-PAGE).....	77
2.2.8.4. Western Blot.....	78
2.2.9. Citometría de flujo.....	80
2.2.10. Técnicas de microscopía	82
Microscopio de fluorescencia	82
Aislamiento de células de la mucosa de intestino de rata.....	82
2.2.11. Análisis in silico	83
3. Resultados	86
3.1. Estudio de la expresión de CD200R en células intestinales y regulación de CD200R por efecto del matrigel.....	86
3.1.1. Expresión en diferenciación.....	86
3.1.2. Expresión de CD200R en función del desarrollo y del eje longitudinal.....	88
3.2. Identificación del componente del matrigel responsable de la regulación de la expresión del gen Cd200r1 en la diferenciación.	92
3.3. Estudio de los niveles de expresión en respuesta a la confluencia celular.....	93
3.4. Estudio de la expresión de Cd200r en células intestinales en distintos modelos de apoptosis ex vivo.....	95
3.4.1. Modelo de apoptosis inducida por LPS.....	95

3.4.2. Modelo de apoptosis inducida con H ₂ O ₂	96
3.4.3. Modelo de apoptosis inducida por butirato.....	97
3.4.4. Modelo de apoptosis inducida por descamación (ANOIKIS)	101
3.4.4.1. Anoikis inducida en células IEC-18	101
3.4.4.2. Anoikis en células CACO-2	102
3.5. La anoikis controla la expresión de CD200R.	106
3.6. La anoikis controla la expresión de cd200r por la via de la PI3K.	109
3.7. La anoikis regula la expresión de cd200r a nivel transcripcional	111
3.8. La anoikis controla la expresión de cd200r <i>in vivo</i>	116
3.9. Expresión de cd200r en células epiteliales y no epiteliales: MCF- 7 (cáncer de mama) y MG-63 (osteosarcoma).	117
3.10. Expresión diferencial de las isoformas de cd200r en enfermos de Crohn, colitis ulcerosa e individuos sanos.....	120
4. Discusión.....	123
5. Bibliografía	137

Indice de figuras

Figura 1. Corte transversal del intestino delgado.....	2
Figura 2. Marcadores del proceso de apoptosis y necrosis.	12
Figura 3. Rutas apoptóticas.	13
Figura 4. Esquemas de las proteínas implicadas en las rutas que llevan a supervivencia celular y a anoikis.....	23
Figura 5. Esquemas de las distintas isoformas que se pueden formar por splicing alternativo del gen CD200R1.	33
Figura 6. Esquemas del vector pGEM-T	39
Figura 7. Esquema del vector pDSRed-Express-1.....	40
Figura 8. Imagen típica de un gel de RNA.....	57
Figura 9. Imagen típica de una reacción de PCR tiempo real.	67
Figura 10. Curvas de amplificación y disociación de una reacción con molde de DNA y sin él.	69
Figura 11. Esquema del programa de temperaturas para el método del SYBR	70
Figura 12 . Expresión de Cd200r (isoforma larga) en distintos puntos analizados.....	87
Figura 13. Expresión de Cd200R en porciones de intestino de rata, para individuos con distintas edades.	89
Figura 14. A)Control negativo,B) marcas de oro coloidal en zonas del citoplasma, C)acumulación en las zonas próximas a microvellosidades en muestras de intestino fetal con anticuerpo rCd200.....	89
Figura 15. La imagen A corresponde al control negativo (muestras tratadas solo con el anticuerpo secundario) y no muestra ninguna marca de oro coloidal. En la imagen B se observa acumulación de rCd200R en las proximidades de la membrana plasmática. En la imagen C se observan marcas similares cuando utilizamos anticuerpos frente a rCd200.	91

Figura 16. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión del gen Cd200r.....	92
Figura 17. Niveles de expresión de la forma larga de CD200R	92
Figura 18. Expresión de las isoformas corta y larga de Cd200r en las células en proliferación (calle 1), crecidas sobre Matrigel (calle 2), confluentes 3 días (calle 3), confluentes 1 día (calle 4) y confluentes 21 días (calle 5).....	94
Figura 19. Expresión de las distintas isoformas de Cd200r en proliferación, en confluencia durante distintos periodos de tiempo (1 día, 3 días, 21 días) y diferenciadas en Matrigel.....	94
Figura 20. Representación de la expresión de ambas isoformas en células IEC-6, cultivadas en presencia de LPS a una concentración de 1,5 µg/mL y mantenidas posteriormente en suspensión durante periodos de tiempo que van desde media hora hasta 4,5 horas.....	95
Figura 21. Geles obtenidos con las isoformas de CD200R y del control interno, la GAPDH..	97
Figura 22. Imágenes del citómetro de flujo.....	99
Figura 23. Viabilidad celular después del tratamiento con butirato..	100
Figura 24. Viabilidad celular de las células IEC-18 y Efecto del Z-VAD-FMK.....	101
Figura 25. Expresión de CD200R en células IEC-18.....	102
Figura 26. Viabilidad celular por citometría de flujo por el método anexina-V/yoduro de propidio en células Caco-2	103
Figura 27. Nivel de expresión de CD200R en células Caco-2 en los controles (adheridas), suspensión y suspensión con Z-VAD-FMK.....	104
Figura 28. Cuantificación relativa correspondiente a CD200R a diferentes tiempos de suspensión de las células.....	105
Figura 29. Cuantificación relativa de CD200R respecto al control interno, que en este caso es la β-actina.....	106

Figura 31. Expresión de CD200R por las células por acción del anticuerpo P4G11(anti- integrina β 1).	108
Figura 32. Principales vías de transducción de señales a partir de la unión de las integrinas a sus ligandos.	109
Figura 33. Porcentaje de células viables, apoptosis y necrosis.	110
Figura 34. Productos de PCR obtenidos con los cebadores PromotorCF y PromotorCR.....	112
Figura 35. Células Caco-2 transfectadas con el promotor de CD200R incluido en el vector pDS-Red-Express-1.....	114
Figura 36. Presión de red GFP:CD200R y de la apoptosis cuando las células entran en suspensión y con el tratamiento con Z-VAD-FMK.	114
Figura 37. Variaciones en la expresión de la fusión CD200R:redGFP en las células transfectadas con el promotor de CD200R en las condiciones previamente ensayadas.....	115
Figura 38. Viabilidad celular, apoptosis y necrosis obtenidas para los enterocitos obtenidos de rata.....	116
Figura 39. Expresión de CD200R en las células intestinales de rata en los controles.	117
Figura 41. Niveles de expresión de CD200R en las células MCF-7 cuando son mantenidas en suspensión, en presencia de adriamicina y con Z-VAD-FMK.....	118
Figura 42. Porcentaje de células MG-63 apoptóticas producidas por la suspensión durante 20 horas y la acción del Z-VAD-FMK sobre la apoptosis.....	119
Figura 43. Expresión de CD200R en las células MG-63 en los controles (células adheridas), en suspensión y en presencia de Z-VAD-FMK.....	119
Figura 44. Expresión del gen cd200 en los individuos sanos, en los pacientes de CU y los pacientes de enfermedad de Crohn.	120
Figura 45. Expresión de la isoforma R1 (sin exón 2) del gen cd200r en los individuos sanos y en los pacientes de CU y enfermedad de Crohn.	121

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Morfología del intestino

El intestino delgado se divide longitudinalmente en tres partes: el duodeno, que se extiende desde el píloro hasta el ligamento de Treitz, el yeyuno y el íleon, que se extiende hasta la válvula ileocecal. Se considera que el yeyuno ocupa el 40% de la porción proximal del intestino delgado y el íleon el 60% distal, sin que exista una frontera anatómica definida entre ambos. Aunque entre estos tres segmentos hay ciertas diferencias todos ellos presentan la misma organización fundamental.

1.1.1. Eje Vertical

En un corte transversal del intestino delgado se distinguen cuatro capas:

- a) **Serosa peritoneal:** capa de células mesoteliales que descansan sobre tejido conjuntivo laxo.
- b) **Muscular:** existe una capa interna longitudinal y una capa externa o circular de fibras musculares lisas; entre ambas se localiza el plexo nervioso mientérico de Auerbach.
- c) **Submucosa:** formada por tejido conjuntivo bastante denso, con un abundante componente de tejido elástico y algunos lóbulos de tejido adiposo; en estos lóbulos se localizan las glándulas de Brunner, grupo de glándulas que se sitúan únicamente en el duodeno y cuyo producto de secreción parece proteger la mucosa duodenal de los efectos erosivos de la acidez del jugo gástrico.
- d) **Mucosa:** capa que a su vez puede subdividirse en otras tres; la primera capa se denomina *Muscularis mucosae* y está constituida por fibras musculares; la segunda capa es la lámina propia en la que se observa tejido conjuntivo, células y fibras nerviosas desmielinizantes; finalmente, la tercera capa la constituyen el epitelio columnar y las células M; el primero recubre las criptas y las vellosidades, mientras las células M recubren el folículo linfático de las placas de Peyer.

Mucosa del intestino delgado

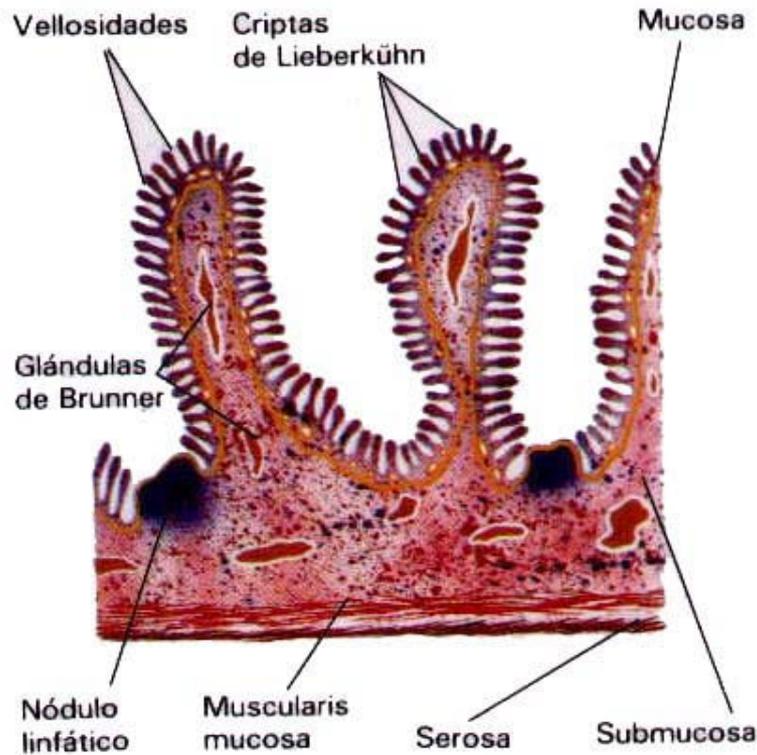


Figura 1. Corte transversal del intestino delgado

1.1.2. Eje Horizontal

La mucosa que tapiza interiormente al intestino delgado es la principal responsable de los procesos de digestión y absorción de alimentos. Presenta un elevado número de pliegues transversales llamados válvulas conniventes, revestidas a su vez por minúsculas y finísimas digitaciones denominadas vellosidades intestinales, prolongaciones de la mucosa que le dan un aspecto aterciopelado al tiempo que aumentan su superficie. Las vellosidades alcanzan su máximo de longitud y área de superficie en el comienzo del intestino delgado y van disminuyendo hasta llegar a un mínimo al final del íleon. Entre estas vellosidades se localizan las llamadas criptas de Lieberkühn, que son invaginaciones tubulares localizadas en la base de la vellosidad (Mahoney, Stappenbeck, and Miner, 2008; Young B, 2000).

Las vellosidades continúan hacia las criptas desde donde se originan los diferentes tipos celulares (Sancho, Batlle, and Clevers, 2003; Van Beers *et al.*, 1995). Cerca del final de cada cripta residen varias células madre con

capacidad para dividirse en nuevas células madre y en células proliferativas. La velocidad de proliferación de estas últimas está relacionada con la velocidad con que desaparecen las células del epitelio. Cuando las células proliferativas se han dividido aproximadamente cuatro veces, se diferencian y dan lugar a cuatro tipos celulares altamente especializados: enterocitos, células endocrinas, células caliciformes y células de Paneth. Cuando la diferenciación resulta en células de Paneth, se produce una migración de las mismas al final de las criptas. Sin embargo, si se diferencian en alguno de los otros tres tipos, se dirigen a lo alto de la vellosidad desde donde son liberadas un par de días después sin dejar ninguna unión a la capa epitelial (Brittan and Wright, 2004; Traber and Silberg, 1996).

1.2. Células intestinales

Los diferentes tipos celulares que podemos encontrar en el intestino son:

- **Enterocitos:** constituyen casi el 90% de la capa de células que dan al lumen. Están polarizadas y poseen una membrana apical con borde en cepillo que da al lumen intestinal con pequeñas proyecciones llamadas microvellosidades o borde en cepillo. Los enterocitos tienen principalmente función hidrolítica y absortiva y son responsables de la degradación y captación de los nutrientes. Expresan hidrolasas como la lactasa-floricina hidrolasa (lactasa) y la sacarosa isomaltasa (sacarasa) y proteínas implicadas en el transporte de nutrientes a través de la barrera intestinal. Durante la migración desde la cripta al vértice de la vellosidad es donde los enterocitos sufren diferenciación y cambios morfológicos (Marshman, Booth, and Potten, 2002).

Aunque la función primaria del intestino delgado es la absorción de nutrientes, sin embargo, durante el desarrollo de esta función el epitelio está expuesto a una amplia variedad de antígenos procedentes de la comida, las bacterias residentes y microorganismos invasores. Como consecuencia de esto, el epitelio intestinal tiene que ser permeable para los nutrientes y las macromoléculas, necesarias para el crecimiento y el desarrollo, a la vez que tiene que ejercer de barrera efectiva hacia potenciales macromoléculas y microorganismos peligrosos. Aunque existen células, derivadas del sistema inmune, especializadas en la protección contra los patógenos así como en la

tolerancia a las bacterias residentes sin embargo los enterocitos además de su función absorbiva y función como barrera protectora también están implicados con frecuencia en el desarrollo de la respuesta inmune. Ellos captan y procesan los antígenos lumbinales principalmente por endocitosis en fase fluida y puede ser por dos vías. En la ruta principal, los lisosomas degradan los antígenos. En la ruta minoritaria, las macromoléculas no son degradadas y son liberadas en el espacio intersticial. (Snoeck, Goddeeris, and Cox, 2005)

- **Células Enterocrinas:** constituyen un pequeño porcentaje de las células del intestino delgado pero producen al menos 15 hormonas gastrointestinales. Cada célula enterocrina produce de una a varias hormonas diferentes (Strader and Woods, 2005; Traber and Silberg, 1996).
- **Células caliciformes:** producen gran cantidad de mucinas secretoras que cubren la capa epitelial de todo el intestino. La cantidad de células caliciformes varía a lo largo del tracto gastrointestinal, desde un 5% en el intestino delgado a un 50% en el colon. La capa de moco forma un gel que constituye una barrera para las moléculas grandes (Gutierrez-Gonzalez and Wright, 2008; Van Beers *et al.*, 1995). Defectos en la producción de moco han sido observados en la IBD (Torres and Rios, 2008).
- **Células de Paneth:** se localizan en las criptas del intestino delgado. Producen polipéptidos antimicrobianos como lisozima y defensinas, que eliminan bacterias y virus. Tienen una tasa de recambio baja (aproximadamente 3 semanas) comparada con los pocos días de los otros tres tipos celulares (Porter *et al.*, 2002; Tsukamoto, Mizoshita, and Tatematsu, 2006). La deficiencia en α -defensinas incrementa el riesgo de padecer la enfermedad de Crohn y un polimorfismo en el gen de las defensinas se ha asociado con esta enfermedad (Fellermann *et al.*, 2006).

Aunque el colon tiene un diámetro mayor que el intestino delgado, su área de superficie es mucho menor. El colon carece de enzimas digestivos y en cambio está recubierto de mucus. Su función principal es regular la captación de fluidos y electrolitos. La expresión de las hidrolasas del borde en cepillo está confinada generalmente a los enterocitos del intestino delgado sin embargo durante el desarrollo embrionario o en circunstancias especiales puede tener lugar la expresión de enzimas (Beaulieu, 1997; Van Beers *et al.*, 1995).

1.3. Membrana basal

La membrana basal es una fina capa especializada de matriz extracelular. Se localiza entre las capas epitelial-endodérmica y fibroblástica-mesenquimática. Aparece en la embriogénesis y divide los tejidos en compartimentos. La membrana basal es muy importante para el entrecruzamiento de epitelio con mesenquima (Simon-Assmann and Keding, 2000).

Hay evidencias de que los movimientos morfogénéticos, la diferenciación y la migración de las células epiteliales están influenciados por alteraciones en la composición de la matriz extracelular mediante la vía de receptores de superficie de las células epiteliales que interactúan con la matriz extracelular.

La membrana basal intestinal está compuesta de principalmente de glicoproteínas como las lamininas, colágeno IV (del que se conocen 3 tipos), proteoglicanos (perlecan y agrin) y nidogenos. La composición de la membrana basal varía dependiendo del estado del desarrollo y el tejido (Scheele *et al.*, 2007). Funciona como una estructura dinámica en la morfogénesis del tejido, en la diferenciación y mantenimiento del intestino maduro. Sus moléculas constituyentes son capaces de regular la adhesión y proliferación de diferentes tipos celulares ya sea directamente o a través de señales de crecimiento o migración (De Arcangelis *et al.*, 1996).

La formación de distintas matrices de membrana basal en el desarrollo embrionario está influenciada por las isoformas de lamininas producidas en cada momento. Se conocen 11 isoformas de lamininas. Las principales funciones de las lamininas incluyen la formación de redes, filamentos y unión a las células epiteliales a través de integrinas. Las lamininas tienen un efecto

biológico sobre la diferenciación de los enterocitos ya que cultivos primarios de enterocitos crecidos sobre laminina expresan una gran actividad de enzimas del borde en cepillo (Hahn *et al.*, 1990). Las alteraciones en las interacciones celulares de las lamininas han sido implicadas en varias alteraciones patológicas. Aunque ninguna de estas alteraciones ha demostrado ser el defecto primario de cualquier enfermedad, estas alteraciones no son exclusivamente secundarias a la ruptura de la interfaz mesénquima-epitelio.

Se ha demostrado que existe una alteración de las lamininas en la mucosa intestinal de los enfermos de Crohn y esto indica que las moléculas de la ECM están implicadas en la inflamación crónica que sufren estos pacientes. Se ha observado que ciertas moléculas de la ECM como la tenascina (Riedl *et al.*, 1998) y el colágeno tipo III están incrementados en las enfermedades inflamatorias del intestino (Sanders, 2005). Concretamente en la enfermedad de Crohn, se ha observado que en los segmentos intestinales inflamados se da una mayor reorganización de la membrana basal de las criptas; esta reorganización consiste en la desaparición de la laminina-2 y su sustitución por laminina-1 y laminina-5 (Perreault, Vachon, and Beaulieu, 1995). Otra característica, que se da en estos sujetos, es que en las criptas de los segmentos no inflamados aparece la cadena $\alpha 1$ de la laminina, fenómeno que ocurre raramente en los individuos controles (Simon-Assmann *et al.*, 1994). Además se ha observado que está regulada positivamente la expresión del transcrito de $\alpha 1$ en la mucosa intestinal de las muestras inflamadas de Crohn.

1.4. Fisiología del intestino

1.4.1. Proliferación y diferenciación

El intestino es un sistema de múltiples tipos celulares en complejo equilibrio que sufre una continua renovación mientras mantiene una precisa interrelación a lo largo del eje cripta-vellosidad, con una población celular dinámica en constante cambio a partir de un estado indiferenciado y proliferativo de la cripta, a un estado maduro de la vellosidad. La migración de las células de la cripta va acompañada de diferenciación celular que conlleva cambios morfológicos y funcionales.

Las distintas líneas celulares que forman el intestino derivan de un grupo de células madre que se localizan en las criptas intestinales. La arquitectura compleja del epitelio intestinal resulta de una serie de procesos muy bien organizados como son la proliferación de células inmaduras en la cripta, diferenciación en varias líneas celulares, migración de las células en patrones definidos y muerte celular programada específica para cada célula (Andreu *et al.*, 2005; Traber and Silberg, 1996). Las células madre intestinales son extremadamente susceptibles a la apoptosis comparadas con otras células progenitoras de las criptas (Potten, Owen, and Booth, 2002). La regulación del crecimiento epitelial y la diferenciación funcional está sometida a varias influencias a lo largo del eje cripta-vellosidad, incluyendo interacciones con moléculas de la matriz extracelular, una serie de grandes glicoproteínas bioactivas y mayoritariamente insolubles. Está reconocida que la composición de la matriz extracelular define el microambiente necesario para múltiples funciones celulares como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Ruoslahti, 1996).

Como resultado del recambio celular, las células en los tejidos periféricos continuamente están sufriendo apoptosis. Estas células apoptóticas están asociadas con una falta de inflamación, llevando a la percepción inicial de que este proceso de apoptosis es inmunológicamente silencioso y pasivo (Rosenblum *et al.*, 2004).

1.4.2. Expresión génica en la proliferación y en la diferenciación del intestino

Para estudiar la expresión de genes durante la diferenciación, se llevó a cabo un trabajo mediante el uso de *microarrays* en la línea celular Caco-2 *in vitro*. Ya que estas células experimentan detención del ciclo celular y diferenciación, en función del tiempo que permanecen en cultivo, se analizaron qué grupos de genes eran sobreexpresados y cuales reprimidos durante el programa de maduración. Los grupos funcionales que más se alteraron durante este proceso fueron:

- **El ciclo celular, la síntesis y reparación del DNA:** Los genes relacionados con el ciclo celular que se vieron reprimidos durante la maduración fueron principalmente ciclinas (*A, B, B1...*), proteínas de la

división celular (*cdc2*, *cdc6*...) y ciclinas dependientes de kinasas (*cdk-1* y *cdk-2*). Debido a la diferenciación, los genes relacionados con la síntesis de DNA, replicación y reparación también se veían reprimidos; algunos de estos genes son timidilato sintasa, UMP kinasa, topoisomerasa I y II, DNA ligasa I, etc (Mariadason *et al.*, 2002)

- **el procesamiento de proteínas y transporte de las mismas, así como su degradación:** en la diferenciación se incrementó la expresión de proteínas asociadas al borde en cepillo como dipeptidilpeptidasa IV y villina además de proteínas relacionadas con las uniones intercelulares (Mariadason *et al.*, 2002)
- **factores asociados a la matriz extracelular:** aumentan genes implicados en la formación de matriz extracelular (laminina $\beta 2$, colágeno tipo III $\alpha 1$, vitronectina y fibrinógenos. Aumentan también las cadenas de integrinas $\alpha 3$ y $\alpha 5$. (Mariadason *et al.*, 2002)
- **metabolismo, kinasas y fosfatasas:** aumenta la expresión de la dipeptidilpeptidasa IV, así como genes relacionados con la absorción de agua, lípidos e iones. Disminuyen genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Mariadason *et al.*, 2002) así como transportadores de aminoácidos e iones fuera de las criptas colónicas (Landowski *et al.*, 2004).

No observaron alteración en genes relacionados con la apoptosis.

Mariadason *et al.* realizó un estudio para definir el perfil de expresión de genes en la maduración de las células epiteliales intestinales de ratón, a lo largo del eje cripta-vellosidad. Dicho trabajo determinó que aproximadamente unos 1000 genes se ven alterados, tanto sobreexpresados como reprimidos. En general si agrupamos los genes según su función biológica las categorías donde se observan más genes alterados son:

- la biogénesis del ribosoma y categorías relacionadas con la traducción,
- procesamiento y plegamiento de proteínas
- ciclo celular (donde se incluye proliferación celular y replicación del DNA)
- procesamiento, metabolismo y transporte del RNA,
- citoesqueleto
- biología de lípidos
- transducción de señales y actividad kinasa

- estructura nuclear y transporte electrónico

Debido a que la proliferación celular se localiza en las criptas del intestino delgado, las categorías que se ven más afectadas en esta ubicación son el ciclo celular y la replicación de DNA.

Los genes cuya función está relacionada con el procesamiento, el *splicing* y transporte de RNA, el procesamiento y el plegamiento de proteínas además de la biogénesis de ribosomas estaban reprimidos en lo alto de la vellosidad; en esta localización están sobreexpresados los genes implicados en el ensamblamiento del citoesqueleto y en la captación y biosíntesis de lípidos. Los genes relacionados con el ciclo celular y la replicación del DNA son reprimidos en lo alto de la vellosidad en comparación con la cripta. (Mariadason *et al.*, 2005).

Los factores de transcripción *homeobox* conducen a la expresión de genes que están relacionados con la proliferación y la diferenciación celular. Se conocen muchos genes diferentes *homeobox* humanos en el intestino delgado con marcadas diferencias considerando su expresión proximal y distal. Los productos génicos más abundantes identificados en humanos son *Cdx1*, *Cdx2* y *Pdx1*.

El gen *Cdx2* es el primero que se expresa, mucho más temprano que *Cdx1* y esta expresión se mantiene a lo largo de la vida. *Cdx1* se expresa en un patrón complejo durante la embriogénesis. Su expresión también continúa en la edad adulta. Ambos genes aumentan drásticamente durante un periodo crítico del desarrollo intestinal: la transformación de endodermo visceral a epitelio columnar simple (Silberg *et al.*, 2000). En el intestino y colon adultos, la expresión de ambas proteínas ocurre en patrones claramente diferentes pero solapantes. *Cdx2* incrementa progresivamente desde el duodeno al intestino distal y muestra sus niveles más altos en el epitelio colónico proximal. La expresión de *Cdx1* aumenta a lo largo del eje antero-posterior y su expresión más alta se encuentra en el colon distal. También presenta una expresión elevada en las células epiteliales de la cripta aunque también se expresa en superficie de los colonocitos y en los enterocitos de la vellosidad pero en estos casos en menor cantidad (Guo, Suh, and Lynch, 2004).

Pdx1 incrementa su expresión por la acción de *NeuroD*. Este gen tiene un papel en la producción de poblaciones específicas de células enterocrinas.

Además hay otra serie de genes recientemente descritos como son:

- los genes *hox* que están implicados en la regionalización del intestino durante el desarrollo.
- En ratones recién nacidos *Ephb2* y *Ephb3* son expresados en las zonas intervellosidad, mientras que el adulto *Ephb2* es expresado en la base columnar y continua hasta la cripta y *Ephb3* está restringido a las células de la base de la cripta.
- La expresión de *LKB1* es observada en el citoplasma de las células de la vellosidad incrementándose en gradiente hacia el extremo.
- *Hes1* ha sido observado en la mayoría de células proliferativas de las criptas pero no en las células enterocrinas, de Paneth y células califormes. También está ausente en las células localizadas en las vellosidades.
- *Math1* se expresa en el adulto en las células de Paneth y las células califormes (Hauck *et al.*, 2005).

En otro estudio se investigó si el cambio de localización de las células influye en su programación genética. Se hizo la transposición de una porción de intestino desde el íleon hasta el colon y observaron que los genes de carácter endocrino *NT/N* y *PYY* no se alteraban por dicha transposición. Estos resultados apoyan el hecho de que los genes endocrinos parece que están programados y no se alteran por cambios medioambientales ya que juegan un papel crucial en la arquitectura estructural y otros aspectos funcionales del intestino (Thomas, Rajaraman, and Evers, 2003).

En la bibliografía también se analiza la regulación de la expresión de genes epiteliales intestinales durante la hipoxia. La exposición de las células intestinales a la hipoxia se traduce en una estabilización de *HIF1 α* y la consiguiente sobreexpresión de *TFF3* (ITF), un importante protector de la función de barrera de los epitelios. Pero esta respuesta es transitoria. Una de las causas primarias de la hipoxia es que provoca la liberación de *TNF- α* por la zona basolateral; este factor actúa sinérgicamente con mediadores derivados de células inmunes como es el *IFN- γ* lo que activamente contribuye a los procesos inflamatorios y esto disminuye la función de barrera epitelial, un marcador de IBD. Al profundizar en el estudio se observó que la hipoxia

modificaba genes relacionados con la inflamación como IL-8 y MHC clase II y se descubrió que existe un elemento de respuesta común en los promotores de los genes inflamatorios inducidos. Este elemento es el CRE y se une a CREB. CREB actúa como represor para estos genes y al ser degradado en la hipoxia pierde su actividad represora. Este proceso está íntimamente asociado con las inflamaciones crónicas, como la enfermedad de Crohn, ya que la disrupción microvascular que se produce debido a la inflamación contribuye significativamente a la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Bajo condiciones fisiológicas normales, los órganos, como el intestino, están profusamente irrigados de sangre (y consecuentemente de oxígeno) por la microvasculatura de la mucosa. En condiciones de inflamación crónica, la disrupción de la microvasculatura ocurre en conjunto con fibrosis en la lámina propia.

La incidencia de la enfermedad de Crohn está significativamente disminuida en pacientes con alteraciones en la coagulación como la hemofilia. (Taylor, 2004).

1.5. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada caracterizado por una serie de cambios morfológicos como encogimiento de la célula, condensación de la cromatina y desintegración en pequeños fragmentos, llamados cuerpos apoptóticos, que son eliminados por fagocitosis. Este proceso es inherente y controlado por parte de la célula.

Existe otro proceso que se denomina **necrosis**, más caótico, y que resulta de circunstancias ajenas a la célula como isquemia, temperaturas extremas o trauma. Se caracteriza por edema celular y ruptura de la membrana plasmática, lo que conlleva una liberación de los componentes celulares y por tanto una respuesta inflamatoria del tejido (Broker, Kruyt, and Giaccone, 2005).

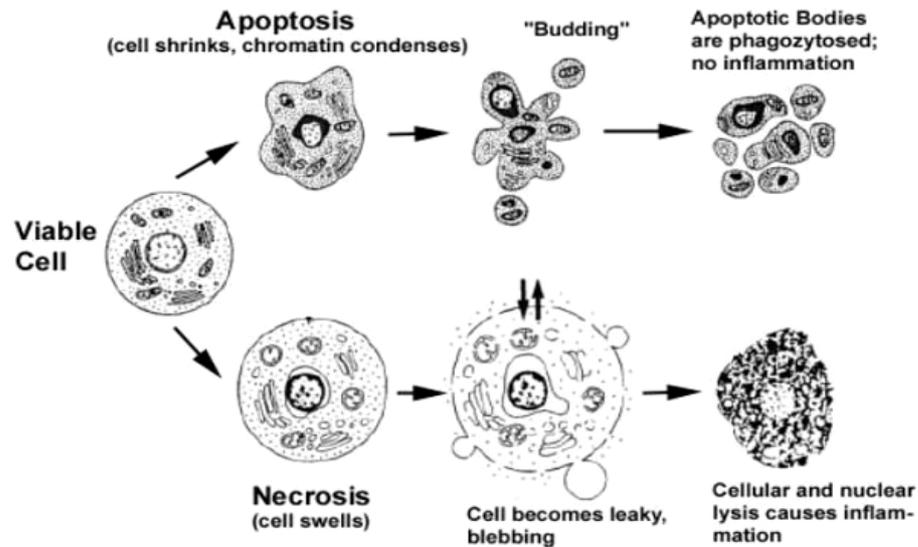


Figura 2.-Marcadores del proceso de apoptosis y necrosis. La apoptosis incluye contracción de la célula, condensación de la cromatina y desplazamiento de la misma a la periferia nuclear con la formación de cuerpos apoptóticos, que contienen orgánulos, citosol y fragmentos nucleares, que son fagocitados sin desencadenar procesos de inflamación. Las células necróticas se hinchan, se hacen permeables y finalmente se rompen liberando todo su contenido provocando la inflamación. Modificado de Van Cruchten, 2002)

La muerte celular es un proceso natural que juega un papel crítico en muchos procesos normales como son el desarrollo fetal y la homeostasis de los tejidos. La falta de regulación de la apoptosis contribuye a muchas enfermedades.

1.5.1. Mecanismo

La cascada apoptótica puede ser iniciada por dos rutas principales, una que implica la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria (ruta intrínseca) y otra que se desencadena por activación de receptores de muerte en respuesta a un ligando (ruta extrínseca). Siguiendo a la activación por cualquier ruta, una familia específica de cisteín proteasas, las caspasas, es activada para ejecutar el destino de las células de un modo programado llevando a los típicos cambios morfológicos (Degterev, Boyce, and Yuan, 2003; Gilmore, 2005).

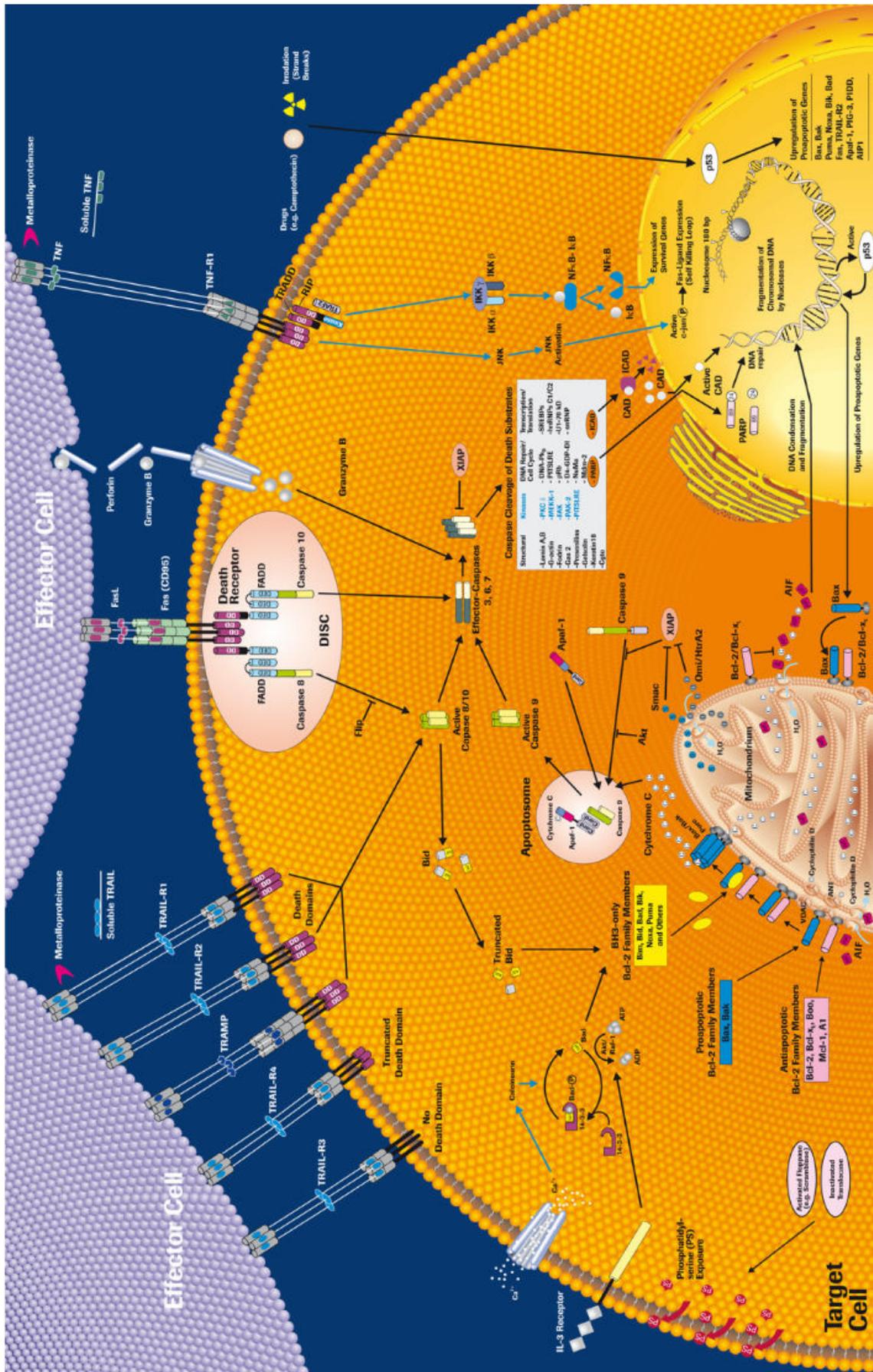


Figura 3.-Rutas apoptóticas. © Roche Diagnostics Corporation

1.5.1.1. Ruta intrínseca

Los marcadores morfológicos que definen una célula apoptótica son el resultado de la activación de las proteasas denominadas “caspasas”. Las caspasas son cistein proteasas que cortan a las proteínas en residuos conservados de ácido aspártico. Se han clasificado como iniciadoras (caspasa-2, -8 -9 y -10) y ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7). Estas moléculas existen en la célula como zimógenos con una actividad muy baja. Para su activación requieren, en la mayoría de las células, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (OMM, en sus siglas en inglés)(Martinou and Green, 2001; Zamzami and Kroemer, 2001). Dicho proceso libera una multitud de factores cuyo efecto combinado es la activación de las caspasas. El citocromo c actúa como cofactor e interactúa con APAF-1 (apoptotic protease activation factor 1) lo que conlleva a la activación de la caspasa 9. La activación de la caspasa 9 es facilitada por su asociación con APAF-1 que se une al citocromo c en una estructura denominada apoptosoma. (Reddig and Juliano, 2005) Otros factores como el Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), bloquean al IAP (inhibitor of apoptosis protein) cuya función es inhibir a las caspasas activadas. Esta permeabilización de la OMM inicia la cascada de caspasas y va a desembocar en la muerte celular.

Los miembros de la familia de Bcl-2 previenen la apoptosis manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial, evitando la formación de poros y desestructuración de la OMM. Dentro de esta familia se incluyen 3 grupos:

- las proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1.
- proteínas como Bax y Bak (Bouillet and Strasser, 2002; Chittenden *et al.*, 1995) y Bok cuyo papel consiste en promover la apoptosis cuando son sobreexpresadas. Aunque Bax puede ser regulado transcripcionalmente (por p53), tanto Bax como Bak son principalmente controlados post-translacionalmente. Bax y Bak existen en las células saludables en una forma latente e inactiva (Griffiths *et al.*, 1999). La forma inactiva de Bak reside en la OMM mientras que Bax se encuentra en el citosol y se transloca a la mitocondria durante la apoptosis en respuesta a muchos estímulos apoptóticos, por ejemplo,

células despegadas de la ECM estimulan la translocación de Bax en quince minutos. En la OMM ocurre la activación de Bax, que sufre un cambio conformacional y forma complejos oligoméricos.

- proteínas tipo BH-3, que incluyen a Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma y Hrk. Es el grupo más grande y diverso de la maquinaria apoptótica. Actúan como sensores vigilando las señales apoptóticas que las células producen. Estas proteínas interactúan con los otros tipos y unas promueven la actividad proapoptótica mientras que otras la inhiben. Dos miembros de esta familia, Bim y Bmf detectan cambios en el citoesqueleto de actina (Puthalakath *et al.*, 1999). Algunas de estas proteínas BH-3 son reguladas a nivel transcripcional. Por ejemplo, PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) y Noxa son regulados positivamente por una ruta dependiente de p53 (Nakano and Vousden, 2001; Shibue *et al.*, 2003). Otras proteínas BH-3 son transcripcionalmente reguladas por factores de crecimiento, como Bid y otras post-translacionalmente. Bad es regulado por fosforilación, por parte de diferentes kinasas que lo fosforilan en distintos sitios (Harada *et al.*, 1999; Zha *et al.*, 1996). Algunas de las kinasas implicadas en su regulación son PKB, PKA (protein kinase A) y PAK-1 (p21-activated kinase), las cuales son componentes críticos de la señalización dependiente de la adhesión.

1.5.1.2. Ruta extrínseca

La ruta extrínseca es iniciada por la unión de los ligandos de muerte extracelulares, como FasL (Fas Ligand) o TNF (Tumor Necrosis Factor) a sus receptores transmembrana denominados receptores de Fas y TNF respectivamente (Chiarugi and Giannoni, 2008). Esto lleva a la formación del DISC (death-inducing signalling complex), cuya función es captar proteínas adaptadoras como FADD, las cuales sucesivamente van agregando varias moléculas de caspasa-8 promoviendo así su activación y autoprosesamiento. La caspasa-8 procesa proteolíticamente y activa a las caspasas 3 y 7, provocando la activación del resto de caspasas que culminan en la proteólisis y muerte celular (Taylor, Cullen, and Martin, 2008). Las células que responden a los ligandos de muerte extracelulares se dividen en dos clases (Green, 2000).

- Células de tipo I: la caspasa 8 es suficiente para iniciar la cascada de efectores de caspasas que llevan a la muerte celular.
- Células de tipo II: la caspasa 8 no puede comenzar ella sola la apoptosis, de hecho en estas células se entrecruza la vía intrínseca con la extrínseca ya que necesita una amplificación vía mitocondria y esto lo consigue con la ruptura de Bid. El complejo formado por los fragmentos de Bid activan la liberación de citocromo c y a Bax, que lo lleva a su oligomerización y por consiguiente a la permeabilización de la OMM (Eskes *et al.*, 2000; Kuwana *et al.*, 2002). Es interesante destacar que durante la anoikis de células epiteliales de mamífero, Bid es translocado a la mitocondria como proteína completa y su ruptura no es necesaria para la anoikis (Wang *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la activación del EGFR (epidermal growth factor receptor) y la posterior estimulación de la cascada de PI3K y Erk/MAPK son capaces de suprimir la actividad de factores apoptóticos. En células adherentes, EGFR reprime la expresión de Bim, a través de la ruta Erk/MAPK por fosforilación, y lleva a su degradación. La inhibición de Bim evita la destrucción de la mitocondria y la inducción de la muerte celular. La pérdida de la interacción de la integrina $\beta 1$ con la matriz, en las células despegadas, reprimió la expresión de EGFR e incrementó la expresión de Bim (Reginato *et al.*, 2003) (Shen and Kramer, 2004). Las señales de supervivencia, a través de la adhesión que suprimen la anoikis, presentan una forma dependiente y otra independiente de Bim (Marani *et al.*, 2004).

1.5.2. Mecanismo independiente de caspasas

En los últimos años se ha visto que la evidente dicotomía de apoptosis *versus* necrosis era una simplificación de un proceso altamente sofisticado que protege a los organismos de las células indeseables y potencialmente nocivas. Existen muchas evidencias de que la muerte celular programada también puede ocurrir en ausencia de caspasas y otras proteasas no caspasas han sido descritas como capaces de ejecutar este proceso (Broker, Kruyt, and Giaccone, 2005). Además este proceso independiente se ha visto que no está restringido a modelos *in vitro* (Cauwels *et al.*, 2003; Perfettini and Kroemer, 2003). No sólo ocurre en circunstancias fisiológicas sino que puede ser inducida por ejemplo

por TNF- α o fármacos. Existen varias formas de muerte celular programada que han sido denominadas como autofagia, paraptosis y catástrofe mitótica.

La autofagia se caracteriza por la formación de vesículas autofágicas que engloban gran cantidad de citoplasma y orgánulos y su consiguiente degradación por el sistema lisosomal propio de la célula (Shintani and Klionsky, 2004). La función exacta de la muerte celular por autofagia en mamíferos no está completamente aclarada (Okada and Mak, 2004).

La paraptosis está caracterizada por una formación de vacuolas citoplasmáticas que comienza con una progresiva turgencia de las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Se ha descrito que está mediada por protein-quinasas mediadas por mitógenos y puede ser desencadenada por el miembro de la familia del receptor de TNF, TAJ/TROY (Wang *et al.*, 2004) y por el insuline-like growth factor I receptor (Sperandio *et al.*, 2004).

La catástrofe mitótica es otra ruta de muerte celular que no es apoptosis típica. Se produce por un fallo mitótico causado por un defecto en el control del ciclo celular y el desarrollo de células aneuploides que son condenadas a morir. Este proceso mata a la célula durante o cerca de la metafase de un modo independiente de p53, pero se ha observado que va acompañada de permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas.

Aunque se ha intentado hacer una clasificación para su mejor entendimiento todas las rutas se solapan y comparten las rutas de señalización con lo cual es muy difícil establecer fronteras entre unas y otras. De hecho en una misma célula pueden aparecer marcadores de muerte tanto apoptóticos como necróticos simultáneamente, lo que indica que más de un programa de muerte celular puede estar activado al mismo tiempo. Aunque solo se hará efectivo el programa más rápido (Castedo *et al.*, 2004).

Una proteína mitocondrial que contribuye, potencialmente, tanto a la muerte celular dependiente como independiente de caspasas es la endonucleasa G. Es una proteína conservada evolutivamente y es capaz de inducir la fragmentación del DNA de forma independiente de las caspasas en núcleos aislados. Otra proteína con papel pivotante es el apoptosis inducing factor (AIF) que funciona normalmente como oxidorreductasa pero que se transforma en un destructor celular cuando es liberado al citosol. Los efectos letales de AIF son controlados por la proteína de shock térmico, proteína 70 (Ravagnan *et al.*, 2001).

La proteína lisosomal cathepsina D se ha observado que dispara la liberación de AIF en varias circunstancias. Además la presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no previene la translocación mitocondrial-nuclear de AIF ni sus efectos letales, indicando que esta proteína está implicada en la ruta independiente de caspasas (Broker, Kruyt, and Giaccone, 2005).

En células MCF-7 se ha observado que ciertos componentes de la vitamina D son capaces de desencadenar la muerte celular ejecutada por proteínas denominadas calpains en ausencia completa e independientemente de las caspasas. Esto indica que el retículo endoplasmático también puede intervenir en ciertos tipos de muerte celular independiente de caspasas (Mathiasen *et al.*, 2002).

La adhesión a la matriz extracelular a través de ciertas integrinas como $\alpha 5\beta 1$ puede estimular la expresión de Bcl-2.(Matter and Ruoslahti, 2001). Existe una proteína que inhibe la transcripción de Bcl-2 y se denomina Bit-1. Durante la anoikis, Bit1 se transloca desde la mitocondria al citoplasma e interacciona con AES, un miembro y regulador negativo de la familia de reguladores transcripcionales Groucho/TLE. Esta interacción inicia la muerte celular programada independiente de la activación de caspasas (Jan *et al.*, 2004).

1.5.3. Marcadores de apoptosis (micropartículas)

Las micropartículas son vesículas, derivadas de la membrana plasmática, que son liberadas de las células durante su activación o por la muerte celular. Estas partículas sirven como mediadores de entrecruzamiento celular e inducen una gran variedad de respuestas celulares. La liberación de estas estructuras aumenta enormemente cuando las células son expuestas a estímulos pro-inflamatorios o pro-apoptóticos. Se ha observado que dichas partículas ejercen una función en las enfermedades autoinmunes, ya que su cantidad es muy superior en estas circunstancias, por lo que han sido propuestas como mediadores de inflamación y pueden funcionar como vectores subcelulares que lleven proteínas y lípidos a las células diana.

Dichas micropartículas son fagocitadas por los macrófagos que sufren apoptosis después de su captación. La muerte de los macrófagos lleva a la liberación de más micropartículas aunque con marcadores celulares diferentes (Huber *et al.*, 2007). Además de los fagocitos profesionales, existen otros tipos

celulares como las células del parénquima que también pueden atrapar células muertas o en proceso de muerte. La desaparición rápida de las células muertas asegura la homeostasis del tejido así como la modulación local de la inflamación (Distler *et al.*, 2005).

Las micropartículas presentan marcadores celulares de superficie que indican su origen celular. También pueden expresar otros marcadores como marcadores de activación celular (Gelderman and Simak, 2008). Aunque las micropartículas pueden ser liberadas por cualquier tipo celular, la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo en las producidas por plaquetas, leucocitos y células endoteliales. De este modo, la presencia de CD4, CD3 o CD8 en la superficie de estas micropartículas indica un origen linfoide mientras que las procedentes de plaquetas van marcadas con la expresión de glicoproteínas IIb-IIIa y P-selectina/CD42a. Las micropartículas que presentan en su superficie CD31 o CD146 indican que son de origen endotelial (Piccin, Murphy, and Smith, 2007). Las micropartículas circulantes de origen endotelial también pueden expresar marcadores de daño celular como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y factor von Willebrand (Leroyer, Tedgui, and Boulanger, 2008). También se ha observado que la mayoría de las micropartículas expresan tanto CD40 como CD40L independientemente de que su origen sea endotelial, de macrófagos, plaquetas o células del músculo. En las plaquetas, CD40L es translocado rápidamente a la superficie celular tras la activación (Pasterkamp and de Kleijn, 2008).

Por otro lado también se ha observado que las micropartículas pueden expresar un conjunto de marcadores de superficie distinto a las células precursoras, esto se ha observado en micropartículas de origen eritrocitario (Butikofer *et al.*, 1989). En la actualidad se desconocen las reglas que rigen la incorporación de diferentes proteínas a la superficie de las micropartículas.

Las micropartículas pueden ser detectadas por citometría de flujo pero presentan el inconveniente de que debido a su pequeño tamaño la cantidad de cualquier marcador de superficie está drásticamente disminuida, en comparación con las células intactas. Por otra parte, la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana permite la unión de la anexina V lo cual puede ser usado para su identificación y cuantificación (Ardoin, Shanahan, and Pisetsky, 2007).

1.6. Anoikis

La anoikis es la apoptosis que se produce en respuesta a la falta de adhesión o a una unión inadecuada a la matriz extracelular. Durante este proceso se observan todas las características propias de la apoptosis, incluyendo la fragmentación nuclear y la formación de burbujas en la membrana plasmática (Kerr, Wyllie, and Currie, 1972; Vermeulen, Van Bockstaele, and Berneman, 2005). Algunos aspectos fundamentales de la anoikis son:

- los receptores de la matriz extracelular (ECM) de la familia de las integrinas son esenciales,
- requiere una permeabilización de la membrana mitocondrial para que ocurra,
- no todas las células son igualmente sensibles a la anoikis. Las células epiteliales y endoteliales son más sensibles que los fibroblastos (Gilmore, 2005).

1.6.1. Contacto por integrinas

La matriz extracelular proporciona el soporte físico para las células pero también aporta información a la célula para llevar a cabo procesos como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia (Valentijn, Zouq, and Gilmore, 2004). La mayoría de las interacciones célula-ECM dependen de las integrinas, que son receptores heterodiméricos transmembrana para las proteínas de la ECM, que se asocian con un gran número de proteínas localizadas en la cara citoplasmática de la membrana plasmática formando los denominados complejos de adhesión (complejos y adhesiones focales (Critchley, 2000; Geiger *et al.*, 2001). En estos sitios, las integrinas se unen a complejos del citoesqueleto intracelulares y de este modo traducen información posicional de la matriz a la célula (Yamada and Miyamoto, 1995).

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas receptoras de membrana conservadas evolutivamente compuestas por una cadena α y una cadena β y que pueden unirse a diferentes ligandos, fundamentalmente componentes de la membrana extracelular. Esta unión es dependiente de cationes y reconocen secuencias específicas en sus ligandos. La más estudiada

es la secuencia RGD, que se ha encontrado en un gran número de proteínas de la matriz, como fibrinógeno, vitronectina, fibronectina, osteopontina, VWF, etc. Sin embargo, también otras integrinas se unen a ligandos no RGD como son los receptores de $\alpha 4\beta 1$ que se unen y reconocen la secuencia LDV que está dentro de la región CS-1 de la fibronectina (Mousa, 2008). Se conocen al menos 8 tipos de subunidades β y 18 subunidades α (Marastoni *et al.*, 2008) La mayoría de los miembros de las integrinas pertenecen al tipo $\beta 1$, y son conocidas como subfamilia VLA. Se han caracterizado al menos, siete receptores de esta subfamilia y cada uno con especificidad de ligando. Entre los más estudiados se incluyen $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha n\beta 1$. La integrina leucocitaria $\alpha 4\beta 1$ (también conocida como VLA4) es un receptor de adhesión celular que se expresa predominantemente en linfocitos, monocitos y eosinófilos (Hamann *et al.*, 1994). Las integrinas $\alpha 4$ son moléculas centrales en la interacción de los leucocitos con otras células y con la matriz. El papel de las integrinas y su regulación por citoquinas y otros mediadores inflamatorios durante la adhesión de los eosinófilos al endotelio, a la matriz extracelular y la migración transendotelial está bien documentada (Springer, 1994; Yednock *et al.*, 1992).

En el intestino, las integrinas son expresadas diferencialmente a lo largo del desarrollo intestinal y del eje cripta-vellosidad en el adulto (Beaulieu, 1999), aunque algunas, como la $\alpha 6\beta 1$, parecen encontrarse en todos los enterocitos (Beaulieu and Vachon, 1994). Las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ se encuentran en la membrana basal de los enterocitos siguiendo un patrón de complementariedad: la primera está en las criptas y la segunda en las vellosidades (Perreault, Vachon, and Beaulieu, 1995). La integrina $\alpha 7\beta 1$ se encuentra paralela a la adquisición de las características de diferenciación durante el desarrollo y el eje cripta-vellosidad, encontrándose en la parte superior de la cripta y la inferior de la vellosidad (Basora *et al.*, 1997). También existen diferentes isoformas de la cadena $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$ a lo largo del eje cripta-vellosidad con diferentes funciones y ligandos (Lussier *et al.*, 2000).

La unión de las integrinas al citoesqueleto se da fundamentalmente a través de las cadenas β a proteínas como talina y filamina (Calderwood, Shattil, and Ginsberg, 2000) que interacciona con vinculina y paxilina, que interactúan con la quinasa de adhesión focal (FAK) y activan esta vía (Almeida

et al., 2000). Las cadenas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ de las integrinas también pueden interactuar con ILK (integrin-linked kinase), una serintreoninquinasa implicada en la adhesión celular, el crecimiento anclaje-dependiente y la anoikis (Attwell, Roskelley, and Dedhar, 2000).

Además las integrinas también pueden ejercer su función al cooperar en asociación lateral directa con otros receptores de membrana (transactivación), como en el caso del receptor CD98 (Cai *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las integrinas $\beta 1$ están presentes en los intestinos inflamados de la enfermedad inflamatoria intestinal y el bloqueo o la pérdida de la integrina $\alpha 1\beta 1$ está asociada a una disminución de la inflamación y el daño en un modelo de colitis inducida de ratón (Krieglstein *et al.*, 2002). Tanto $\alpha 1\beta 1$ como $\alpha 2\beta 1$, han demostrado estar implicadas en la migración del cáncer de colon sobre colágeno IV (Sanders and Basson, 2004).

Las señales que se producen en las uniones célula-ECM activan un gran número de rutas intracelulares que están bien caracterizadas, muchas de las cuales se ha sugerido que intervienen en la supresión de la apoptosis (Frisch and Sreaton, 2001).

1.6.2. Rutas implicadas en la supervivencia y en la anoikis

Las piezas claves en la transmisión de señales, mediada por integrinas, que lleva a la protección contra la anoikis son la PI3K, FAK, ILK (integrin-linked kinase), Src tirosin kinasa, ERK y la proteína adaptadora Shc (Chiarugi and Giannoni, 2008).

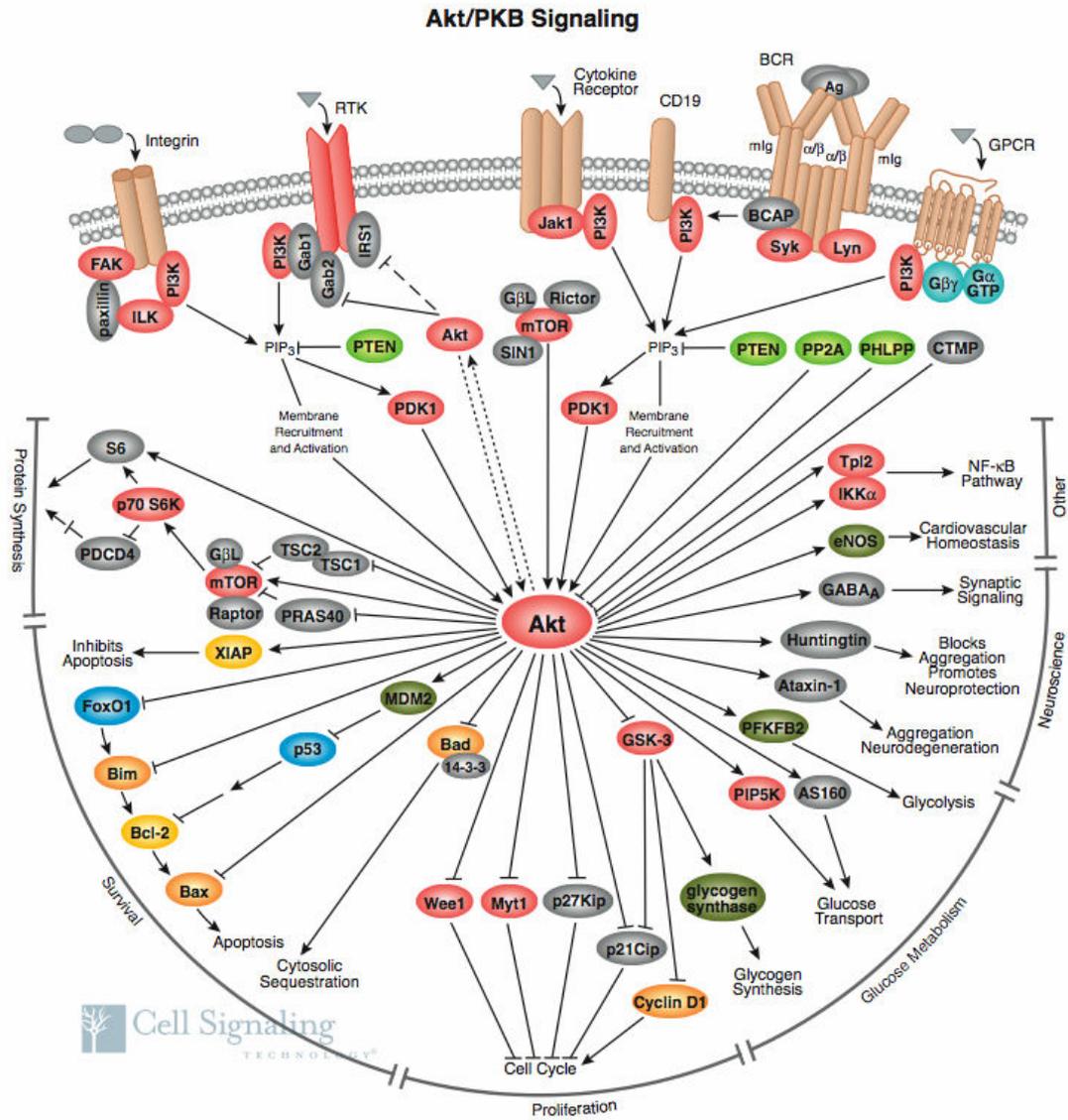


Figura 4.- Rutas intracelulares de señalización desde las integrinas y otros receptores. Tomada de Cell Signaling.

Un elemento importante en el proceso de la anoikis es la PI3K. Este enzima genera derivados fosforilados (PI3, 4P & PI3, 4,5P) que estimulan la unión de la PKB/Akt a la membrana y su activación. La consecuencia de esta activación es la supervivencia celular ya que a través de la fosforilación de varios sustratos, entre los que se incluyen Bad, Bim (Gilley, Coffey, and Ham, 2003) y la pro-caspasa 9, inhibe su función y no ocurre la apoptosis. Este grupo de enzimas juega una función primordial en la regulación de la adhesión mediada por señales de supervivencia (Alahari, Reddig, and Juliano, 2002; Nicholson and Anderson, 2002) ya que la pérdida del contacto con la ECM lleva a una inhibición de las señales producidas por PI3K/Akt y Erk, lo que incrementa considerablemente la acumulación de Bim (Cheng *et al.*,

2001). La serin-treonin kinasa PKB/Akt también es un elemento vital en la señalización de supervivencia ya que su activación conlleva múltiples efectos inhibitorios de la maquinaria apoptótica como son la inactivación de la caspasa-9 (Cardone *et al.*, 1998), la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad (Datta *et al.*, 2000), la activación del NF- κ B (Romashkova and Makarov, 1999) así como la inhibición de factores de transcripción Forkhead (Kops and Burgering, 1999).

Se ha observado que el dominio citoplasmático de la integrina β 1 es el que regula específicamente las señales de supervivencia ya que éste estimula la actividad de la PKB/Akt (Pankov *et al.*, 2003). La Akt presenta varias isoformas que parecen tener papeles independientes en la supervivencia dependiente de anclaje. En células epiteliales intestinales, la activación de la isoforma Akt-1 por la adhesión celular a través de la integrina β 1, FAK y PI3K es crucial para la supervivencia celular en todas las etapas de la diferenciación del enterocito. Sin embargo, la Akt-2 no es regulada por la PI3K y no puede sustituir a PKB/Akt en la señalización (Dufour *et al.*, 2004).

- **PI3K con DAP-3**

Otra conexión en la red de las interacciones de la PI3K que regulan la anoikis es la DAP-3 (death associated protein-3). Esta proteína es pro-apoptótica y está presente tanto en la mitocondria como en el citosol. Regula la muerte celular mediada por factores como el TNF- α . La separación de las células de la matriz extracelular estimula la asociación de DAP-3 con FADD y esto incrementa la actividad de la caspasa 8. Akt puede fosforilar directamente a DAP-3 y esto conlleva que aumente la supervivencia en células en suspensión. Es por esto que DAP-3 parece ser una diana importante para la Akt en la señalización de supervivencia mediada por la adhesión (Miyazaki *et al.*, 2004).

- **PI3K con IAP**

La ruta de supervivencia de la PI3K tiene también otro punto importante que es la survivina de la familia de proteínas IAP. Esta proteína no se expresa en la mayoría de tejidos adultos pero se ha descubierto que su expresión está elevada en numerosos cánceres humanos y está asociada a

un difícil diagnóstico (Altieri, 2001). La importancia de la cascada de señalización de la PI3K-AKT en la anoikis fue reforzada por un estudio sobre supresores de la anoikis en células epiteliales intestinales de rata (RIE). Se observó que el TrkB, un receptor neurotrófico tirosin kinasa, suprimió fuertemente la anoikis en la células RIE en presencia o ausencia de su ligando, el factor neurotrófico derivado del cerebro. TrkB activa la cascada de la PI3K y esta activación es necesaria para la supresión de la anoikis (Douma *et al.*, 2004).

- **PI3K con FAK**

FAK (focal adhesión kinase) desempeña una función central en la transmisión de señales dependientes de la adhesión y es muy importante para la supervivencia celular. Interacciona con varias proteínas efectoras como la p85, subunidad catalítica de la PI3K, Shc, Src y Cas. La señal de supervivencia de FAK depende de la cascada de señalización de la PI3K, mientras que la muerte celular en ausencia de FAK depende de la presencia de p53 (Abbi and Guan, 2002; Alahari, Reddig, and Juliano, 2002). Se ha descubierto que FAK interacciona directamente con RIP, un dominio de muerte que a su vez se une con otros receptores de muerte y regulan las señales vida/muerte a través de la regulación de NF- κ B (Hsu *et al.*, 1996).

Otra proteína de contacto focal, la vinculina, ha sido implicada en la regulación de la supervivencia celular a través de la cascada de FAK. La vinculina se une a la talina, actina y paxilina y es un enlace importante en las conexiones entre integrinas y el citoesqueleto de actina (Johnson and Craig, 1994; Johnson and Craig, 1995). Tanto la vinculina como FAK interactúan con la paxilina (Tumbarello, Brown, and Turner, 2002), pero se ha observado que la ausencia de vinculina favorece la señalización entre paxilina y FAK hacia Erk y mejora la movilidad de las células F9 (células de carcinoma embrionario de ratón)(Coll *et al.*, 1995).

ILK es una protein-kinasa que interacciona con las integrinas y es capaz de fosforilar a PKB/Akt estimulando así su actividad (Attwell, Roskelley, and Dedhar, 2000; Wu, 2001). La sobreexpresión de FAK o ILK activos bloquea la anoikis en las células a pesar de la pérdida de anclaje, lo que apoya

la importancia de estas enzimas en la regulación de la anoikis ((Frisch, 1999; Frisch and Francis, 1994; Hungerford *et al.*, 1996; Ilic *et al.*, 1998). Además el compromiso de anoikis debido a la sobreexpresión de ILK no es eliminado por FAK, lo que sugiere que cada una de estas enzimas afecta a la anoikis por rutas diferentes (Attwell, Roskelley, and Dedhar, 2000).

Existe otra ruta que ocurre al margen de FAK o ILK y es a través de la vía de la caveolina-1 que interviene en la unión de las integrinas a la proteína adaptadora Shc lo que lleva a la activación de ERKs independientemente de la participación de FAK. Esto protege a la célula frente a la apoptosis y promueve el ciclo celular mediante la acumulación de ciclina D1 (Barberis *et al.*, 2000; Wary *et al.*, 1998).

La ruptura de proteínas es un marcador de apoptosis ya que es la consecuencia de la activación de las caspasas. La ruptura de moléculas como FAK, Src y paxilina son importantes para la progresión de señales que desembocan en la muerte celular (Shim *et al.*, 2001; Widmann, Gibson, and Johnson, 1998). Una de las proteínas que se une a FAK para transmitir las señales de las integrinas, se denomina CAS y es cortada durante la apoptosis por la caspasa-3. Esta ruptura hace que se produzca la separación del complejo CAS-paxilina y que se deshaga la arquitectura de la adhesión focal.(Kook *et al.*, 2000).

Las Rho GTPasas, Rac1 y Cdc42 son componentes importantes de la red de señalización dependiente de la adhesión. La unión entre las integrinas regula su activación y su translocación a la membrana donde pueden actuar con efectores como p21 (Del Pozo *et al.*, 2002). La expresión de Cdc42 activado inhibe la anoikis y este efecto depende de su capacidad para activar la PI3K y Rac. También se ha observado que Cdc42 y Rac pueden regular la supervivencia celular a través de rutas dependientes e independientes de la PI3K (Cheng, Symons, and Jou, 2004). Recientemente se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) produjeron, a través de Rac-1, un efecto protector de la anoikis. En particular, las ROS son responsables de la activación tipo redox de Src que lleva a la fosforilación independiente de ligando de EFGR y esta activación dispara las rutas de Erk y PKB/Akt, que culminan en la degradación de Bim (Giannoni *et al.*, 2008).

Varios estudios han demostrado que las cadherinas también juegan un papel en la señalización celular ya que la interrupción de su función desembocó en el incremento en la apoptosis en células epiteliales intestinales

(Hermiston and Gordon, 1995). Estas proteínas promueven la supervivencia, principalmente, a través de la ruta PI3K/Akt (Bergin *et al.*, 2000) aunque también pueden afectar a través de asociaciones indirectas con las integrinas.

1.7. Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés) es una afección crónica que causa inflamación e hinchazón en el tubo digestivo o la pared intestinal. Cuando el tubo digestivo se inflama debido a la IBD, se forman llagas (úlceras) que sangran. Esto a su vez puede causar dolor abdominal, diarrea líquida, sangre en la materia fecal, fatiga, disminución del apetito, pérdida de peso, o fiebre. Los dos tipos de IBD más comunes son la *colitis ulcerosa* (UC) y la *enfermedad de Crohn* (CD)(Lanzoni *et al.*, 2008).

La enfermedad suele desarrollarse durante la segunda y tercera década de la vida tanto en hombres como en mujeres. La edad promedio de diagnóstico son los 27 años. Un segundo pico de nuevos casos, pero mucho menor, ocurre en personas mayores de 65 años de edad. En total, la IBD afecta a los hombres y a las mujeres por igual. Se ha observado que las personas blancas tienen el más alto riesgo de enfermedad, especialmente aquellas de origen judío o europeo. Aproximadamente entre el 15 y el 30 por ciento de las personas que padecen IBD tienen un pariente que sufre de la enfermedad. Por este motivo se está investigando si existe predisposición genética para que una persona tenga más probabilidades de padecer IBD.

Se desconoce su etiología pero como sucede con otras enfermedades, el estrés puede empeorar los síntomas de IBD. Tampoco se conoce ninguna conexión entre consumir ciertos tipos de alimentos y padecer IBD, pero un cambio en la dieta puede ayudar a disminuir los síntomas y a reemplazar los nutrientes perdidos.

1.7.1. Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa (UC, por sus siglas en inglés) causa inflamación y llagas llamadas úlceras en las capas superiores del recubrimiento del intestino grueso (colon) o del recto. Suele ocurrir en la parte inferior del colon y el recto, pero puede afectar al colon completo. Cuando está localizada solamente en el

recto, se la llama *proctitis*. Sucede más frecuentemente en personas jóvenes de entre 15 y 40 años de edad.

El síntoma más común es la diarrea, porque la inflamación evita que el agua sea absorbida dentro de la corriente sanguínea y hace que el colon se vacíe a menudo. La inflamación también mata células sanas del revestimiento del colon, lo que hace que se formen úlceras y sangren, y generen pus y mucosidad. Algunos de los otros síntomas son la diarrea con sangre, calambres abdominales graves, náusea y fiebre frecuente. La mayor parte de las personas que padecen UC tienen momentos en los que se sienten bien (remisión) y otros en los que se sienten enfermos (recaídas). Aproximadamente la mitad de las personas que padecen UC sólo tienen síntomas leves. En casos graves, las personas pueden desnutrirse y pueden tener que hacer una dieta especial, o recibir fluidos por vía intravenosa (Torres and Rios, 2008).

La UC puede también causar problemas tales como la artritis, inflamación en el ojo, enfermedades del hígado, erupciones cutáneas, anemia, y cálculos renales. Se desconoce por qué suceden estos problemas fuera del colon aunque se sospecha que puede ocurrir cuando el sistema inmunológico provoca inflamaciones en otras partes del cuerpo. Estos problemas suelen ser leves y desaparecen una vez que se trata la colitis. El bajo consumo de calcio y vitamina D a través de productos lácteos, la mala absorción de nutrientes en el cuerpo, la inflamación, y el uso de corticosteroides (para el tratamiento de la UC) pueden causar osteoporosis.

1.7.2. Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés) suele causar inflamación en el recubrimiento de las paredes del intestino grueso (colon) o el intestino delgado, pero también puede afectar cualquier parte del tubo digestivo, de la boca hasta el ano. A veces la CD puede afectar a otras partes del tubo digestivo superior con la formación de úlceras en el estómago, la parte superior del intestino delgado, o el esófago. Al igual que la UC, la CD también tiene períodos de remisión y recaídas (Torres and Rios, 2008).

El problema más común en personas que padecen CD es la obstrucción del intestino. Debido a que la hinchazón y la cicatrización ensanchan la pared del intestino, el conducto intestinal puede cerrarse. Las úlceras en el intestino, que atraviesan hacia otras partes del intestino o a tejidos adyacentes de la vejiga, la vagina o la piel, pueden formar fistulas, o conexiones anormales entre el intestino y otros órganos. Éstas suelen formarse alrededor del ano y el recto.

Los problemas de nutrición son comunes en personas que padecen CD. Muchas de ellas tienen deficiencias de proteínas, calorías, y vitaminas. Éstas pueden ser causadas por no comer lo suficiente, por pérdidas de proteína dentro del intestino, o por mala absorción. Otro peligro es la osteoporosis, debido al bajo consumo de calcio y vitamina D a través de productos lácteos, la mala absorción de nutrientes en el cuerpo, o el uso de corticoides (para el tratamiento de la CD o de la inflamación en sí). Algunas personas que padecen CD tienen problemas de artritis, de la piel, inflamación en los ojos o la boca, cálculos renales, cálculos biliares, y otras enfermedades del hígado. Algunos de estos problemas mejoran al tratarse la enfermedad del aparato digestivo, pero otros se tratan por separado.

1.7.3. Apoptosis en ibd

La IBD es considerada como una compleja alteración poligénica y la susceptibilidad de los genes interviene tanto en la enfermedad como en la respuesta de la misma a los diferentes tratamientos.

Se piensa que está causada por reacciones entre los genes que confieren susceptibilidad como son CARD15/NOD2, CARD4/NOD1, HLA, TLR4, DGL5 Y NF- κ B1, factores medioambientales que incluyen la flora entérica y los antígenos de los alimentos, y un balance inmune alterado. La base de la IBD es la presencia de alteraciones determinadas genéticamente que resultan en un sistema inmune que reacciona excesivamente a la microflora intestinal. Estas respuestas inmunes pueden ser inducidas por defectos en la barrera epitelial, una permeabilidad intestinal incrementada, la adherencia de las bacterias y la disminución de la expresión de defensinas (Torres and Rios, 2008).

Una apoptosis defectuosa en las poblaciones de células de la mucosa parece ser relevante en el mecanismo patogénico de la IBD. Una proliferación incrementada o una apoptosis insuficiente podrían contribuir al aumento de células inflamatorias. La disfunción o desregulación del programa de apoptótico ha sido implicado en múltiples enfermedades inmunes, como la artritis reumatoide. Se han estudiado las propiedades de la inducción de la apoptosis en pacientes de Crohn y UC y se ha visto que las células T de la mucosa son altamente resistentes a la apoptosis, lo que explicaría la perpetuación de la reacción inflamatoria en la mucosa con IBD. Observaciones recientes sugieren que el defecto apoptótico en las células de la mucosa de los enfermos de Crohn ocurriría a nivel de la mitocondria en la ruta intrínseca de la apoptosis (Lugering *et al.*, 2006). La inducción de la apoptosis no parece requerir la ruta de señalización vinculada a Fas/FasL, pero sí implica la sobrerregulación de Bax/Bak seguida de la liberación mitocondrial del citocromo c.

Los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la IBD tienen la capacidad de inducir la apoptosis en monocitos o linfocitos y usan distintas rutas moleculares para llevar a la apoptosis lo que explicaría los diferentes efectos terapéuticos causados por estos agentes. Los agentes anti-TNF, como infliximab y adalimumab, son capaces de inducir la apoptosis en monocitos y linfocitos *in vitro* e *in vivo*, pero la cuestión es que no hay un método simple para cuantificar la apoptosis *in vivo* ya que las células que mueren son rápidamente eliminadas por los macrófagos y por tanto no se puede saber si este mecanismo está asociado con la eficacia de estos fármacos.

Por otra parte, las células muertas pueden acumularse en pacientes con defectos en la fagocitosis de las células apoptóticas o durante una muerte celular masiva, cuando un gran número de células muertas excede la capacidad de eliminación del organismo. De hecho, defectos en la fagocitosis de las células apoptóticas han sido observados en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Distler *et al.*, 2005).

1.8. CD200R y CD200

CD200R es una glicoproteína transmembrana que se encuentra en la superficie celular y que actúa de receptor de otra molécula denominada CD200.

CD200R se expresa en la superficie de células del tejido mieloide y en linfocitos CD4⁺ de sangre periférica (Wright *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2000) mientras que CD200 se expresa en una amplia variedad de tejidos, como son timocitos, células dendríticas foliculares, endotelio vascular, células B recirculantes, células T activadas y neuronas tanto del sistema nervioso central como periférico. Ambas moléculas comparten estructura ya que contienen dos dominios tipo inmunoglobulina e interaccionan entre ellas. Además si se comparan filogenéticamente están muy cercanas lo que indica que ambas proceden de un gen ancestral común.

Aunque la existencia de CD200 se conocía desde la década de los 80 (antes conocida como OX-2) no se planteó la existencia de CD200R hasta 1997 que fue sugerida por Preston *et al.* (Preston *et al.*, 1997). Aún así, no fue hasta el año 2000, cuando dicha molécula fue caracterizada en ratón (Wright *et al.*, 2000).

1.8.1. Estructura de CD200R y CD200. Caracterización del gen.

Estructuralmente, CD200R contiene dos dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas en una estructura típica de unión V/C2; contiene una estructura transmembrana y un tallo citoplasmático más largo que CD200. Este tallo está compuesto de 67 aminoácidos y posee tres residuos de tirosina altamente conservados. Una de estas tirosinas forma parte de un motivo NPXY. Estos motivos son conocidos por su capacidad de unión a dominios PTB/PID que están presentes en moléculas adaptadoras como SHC, IRS-1 y Numb. Esto lleva a pensar que es CD200R la encargada de desarrollar señales intracelulares que afecten a la función del macrófago.

CD200 es una glicoproteína de tipo I que presenta dos dominios extracelulares, una región transmembrana y un tallo citoplasmático que no presenta ningún motivo conocido de señalización (Barclay *et al.*, 2002).

Por otro lado, CD200R es una molécula altamente glicosilada (aproximadamente un 70% de su peso son carbohidratos). Existen de ocho a diez sitios potenciales de N-glicosilación tanto en ratón como en rata. A pesar de este grado tan alto de azúcares asociados se cree que la interacción está mediada por la proteína y que los carbohidratos son importantes para el mantenimiento de la orientación respecto a la membrana y para prevenir posibles interacciones cis no deseadas.

En el año 2003, nuestro grupo describió la caracterización del *CD200R1* en el genoma humano (Vieites *et al.*, 2003). Se descubrió que estaba localizado en la región del cromosoma 3q12-13 muy cercano al *CD200*. Ambos genes están muy conservados entre humanos y ratones y estrechamente relacionados, lo que indica que estos genes pudieron surgir por sucesos de duplicación (Wang *et al.*, 2007).

El gen humano consta de una región de 52 kb que conforman 9 exones. Dichos exones codifican para una proteína celular de superficie compuesta de 348 aminoácidos consistentes en dos dominios IgFF (fold-family) en una típica unión V/C2 con los residuos conservados de tirosina, cisteína y triptófano que definen las hebras B a F de la organización IgFF (Halaby, Poupon, and Mornon, 1999). El dominio citoplasmático consta de 59 aminoácidos y tiene 2 residuos de tirosina, uno de los cuales forma parte de un motivo NPXY. Al igual que otros genes IgSF el gen CD200R puede generar distintas isoformas mediante splicing alternativo.

Una isoforma alternativa, que todavía no se ha descrito en ratón, es la formada por 188 aminoácidos que codifican un polipéptido soluble que contiene solo el dominio inmunoglobulina V. Ésta se formaría por la inclusión de un fragmento de 125 pares de bases que se encuentra entre los exones 4 y 6 y que daría lugar a un codón de paro produciéndose dicha forma truncada.

Otro aspecto diferencial con el homólogo murino sería que ambas formas tanto la soluble como la unida a membrana pueden presentar una inserción de 23 aminoácidos en la posición 23; dicha inserción conformaría el exón 2 y generaría un dominio putativo de dihidroxiácido dehidratasa. Por lo

tanto se generarían dos nuevas isoformas que serían la unida a membrana y la soluble y con o sin el exón 2. Por otro lado, CD200R ha sido estudiado en hígado, timo, bazo, riñón, cerebro y placenta.

La siguiente figura representa las distintas isoformas que se pueden formar:

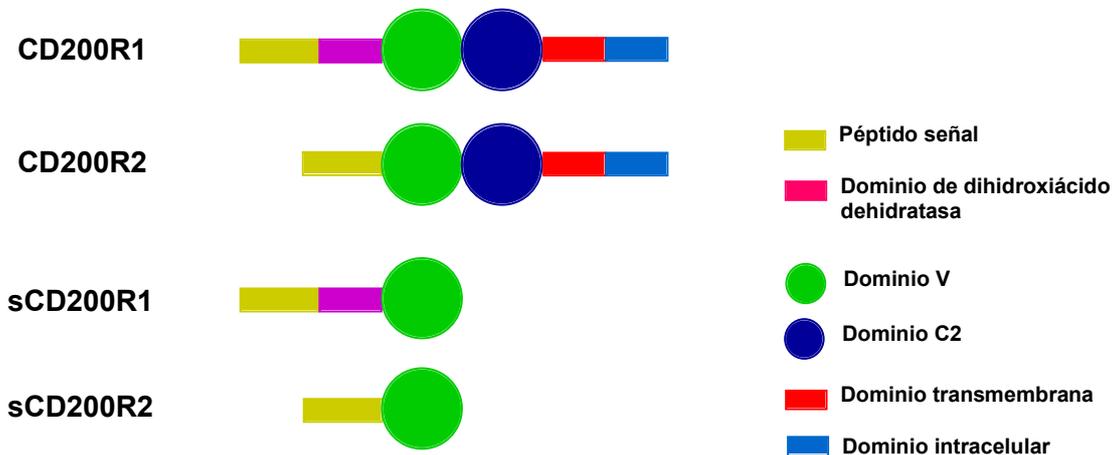
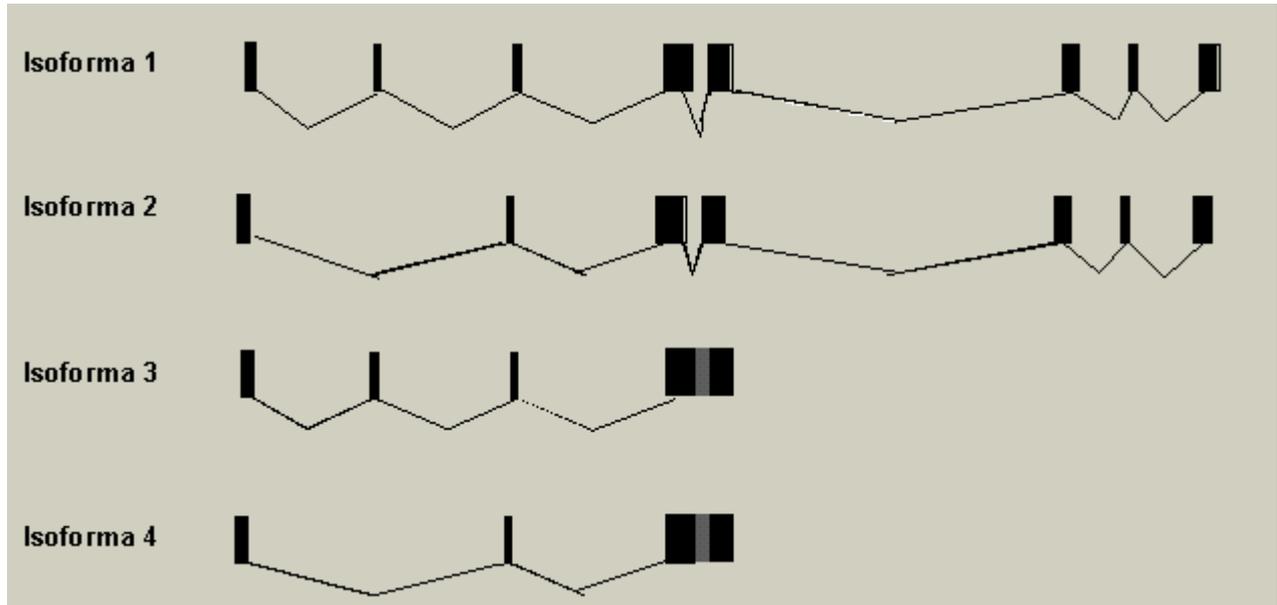


Figura 5.- Arriba: Esquemas de las distintas isoformas que se pueden formar por splicing alternativo del gen CD200R1. Los bloques negros corresponden a los exones y las líneas de unión entre éstos serían los intrones. Los bloques grises corresponden a un intrón que tendría la capacidad de ser transcrito en ciertas circunstancias y dar lugar a las isoformas cortas. Abajo: una representación esquemática de los distintos dominios que presenta la proteína codificada por CD200R1 y las distintas proteínas a las que darían lugar las combinaciones representadas en la imagen de arriba. Corresponderían a dos proteínas tipo receptor y otras dos que tendrían naturaleza soluble.

Otros autores (Wright *et al.*, 2003) han observado un gen relacionado con CD200R1 en humanos y cuatro genes relacionados con CD200R en ratón.

Definen dos proteínas denominadas mCD200RLa y mCD200RLb. Ambas tienen una secuencia similar a CD200R1 pero con una cola citoplasmática corta y que no presenta motivos conocidos de señalización. Por otro lado en la zona transmembrana presentaría un aminoácido cargado positivamente, lisina, que interactuaría con DAP12, una molécula adaptadora. El gen que han encontrado en humanos lo han denominado hCD200RLa y sería similar a mCD200RLa, pero el análisis de la secuencia de aminoácidos ha demostrado que esta proteína no tendría dos residuos de cisteína que sí presenta la de ratón y eso explicaría el motivo de por qué esta forma no es funcional en humanos ya que no interaccionaría con DAP12.

Gorczynski *et al.* hacen un estudio en el genoma de ratón e informa que existe una familia de moléculas CD200R, en la cual cada uno de sus miembros tiene patrones de expresión y propiedades funcionales propias. La isoforma CD200R1 estaría expresada en tejidos como bazo, pulmón, testículos, intestino y otros. En intestino también se expresaría la isoforma CD200R4. También han observado que aunque todas las isoformas interactúan con CD200 es la R1 la que desencadena una señal intracelular ya que las otras presentan un tallo citoplasmático corto y sin motivos de señalización. Estas isoformas no corresponderían exactamente a las definidas por Wright *et al.* ya que dicho autor considera que éstas isoformas están truncadas y no serían funcionales mientras que Gorczynski asigna a cada isoforma una localización e intenta asignarle un papel específico de tejido (Gorczynski *et al.*, 2004).

Viertlboeck y colaboradores han demostrado que existe un homólogo del CD200R1 mamífero en el pollo. Al analizar el área cromosómica de ambos genes se ha visto que están relacionados y que presentan idénticas características estructurales, aunque los genes CD200R mamíferos presentan un exón que codifica aproximadamente unos 20 aminoácidos que preceden al dominio V, y este exón no aparece en el pollo. Estos autores identifican un segundo gen, que daría lugar a un receptor soluble (Viertlboeck *et al.*, 2008).

Se han encontrado secuencias similares a CD200 en los genomas de virus de las familias *Herpesviridae* y *Poxviridae*. Estos virus están muy adaptados y son patógenos capaces de provocar infecciones asintomáticas durante mucho tiempo en grandes poblaciones inmunocompetentes. Uno de ellos es el herpesvirus 8 humano (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi),

cuya proteína K14, es capaz de interactuar con CD200R e inhibir la secreción de citoquinas inflamatorias (TNF- α) por parte de los macrófagos activados. Todo esto, a pesar de que solo comparte un 40 % de homología con CD200 pero han sabido retener todas las propiedades bioquímicas de la proteína original para poder desarrollar su función eficazmente y minimizar la señal en el hospedador (Foster-Cuevas *et al.*, 2004). Otros herpesvirus humanos que tienen homólogos de CD200 son el HHV-6, HHV-7 y HHV-8. Estos homólogos virales son reconocidos por CD200R y regulan la activación de los basófilos (Shiratori *et al.*, 2005).

Los *myxoma virus*, que pertenecen al género de los *Leporipoxvirus* y es un miembro de la subfamilia *Chordopoxvirus*, infectan a los conejos y también se ha observado que poseen secuencias similares a CD200; en este caso también le sirven para reducir los niveles de activación de los macrófagos y las células T en el hospedador (Cameron *et al.*, 2005).

La presencia de homólogos de CD200 en virus de familias muy diferentes sugiere que esta capacidad para controlar a los macrófagos del hospedador es una estrategia inmunomoduladora viral común y por tanto sugiere que la relación CD200:CD200R es importante en el control de las reacciones inmunes.

1.8.2. Función de CD200R y CD200

En las primeras observaciones, Hoek y colaboradores demostraron, en ratones, que una delección del gen *CD200* aumentaba el número de células que expresaban CD200R y los animales mostraban más susceptibilidad a sufrir artritis inducida por colágeno y encefalomiелitis alérgica experimental, además de presentar un compartimento mielóide expandido y activado (Hoek *et al.*, 2000). Las células mieloides y neuronas también presentan un receptor inmune inhibitorio denominado SIRP- α que se une a su ligando que es el CD47 y es similar a CD200. Esta interacción SIRP- α /CD47 causa la inhibición de la actividad de los macrófagos a través de los motivos inhibitorios presentes en el tallo citoplasmático de SIRP- α . Se ha demostrado que esta interacción es importante en la inhibición de la fagocitosis de los macrófagos. La abundante expresión de CD200 y CD47 en el sistema nervioso central sugiere un importante papel para estas moléculas inhibitorias (Koning *et al.*, 2007).

En otro estudio se observó que la interacción de CD200 con CD200R producía un efecto inmunoregulatorio ya que inhibía la producción de citoquinas tipo-1, que son las encargadas de la defensa de tipo celular y producidas por los linfocitos T helper tipo-1. Estos datos apoyan la idea de que las interacciones CD200:CD200R son importantes en la inmunoregulación que contribuye a determinar la susceptibilidad a la enfermedad autoinmune (Gorczynski, 2001). La interacción de CD200 con su receptor provoca una señal inmunosupresora que lleva a la inhibición de los macrófagos, a la inducción de células T reguladoras, cambio del perfil de citoquinas desde Th1 a Th2 e inhibición de la inmunidad específica de tumor de las células T (Moreaux *et al.*, 2008).

Clark *et al.* (2003) demuestran que la expresión de CD200 en trofoblastos está relacionada con el éxito en el término de un embarazo ya que cuando la expresión de esta molécula falla se provoca el aborto. Demuestran que el cambio de citoquinas de Th1 a Th2 en la superficie fetomaternal es importante para que un embarazo llegue a término y que este cambio está influenciado por la expresión de CD200 tanto en los trofoblastos fetales como en la decidua materna (Clark *et al.*, 2003).

Se ha observado que durante la muerte celular por apoptosis, los procesos bioquímicos modifican las proteínas propias y crean potenciales autoantígenos. Para mantener la tolerancia, el sistema inmune debe controlar las respuestas asociadas a estos autoantígenos. Rosenblum *et al.* (2004) demuestran que las células dendríticas experimentan un incremento en la expresión de CD200 cuando dichas células entran en apoptosis (fenómeno que ocurre continuamente debido al recambio celular). Además ambos procesos van unidos porque cuando se inhibe la apoptosis utilizando un inhibidor de la misma, como es el Z-VAD-FMK, también es inhibida la expresión de CD200. También encontraron que en la secuencia de CD200 hay 4 posibles sitios de unión a p53 en el primer intrón murino y 2 sitios putativos en el primer intrón humano. Esto es importante porque p53 juega un papel importante en las rutas de señalización iniciadas en las células apoptóticas, lo que sugiere que CD200 juega un papel en la tolerancia inmune asociada a la apoptosis (Clark *et al.*, 2003; Rosenblum *et al.*, 2004).

CD200R también ha sido analizado en mastocitos tanto humanos como de ratón y se ha visto que desarrolla un papel importante en la respuesta inmune inhibitoria (Cherwinski *et al.*, 2005).

Recientemente se ha demostrado que tanto Dok-1 como Dok-2 se asocian a CD200R y median su función inhibitoria (Zhang *et al.*, 2004b; Zhang and Phillips, 2006). Además se ha demostrado que la unión de CD200R por su ligando CD200 no es necesaria para la mielopoiesis en ratones normales ya que el desarrollo de leucemia en ratones DKO no fue causada por un defecto en la señalización de CD200R (Rijkers *et al.*, 2007).

Muchos estudios sugieren que la señalización producida por la interacción CD200-CD200R disminuye la actividad de las células mieloides (Jenmalm *et al.*, 2006). Se ha descrito una relación entre esta interacción y la enfermedad de Parkinson ya que CD200 transmite una señal inmunoreguladora a través del receptor de CD200 para regular la activación de la microglia y este suceso está bastante relacionado con la patogénesis y la progresión de la enfermedad de Parkinson (Wang *et al.*, 2007).

CD200 está también implicada en la inmunosupresión en las neoplasias de células B. Las células B de la leucemia linfocítica crónica expresan CD200, lo que lleva a la inhibición de la respuesta Th1 en las reacciones linfocitarias (McWhirter *et al.*, 2006).

En el año 2008 se ha llevado a cabo un estudio empleando un ligando soluble de CD200R para tratar la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. El resultado ha sido, que este tratamiento ha reducido la gravedad de los síntomas tanto clínicos como histológicos, e incluso empleando menos dosis que el TNFR-Fc. La administración de CD200R-Fc disminuyó los niveles de expresión de RNAm para el TNF- α , la IL-1 β , la IL-10 y la metaloproteinasa 13 (MMP-13) en las articulaciones (Simelyte *et al.*, 2008).

Otro artículo reciente demuestra la expresión de CD200R tanto en células T como células B, y esto ocurre tanto en humanos como en ratones (Rijkers *et al.*, 2008). También se expresa en bazo y en los nódulos linfáticos (Simelyte *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Bacterias

Para los procesos de transformación y expansión de clones se empleó la cepa de bacterias *Escherichia coli* XL1-Blue, que es resistente a tetraciclina. Las principales características del genotipo de esta cepa bacteriana son: F' Tn10 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q $\Delta(lacZ)$ M15/*recA1* *endA1* *gyrA96*(Nal^r) *thi* *hsdR17* (*r*_k⁻ *m*_k⁻) *supE44* *relA1* *lac* (Bullock, 1987).

Plásmidos

pGEM-T

Para la clonación de fragmentos de DNA y su envío para secuenciar se utilizó el vector pGEM-T de Promega (Promega Biotech Ibérica, SL, España).

Los vectores comerciales están linealizados y poseen en sus extremos 5' una timina desapareada. Esto permite la clonación de fragmentos de PCR producidos con la *Taq* polimerasa ya que esta enzima agrega una adenina en las reacciones de amplificación.

Este vector confiere resistencia a ampicilina y permite la selección por α complementación. Además incluyen las secuencias promotoras de los fagos T7 y SP6, lo que permite la secuenciación de los fragmentos clonados.

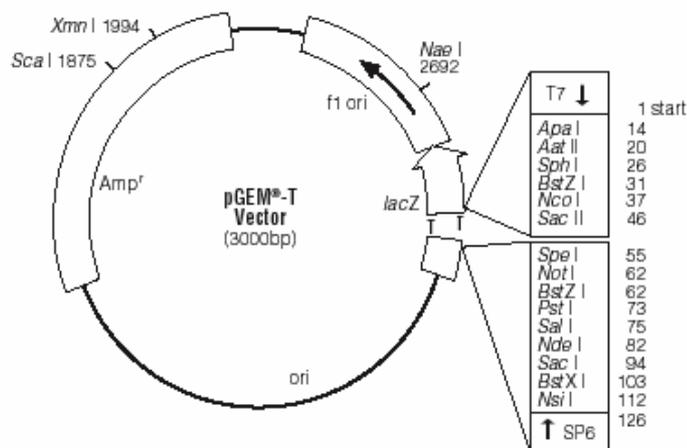


Figura 6. Esquemas del vector pGEM-T donde se indican sus principales características, así como los sitios de corte únicos del sitio de clonación múltiple.

pDsRed-Express-1

El vector pDsRed-Express-1 (Clontech, Becton Dickinson, España) codifica una variante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.* llamada DsRed-Express, que presenta mejores características de solubilidad y emisión de fluorescencia, y puede ser usado como un *reporter in vivo* de la expresión de genes.

Eso es debido a que pDsRed-Express-1 es un vector que carece de promotor y puede ser usado para monitorizar la transcripción de diferentes promotores y combinaciones promotor-potenciador insertadas en el sitio de clonación múltiple.

Este vector presenta el gen *neo^r* (*aminoglycoside phosphotransferase*) que confiere resistencia frente a aminoglucósidos como kanamicina, neomicina y geneticina.

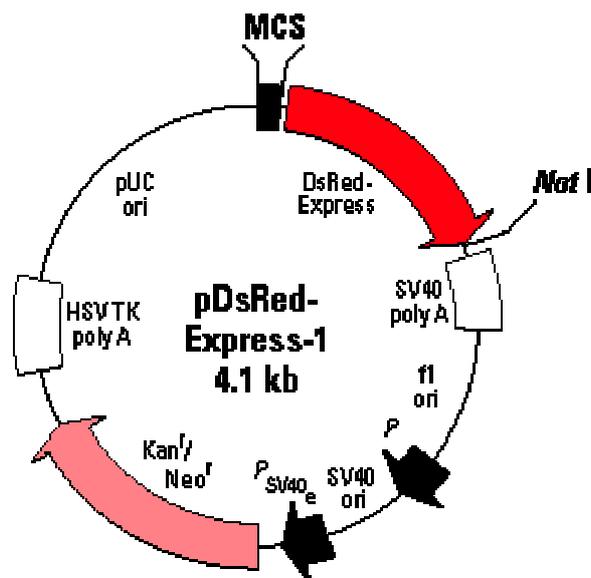


Figura 7. Esquema del vector pDsRed-Express-1 donde se indican sus principales características, así como los sitios de corte únicos.

2.1.2. Animales

Se emplearon ratas Wistar suministradas por el Servicio de Animales de la Universidad de Granada. Los animales fueron mantenidos en jaulas en una habitación termostatazada y con iluminación de 8 a 20 horas. Las ratas tenían acceso a la comida y la bebida *ad libitum*. Antes de su sacrificio, fueron mantenidas en ayunas durante 24 horas. Los animales fueron anestesiados con éter antes de su sacrificio.

Las líneas celulares empleadas durante esta Tesis fueron aportadas por los servicios técnicos de la Universidad a partir de la ATCC (*American Type Culture Collection*, LGC Promochem, Inglaterra). Se emplearon las líneas celulares derivadas de cripta de íleon de rata IEC-6 (CRL-1592™), IEC-18 (CRL-1589™) y las línea celular humana derivada de carcinoma de colon, Caco-2 (HBT-37™). También se utilizaron células MG-63 (CRL-1427™) y MCF-7 (HTB-22™), ambas de origen humano y de tipo epitelial pero proceden de osteosarcoma y de adenocarcinoma de mama respectivamente.

2.1.3. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos empleados en esta Tesis han sido:

- STAR9B de Serotec (Bionova Científica, España) como secundario conjugado a fluoresceína para la detección del anticuerpo primario.
- Mouse antihuman CD200R (MCA2282) (Serotec, Bionova Científica, España)
- Mouse antirat CD200 (Serotec, Bionova Científica, España)
- Mouse antirat OX2 Ligand (Serotec, Bionova Científica, España)
- Mouse IgG1 Control Negativo

2.1.4. Enzimas

Las enzimas utilizadas en esta Tesis han sido:

- DNA polimerasa: Biotools DNA polymerase (recombinante de *Thermus*) Biotools España
- Transcriptasa inversa: Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen S.A., España)
- DNasa: Turbo DNase (Ambion, Bionova Científica, España)
- Enzimas de restricción: la mayoría eran de la marca New England Biolabs (Izasa S.A., España)
- Fosfatasa: Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, GE Healthcare Biosciences, España)
- Ligasa: T4 DNA Ligase, New England Biolabs (Izasa S.A., España)
- Quinasa: T4 Polynucleotide Kinase, New England Biolabs (Izasa S.A., España)

2.1.5. Productos químicos

Los reactivos químicos generales empleados fueron de las casas Merck (VWR International Eurolab S.L., España), Sigma y Fluka (Sigma-Aldrich Química, S.A., España), Bio-Rad (Bio-Rad Spain, España), Invitrogen (Invitrogen, S.A., España), Ambion y Molecular Probes (Bionova Científica), BD Biosciences (España), Qiagen (Izasa S.A.), USB Corporation (Amersham Biosciences Europe GMBH, GE Healthcare Bio-Sciences, España) y Panreac (Labortecnic, España). El nitrógeno líquido fue aportado por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

2.1.6. Soluciones generales

2.1.6.1. Medios de cultivos para bacterias

Todos los medios y soluciones utilizadas en el cultivo de bacterias fueron esterilizados por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	15 g
Agua destilada	c. s. p. 1 litro

Para el crecimiento de *E. coli* en medio sólido se añade a la mezcla anterior 15 gramos de agar bacteriológico.

Todos los componentes del medio fueron proporcionados por BD Biosciences, a excepción del cloruro sódico que era de la marca Sigma-Aldrich.

Antibióticos.

Los antibióticos se adicionaron a los medios de cultivo para seleccionar aquellas bacterias portadoras de diferentes genes de resistencia a antibióticos. Las soluciones preparadas fueron esterilizadas por filtración y guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los antibióticos empleados fueron ampicilina (100 mg/mL), tetraciclina (10 mg/mL) y kanamicina (50 mg/mL) en agua bidestilada estéril. Todos eran suministrados por Sigma-Aldrich.

Isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG).

Este compuesto fue añadido al medio de cultivo sólido donde se crecieron bacterias transformadas con plásmidos de la familia pGEM-T que poseen sistema de selección por α complementación. El IPTG inactiva el represor del operón *lac*, lo que induce la expresión del gen *lacZ* que codifica un fragmento de la β -galactosidasa. Este fragmento se complementa con otro fragmento del enzima codificado por el cromosoma bacteriano dando lugar a la enzima funcional. Dado que el sitio de clonación múltiple está en el gen *lacZ*, cuando se clonan fragmentos de DNA se interrumpe la expresión del mismo y no se da la actividad enzimática en bacterias transformadas con el plásmido con el fragmento clonado.

El IPTG se empleó en solución con agua bidestilada a una concentración de 0,1 M. dicho compuesto era de USB Corporation.

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal).

Sustrato alternativo de la β -galactosidasa que da como producto un compuesto azulado insoluble. El color de las colonias bacterianas en medio de cultivo con IPTG y X-Gal permite seleccionar las bacterias recombinantes positivas con el fragmento clonado (de color blanco) y negativas (de color azul).

El X-gal (de USB Corporation) se utilizó a una concentración 2% p/v diluído en dimetilformamida.

2.1.6.2. Medios de cultivo para células.

Para el mantenimiento y expansión de las líneas celulares se empleó el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) libre de complemento, 200 mM de L-glutamina, 1000 unidades/ mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina y 0,2 U/mL de insulina bovina.

Para la selección, mantenimiento y expansión de los clones transfectados establemente se empleó medio RPMI sin indicador rojo fenol suplementado con 10% de FBS, 200 mM de L-glutamina, 0,5 mg/mL de geneticina (G-418) y 0,2 U/mL de insulina bovina. El medio de selección fue usado sin indicador de pH dado que el rojo fenol interfiere en la detección de la fluorescencia emitida por la proteína roja fluorescente.

Todos los reactivos empleados en los medios celulares fueron de las casas Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química, S.A., España) e Invitrogen (Invitrogen S.A., España).

2.1.7. Equipamientos generales

- Material de plástico: Nalge Nunc (Dinamarca), Sarstedt (Sarstedt S.A., España) y Labortecnic (España).
- Pipetas: Wilson (Wilson Inc., EEUU) y Labsystem Finnipipette (Termo Electrón Corporation, EEUU)
- Autoclave: Selecta (Eleco, S.A., España).
- Centrífugas: Modelo Centrifuge 5415 D (Eppendorf Ibérica, España)
 Modelo Microcentrifuge MC-13 (Amicon, Millipore Ibérica, España).
 Modelo MixtaseI (Selecta).
 Modelo Microfuge E (Beckman Coulter España S.A., España).
- Centrífugas refrigeradas: Modelo Centrifuge J2-21 (Beckman Coulter España S.A.)
 Modelo Universal 16R (Hettich Zentrifugen, Alemania).

- Agitador orbital: Orbital Shaker S03 (Stuart Scientific, Real Labware, Reino Unido).
- Baños: Precistern (Selecta).
Mettler (GmbH+Co, Alemania).
- Incubador de células (Revco, Pacisa y Giralt, S.L., España).
- Campana de flujo laminar: Microflow Laminar Flow Cabinet (MDH Limited, EEUU).
- Congelador de -20 °C: Liebherr (España).
- Congelador de -80 °C: -86 °C Freezer (Forma Scientific, EEUU).
- Lector de placas: EMS Reader MF (Labsystems, GMI Inc., EEUU).
- Sistema de obtención de imágenes: Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak, España).
- Estufas: Memmert.
- Incubador de bacterias: Orbital Incubator Cooled (Gallenkamp, Alemania).
- Transiluminador UV: New Brunswick Scientific, EEUU.
- Termobloque: Thermomixer 5436 (Eppendorf Ibérica).
- Agitador magnético: Asincro (Selecta).
- Espectrofotómetro: DU-70 Spectrophotometer (Beckman Coulter España S.A.).
- Vórtex: Press-to-mix 34524 (Snijders, Holanda).
- Microscopio óptico: Olympus CK2 (Alemania).
- Cámara fría: SIFSA, (España.)
- pHmetro: Crison micropH 2002, (España)
- Luminómetro: Lumart LB9507 (Berthold Technologies, Alemania)
- Citómetro de flujo: Citómetro de Flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, Palo Alto, California), serie C0005, equipado con dos cabezas Láser.
 - Láser dual Coherente Enterprise a 488nm (340 mW) y UV (60mW).
 - Láser rojo visible Spectra Physics 127 a 640 nm (15mW).
Cuenta con 7 detectores: 5 para fluorescencia (fotomultiplicadores), SSC (fotomultiplicador), FSC (diodo).
 - Módulo Procesador de Pulsos.
 - Módulo de SORTER.
 - Banco de filtros Band-pass, Short-pass y espejos dicróicos divisores de banda.

- Software de adquisición y análisis CELL Quest (Becton Dickinson).

- Termocicladores: Modelos 2700 y 9600 de Applied Biosystems (EEUU).
- Fuentes de electroforesis: Model 250 EX (Gibco, Invitrogen).
Model 200/2.0 Power Supply (BioRad, Bio-Rad Laboratories, S.A., España).
- Cubetas de electroforesis: Horizon 11-14 (Gibco, Invitrogen).
Horizon 58 (Gibco, Invitrogen).
- Homogenizador: Polytron T25 Basic (IKA Labortechnik, Alemania).

2.2. Métodos

2.2.1. Procedimientos generales de trabajo con líneas celulares de mamíferos

2.2.1.1. Materiales

- Lipofectamine 2000 (Invitrogen).
- Plásmidos.
- Cilindros y discos de clonación (Sigma-Aldrich).
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich).
- Contenedor de congelación Nalgene Cryo – 1 °C (Nalge Nunc, Dinamarca).
- Crioviales (Nalge Nunc).
- Solución de Trypan Blue.
- Cámara de Neubauer.
- Cubreobjetos.
- Tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen).

2.2.1.2. Cultivo

El cultivo de las diferentes líneas celulares se llevó a cabo en una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles usando material estéril. Los medios fueron guardados a 4 °C y precalentados a 37 °C antes de su empleo.

Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

Subcultivo y expansión

En general, las células fueron cultivadas hasta su confluencia y posteriormente separadas por tripsinización. Después fueron recuperadas con medio completo y centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos en tubos de polipropileno a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en medio completo y colocadas en nuevos frascos de cultivo a una densidad aproximada de 2×10^5 células por mililitro.

Tripsinización

Las monocapas de células adherentes fueron dispersadas por tratamiento con 1 mL de tripsina-EDTA por frasco de 25 mL. Para ello previamente se eliminó el medio y se lavaron las células dos veces con 5 mL de PBS sin calcio ni magnesio.

Contaje

Cuando se requirió la determinación del número de células, se mezclaron 50 μ L de la suspensión celular con 50 μ L de una solución de Trypan Blue para determinar la viabilidad celular. A continuación se procedió al contaje de las células utilizando una cámara de Neubauer.

2.2.1.3. Congelación y descongelación

Las líneas celulares fueron almacenadas en crioviales de 1,8 mL en medio completo con 8% de DMSO (medio de congelación) en un congelador de -80 °C. Para su congelación las células recuperadas y centrifugadas fueron resuspendidas en 1 mL de medio de congelación, pasadas al criovial e introducidas en el congelador de -80 °C en un contenedor de congelación Nalgene Cryo -1 °C durante 24 horas, para posteriormente almacenarlas en el congelador en cajas de congelación.

Para la descongelación el criovial se introdujo en un baño a 37 °C. El medio descongelado, que contiene las células, fue transferido a un frasco con 10 mL de

medio completo, permitiéndose que las células se adhiriesen durante 24 horas, pasadas las cuales se eliminaron las células muertas cambiando el medio.

Cuando los crioviales, que se van descongelar, llevan mucho tiempo en el congelador (más de 6 meses) requieren unas características especiales para que las células se recuperen. En estos casos es conveniente preparar un medio completo pero en este caso con un 20% de FBS. A la hora de descongelar los crioviales escoger un frasco de cultivo pequeño, por ejemplo una placa de 6 pocillos o placas individuales de 35mm y poner ahí las células. Favorecer que haya muchas células, si es preciso añadir dos crioviales a la misma placa. Pasadas unas horas en estufa, observar si se van pegando al fondo y si quedan muchas en suspensión recuperarlas con la pipeta y pasarlas a otra placa. Dejar en la estufa 24 horas y pasado este tiempo cambiar el medio antiguo por nuevo y dejar crecer hasta confluencia.

2.2.1.4. Transfección transitoria de células

La transfección de células es el proceso por el que se introduce un DNA extraño en la célula por métodos físicos o bioquímicos. Esa transfección puede ser transitoria o estable. En este último caso el DNA extraño se integra en el genoma de la célula hospedadora.

Existe multitud de métodos para la transfección de células: coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, uso de DEAE-dextrano y uso de reactivos lipídicos catiónicos. En nuestro caso, empleamos el reactivo lipídico catiónico Lipofectamine 2000. Brevemente, la técnica consistió en mezclar en un tubo 250 μL de medio DMEM con 3-4 μg del DNA de interés y en otro tubo, 240 μL de DMEM con 10 μL de Lipofectamine 2000. Inmediatamente se echó el contenido del segundo tubo sobre el primero y se incubó la mezcla 20 minutos, durante los cuales se formaron micelas de agente transfectante cargadas positivamente que atraen el DNA cargado negativamente formando complejos. La relación óptima para la formación de estos complejos es una proporción de DNA (μg) y Lipofectamine 2000 (μL) de 1:2 o 1:3. Cuando se echó la mezcla que contiene los complejos de agente transfectante con DNA sobre las células con medio DMEM sin aditivos, los complejos se vieron atraídos por la membrana celular, produciéndose la entrada del DNA en las células.

A continuación, las células transfectadas fueron incubadas en la estufa durante 5-10 horas, tras las cuales se procedió a cambiar el medio a medio normal de cultivo, durante el tiempo necesario para que se produjera la expresión del gen reporter (normalmente 72 horas).

2.2.1.5. Establecimiento de clones estables

Se empleó la misma técnica que en el caso anterior, pero en esta ocasión seleccionamos clones de células que hubieran integrado establemente el plásmido de interés. Para que esto se diese, el DNA introducido debía sufrir un proceso de recombinación con el genoma celular. Para identificar las células en las que se hubiera dado la recombinación usamos un medio de selección que contenía G-418 (geneticina), producto que eliminó aquellas células que no hubieran integrado establemente en su genoma el plásmido pDs-Red-Express-1, que confería resistencia frente a G-418. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y sembradas a baja densidad para que crecieran clones separados, manteniendo la presión selectiva para asegurar que sólo crecieran las células transfectadas establemente. Cuando estos clones adquirieron un tamaño adecuado se purificaron usando cilindros o discos de clonación y se pasaron a pocillos donde se mantuvieron con medio de selección hasta su crecimiento y posterior uso o caracterización.

2.2.1.6. Inducción de apoptosis

Materiales

- Materiales de cultivo de células
- Agitador orbital
- Estufa a 37 °C
- Butirato sódico (Sigma-Aldrich)
- PBS
- Tripsina
- Tubos eppendorf
- Centrífuga

Técnica

La apoptosis de las células CACO-2 se realizó manteniendo las células en suspensión, en medio completo, en tubos en los cuales no podían adherirse, y que además fueron mantenidos en agitación para evitar que las células se agregaran. Para ello, una vez que habían crecido en la placa y estaban confluentes eran tripsinizadas, contadas con la cámara Neubauer (se ponían unas $1-2 \times 10^5$ células/mL) y se repartían en tubos eppendorf (según los puntos que necesitábamos y por duplicado) junto con medio de cultivo. Los tubos eran colocados en un agitador orbital a unas 100 rpm y puestos en una estufa a 37 °C. Así se incubaban, con un movimiento suave, durante unas 20 horas. Posteriormente, las células eran recogidas mediante una centrifugación y tratadas adecuadamente según la técnica a seguir posteriormente. Estas podían ser la determinación de su fenotipo por citometría de flujo, la determinación de apoptosis o la extracción de RNA.

Durante algunos experimentos, las células Caco-2 fueron tratadas con butirato sódico 5 mM durante 72 horas. La presencia de esta sustancia produce un efecto de diferenciación y muerte celular que hace que muchas células se desprendan de la monocapa celular y aparezcan en suspensión. Para rescatar las células y poder extraerles el RNA o proceder a su tipado, primeramente se recogió el medio con las células que se habían desprendido. Este medio se centrifugó y se recuperaron las células. En el caso de las células que seguían adheridas, se procedió a su tratamiento con tripsina y se recuperaron con medio completo. Ambos grupos celulares fueron mezclados, centrifugados y lavados posteriormente con PBS.

2.2.1.7. Inducción de diferenciación

Materiales.

- Materiales generales de cultivo de células.
- Dispasa (Becton Dickinson).
- Matrigel (Becton Dickinson).
- Laminina 1 (Becton Dickinson).
- Colágeno IV (Becton Dickinson).
- NGF-7S (Sigma-Aldrich).
- IGF-I (Sigma-Aldrich).
- TGF- β 1 (Sigma-Aldrich).

- PDGF (Sigma-Aldrich).
- bFGF (Biosource, Labclinics, España).
- EGF (Calbiochem, Bionova Científica, S.L., España).

Técnica.

Para determinar el efecto de la diferenciación en la expresión de *CD200R* en las células IEC-6, éstas fueron plaqueadas (5×10^5) en placas de 35 mm que previamente habían sido recubiertas de una fina capa de una matriz extracelular extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) llamada Matrigel según las instrucciones del proveedor. Esta matriz extracelular está compuesta de laminina, colágeno IV, nidógeno, heparán sulfato y diferentes factores de crecimiento, entre los que destacan TGF- β , EGF e IGF. Esa matriz es similar a la que se encuentra en la superficie basolateral de las células epiteliales intestinales ((Kleinman and Martin, 2005).

Las células fueron cultivadas en esas condiciones durante 24 ó 48 horas, momento en el que fueron recogidas usando dispaşa según las instrucciones del proveedor. Las células separadas del Matrigel fueron recogidas y tratadas para la extracción de RNA.

Para determinar posteriormente si alguno de los componentes del Matrigel por separado era el inductor de la diferenciación de las células y de los cambios en la expresión de *CD200R*, se procedió al cultivo de las células con cada uno de los siguientes componentes del Matrigel: laminina 1, colágeno IV, factor de crecimiento de nervios (*nerve growth factor 7S*, NGF-7S), factor de crecimiento parecido a la insulina I (*insulin-like growth factor I*, IGF-I), factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (*transforming growth factor $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) a concentraciones similares a aquellas en las que se encuentran en el Matrigel. En el caso de la laminina y el colágeno se procedió a cubrir las placas con la proteína, dejar que gelificara y posteriormente sembrar las células. En el caso de los factores de crecimiento, se procedió al cultivo de las células con medio al que se le adicionó la cantidad correspondiente del factor de crecimiento.

2.2.1.8. Análisis de actividad de la región promotora

El estudio de la actividad del promotor de CD200R1 se ha realizado utilizando el vector pDs-Red-Express-1, que permite observar la actividad promotora mediante la medición o visualización de la proteína roja fluorescente (RFP).

Materiales

- Materiales de cultivo de células.
- Materiales para transfecciones.
-

2.2.1.9. Medición de la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP).

Se introdujo la región promotora en el vector pDsRed-Express-1 y esta construcción fue transfectada en células eucariotas por el método descrito en la Sección 2.2.1.5. Posteriormente se aislaron aquellos clones que la hubieron integrado establemente en su genoma. De esta manera se puede visualizar en un microscopio de fluorescencia cuáles son las células emisoras de fluorescencia y además ésta puede ser medida en un citómetro de flujo, lo que permite observar la actividad del promotor sin necesidad de lisar las células. Para ello se cultivaron las células en las condiciones experimentales pertinentes y, cuando hubo pasado suficiente tiempo para la expresión de la RFP, se observaron al microscopio de fluorescencia, tras lo cual fueron tripsinizadas y lavadas y se procedió a medir la emisión de fluorescencia en el citómetro de flujo

2.2.2. Procedimientos de trabajo con Escherichia coli

2.2.2.1 Cultivo de bacterias

Materiales.

- Medios LB y LB-agar.
- Soluciones de antibióticos.
- Glicerol (Sigma-Aldrich).

- Crioviales (Nalgene Nunc).
- Material de plástico y de vidrio estériles.

Técnica.

Las bacterias *E. coli* XL1-Blue fueron crecidas en medio LB estéril con tetraciclina a 37 °C. En el caso de aquellas bacterias transformadas con un plásmido que confiriera resistencia a algún otro antibiótico (ampicilina en el caso de los plásmidos de las familias pGEM-T y kanamicina en el caso de pDs-Red-Express-1), éstas fueron crecidas en LB con tetraciclina y ese antibiótico.

Todos los materiales y soluciones empleadas en el cultivo de bacterias eran estériles o autoclavados. Para el almacenamiento a largo plazo de las cepas bacterianas, estas fueron guardadas en crioviales a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 50%.

En los casos en los que se requería pequeñas cantidades de bacterias, se inocularon 5-10 mL de LB más los correspondientes antibióticos con una colonia o parte del glicerol y se cultivó a 37 °C durante 12-15 horas.

Para los cultivos en los que se requería mayor cantidad de bacterias, se preparó previamente un cultivo iniciador de la manera previamente indicada. Posteriormente se inoculó 100-200 mL de LB más los correspondientes antibióticos con 1:100 del cultivo iniciador y se procedió a su incubación a 37 °C con agitación suave durante el tiempo necesario para obtener una absorbancia de 0,5-0,6 a 600 nm. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación.

En el caso de los cultivos sobre medio sólido, se usaron placas de LB-agar con los correspondientes antibióticos en las que se sembraron diferentes diluciones de soluciones de bacterias *E. coli*. Las placas fueron incubadas invertidas durante toda la noche a 37 °C.

Preparación de bacterias competentes

Materiales.

- Bacterias *Escherichia coli* cepa XL1-Blue.
- Medio LB líquido.
- Solución de tetraciclina.
- Agua estéril autoclavada fría.
- Glicerol al 10% autoclavado frío.
- Glicerol absoluto estéril.

Técnica.

Se inocularon 5 mL de medio LB líquido y tetraciclina con bacterias de la cepa XL1-Blue. El inóculo se incubó a 37 °C con agitación moderada durante toda la noche. Al día siguiente se tomó una alícuota con la que inoculamos un matraz erlenmeyer de 250 mL de LB líquido y tetraciclina, que fue incubado a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5-0,6 a 600 nm. En ese momento se pasaron las bacterias a tubos de polipropileno en los que se realizaron los siguientes pasos:

- Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar una vez con un volumen de agua bidestilada autoclavada fría.
- Lavar dos veces con medio volumen de agua bidestilada autoclavada fría.
- Lavar una vez con 0,02 volúmenes de glicerol al 10% en agua frío.
- Resuspender en 0,002 volúmenes de glicerol al 10% en agua frío.
- Las bacterias así obtenidas se hicieron alícuotas y, bien fueron utilizadas inmediatamente, bien fueron guardadas a -80 °C para su uso posterior.

Electroporación

Materiales

- Bacterias competentes.
- Plásmido.
- Medios LB y LB-agar.
- Soluciones de antibióticos.
- Electroporador Electroporator 2510 (Eppendorf).
- Cubetas de electroporación.
- Material de plástico estéril

Técnica

Es el proceso por el que se introduce el DNA en el interior de las bacterias a través de una descarga eléctrica. La electroporación es el método más eficiente para la transformación de *E. coli*.

Para ello se utilizaron 50 µL de las bacterias competentes obtenidas por la técnica previamente descrita que fueron mezcladas con parte del volumen de la ligación (según protocolo indicado en la sección 2.2.7.8). La mezcla se introdujo

dentro de la cubeta de electroporación y se sometió a un pulso eléctrico de 2500 voltios a 16-19 kV/cm². Las bacterias fueron recogidas añadiendo directamente a la mezcla un mililitro de medio LB sin antibióticos a 37 °C. Las bacterias transformadas se incubaron durante una hora a 37 °C en un agitador orbital con agitación suave (100 rpm) para favorecer su recuperación tras la electroporación. Pasado ese tiempo se sembró una alícuota de esas bacterias en una placa de LB-agar con los antibióticos adecuados, tras lo cual la introdujimos en una estufa a 37 °C durante toda la noche o hasta la aparición de colonias.

Screening de colonias

Materiales

- Medios LB y LB-agar.
- Soluciones de antibióticos.
- Solución STET: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris·HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8 y 5% Tritón X-100 en agua bidestilada estéril.
- Isopropanol (Panreac).
- Etanol (Panreac).

Técnica.

En el caso de los plásmidos que, como el pGEM-T, permiten la selección blanco-azul, las colonias blancas que se han obtenido se pican con palillos de dientes estériles que se introducen en tubos eppendorf de 1,5 mL que contienen un mililitro de medio LB líquido. Se dejan crecer durante toda la noche a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Cuando el sistema de selección blanco-azul no estaba disponible, se picaron colonias transformadas con el plásmido religado (control negativo) y colonias transformadas con la ligación aleatoriamente.

El DNA plasmídico se extrae mediante una variante del protocolo de lisis por calentamiento (miniprep) (Sambrook, 1989) que implica un choque térmico a 95 °C durante 55 segundos seguido de una serie de precipitaciones. Así, los cultivos fueron centrifugados y el sedimento de bacterias fue resuspendido en solución STET, para posteriormente sufrir el choque térmico. A continuación se eliminaron los restos bacterianos y se procedió a precipitar el DNA plasmídico con acetato sódico 3 M pH 5,2 y 500 µL de isopropanol, para posteriormente limpiarlo

con etanol. Finalmente secamos el DNA al aire y se resuspendió en agua bidestilada estéril. Para la comparación de los plásmidos se procedió a correr una alícuota en un gel de agarosa. Cuando comparamos el tamaño de los plásmidos obtenidos por este protocolo y el del plásmido control religado decidimos qué plásmidos (y por ende, qué colonias) habían integrado el fragmento de DNA que queríamos clonar. Mediante cortes con enzimas de restricción se determinó cuál de los positivos portaba el fragmento que nos interesaba.

2.2.3. Procedimientos de trabajo con RNA

Extracción de RNA

El RNA se obtuvo por el método de la extracción con el reactivo llamado Trizol (Invitrogen), que consiste en una solución monofase de fenol y tiocianato de guanidina, y el método indicado por el fabricante.

Todas las soluciones que no contienen componentes orgánicos y el material de plástico y de vidrio fueron tratados con agua y dietilpírocarbonato (DEPC) durante un mínimo de 12 horas y posteriormente autoclavados dos veces para eliminar las posibles nucleasas de RNA existentes y los restos de DEPC. La solución stock de tiocianato de guanidina (GT) se esterilizó por filtración a través de filtros de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0.2 μ M.

Extracción con Trizol.

Materiales

- Reactivo Trizol (Invitrogen).
- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Alcohol isopropílico (Panreac).
- Etanol (Panreac).

Técnica

Se partió de las células (sobre las cuales se añadió el Trizol) o de los tejidos (a los que se les añadió el Trizol y se homogenizaron usando un Polytron). A continuación se incubaron las muestras y se les añadió 0,5 volúmenes de cloroformo, mezclando bien el contenido del tubo. Se centrifugó a máxima

velocidad a 4 °C para separar dos fases, una superior donde permanece el RNA y otra inferior donde queda el DNA y otros componentes celulares, separadas por una interfase de proteínas.

La fase superior fue recuperada y pasada a otro tubo en el que se añadió un volumen de isopropanol. La mezcla fue incubada y, tras centrifugarla, se obtuvo un precipitado de RNA que fue lavado secuencialmente con etanol absoluto y etanol 70%. Este precipitado fue secado al aire y posteriormente resuspendido en agua tratada con DEPC.

Para comparar la calidad del RNA se resolvieron 5 µg de RNA, previamente adicionados de tampón de carga y desnaturalizados por calentamiento durante 5 minutos a 65 °C, en un gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo durante una hora a 80V, utilizando TAE 1X como tampón. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de ultravioleta. Si el RNA obtenido estaba en buenas condiciones se veían dos bandas que corresponden a las subunidades ribosómicas 18S y 28S.

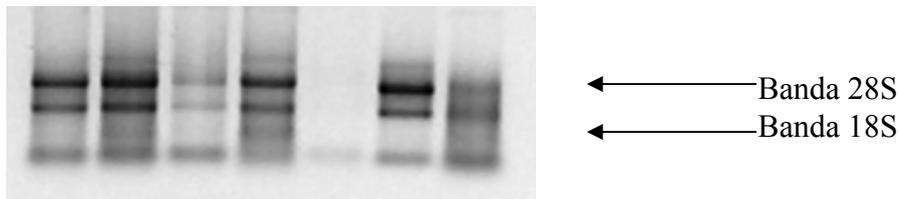


Figura 8.-Imagen típica de un gel de RNA donde se observan las bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas.

Tratamiento con TURBO DNAsa

Para evitar la posible interferencia del DNA que puede contaminar las muestras de RNA se trataron las muestras con TURBO DNasa.

Materiales

- Kit Turbo DNA-free (Ambion, Bionova Científica, S.L., España).
- RNA de interés.
- Agua bidestilada tratada con DEPC.

Técnica

Mezclamos 10 µg de RNA total con 1 µL de TURBO DNasa (2 U) y 5 µL de tampón de TURBO DNasa y completamos hasta un volumen final de reacción de 50 µL con agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato. Se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se añadió otro microlitro de enzima TURBO DNasa e incubamos nuevamente durante 30 minutos a 37 °C. Para detener la reacción e inactivar la enzima añadimos 5 µL de reactivo de inactivación (*Dnase Inactivation Reagent*) y mezclamos bien. Se mantuvo la solución a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y se eliminó el agente inactivador por centrifugación. A continuación se recuperó el sobrenadante, se pasó a un tubo nuevo libre de RNAsas y se procedió a la cuantificación del RNA limpio de DNA.

2.2.4. Cuantificación de DNA y RNA

Materiales

- Agua bidestilada estéril.
- Ácido nucleico de interés.
- Cubeta de cuarzo.
- Espectrofotómetro.

Técnica

Para cuantificar el RNA y el DNA obtenidos se emplea un método espectrofotométrico. Para determinar la calidad se mide la absorbancia a 230, 260, 270 y 280 nm y se hacen las siguientes comparaciones:

- A_{260}/A_{280} : debe estar entre 1,7 y 2,0. Una relación menor indica contaminación por proteínas.
- A_{260}/A_{270} : debe ser mayor de 1. Si es menor indica contaminación por fenol.
- A_{260}/A_{230} : debe estar entre 2,0 y 2,3. Si es menor indica contaminación por lípidos o tiocianato de guanidina.

Para determinar la cantidad, se mide la absorbancia (A) a 260 nm dado que una unidad de absorbancia a dicha longitud de onda equivale a una concentración de 40 µg/mL (en el caso del RNA) o de 50 µg/mL (en el caso del

DNA de doble hebra) usando una cubeta de cuarzo de 1 mL de capacidad y 1 cm de ancho.

2.2.5. Reacción de transcripción inversa (RT)

Esta técnica se basa en la síntesis de una hebra de DNA complementario (cDNA) de cadena simple a partir del RNA mensajero (mRNA) (Sambrook *et al.*, 1989).

Para ello se usa la enzima transcriptasa inversa que sintetiza el cDNA a partir de los sitios determinados por los cebadores empleados, que pueden ser útiles para generar cDNA de todos los mRNA (en este caso el cebador es un p(dT)_n) o sólo para uno de los mRNA (en cuyo caso el cebador será complementario a una parte de la secuencia del mRNA).

Materiales

- Tampón de la transcriptasa inversa 5X (Invitrogen).
- Ditioneitol (DTT) 100 mM (Invitrogen).
- Inhibidor de nucleasas de RNA: Rnase Out (Invitrogen).
- Transcriptasa inversa: SuperScript II RT RNASA H-Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) (Invitrogen).
- dNTPs 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Biotools).
- Cebadores (Sigma Genosys).
- Termociclador.
- Tubos eppendorf de 200 μ L libres de nucleasas de RNA (Molecular Bioproducts, EEUU).

Técnica

Se mezclaron de 100 a 500 ng de RNA total con 1 μ L de cebador p(dT)_n de concentración 10 μ g/ μ L o 1 μ L de cebador específico de concentración 2 μ g/ μ L. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 70 °C para desnaturalizar el RNA e inmediatamente se enfrió a 4 °C, proceso durante el cual hibrida el cebador. En ese momento se añadió una mezcla que contenía 4 μ L del buffer 5x, 2 μ L de DTT 100mM, 1 μ L de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 μ L de dNTPs, 1 μ L de enzima SuperScript II y la cantidad de agua tratada con DEPC necesaria para llegar hasta un volumen total de 20 μ L. Aplicamos un pulso a las muestras que fueron

incubadas en el termociclador a 42 °C durante 1 hora a 70 °C durante 15 minutos para terminar la reacción, tras lo cual se enfriaron a 4 °C. El cDNA así obtenido pudo ser usado inmediatamente o guardado a -20 °C hasta su empleo.

2.2.6. Extensión de cebadores (Primer Extension)

Esta técnica permite llevar a cabo el estudio del extremo 5' de los mRNA de los genes. Así podemos determinar el punto de inicio de la transcripción y estudiar también si existe más de un inicio de transcripción. Consiste en la retrotranscripción del mRNA usando un cebador específico antisentido marcado radiactivamente y que hibrida en una posición cercana al supuesto inicio de transcripción.

Marcaje del cebador y de los marcadores de pesos moleculares.

Materiales

- Tampón 10x de la T4 polinucleótido-quinasa.
- T4 polinucleótido-quinasa.
- Cebadores (Sigma Genosys).
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (USB Corporation)
- Sephadex G-25 ó Sephadex G-50. (GE Healthcare Biosciences, España).
- [γ -³²P]ATP (GE Healthcare Biosciences, España).

Técnica

Marcamos el cebador correspondiente mezclando 1 μ L de cebador (10 picomoles totales), 5 μ L de [γ -³²P] ATP, 2 μ L de tampón 10x, 2 μ L de T4 polinucleótido-quinasa (8 unidades) y agua para un volumen final de 20 μ L. Incubamos a 37 °C durante 1 hora y posteriormente inactivamos la enzima incubando a 70 °C durante 10 minutos. Después introducimos la mezcla en hielo.

A continuación cuantificamos el porcentaje de incorporación del [γ -³²P] ATP filtrando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 al centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Medimos en un contador de centelleo 1 μ L de cebador marcado en 1 mL de líquido de centelleo. El valor obtenido debe ser superior a 10⁵ cpm/ μ L.

En el caso de los marcadores de pesos moleculares, la reacción que se preparó fue la misma sustituyendo el cebador por el marcador de peso molecular.

Reacción de hibridación.

Materiales

- Agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC).
- Cebador marcado.
- Termobloque.
- Baño de agua en ebullición.

Técnica

Cuantificamos y verificamos el estado del RNA problema. Mezclamos para un volumen total de 10 μL : 2 μL de tampón 10x, 10 μg de RNA total, 10^5 cpm del cebador y agua tratada con DEPC. Aplicamos un pulso en la centrífuga e incubamos la mezcla a 95 °C durante 5 minutos, tras lo cual enfriamos de forma rápida hasta 65 °C, temperatura que la mantuvimos durante 10 minutos, para posteriormente enfriar lentamente hasta los 42 °C, proceso que duró 2-3 horas.

Reacción de extensión del cebador.

Materiales

- Tampón 5x para la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen).
- dNTPs (100mM) (Invitrogen).
- DTT (100mM) (Invitrogen).
- Inhibidor de nucleasas de RNA (40 U/ μL) (Invitrogen).
- Transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen).

Técnica

Una vez la mezcla de la reacción de hibridación había alcanzado los 42 °C le añadimos la mezcla, previamente preparada y calentada, de 10 μL de tampón 5x, 0,5 μL de la mezcla de dNTP (10 mM de cada uno –dATP, dCTP, dGTP, dTTP-), 0,5 μL de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 μL de la transcriptasa inversa SuperScript II y 26 μL de agua tratada con DEPC. Mezclamos por pipeteo y aplicamos un pulso en la microfuga. Finalmente incubamos la muestra a 42 °C

durante 1 a 2 horas, tiempo durante el cual se dio la reacción de transcripción inversa.

Detuvimos la reacción añadiendo 5 μ L de acetato sódico 3 M, pH 4.8 y 150 μ L de etanol absoluto. Dejamos que el cDNA precipitara durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente centrifugamos 15 minutos a 13000 rpm. Eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado con 150 μ L de etanol al 70%. Centrifugamos nuevamente en las mismas condiciones. Dejamos secar la muestra al aire y resuspendimos en 5 μ L de tampón TE. Los productos de la transcripción inversa así resuspendidos se mezclaron con 10 μ L de tampón de carga desnaturizante, con 97,5% de formamida, 10 mM EDTA pH 7,5, azul de bromofenol 0,3% y xileno cianol 0,3%. Calentamos dos veces a 65 °C durante 10 minutos, mezclando en el vortex antes de cada calentamiento. Después calentamos a 90 °C durante tres minutos antes de cargar las muestras.

Electroforesis de las muestras.

Materiales

- Urea (Sigma-Aldrich).
- Solución de acrilamida/Bis (37,5:1) al 40% (BioRad).
- Tampón de electroforesis TBE 1x y TBE 10x (BioRad).
- Persulfato amónico (Sigma-Aldrich)
- TEMED(Sigma-Aldrich)
- Películas Kodak (Sigma-Aldrich).
- Líquidos de revelado: Revelador ultrafin y fijador Superfix, de Tetenal, de Alemania.
- Casete: Hyperscreen (Amersham, GE Healthcare).

Técnica

En un vaso de precipitados mezclamos 25,2 g de urea, 6 mL de TBE 10x (1 M Tris-base, 16 mM EDTA pH 8, 800 mM ácido bórico), 9,76 mL de solución de acrilamida/bis (37,5:1) al 40% y agua hasta un volumen de 60 mL. Una vez mezclados los distintos componentes le añadimos los agentes polimerizantes: 250 μ L de persulfato amónico al 10% y 75 μ L de TEMED. Vertimos el contenido del vaso de precipitados entre los cristales y dejamos polimerizar durante una hora

aproximadamente. Para la electroforesis se empleó un sistema Poker Face II SE 1600 (Hoefer Scientific Instrument).

Cargamos el volumen total de las muestras en el gel, que había sido precalentado durante 30 minutos a 1500 V. La electroforesis se realizó a 2000 V hasta que el frente alcanzó la parte baja del gel (2-3 horas).

Una vez finalizada la electroforesis transferimos el gel a papel Whatman y secamos calentando a 65 °C durante 2 horas en un sistema de vacío Centrivac (Heraeus Instruments, Control Técnica, España). Recortamos el papel Whatman con el gel y le expusimos una película fotográfica en un casete durante un tiempo que varió dependiendo de la emisión de radiactividad detectada con un contador Geiger-Müller Series 900 Mint Monitor (Morgan, España). Al día siguiente revelamos la película y determinamos los tamaños de los productos extendidos en la reacción.

2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite la amplificación *in vitro* de un DNA utilizando cebadores específicos de la secuencia. Dependiendo de la enzima usada y de la secuencia a amplificar se aplican diferentes protocolos que tienen en común la existencia de un número dado de ciclos que constan de los pasos:

- desnaturalización: consiste en la separación de la doble hebra de DNA en dos hebras complementarias por calentamiento.
- hibridación: paso en el que los cebadores se unen al DNA desnaturalizado previamente en aquellas zonas en la que exista complementariedad, que estarán flanqueando la zona que se pretende amplificar.
- elongación: paso en el que la DNA polimerasa añade nucleótidos para producir la hebra complementaria a aquella donde se ha unido el cebador. Los productos de cada ciclo de amplificación serán desnaturalizados, empezando un nuevo ciclo de amplificación. Teóricamente, para un número n de ciclos, se obtendrán 2^n hebras del producto por cada secuencia inicial.

Materiales.

- Tubos eppendorf de 200 μ L para PCR.
- dNTPs 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP.
- Oligos *forward* y *reverse* (Sigma-Genosys).
- Tampón de la polimerasa 10X
- Cloruro de magnesio 25mM.
- DNA polimerasa (2,5 U/ μ L)

Técnica

Se mezcla en un tubo de 0,2 mL una cantidad de DNA que varía dependiendo del experimento a realizar (excepto en el tubo de control negativo, donde se añade agua bidestilada estéril), 5 μ L del tampón de la DNA polimerasa, 1 μ L de la mezcla de nucleótidos, 2 μ L de la solución de cloruro de magnesio, 1 μ L de una solución 10 mM de los correspondientes cebadores, 0,5 μ L de la DNA polimerasa y completamos hasta 50 μ L con agua bidestilada autoclavada.

A continuación se aplicó un pulso para mezclar bien los componentes de la muestra y se colocaron los tubos en el aplicándosele un protocolo de temperaturas que varió dependiendo del producto que esperamos obtener y de las características de los cebadores, aunque las condiciones estándar de amplificación pueden resumirse en un ciclo de desnaturalización inicial (94 °C, 5 minutos), seguido de un número variable de ciclos compuestos de desnaturalización (94 °C, 30-60 segundos), hibridación (50-60 °C, 30 segundos) y elongación (72 °C, 60 segundos/kilobase del producto amplificado), y que acaba con una elongación final (72 °C, 10 minutos).

Los productos obtenidos pueden ser usados inmediatamente o bien guardados a -20 °C hasta su utilización.

La temperatura de hibridación empleada fue la temperatura media de fusión (T_m) de los cebadores empleados menos 5 °C. El número de ciclos empleado dependió del uso posterior del producto amplificado: cuando se usó para su secuenciación se usó un número final de ciclos de 30-35 ciclos, mientras que si se pretendía la semicuantificación de la expresión del mRNA se usó un número similar de ciclos pero se sacaron alícuotas desde el ciclo 20 hasta el 30 para su análisis en geles de agarosa.

En los casos en los que se pretendía clonar el producto que se obtuviera de la reacción de PCR, como cuando se obtuvo el promotor de *CD200R*, los cebadores

tenían en los extremos sitios de restricción para que el producto fuera digerido y clonado en el vector de interés digerido con esas mismas enzimas. Dado que los sitios de restricción no hibridaban con el molde, se procedió en los primeros cinco ciclos a usar una T_m de la zona que hibridaba realmente, y posteriormente, una vez que se hubieran producido algunos productos con los sitios de corte, se aumentó la temperatura de hibridación a la T_m del cebador completo. Además la cantidad de nucleótidos se disminuyó a la mitad para disminuir la posibilidad de que la DNA polimerasa introdujera mutaciones.

2.2.7.1. Estudio de la expresión de genes por RT-PCR

Materiales

- Tubos eppendorf de 200 μ L para PCR.
- dNTPs 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP.
- Oligos *forward* y *reverse* (Sigma-Genosys)
- Tampón de la polimerasa 10X.
- Cloruro de magnesio 25mM.
- DNA polimerasa (2,5 U/ μ L)
- Termociclador 9600 ó 9700 de Applied Biosystem.
- Scion Image Beta 4.02 para Windows (Scion Corporation, EEUU).

Técnica

El estudio de la expresión de genes a nivel de mRNA incluye el aislamiento del RNA total, la reacción de transcripción inversa del mRNA a cDNA y la amplificación del DNA diana por PCR.

Para determinar la expresión de CD200R a nivel de mensajero se emplearon los siguientes cebadores:

LRGQP-F	5'-ATCCTGAGAGGCCAGCCTTC-3'
SNGTV-R	5'-CAGTCACTGTGCCCATGCTC-3'
CEXON3-F	5'-CACTTTCCAGGGGAAAATAG-3'
PEXON5-R	5'-CGGGATCCTCACAAATCTGGTGATGTGAAA-3'
PEXON3-F	5'-GGAATTCCATATGTGTATGGATGAAAAACAGATTAC-3'
VTPDG-R	5'-GGAAATTCCCATCAGGTGTTAC-3'
cd200RF	5'-GACTGGCAACAAGAGTCTG-3'
CD200RrevA	5'-CCTGTGGTGACCAGAATGA-3'

Como control interno se empleó la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*) y la β -Actina utilizando los siguientes cebadores:

GAPDH-F	5'-CCCTTCATTGACCTCAACTAC-3'
GAPDH-R	5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGT-3'
β -ACTINA-F	5'-ATCGTGCGTGACATTAARGA-3'
β -ACTINA -R	5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'

Para realizar la comparación de la expresión de los mRNA en las diferentes muestras se utilizó el programa Scion Image Beta 4.02 para Windows, de Scion Corporation, EEUU, según las instrucciones del uso indicadas en la Ayuda del programa.

2.2.7.2. Estudio de la expresión de genes por PCR a tiempo real (Real Time PCR)

El estudio de la expresión de genes por PCR a tiempo real se realizó por dos métodos diferentes:

SONDAS TAQMAN

En el caso de la determinación de la expresión de CD200R en los individuos sanos y enfermos utilizamos oligos que están marcados específicamente con sondas Taqman para analizar las distintas isoformas; los reactivos procedían de la casa Applied Biosystem y en este caso los oligos fueron diseñados también por esta casa (Assays-by Design). Desconocemos su secuenciación.

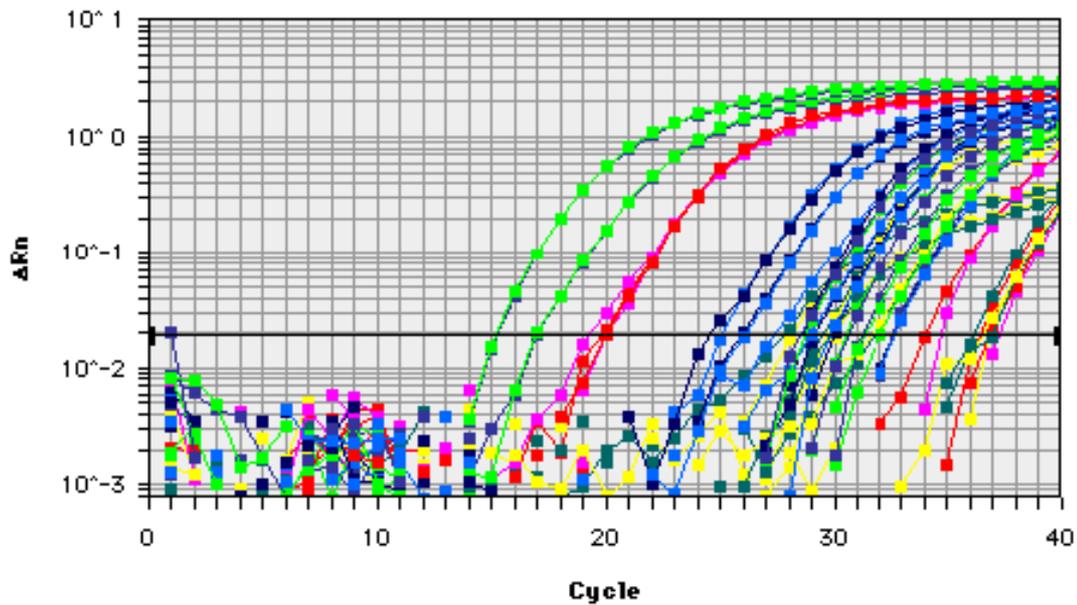


Figura 9. Imagen típica de una reacción de PCR tiempo real.

Materiales

- Tubos para PCR a tiempo real
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
- Mastermix: 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
- Oligos específicos marcados con sondas Taqman ®:
 - Hs00373422_m1 (permite detectar la isoforma larga)
 - Hs00793597_m1 (permite detectar la isoforma sin el exón 2)
- Control interno GUS
- Termociclador: ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System

Técnica

En este experimento se utilizó como control interno el gen GUS (codifica para la β -glucuronidasa) que es una glicoproteína relativamente abundante y que es expresada de forma constitutiva en muchos tejidos. Actúa como una exoglicosidasa en los lisosomas (Oshima *et al.*, 1988).

Se empleó dicho gen porque en un estudio preliminar con diferentes controles internos se determinó que era el gen más idóneo ya que ofrecía menos variación entre muestras.

SYBR® Green QPCR

En el caso de la determinación de la variación de la expresión de CD200R con el paso del tiempo de las células que permanecen en suspensión, utilizamos esta técnica pero marcando el DNA con un fluoróforo inespecífico como es el SYBR® Green. En este experimento usamos los oligos LRPQ-F y SNGT-V (detallados más atrás). En este caso el gen control empleado fue la β -Actina.

Materiales

- Tubos para PCR a tiempo real
- Mastermix: 2X Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix
- Termociclador : Mx3000P de Stratagene
- Oligos específicos: LRPQ-F y SNGT-V, β -Actina.

Técnica

El método seguido es el siguiente. Se hace una mezcla madre con todos los componentes para que al final salga un volumen final de 25 μ L. Los componentes se van añadiendo en el orden en que están escritos:

-12,5 μ l de 2X Brilliant II SYBR Green QPCR master mix.

-0,06 μ L de RT.

-x μ l de oligo forward (200–600 nM concentración final) (por ejemplo, 5 μ L/tubo de dilución 1/100 de la solución madre del oligo de β -actina-F)

-x μ l de oligo reverse (200–600 nM concentración final) (por ejemplo, 6,25 μ L/tubo de dilución 1/100 de la solución madre del oligo de β -actina-R).

Agitar suavemente para que se mezclen pero sin hacer burbujas.

-Añadir x μ l of experimental gDNA, cDNA, o DNA plasmídico a cada reacción.

-Añadir agua si es necesario para tener los 25 μ L de volumen final.

Agitar de nuevo, suavemente, para que se mezclen pero con cuidado de no hacer burbujas.

Poner en el termociclador con el siguiente programa:

CICLOS	DURACIÓN DEL CICLO	TEMPERATURA
1	30 minutos	50°C
1	10 minutos	95°C
40	30 segundos	95°C
	1,0 minuto	60°C
	1,0 minuto	72°C

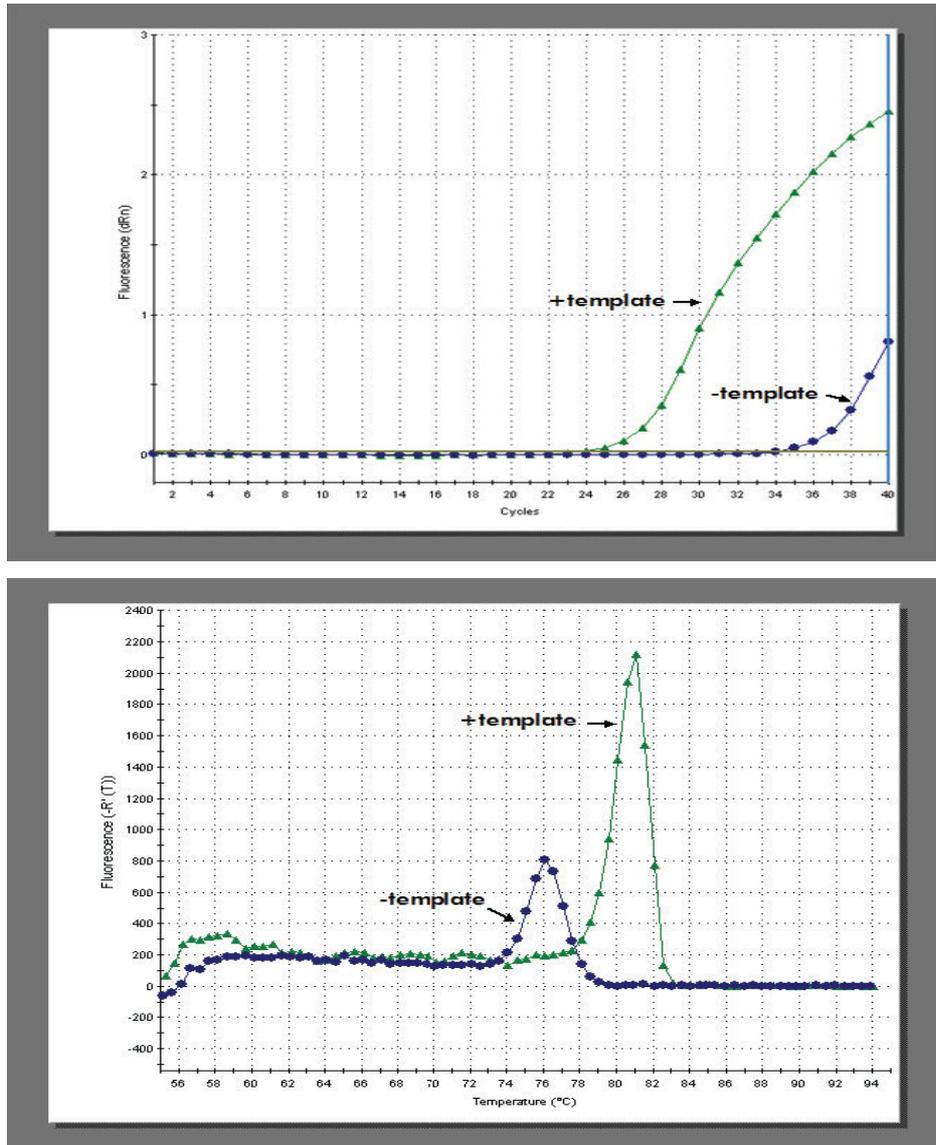


Figura 10.-. Curva de amplificación (arriba) y curva de disociación (abajo) de una reacción con molde de DNA y sin él. Cuando los productos amplificados son sometidos al análisis de la curva de disociación se distinguen fácilmente el pico correspondiente al ampli amplicon (que se centra en los 81°C) y el pico de fluorescencia correspondiente a los dímeros de oligos que se han formado (que se localizan a los 76°C)

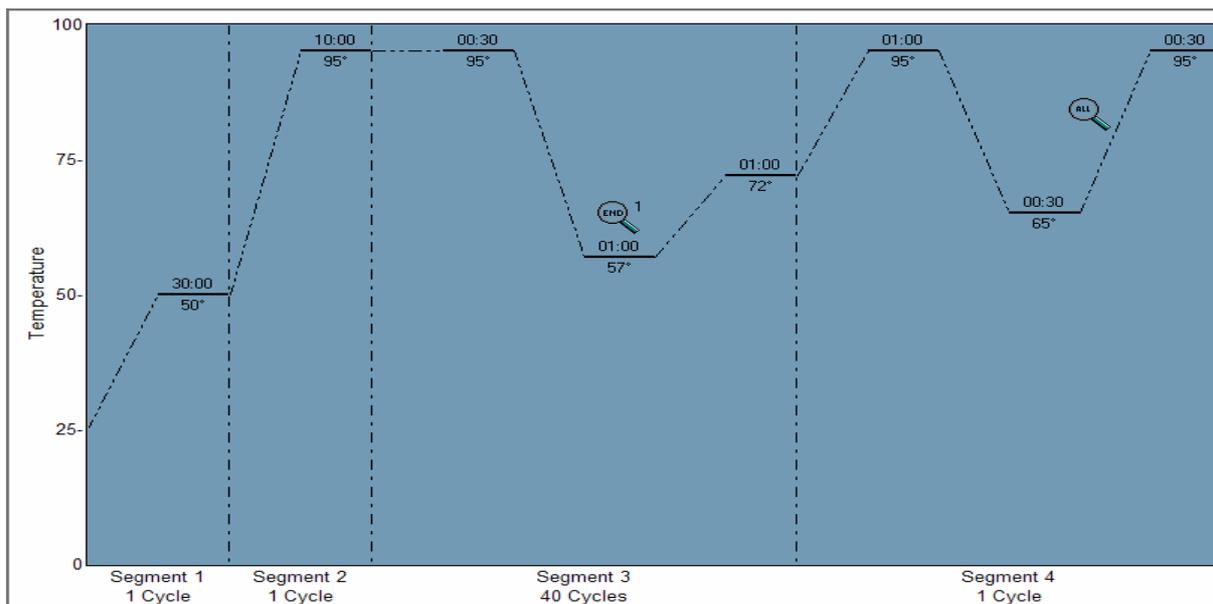


Figura 11. Esquema del programa de temperaturas seguido por el método del SYBR® Green.

En este caso hay que poner el programa para que se desarrolle la curva de disociación, que es la que nos confirmará que el experimento ha salido bien o mal.

Incubar las reacciones durante 1 minuto a 95°C, subiendo desde 55°C. Para ello, el instrumento irá aumentando la temperatura desde 55°C hasta 95°C a una velocidad de 0.2°C/sec y recogerá datos de fluorescencia continuamente durante toda la rampa de temperatura.

2.2.7.3. Preparación de DNA plasmídico

Materiales

- Medio LB.
- Soluciones de antibióticos
- CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System. (Invitrogen).
- GFX™ Microplasmid Prep Kit (Amersham, GE Healthcare).
- Glicerol (Sigma-Aldrich)

Técnica.

Las colonias positivas verificadas, según el protocolo de la Sección 2.2.2.1 (*Screening* de colonias), fueron crecidas para obtener la cantidad suficiente de

bacterias que nos diese la cantidad de plásmido necesaria para poder secuenciarlo. El crecimiento se dio durante unas 16 horas a 37 °C con agitación. Para ello las colonias seleccionadas fueron crecidas en LB líquido con los correspondientes antibióticos durante toda la noche. Una alícuota del cultivo fue mezclada con glicerol y congelada a – 80 °C para obtener el correspondiente *stock* de glicerol del que poder recuperar el clon cuando fuera necesario. El resto del cultivo fue usado para extraer el plásmido siguiendo los protocolos respectivos de los *kits* comerciales CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System o GFX™ Microplasmid Prep Kit. Básicamente, las bacterias fueron centrifugadas y posteriormente resuspendidas en una solución de resuspensión. A continuación se añadió la solución de lisis que rompiera las membranas bacterianas, y después se añadió una solución neutralizadora. Se eliminaron los restos bacterianos por centrifugación y el sobrenadante se filtró por una columna en la que quedó el DNA plasmídico. Éste fue lavado y posteriormente eluido.

2.2.7.4. Preparación de DNA genómico

Materiales.

- Tampón de lisis de eritrocitos: Tris-HCl pH 7,5 20 mM; MgCl₂ 5mM
- Tampón de lisis de leucocitos: NaCl 0,4 M; EDTA pH 8 2 mM; Tris-HCl pH 7,5 10 mM.

Técnica.

Para la obtención de DNA genómico de linfocitos humanos se usó el metodo de la extracción salina. Para ello, se obtuvo sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante, que fue diluida con suero salino y posteriormente centrifugada. La fase inferior y la interfase fueron lavadas dos veces con tampón de lisis de eritrocitos, tras lo cual los leucocitos quedaron como un sedimento en el fondo del tubo. Estos leucocitos fueron lisados al añadir SDS y proteinasa K junto con tampón de lisis de leucocitos e incubar a 37°C toda la noche. A continuación, se añadió solución de cloruro sódico y se centrifugó la mezcla. El sobrenadante fue mezclado con cloroformo y centrifugado de nuevo. La fase superior, que contiene el DNA, es mezclada con etanol, lo que produce que aparezca una malla de DNA genómico que fue recogida y pasada a un tubo nuevo

donde se lavó con etanol del 70% para, posteriormente, ser resuspendido en agua bidestilada estéril.

2.2.7.5. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de los productos de DNA se realizó en geles de agarosa horizontales preparados en tampón TAE (40 mM Tris-base, ácido acético glacial 0,11% (v/v), 1 mM EDTA-Na₂, pH 8) de porcentajes variables dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA esperado.

Materiales

- Cubeta de electroforesis.
- Soporte de geles.
- Peines de ocho pocillos.
- Etanol al 70 %.
- Solución TAE 1X(40 mM Tris-base, ácido acético glacial 0,11% (v/v), 1 mM EDTA-Na₂, pH 8).
- Soluciones de agarosa en TAE a diferentes concentraciones.
- Tampón de carga: sacarosa 40 % p/v en agua destilada estéril con 0,5% de azul de bromofenol.
- Fuente de electroforesis.

Técnica

Se limpió el soporte y la cubeta con etanol al 70 % primero y después con agua bidestilada estéril. El soporte se selló con dos trozos de cinta de autoclave y se colocó el peine. Posteriormente vertimos la solución de agarosa, que había sido fundida previamente, evitando que se formen burbujas. Esperamos que polimerizara el gel durante 30-45 minutos.

Una vez se produjo la polimerización, se retiraron los dos trozos de cinta de autoclave y el peine y se colocó el soporte con el gel en la cubeta, cubriéndolo con TAE 1X.

Después cargamos las muestras, que habían sido previamente mezcladas con el tampón de carga, en los diferentes pocillos, evitando hacer burbujas con aire que pudieran expulsar parte de la muestra del pocillo.

Tras haber cargado las muestras se cerró la cubeta y se conectaron los electrodos. Se dejó correr el gel durante aproximadamente una hora a 60-80V. El DNA, cargado negativamente, migró hacia el ánodo. Los fragmentos migraron a distancias inversamente proporcionales al logaritmo del número de pares de bases de los mismos. Una vez realizada la electroforesis se desconectaron los electrodos, se abrió la cubeta y se introdujo el gel en una solución de bromuro de etidio durante diez minutos, lavándolo después con agua bidestilada durante cinco minutos. Posteriormente se procedió a visualizar el gel en un transiluminador que emite luz UV ($\lambda=254$ nm) para poder ver las bandas de DNA en las que se ha intercalado el bromuro de etidio.

Para poder determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos se usaron marcadores de pesos molecular comerciales del fago λ digeridos con HindIII (Invitrogen), PstI (Sigma-Aldrich) o con diferentes enzimas para dar fragmentos múltiples de 100 ó 1000 pb (Biotools).

2.2.7.6. Purificación de DNA de geles de agarosa

En el gel se puede ver si se obtienen fragmentos de los tamaños esperados por comparación con un marcador de tamaños de DNA.

Cuando se obtienen fragmentos de los tamaños esperados se puede proceder a su purificación del gel de agarosa donde se encuentra.

Materiales

- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).
- Isopropanol.
- Agua bidestilada estéril.

Técnica

Se siguió el protocolo indicado en el *kit* QIAquick Gel extraction Kit. Una vez seleccionada la banda de tamaño esperado se procedió a la extracción de la misma del gel de agarosa usando una cuchilla estéril y se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5 mL que había sido previamente pesado. Pesamos el tubo con la banda de DNA y por diferencia obtuvimos cuánto pesaba el fragmento de gel que habíamos cortado.

A continuación se añadieron tres volúmenes del tampón de solubilización QG e incubamos a 50 °C durante diez minutos. Posteriormente añadimos un

volumen de isopropanol, mezclamos y cargamos la muestra en una columna con una matriz de gel de sílice provista por el *kit*. Centrifugamos a 13000 rpm durante un minuto lo que permitió que el DNA se uniera a la columna. Después lavamos con el tampón PE y centrifugamos nuevamente para eliminar los restos de etanol que pudieran quedar. Finalmente se eluyó con 30 ó 50 μL de agua estéril autoclavada.

2.2.7.7. Empleo de enzimas de restricción

Materiales

- Tampón 10X de la enzima.
- Enzima de restricción.
- Agua bidestilada estéril.
- DNA de interés

Técnica

Se emplearon enzimas de restricción de tipo II para digerir DNA de doble banda para propósitos analíticos (para identificar si el producto tenía un patrón de digestión esperado) o preparativos (fundamentalmente para su posterior clonación). Las enzimas o endonucleasas de restricción son proteínas que reconocen secuencias particulares del DNA, a las que se unen y cortan en sitios específicos denominados sitios de restricción, hidrolizando un enlace fosfodiéster en cada banda.

En general, se digirieron 1-10 μg de DNA con 10-20 unidades de enzima en un volumen total de 20 μL con el tampón apropiado (suministrado por la casa comercial). Esta reacción se realizó durante 1-2 horas a 37 °C. La reacción fue terminada mediante choque térmico o extrayendo el DNA usando fenol:cloroformo. La digestión completa fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa.

2.2.7.8. Clonación de fragmentos de DNA

La clonación de los productos de PCR consta de la ligación de dichos fragmentos tras ser purificados en un plásmido y de la posterior transformación

de bacterias competentes con dicha ligación (2.2.2.1). Puede ser necesario defosforilar el vector para evitar la posibilidad de la religación del vector y disminuir el número de falsos positivos (colonias que crecen porque tienen el plásmido pero éste no ha incorporado el fragmento de interés), sobre todo cuando se pretende obtener transformantes con un vector sin el sistema de selección blanco/azul.

Defosforilación de los plásmidos linearizados con *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP) o con *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP)

Materiales

- Tampón de la CIP (o Tampón de la SAP) (GE Healthcare Biosciences)
- *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP) o *Shrimp Alkaline Phosphatase* (USB Corporation, GE Healthcare Biosciences)
- DNA plasmídico de interés.

Técnica

Para evitar la ligación de los extremos de los plásmidos digeridos en las estrategias de clonación, el DNA plasmídico linearizado fue tratado con la enzima CIP o SAP. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los residuos 5'-fosfato, dejando libres los hidroxilos en posición 5'. Dado que la T4 DNA Ligasa requiere residuos 5'-fosfato para formar nuevos enlaces fosfodiéster, la ligación sólo será posible entre los extremos de los vectores y los insertos, pero no entre los propios extremos de los vectores.

La defosforilación se llevó a cabo tras la linearización del plásmido por tratamiento con la/s correspondiente/s enzima/s de restricción. Para ello se dializó la reacción de digestión, se añadió el tampón de la CIP o SAP y la propia enzima, y se incubó la muestra a 37 °C durante 30 minutos, tras los cuales se añadió una segunda alícuota de la enzima, incubándose otros 30 minutos. Finalmente, la enzima fue inactivada por calentamiento (68 °C/ 5 minutos) y el DNA recuperado por extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol.

Ligación

Materiales.

- Vector (50-200 ng/ μ L).
- T4 DNA ligasa.

- Tampón 10x de la T4 DNA ligasa.
- Fragmento a clonar.

Técnica

Se empleó la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre un residuo 5'-fosfato de un fragmento de DNA y un 3'-hidroxilo de otro fragmento de DNA. Para ello, en un tubo eppendorf de 1,5 mL mezclamos los siguientes componentes de la reacción: 1 μ L del tampón 10X, 1 μ L de plásmido (50-200 ng), 150 ng del fragmento de DNA a clonar, 1 μ L de T4 DNA ligasa y agua bidestilada estéril autoclavada hasta completar un volumen de 10 μ L. Se mezcló bien y se incubó durante toda la noche en un baño a 16 °C. Durante este tiempo la enzima catalizó la formación de nuevos enlaces fosfodiéster entre los fragmentos de DNA.

2.2.8. Análisis de proteínas

2.2.8.1. Extracción de proteínas

Materiales

- PBS
- Tampón de extracción de proteínas: RIPA (0,1% de deoxicolato sódico, 0,1% de laurilsulfato sódico, 1% de Tritón X-100 y 1mM de fenilmetilsulfonilfluoruro en PBS).

2.2.8.2. Medición de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método del ácido bicinonínico (BCA), reactivo que detecta el catión cuproso (Cu^+) que se forma por la reducción mediada por proteínas del catión cúprico (Cu^{2+}) en medio alcalino. El complejo formado por dos moléculas de BCA con un catión cuproso presenta un máximo de absorción en el espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 562 nm, permitiendo de este modo la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.

Materiales

- Solución estándar de albúmina bovina sérica (BSA) en agua destilada (1 mg/mL).
- Kit de ensayo BCA (Sigma Aldrich).

Técnica.

Se empleó una solución madre de albúmina bovina sérica (BSA) en agua bidestilada para preparar los estándares de proteínas. A cada conjunto de estándares y muestras se le añadió 150 μ L de solución de trabajo del kit de BCA preparada extemporáneamente. Las soluciones de proteínas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se midió la absorbancia a 562 nm.

Según los valores de absorbancia de los estándares, se construyó una curva de calibración que fue empleada para determinar las concentraciones de las muestras problema. La determinación de concentración tanto de los estándares como de las muestras problema fue realizada por duplicado.

2.2.8.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

El empleo del detergente dodecil sulfato sódico (SDS) permite que la separación de las proteínas en el gel de poliácridamida se dé de acuerdo con el peso molecular de las proteínas. El SDS se une a los polipéptidos confiriéndoles una carga negativa directamente proporcional a su tamaño molecular.

Materiales

- Sistema de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad)
- Poliácridamida en solución: 30% acrylamide/ bys solution (29:1) (Bio-Rad)
- Solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%
- Persulfato amónico (Sigma- Aldrich)
- Marcadores de peso molecular: *Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range* y *Kaleidoscope Prestained Standard* (Bio-Rad)
- Tampón de carga 2X: 100mM Tris-HCl pH 6,8; 5% de SDS; 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glycerol y 10% de β -mercaptoetanol

- Solución de tinción: Comassie Brilliant Blue G-2500 2%; metanol 40% y ácido acético 15% en agua destilada
- Solución colorante: metanol 40% y ácido acético 15% en agua destilada

Técnica

La electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida se realizó en el sistema Mini-Protean II (Bio Rad) según las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo de tampones que primero concentra las proteínas en un gel concentrador (*stacking gel*) antes de la migración en el gel donde se discriminan las proteínas por tamaños (*resolving gel*).

La preparación de las muestras de proteínas para su electroforesis fue realizada resuspendiendo 25-50 µg de proteínas en tampón de carga 2X. Las muestras así mezcladas fueron incubadas 5 minutos a 95 °C, tras lo cual las muestras fueron enfriadas rápidamente al pasarlas a hielo.

Los geles de SDS-poliacrilamida fueron preparados mezclando los siguientes componentes: agua destilada, tampón Tris-HCl, SDS 10% y solución de acrilamida/Bis (29:1) al 30%. A continuación se añadieron los agentes polimerizantes: persulfato amónico al 10% y TEMED.

Las proteínas separadas en la electroforesis fueron visualizadas empleando el colorante Comassie Brilliant Blue G-250. Para ello el gel con las proteínas fue sumergido en una solución de tinción a temperatura ambiente durante varias horas. A continuación el gel fue desteñido sumergiéndolo en solución decolorante (de la misma composición que la de tinción pero sin el colorante), tras lo cual el gel fue secado en papel de celofán para su conservación.

2.2.8.4. Western Blot

Materiales.

- Anticuerpos primario y secundario.
- PBS-leche (PBS añadiendo 5% de leche en polvo)
- TBS (8 grs de ClNa y 2,42 grs de Tris-Base. Diluir en 1 litro de agua y llevar el pH a 7,6)
- TBS-T (a partir de TBS, añadiéndole 0,1 % de Tween 20)
- TBS-T-leche (a partir del anterior, añadiendo 5% de leche en polvo)

- Membrana de nitrocelulosa: Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad)
- Tampón de transferencia: 39 mM glicina, 48 mM Tris-Base, 0,037% de SDS y 20% metanol en agua destilada.
- Sistema de transferencia (Bio-Rad)
- Kit de quimioluminiscencia: ECL Western Blotting Detection reagents (GE Healthcare Bio-sciences)
- Películas fotográficas Kodak: Kodak X-Omat AR Film XAR-5 (Sigma-Aldrich)
- Líquido revelador Ultrafin (Tetenal)
- Líquido fijador Superfix (Tetenal)

Técnica

Para realizar esta técnica se requiere primero la transferencia de las proteínas electroforéticamente separadas del gel de SDS-poliacrilamida a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa.

La membrana de nitrocelulosa fue colocada sobre el gel de poliacrilamida. Posteriormente ambas fueron colocadas entre papeles Whatman, esponjas y un soporte de plástico. Las proteínas fueron transferidas por electroforesis hacia el ánodo en tampón de transferencia frío (4 °C).

Los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados por PBS-leche durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana fue incubada con el anticuerpo primario, lavada con TBS-T tres veces, e incubada con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos empleados fueron diluidos en TBS-T-leche a las concentraciones indicadas por los proveedores.

Posteriormente, la solución quimioluminiscente fue preparada y añadida a la membrana, tras lo cual se colocó una membrana de plástico y la película fotográfica, que fue expuesta durante tiempos variables entre 30 segundos y 15 minutos. Finalmente, se procedió al revelado de la película.

Revelado de la película

- Se introduce la película en el líquido de revelado durante 3 a 5 minutos con agitación suave.
- Se pasa la película a un contenedor con agua donde se deja 30 segundos.

- Se introduce la película en el líquido fijador donde se mantiene también de 3 a 5 minutos.
- Finalmente se vuelve a lavar con agua la película durante 5 minutos.
- La película es secada en la estufa a 60 °C e identificamos la posición de las bandas del marcador comparando con la membrana.

2.2.9. Citometría de flujo

Esta técnica estudia la expresión de moléculas celulares por medio del paso de una suspensión celular marcada con anticuerpos monoclonales, conjugados con fluorocromos, a través de una cámara sobre la que incide un láser que excita los fluorocromos. Fue empleada para medir el nivel de apoptosis y la expresión de *CD200R* en las células.

Determinación del grado de apoptosis por anexina V/ yoduro de propidio (PI).

El ensayo para la medición del grado de apoptosis en las suspensiones celulares se basa en el empleo de anexina V, molécula que se une a la fosfatidilserina que es externalizada por las células en los primeros momentos de la apoptosis. Esta técnica presenta las ventajas de ser muy sensible y detectar la apoptosis en las células antes del evento de la degradación de DNA que es visible en electroforesis en geles de agarosa y usado en técnicas como TUNEL (Martin *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995). El yoduro de propidio es un agente intercalante que se une al DNA. Las células sanas o en el inicio de su apoptosis no dejan entrar el PI, mientras que aquellas más dañadas sí permiten su paso al interior celular y de este modo se puede unir al DNA, por lo que emitirán fluorescencia en la longitud de onda del PI.

Materiales

- Tampón de unión de anexina: HEPES 10mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4. Se prepara extemporáneamente.
- Solución de Anexina V- FITC (Molecular Probes)
- Solución de yoduro de propidio (Molecular Probes)
- PBS

Técnica

Las células fueron recogidas por tripsinización ligera, lavado y centrifugación (células adheridas al sustrato) o por centrifugación directamente (células en suspensión). El sedimento celular fue resuspendido en tampón de unión de anexina V y posteriormente incubadas en oscuridad con anexina V. Se procedió a la adición de un nuevo volumen de tampón de unión de anexina V y, a continuación, 10 μ L de yoduro de propidio, tras lo cual se midió en un citómetro de flujo.

Determinación de la expresión de CD200R.

Materiales

- PBS
- PBS con 1% de albúmina bovina sérica (BSA)
- Anticuerpo primarios y secundario

Técnica.

Las células fueron recuperadas del modo indicado previamente. El sedimento celular fue lavado con solución de PBS + BSA y pasado a tubos de citometría. A continuación se recuperaron las células por centrifugación y fueron resuspendidas en 100 μ L de PBS + BSA, donde se añadió el anticuerpo primario que reconoce a CD200R, e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente centrifugamos para eliminar el exceso de anticuerpo primario y resuspendimos las células en 50 μ L de PBS + BSA suplementado con anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína a la dilución indicada por el proveedor.

Se realizó la medición de las muestras, contándose, en general, 10000 células por tubo. La expresión de la proteína se observa por la presencia de una población de células altamente fluorescentes en el histograma.

2.2.10. Técnicas de microscopía

Microscopio de fluorescencia

Materiales

- Microscopio Olympus IK70
- Unidad de láser Olympus U-RFL-T

Técnica

Las muestras de células transfectadas con las construcciones del plásmido pDsRed-Express-1 fueron observadas al microscopio de fluorescencia en un microscopio invertido. Para observar la proteína roja fluorescente, las células fueron cultivadas en medio sin rojo fenol para que el colorante no interfiriese en la determinación de la fluorescencia.

Aislamiento de células de la mucosa de intestino de rata

Materiales

- PBS
- DTT 10 mM en PBS
- EDTA 1mM en PBS
- Malla de Nylon (Sefar Nytel PA-17XXX/80 micras (Sefar Maissa, S.A., España)
- Medio DMEM
- Vasos de recogida de muestras estériles.

Técnica

Para los experimentos en que se necesitaban enterocitos de intestino de rata se empleó la técnica desarrollada por (Grossmann *et al.*, 1998), con algunas modificaciones.

Los animales fueron sacrificados y se extrajo la porción correspondiente al intestino delgado. El intestino fue lavado dos veces haciendo pasar PBS por él con una jeringa. Posteriormente fue abierto longitudinalmente y cortado transversalmente en pequeñas tiras de 2 x 0,5 cm. Dichas tiras fueron sumergidas en solución de ditiotreitól 10 mM en PBS durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

Posteriormente, las tiras fueron recogidas y sumergidas en EDTA 1 mM en PBS durante 60 minutos con agitación suave a 4 °C. Las células epiteliales fueron separadas de la mucosa mediante 10 golpes fuertes y la solución resultante fue filtrada a través de una malla Sefar Nytel PA-17XXX/80 micras (Sefar Maissa, S.A., España) y recogidas en un vaso de recogida de muestras de orina estéril. El filtro fue lavado con DMEM y las células aisladas de este modo eran visualizadas al microscopio óptico y sembradas en placas de cultivo de células durante el tiempo de duración de los experimentos.

Como control del efecto de la pérdida de membrana basal se usaron tiras de intestino mantenidas a 4 °C en PBS y a las que se les hacía el mismo tratamiento de extracción de células epiteliales.

2.2.11. Análisis in silico

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media +- SEM (error estándar de la media). Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se establecieron usando el paquete estadístico BMDP, versión PC 90 (BMDP Statistical Software, UCLA, Los Ángeles, EEUU).

Análisis del promotor

Para determinar la posible región promotora del gen *CD200R1* humano se procedió al análisis de la región existente por delante del comienzo del mensajero tanto en humano como en rata por medio de los softwares GenomatixSuite (al que se puede acceder gratuitamente desde las instituciones públicas en <http://www.genomatix.de>) y de la técnica de *primer extensión*.

A continuación se analizaron primero las secuencias de *CD200R1* en ambos organismos (humano y rata) usando el software ClustalW v1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)(Thompson, Higgins, and Gibson, 1994) para hacer un análisis comparativo y determinar las zonas de homología.

A partir de los datos obtenidos del inicio de la transcripción de *CD200R1*, se pudo localizar la posible región promotora. Esta región se estudió con diferentes programas informáticos que comparan posibles regiones promotoras y determinar la fiabilidad de que esas regiones realmente tengan función

promotora. Se emplearon diversas fuentes procedentes de internet: Neural Network Promoter Prediction Versión 2.2 (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), los programas TSSW y TSSG que se dedican a buscar promotores humanos y su inicio de transcripción (www.softberry.com/berry.phtml), Proscan versión 1.7 (<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) y Promoter 2.0, que encuentran promotores de la polimerasa II (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>). También se consultó la suite Genomatix Suite.

Cuantificación de bandas en geles.

Para la cuantificación de las cantidades relativas de DNA, RNA o proteína en las diferentes técnicas descritas se utilizó el programa Scion Image Beta 4.02 para Windows, de Scion Corporation, EEUU, según las instrucciones indicadas en la Ayuda del programa.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Estudio de la expresión de CD200R en células intestinales y regulación de CD200R por efecto del matrigel.

Cuando las células de intestino de rata IEC-6 son cultivadas sobre Matrigel tienen la capacidad de diferenciarse (Carroll *et al.*, 1988). En trabajos previos de nuestro laboratorio, empleando una modificación de la técnica *differential display*, se observaron una serie de genes que modificaban su expresión como consecuencia de la diferenciación celular (Vieites *et al.*, 2005). Uno de estos genes fue identificado como *Cd200r* y se inició el estudio de los cambios que experimentaba dicho gen tanto en células en proliferación como en células diferenciadas sobre una matriz extracelular (Matrigel).

Aunque en la bibliografía se había sido descrito que este gen se expresaba en células de la línea mieloide (Wright *et al.*, 2000), el estudio de expresión de *Cd200r* se realizó sobre células IEC-6 ya que era en estas células donde se habían observado los cambios de su expresión. Las células fueron diferenciadas y cultivadas en presencia o ausencia de suero, para ver si este factor también era importante a la hora de expresar el gen en estudio. Se les extrajo el RNA y se hizo una RT radiactiva empleando como cebador un oligo dT₁₆. Posteriormente las PCR se hicieron a partir de 20000 cpm. Como control interno se utilizó la GAPD y con ella normalizamos los resultados. Este gen presenta *splicing* alternativo que da lugar a dos isoformas, una más extensa que contiene todos los exones y origina una proteína receptor de membrana y una isoforma más corta que finaliza en un punto intermedio (exón 5) y que da lugar a una proteína carente de la zona transmembrana y que ,por tanto, es de carácter soluble. Analizamos ambas isoformas.

3.1.1. Expresión en diferenciación

En la Figura 12 se observa que existe una disminución de la cantidad de mRNA correspondiente a *Cd200r*, en ambas isoformas, cuando las células están diferenciadas sobre Matrigel. La isoforma larga está disminuida en las células diferenciadas sobre Matrigel pero aún se aprecia en el gel mientras que

la isoforma corta ha desaparecido y no es detectada en estas circunstancias. Por otro lado, se observa que la ausencia de suero hace que disminuya más la isoforma larga respecto a la muestra con suero. En la isoforma corta esta variación no se aprecia ya que desaparece en ambos casos.

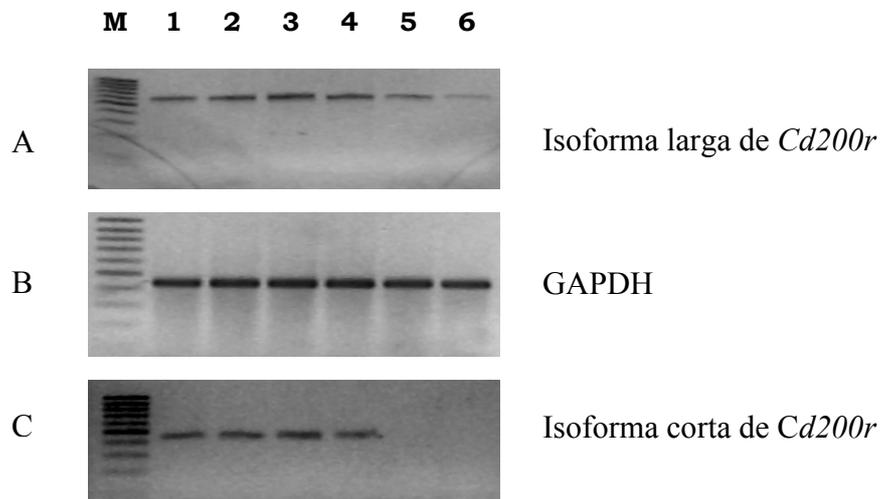


Figura 12 .- A) Expresión de Cd200r (isoforma larga) en los distintos puntos analizados. Estos puntos son: calle 1- control sin suero, calle 2- control con suero, calle 3- células crecidas sobre todos los componentes del Matrigel con suero, calle 4- células crecidas

Las bandas aparecidas en los geles fueron cuantificadas por el programa ScionImage y normalizadas con la GAPD, obteniéndose unos niveles relativos de expresión que se resumen en la Tabla 1:

	Cd200R larga	Cd200R corta
Control sin suero	0.69	1.15
Control con suero	1.00	1.00
Todos los componentes sin suero	1.09	1.15
Todos los componentes con suero	1.15	1.37
Matrigel sin suero	0.21	0.01
Matrigel con suero	0.45	0.10

Tabla 1. Densitometría (en valores relativos) de los geles de Cd200r respecto de la GAPDH. Se toma como control normal las células crecidas en presencia de suero y se hace un control sin suero para ver si esto puede afectar o no a la expresión de Cd200r.

Como se aprecia en los datos de la Tabla 1, aunque ambas isoformas de *Cd200r* disminuyen al diferenciarse las células en el Matrigel, la isoforma larga predomina sobre la corta en estas condiciones. Sin embargo cuando se ponen las células con todos los componentes del Matrigel pero sin constituir dicha matriz, la isoforma más expresada es la corta. En los controles observamos que la ausencia de suero tiene un efecto negativo sobre la isoforma larga, ya que el valor de esta isoforma disminuye en relación al control con suero. En la diferenciación en Matrigel, la presencia de suero es positiva para la expresión de ambas isoformas de *Cd200r*.

Estos resultados demuestran que *Cd200r* se expresa en células intestinales, como es la línea celular IEC-6, y que esta expresión se ve alterada por el estado de diferenciación celular.

3.1.2. Expresión de CD200R en función del desarrollo y del eje longitudinal

Dado que se había observado la expresión de este gen en la línea celular IEC-6 se decidió comprobar si *in vivo* también se presentaba. Se hizo un análisis del patrón de expresión de Cd200R en rata en función de la porción intestinal y del desarrollo del animal. Este estudio se realizó mediante *western blot*. Los resultados obtenidos (Figura 13) mostraron que todos los segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, ileon y colon) mostraban expresión de CD200R en ratas desde el nacimiento incrementándose hasta los 7 días de vida, aunque esta expresión era más acusada en ileon. En los extractos obtenidos de ratas a partir de 21 días la expresión de CD200R no es detectada, salvo en la porción de colon.

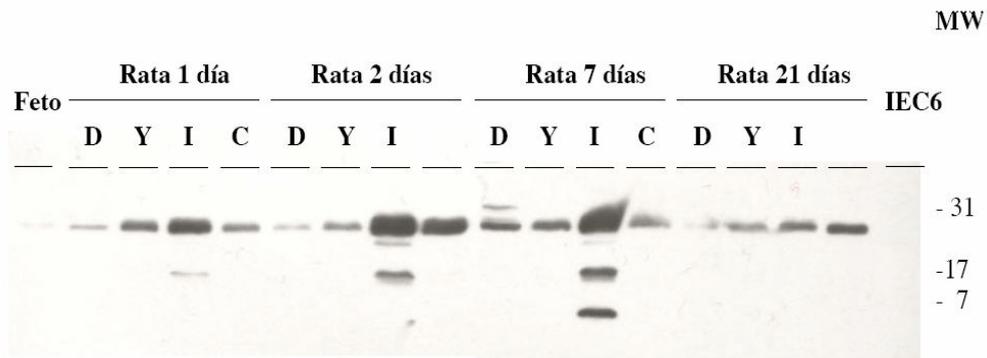


Figura 13.-En esta imagen de *western blot* se presenta la expresión de Cd200R en las distintas porciones del intestino de rata, en individuos con distintas edades (Feto, 1 día, 2 días, 7 días, 21 días) junto a la expresión en las células IEC-6.

Sin embargo, como se aprecia en la Figura 13 no se detectó la expresión de proteína Cd200R en las células IEC-6. Esto creemos que se debe a la baja proporción de proteína existente en estas células cuando están en proliferación.

Con el fin de analizar la localización celular de la proteína CD200R de rata se llevaron cabo técnicas de inmunohistoquímica con marcaje de oro coloidal, aunque experimentos previos habían demostrado que la expresión de Cd200R es muy reducida en muestras de rata fetal. Las marcas de oro coloidal aumentan en número y magnitud a medida que nos desplazamos desde la base de la microvellosidad hacia las capas más profundas en dirección a la lámina basal, en muestras de feto de rata con anticuerpo rCD200R. Esas marcas están distribuidas en el citoplasma y no asociadas a orgánulos definidos. El control negativo (muestras tratadas únicamente con el anticuerpo secundario) no mostró ninguna señal de oro coloidal residual.

Los resultados de microscopía en rata fetal concuerdan con los obtenidos en los *western blot* ya que los niveles de marcaje de oro coloidal en estas muestras son muy bajos.

También se trataron las muestras con anticuerpo anti-rCd200 para observar donde se localizaba el ligando de Cd200r. Las imágenes nos muestran que la marca de oro coloidal está próxima a las microvellosidades (Figura 14C).

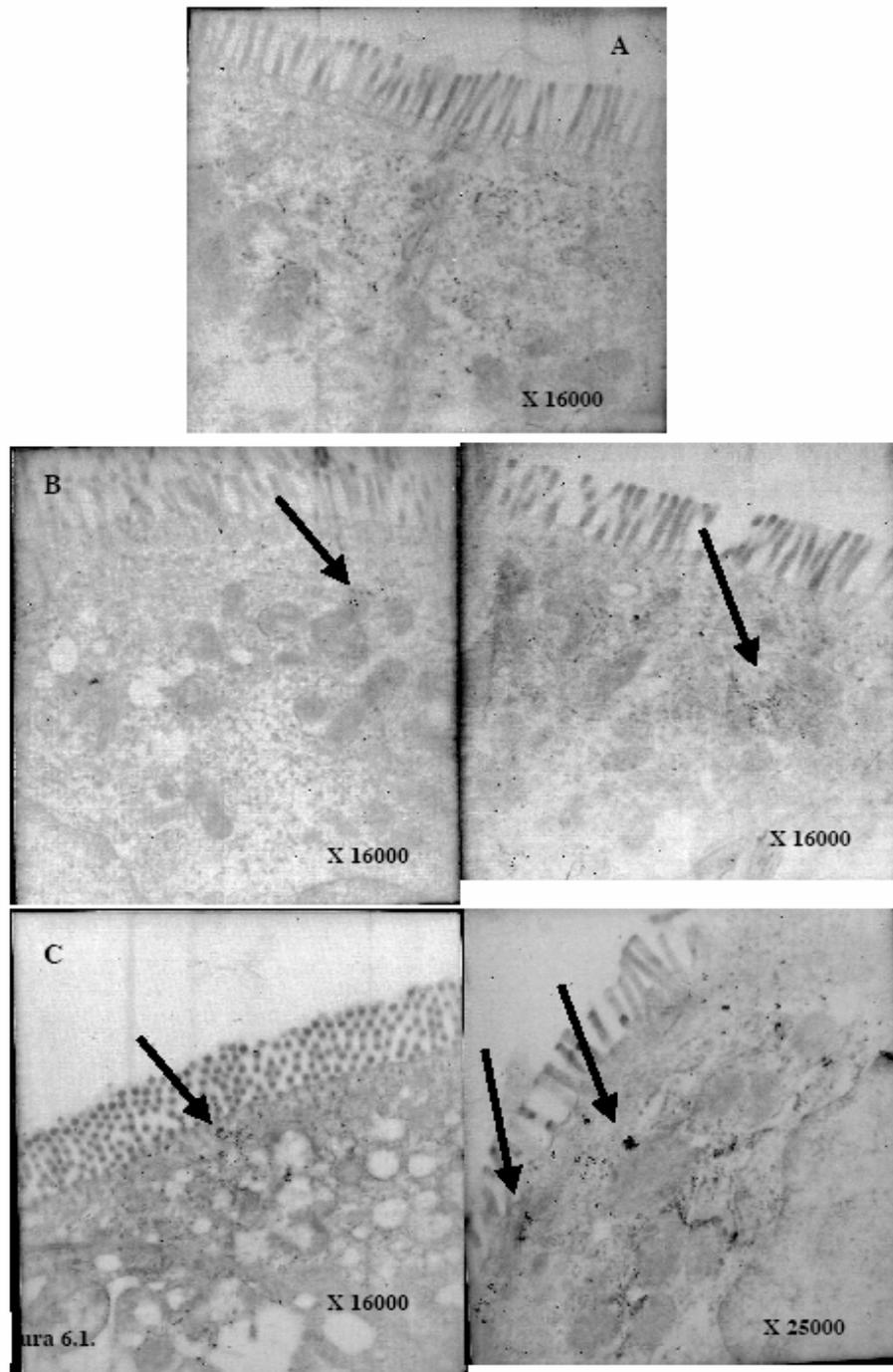


Figura 14.- La imagen A corresponde al control negativo, en el cual no se observa ningún marcaje. En la imagen B están señaladas las marcas de oro coloidal que se presentan en la zona del citoplasma. La imagen C indica una acumulación de oro coloidal en la zona próxima a las microvellosidades en muestras de intestino fetal en las que se utilizó rCd200 como anticuerpo primario.

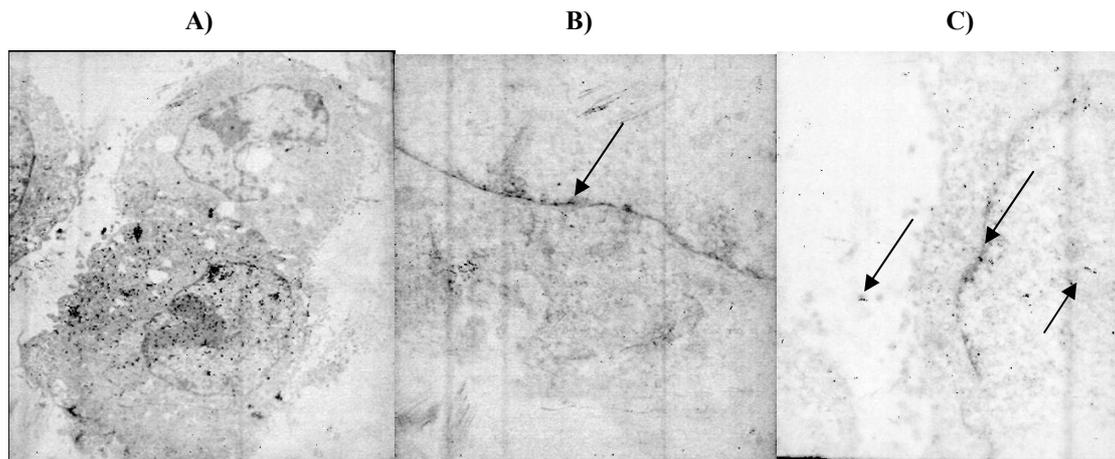


Figura 15.- La imagen A corresponde al control negativo (muestras tratadas solo con el anticuerpo secundario) y no muestra ninguna marca de oro coloidal. En la imagen B se observa acumulación de rCd200R en las proximidades de la membrana plasmática. En la imagen C se observan marcas similares cuando utilizamos anticuerpos frente a rCd200.

En cuanto a los experimentos realizados en IEC-6, en la Figura 15B se observa una acumulación de anticuerpo en la zona próxima a la membrana plasmática. El control negativo mostró señal difusa de oro coloidal residual. El análisis de rCd200 nos muestra imágenes similares a las obtenidas con rCd200r, esto es, (Brittan and Wright, 2004) marcas próximas a la membrana citoplasmática.

El análisis de estos experimentos nos ha permitido conocer el patrón de expresión de CD200R a lo largo del eje longitudinal intestinal y a lo largo del tiempo, desde el estado de feto hasta rata adulta. Los resultados de microscopía no nos ayudaron a identificar la localización de la proteína pues la cantidad de proteína detectada fue mínima y difusa.

3.2. Identificación del componente del matrigel responsable de la regulación de la expresión del gen *Cd200r1* en la diferenciación.

Para comprobar la hipótesis de que alguno de los componentes del Matrigel fuera el responsable de las variaciones en la expresión de *Cd200r* durante la diferenciación en dicha matriz y puesto que está compuesta de una serie de elementos estructurales y factores de crecimiento, se realizó un minucioso estudio para conocer qué componente del Matrigel era el responsable de los cambios que experimentaba nuestro gen. Se cultivaron las células IEC-6 con cada uno de los componentes del Matrigel por separado y en concentración similar a la empleada en el Matrigel y se procedió a determinar los niveles de mRNA del gen *Cd200r1* mediante PCR semicuantitativa.



Figura 16.- Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión del gen *Cd200r*

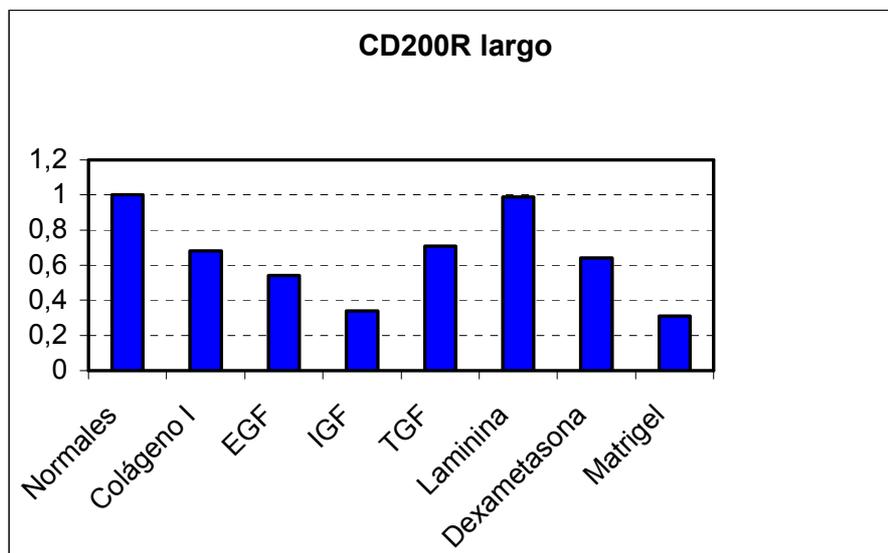


Figura 17.- En la gráfica se muestran los niveles de expresión de la forma larga de CD200R cuando las células son crecidas sobre una matriz formada por cada uno de los compuestos que aparecen reflejados en el eje X.

Ya que la isoforma larga era la más abundante en los experimentos preliminares, nos decantamos por analizar solo ésta última. En la Figura 17, al comparar la expresión de *Cd200r* en los controles y en las matrices compuestas por los elementos del Matrigel, observamos que aunque existe una disminución de la expresión con algunos de los componentes, no se llega a alcanzar la disminución que se consigue con el Matrigel integro. A la vista de los resultados, decidimos mezclar todos los componentes para hacer una matriz extracelular que llevara todos los elementos del Matrigel original. Posteriormente dejamos crecer las células sobre esta matriz y analizamos, del mismo modo, los niveles de RNA mensajero de *Cd200r* presentes en las células. En este caso tampoco fuimos capaces de detectar cambios significativos en los mRNA correspondientes a nuestro gen.

Este experimento nos demuestra que no es un solo componente del Matrigel el responsable de las modificaciones del gen sino una combinación de varios factores que por el momento desconocíamos.

3.3. Estudio de los niveles de expresión en respuesta a la confluencia celular.

Puesto que los niveles de expresión de *Cd200r* variaban con la diferenciación sobre Matrigel decidimos estudiar los cambios de expresión en respuesta a la confluencia celular y al tiempo de confluencia. Este hecho parece ser de gran importancia en la diferenciación de algunas líneas celulares de epitelio intestinal, siendo utilizado de hecho, como otro modelo de inducción de diferenciación. Para ello, crecimos las células IEC-6 manteniéndolas en confluencia del 100% durante varios períodos de tiempo.

Los resultados fueron los que presentamos a continuación. En todos los casos las células fueron crecidas con medio DMEM 10% FBS (que era cambiado cada 48 horas).

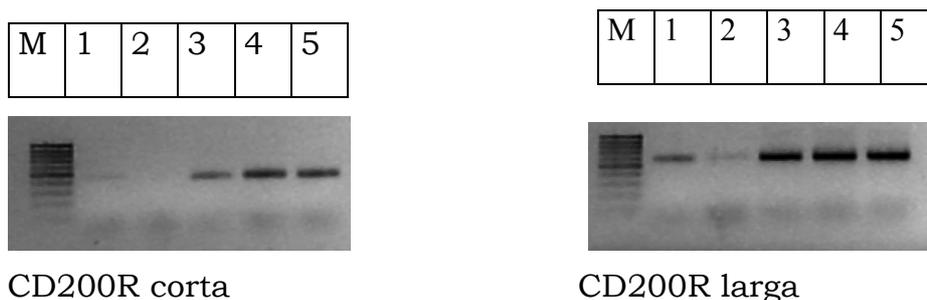


Figura 18.- Expresión de las isoformas corta y larga de Cd200r en las células en proliferación (calle 1), crecidas sobre Matrigel (calle 2), confluentes 3 días (calle 3), confluentes 1 día (calle 4) y confluentes 21 días (calle 5).

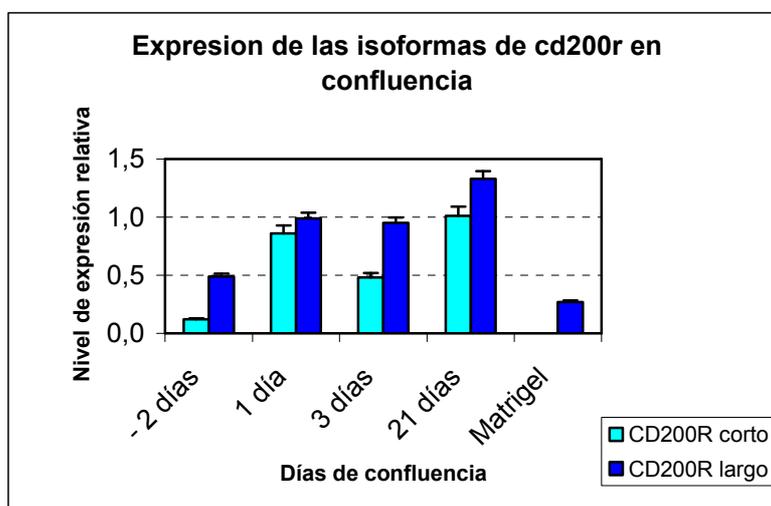


Figura 19.- Expresión de las distintas isoformas de *Cd200r* en proliferación, en confluencia durante distintos periodos de tiempo (1 día, 3 días, 21 días) y diferenciadas en Matrigel.

Los niveles de expresión de *Cd200r* encontrados en el Matrigel para ambas isoformas son muy bajos a diferencia de la expresión encontrada en las células que permanecieron en confluencia durante 3 y 21 días, aunque como se puede apreciar en la Figura 19 a los 3 días ya se alcanzan unos niveles considerables. De igual modo que en la diferenciación, la isoforma larga es la más abundante en respuesta a la confluencia aunque la isoforma corta se ha incrementado más respecto a la cantidad de partida en las células en proliferación.

En este experimento demostramos que con la confluencia, al contrario que la diferenciación en Matrigel, los niveles de expresión de *Cd200r*

aumentaban pero no identificamos la causa que provocaba que dichos niveles fueran modificados. Los resultados eran aparentemente contradictorios.

3.4. Estudio de la expresión de Cd200r en células intestinales en distintos modelos de apoptosis ex vivo.

Para completar el estudio se decidió estudiar la relación entre la apoptosis de células intestinales y la expresión del gen *Cd200r1* ya que el desarrollo fisiológico de un enterocito consiste en proliferación, diferenciación y apoptosis cuando llega a la cima de la vellosidad.

3.4.1. Modelo de apoptosis inducida por LPS.

Se realizó la inducción de apoptosis añadiendo al medio LPS a baja concentración (1,5 µg/mL) y manteniendo después las células en suspensión durante determinados periodos de tiempo. Los resultados que obtuvimos se muestran a continuación.

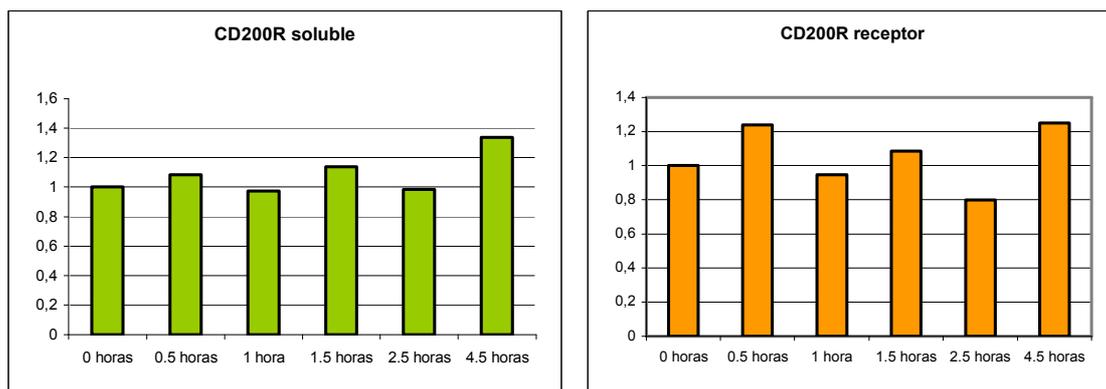


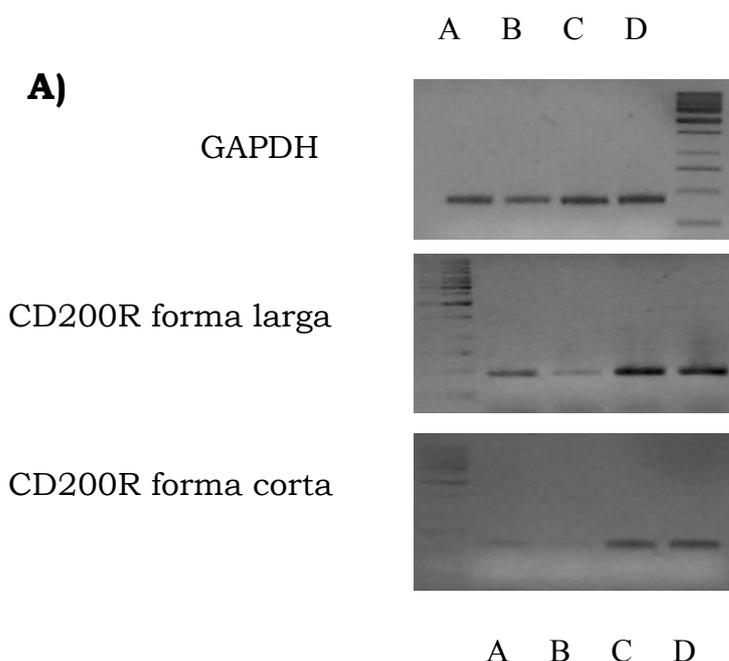
Figura 20.- Representación de la expresión de ambas isoformas en células IEC-6, cultivadas en presencia de LPS a una concentración de 1,5 µg/mL y mantenidas posteriormente en suspensión durante periodos de tiempo que van desde media hora hasta 4,5 horas.

Como se aprecia en los gráficos, la forma soluble, en tiempos cortos varía oscilando entorno al punto de inicio pero a las 4,5 horas se produce un incremento mayor; del mismo modo, la forma receptor de CD200R experimenta un incremento a la media hora y a las 4,5 horas de suspensión.

El LPS modificó los niveles de mRNA de *Cd200r* dándonos un patrón regular pero no concluyente porque las modificaciones eran muy pequeñas y balanceándose en torno al punto de origen.

3.4.2. Modelo de apoptosis inducida con H₂O₂.

La inducción de la apoptosis fue realizada, al principio, en células IEC-6 mediante la adición de agua oxigenada al medio de cultivo a distintas concentraciones durante 20 horas. Las concentraciones fueron 1 mM, 0,1 mM y 0,01mM. El empleo de estas concentraciones se debió a que, según el tipo celular, las células varían en su sensibilidad y quisimos abarcar un rango bastante amplio. Por ejemplo, las células MCF-7 necesitan una concentración de H₂O₂ de 250-1000 μ M para provocar la apoptosis (Kim, Cho, and Um, 2000) mientras que las células germinales testiculares sufren apoptosis con una concentración de 1 μ M de H₂O₂. La concentración fisiológica de H₂O₂ está entre 30 y 50 μ M (Maheshwari *et al.*, 2009). Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:



B)

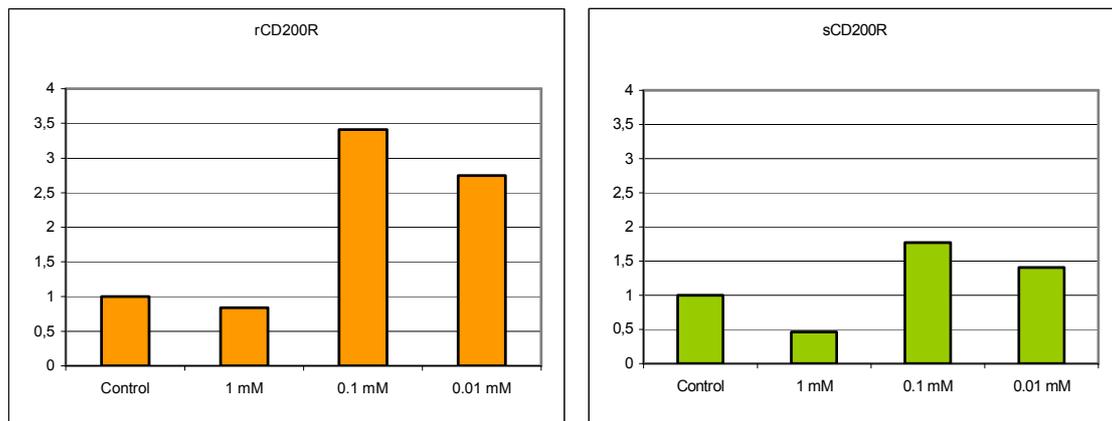


Figura 21.-A) Imagen de los geles obtenidos con las isoformas de CD200R y del control interno, la GAPDH. B) Gráficos correspondientes a las densitometrías normalizadas realizadas a los geles anteriores. Representan las expresiones de ambas isoformas de Cd200r, en las células IEC-6 cultivadas con distintas concentraciones de agua oxigenada agente desencadenante de la apoptosis. Las concentraciones empleadas fueron A) Control, B) 1mM, C) 0,1 mM y D) 0,01 mM.

En estas figuras se aprecia que a una concentración de 1 mM disminuye la cantidad de mRNA de ambas formas de CD200R; esto es porque a esta concentración ocurre una gran muerte celular que hace que la cantidad de mRNA total también esté disminuida. En el siguiente punto, 0,1mM, ambas isoformas aumentan porque el grado de apoptosis es elevado pero las células no están tan deterioradas y se puede cuantificar mejor. En el cuarto punto, 0,01mM, la concentración de agua oxigenada a hace que la muerte celular no sea tan elevada con lo cual los niveles de mRNA de CD200R disminuyen.

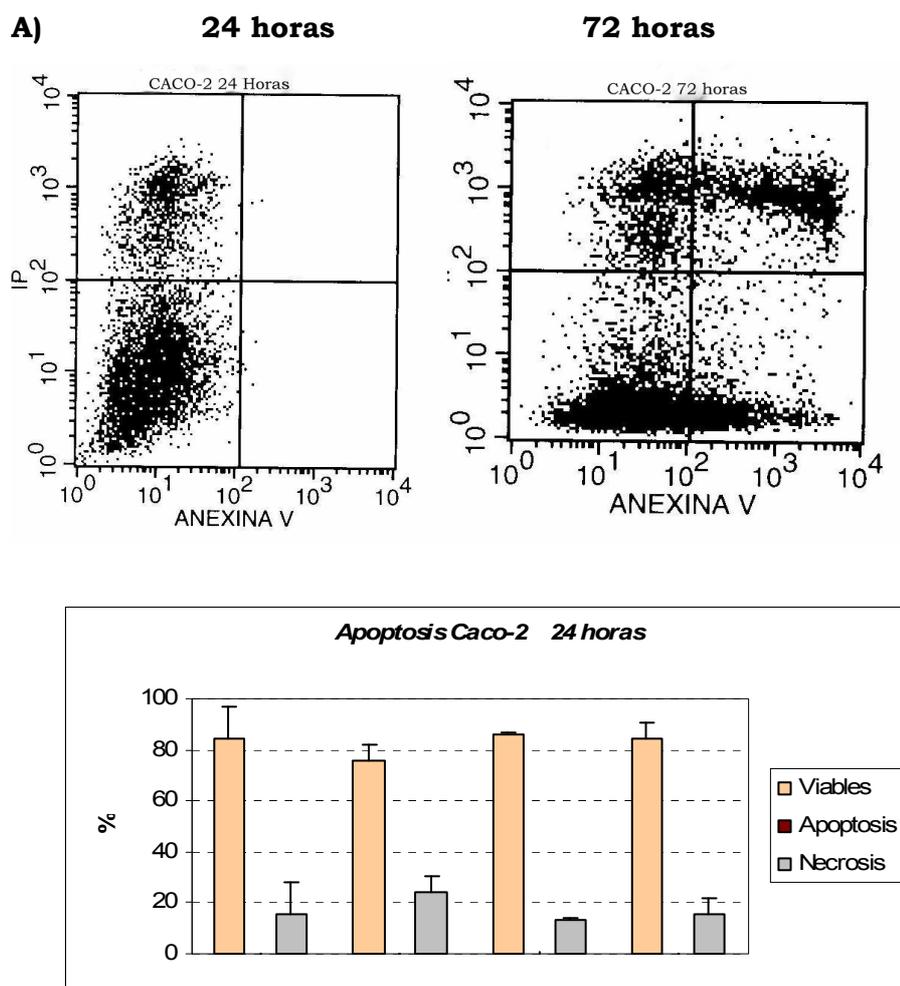
Los niveles de mRNA de *Cd200r* se vieron bastante alterados por la acción de este compuesto pero la gran cantidad de células muertas nos impidió detectar la verdadera causa del incremento de la expresión del gen.

3.4.3. Modelo de apoptosis inducida por butirato.

Se ha demostrado que el butirato inhibe el crecimiento celular *in vitro* favoreciendo la parada del ciclo celular, promueve la diferenciación en células normales y transformadas y es capaz de inducir apoptosis en algunos tipos de cáncer (Giuliano *et al.*, 1999). Es por ello que decidimos hacer un estudio para ver como se afectaban las células intestinales de la línea celular

Caco-2 por dos métodos: adición de butirato al 5% al medio de cultivo de las células y mantenimiento de las células en suspensión durante 20 horas. Dichas células presentan la característica de que experimentan la diferenciación espontáneamente y en un patrón reproducible que es similar a las células epiteliales maduras *in vivo*, tanto en fenotipo como en capacidad funcional (Levy *et al.*, 1994). También hay que tener en cuenta que en estudios anteriores se observó que el butirato además inhibe la adhesión de las células a la matriz y disminuye la expresión de las integrinas (Basson *et al.*, 1996).

Se cultivaron las células y se pusieron en presencia de butirato durante varios tiempos para ver que el efecto que causaba sobre la viabilidad celular. Se incluyó un punto adicional en el experimento en el cual le añadíamos un inhibidor de caspasas (Z-VAD-FMK), que son las moléculas efectoras de la apoptosis; con ello pretendíamos contrarrestar los efectos apoptóticos del butirato. Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:



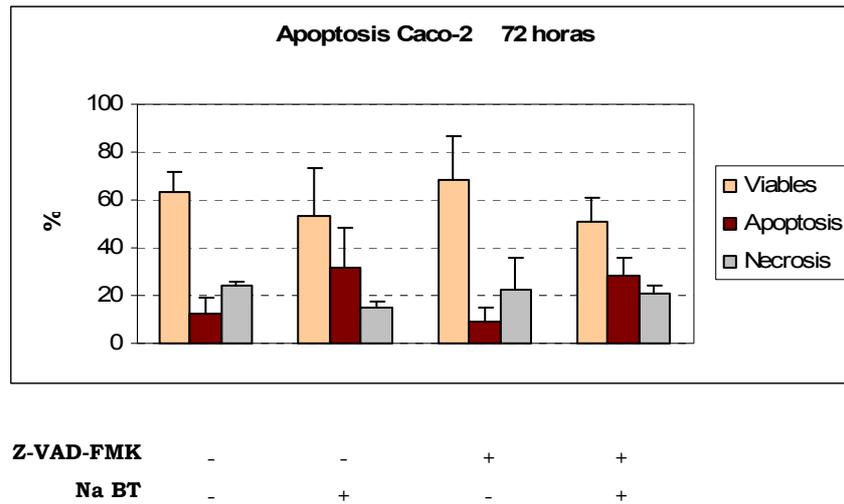
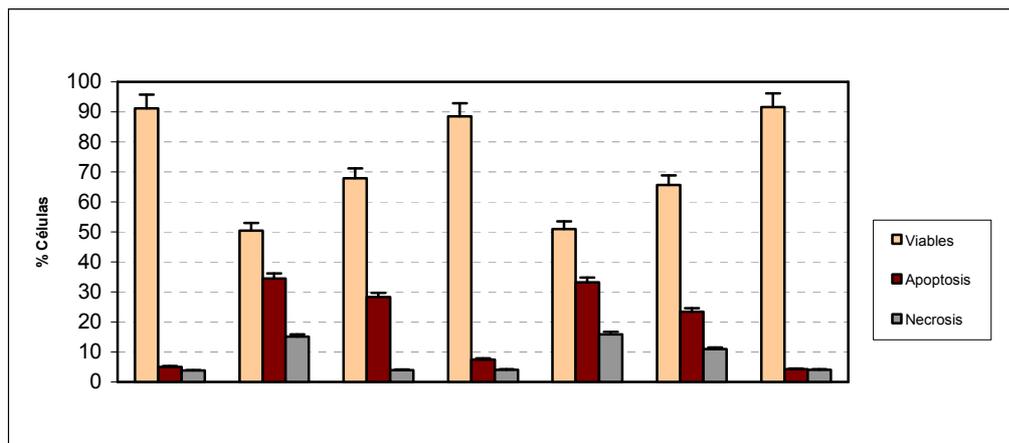


Figura 22.- A) Imágenes del citómetro de flujo en el las cuales se observa que la mayoría de las células están vivas (24 h) o empiezan a presentar fosfadilserina que es reconocida por la Anexina V (72 h). B) Porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas en las células Caco-2 tratadas durante 24 y 72 horas con butirato sódico 5mM. Los resultados representados son la media y desviaciones estándar de dos experimentos diferentes.

Podemos ver que el butirato a las 24 horas (Figura 22B) prácticamente no ha afectado a la viabilidad celular, aunque se aprecia un leve aumento de la necrosis. En todos los casos analizados, tanto con Z-VAD-FMK como sin él, el porcentaje de apoptosis es inapreciable.

Al aumentar el tiempo de exposición a la presencia del butirato (72 horas) la presencia del butirato hace que la apoptosis se vea incrementada pero, igualmente, en un porcentaje reducido. La existencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK a concentración 100 μ M no dio lugar a una disminución en la cantidad de células apoptóticas ni en células controles ni en células tratadas con butirato a diferencia de lo indicado por otros autores, que describieron que el Z-VAD-FMK era capaz de evitar la muerte celular inducida por butirato (Ruemmele *et al.*, 2003).

Al analizar la viabilidad de las células observamos que había mucha diferencia entre las células que estaban en suspensión y las que se quedaban pegadas (Figura 23).



Z-VAD-FMK	-	-	-	+	+	+	-
Na BT	-	+	+	-	+	+	-
DMSO	-	-	-	+	+	+	+
	Peg	Susp	Peg	Peg	Susp	Peg	Peg

Figura 23.- Viabilidad celular después del tratamiento con butirato. Hicimos distinción entre pegadas y no pegadas porque la proporción de ambas era importante. También incluimos en el ensayo el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK para inhibir la apoptosis que se originaba. El DMSO era el vehículo del Z-VAD-FMK con lo cual también se usó como control para ver si afectaba en algún aspecto.

Como se puede observar se da una disminución importante en la viabilidad celular cuando las células están en presencia de butirato y la apoptosis/necrosis es más importante cuando observamos las células que están en suspensión respecto a las que se han quedado pegadas a la placa. El Z-VAD-FMK no afecta a las células cuando están en proliferación (control) y tampoco se aprecia su efecto inhibidor de apoptosis cuando las células entran en apoptosis a causa del butirato. La influencia del vehículo del Z-VAD-FMK que es el DMSO no afecta ni a la viabilidad celular ni a la apoptosis.

Según nuestra experiencia, la muerte celular inducida por butirato ha presentado el inconveniente de no poder ser evitada por un inhibidor de caspasas. Además la adición de butirato no solo provoca la muerte celular sino también su diferenciación lo que podría influir en la expresión del gen estudiado.

3.4.4. Modelo de apoptosis inducida por descamación (ANOIKIS)

Debido a estos factores y puesto que las células epiteliales intestinales sufren anoikis (Joseph *et al.*, 2005; Krestow *et al.*, 1999), en la cual por pérdida de anclaje estas células entran en apoptosis, decidimos investigar si este método era más modulable que el empleo de butirato.

3.4.4.1. Anoikis inducida en células IEC-18

Empezamos estudiando como afectaba la suspensión a las células IEC-18 ya que al ser de naturaleza adherente, si se impide su adhesión al frasco mediante agitación suave, las células entran en un estado de apoptosis debido a la pérdida de adhesión celular. En este caso usamos las IEC-18 porque encontramos más bibliografía sobre este método de suspensión.

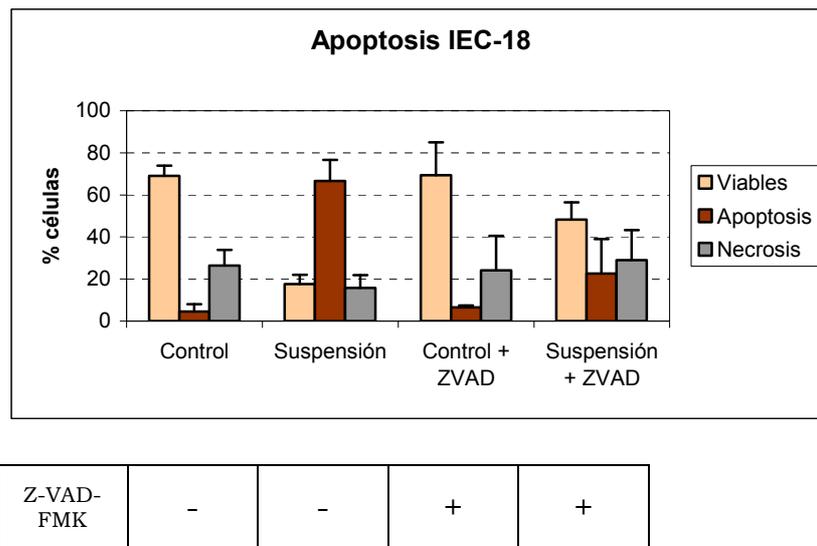


Figura 24.- Viabilidad celular de las células IEC-18 en los controles (pegadas a la placa) y en suspensión. Efecto del Z-VAD-FMK en ambos casos.

Como se puede apreciar la suspensión induce en gran medida la apoptosis en este tipo celular y cuando las células son puestas en presencia de Z-VAD.FMK, éste ejerce su efecto inhibitor de la apoptosis con lo cual nos decantamos por este sistema de inducción de apoptosis que nos permitía controlarlo con el Z-VAD-FMK.

Cuando analizamos la expresión de CD200R en las IEC-18 observamos que la expresión en condiciones normales, es decir células adheridas, es muy baja mientras que cuando las células están en suspensión aumenta en una gran proporción. Cuando repetíamos el experimento añadiendo Z-VAD-FMK a las células en suspensión para inhibir la apoptosis observamos que la expresión de CD200R disminuía en un 15% aproximadamente.

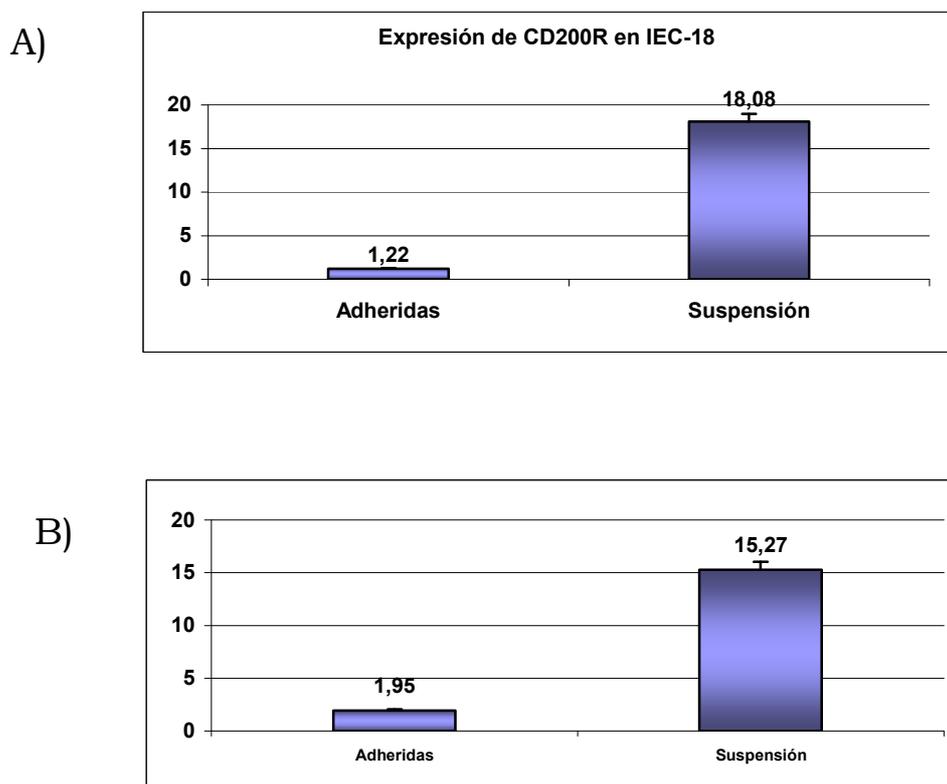


Figura 25.- Expresión de CD200R en células IEC-18 cuando están adheridas y cuando están en suspensión. A) células sin Z-VAD-FMK. B) Células con Z-VAD-FMK.

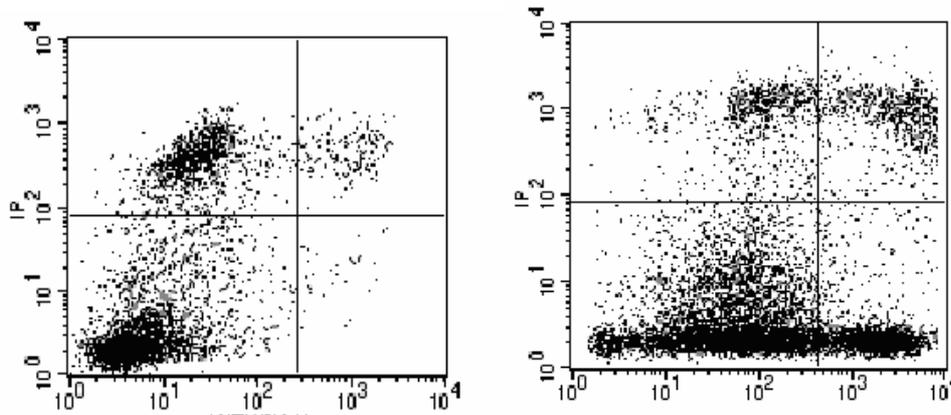
Este experimento nos confirma que la expresión de CD200R en condiciones normales, es decir células adheridas es muy baja pero cuando las células entran en apoptosis esta expresión aumenta significativamente.

3.4.4.2. Anoikis en células CACO-2

Además de los resultados obtenidos en IEC-18 decidimos estudiar si ocurriría lo mismo en las células intestinales humanas Caco-2 cuando eran sometidas a suspensión aunque éste es un método muy poco usado en estas células (Morozevich *et al.*, 2003)

Cuando las células Caco-2 fueron puestas en suspensión durante un periodo de tiempo de 20 horas y se analizó la viabilidad celular y la apoptosis mediante citometría de flujo y se obtuvieron los siguientes resultados:

A)



B)

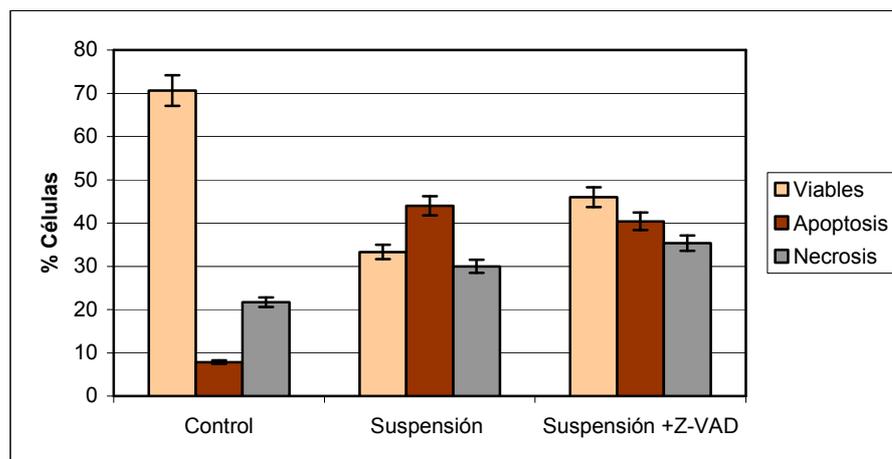


Figura 26.- A) Imagen obtenida al determinar la viabilidad celular por citometría de flujo por el método anexina-V/yoduro de propidio en células Caco-2 mantenidas adheridas (izquierda) y en células Caco-2 mantenidas en suspensión durante 20 horas (derecha). El eje Y muestra la tinción por yoduro de propidio, indicativa de necrosis, mientras que el eje X muestra la tinción por anexina- V, típica de la apoptosis. B) Efecto de la suspensión sobre la viabilidad celular de Caco-2 en los controles (células adheridas), células en suspensión y células en suspensión con Z-VAD-FMK.

Como se aprecia en la figura 15, cuando las células son sometidas a suspensión, el número de células apoptóticas aumenta en una proporción bastante alta (casi un 40%). Diferenciamos células apoptóticas y células necróticas por la presencia de fosfatidilserina y yoduro de propidio en las

células respectivamente. Igual que con las IEC-18, se hizo el mismo experimento pero esta vez se cultivaban las células en suspensión en presencia del inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK. Se aprecia un descenso en el grado de apoptosis y necrosis y un aumento en las células viables.

Una vez determinado el grado de apoptosis que provocamos con la suspensión estudiamos el grado de afectación que producía este fenómeno en los niveles de expresión de CD200r. Como se observa en el gráfico (Figura 25) hay un aumento importante (un 40%) desde los niveles basales expresados en células adherentes que actúan como control y los expresados por las células en suspensión. La adición del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK, al igual que la vez anterior, hizo que disminuyera un pequeño porcentaje la expresión de CD200r lo que es coincidente con la pequeña disminución de apoptosis que habíamos visto antes. Por todo esto, se observa que existe un grado de relación entre apoptosis y expresión de CD200r.

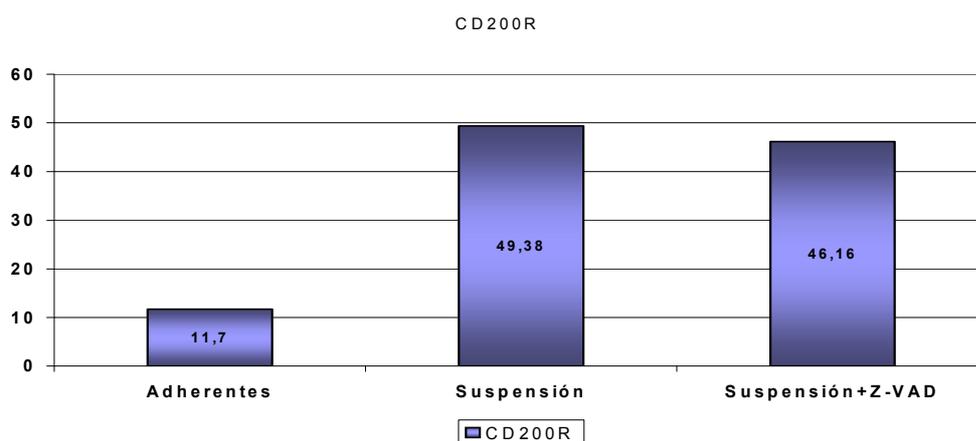


Figura 27.- Nivel de expresión de CD200R en células Caco-2 en los controles (adheridas), suspensión y suspensión con Z-VAD-FMK.

Mediante el empleo de la técnica de PCR a tiempo real realizamos el estudio de la variación en los niveles de RNA mensajero correspondientes al gen *cd200r* en células mantenidas en suspensión durante diferentes tiempos. En la figura 17 se muestran dichos niveles y como van variando con el tiempo de suspensión. El gen usado como control interno es GAPDH y el calibrador es considerado el tiempo 0 horas. Los oligos usados para determinar CD200R son LPQR-F (forward) y SNGTV-R (reverse).

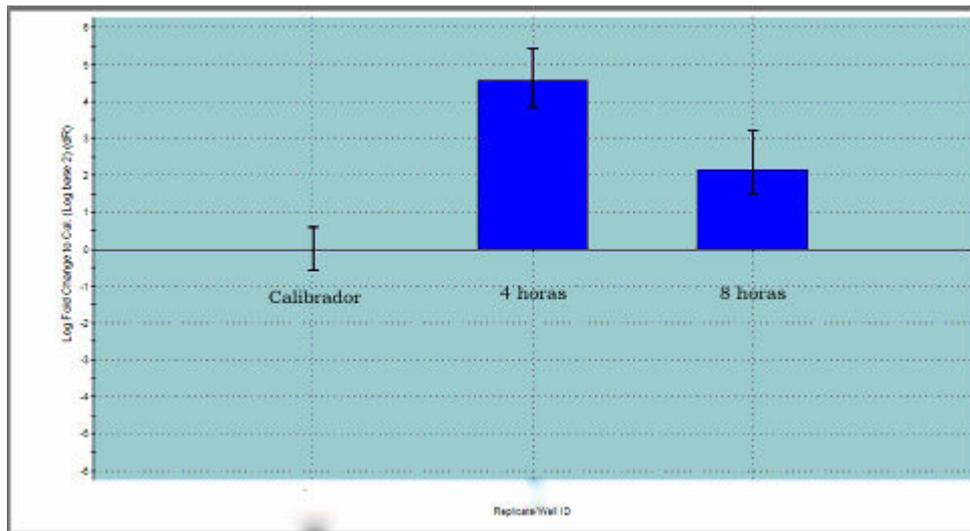


Figura 28.- En este gráfico se muestra la cuantificación relativa correspondiente a CD200R a diferentes tiempos de suspensión de las células. La primera barra corresponde al tiempo 0 horas es decir, la expresión basal que es considerada como el calibrador. La segunda barra corresponde al tiempo 4 horas y la tercera barra corresponde a las 8 horas de suspensión.

Se aprecia un incremento muy importante a las 4 horas de suspensión, ya que a tiempos cortos ocurre una disminución de los niveles de RNA mensajero. A las 8 horas disminuyen dichos niveles a la mitad debido, posiblemente, a la apoptosis de las células que hace que se activen las caspasas y degraden dicho mensajero.

Se repitió el experimento cambiando el control interno por la β -actina por si acaso la GAPDH se veía también afectada por la acción de las caspasas. Los oligos usados para determinar CD200R fueron los mismos que en el experimento anterior. En la figura 18 se observa que el comportamiento es similar para ambos genes controles, lo que indica que ese es el comportamiento del gen en estudio y se corresponde con los resultados encontrados en citometría de flujo.

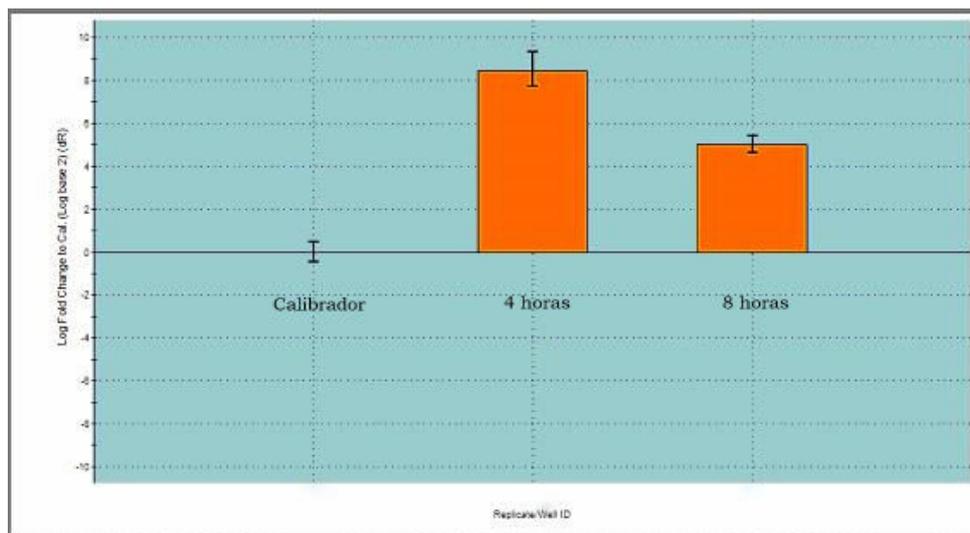


Figura 29.- En este gráfico se expresa la cuantificación relativa de CD200R respecto al control interno, que en este caso es la β -actina. El primer dato corresponde al calibrador, el segundo al tiempo 4 horas y el tercero a las 8 horas.

La cantidad de mRNA correspondiente al gen *Cd200r* se ve incrementada en las primeras horas de permanencia de las células en suspensión lo que nos indica que la proteína codificada por el gen está siendo traducida, confirmando lo que se había observado por citometría de flujo. Posteriormente dicha cantidad de mRNA disminuye lo cual se traduce en la degradación del mismo por la entrada de las células en un estado de muerte irreversible que lleva a que toda la maquinaria intracelular vaya encaminada a la formación de cuerpos apoptóticos.

3.5. La anoikis controla la expresión de CD200R.

Los resultados anteriores indicaban que probablemente en la modificación de la expresión de Cd200r intervinieran factores de adhesión celular ya que al aumentar la apoptosis debido a la pérdida de adhesión también aumentaba la expresión de CD200R. Como se explicó en la introducción las moléculas más importantes implicadas en la adhesión a la matriz extracelular son las integrinas, concretamente las del tipo β 1. Dichas

integrinas también son capaces de desencadenar una respuesta intracelular que lleva a provocar cambios muy importantes en la célula ya que son en parte responsables de la maduración y diferenciación de los enterocitos a través del eje cripta-vellosidad. Se decidió averiguar si estas integrinas estaban relacionadas con el proceso de la anoikis que habíamos observado anteriormente. Se realizó un ensayo cultivando las células en suspensión y añadiéndole a las mismas un anticuerpo anti- $\beta 1$. Como control utilizamos una inmunoglobulina que no afectaba a las integrinas pero que nos servía para discriminar si el efecto que se produjera era debido al anticuerpo o era una reacción inespecífica. El anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (P4G11) es de tipo activador, es decir de los que son capaces de desarrollar una respuesta intracelular.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la siguiente figura:

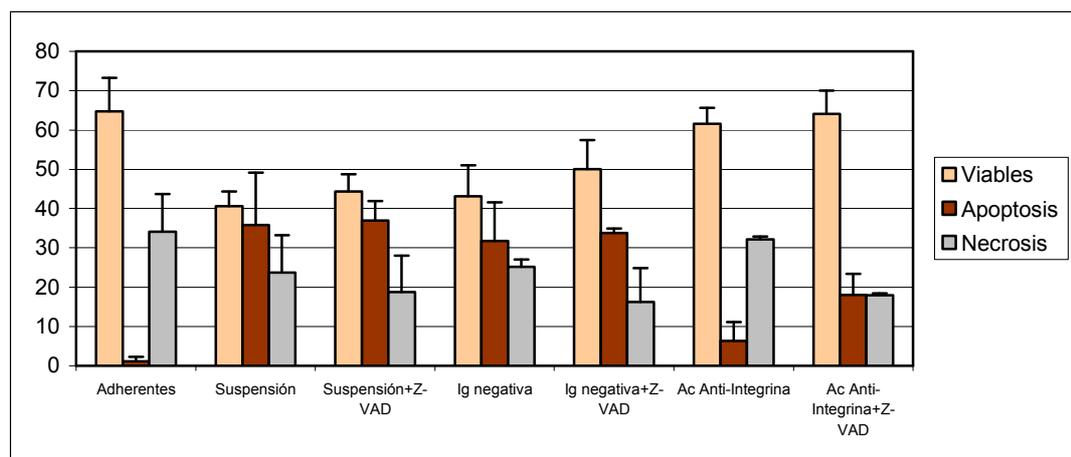


Figura 30.- Viabilidad de las células en presencia de la inmunoglobulina inespecífica (control negativo) y del anticuerpo anti-integrina $\beta 1$.

Al analizar el grado de apoptosis desarrollado por las células, observamos que éste no se modificaba prácticamente cuando ponemos las células en presencia de la inmunoglobulina inespecífica y sin embargo aumenta un 10% la viabilidad celular cuando ponemos el inhibidor Z-VAD-FMK. Sin embargo cuando ponemos las células en presencia del anticuerpo P4G11 aumenta una gran proporción el porcentaje de células viables y disminuye, por tanto, el porcentaje de células apoptóticas. El número de células necróticas aumenta un 5% y esto puede deberse a que cuando las

células ya han llegado a un punto determinado de la apoptosis, este proceso se vuelve irreversible y la acción del anticuerpo no puede revertir a aquellas células que ya han llegado a ese punto.

Por otra parte, estudiamos las modificaciones que ocurrían en la expresión de CD200R en estas condiciones. Observamos en esta ocasión que la expresión de dicha molécula disminuía en respuesta a la acción del anticuerpo lo que nos lleva a relacionar la modulación de *Cd200r* con la activación de las integrinas con cadena $\beta 1$. Es decir cuando las células son sometidas a suspensión la falta de activación de las integrinas por la matriz extracelular, a través de su cadena $\beta 1$, hace que el proceso de anoikis comience y por tanto que la expresión de CD200R aumente.

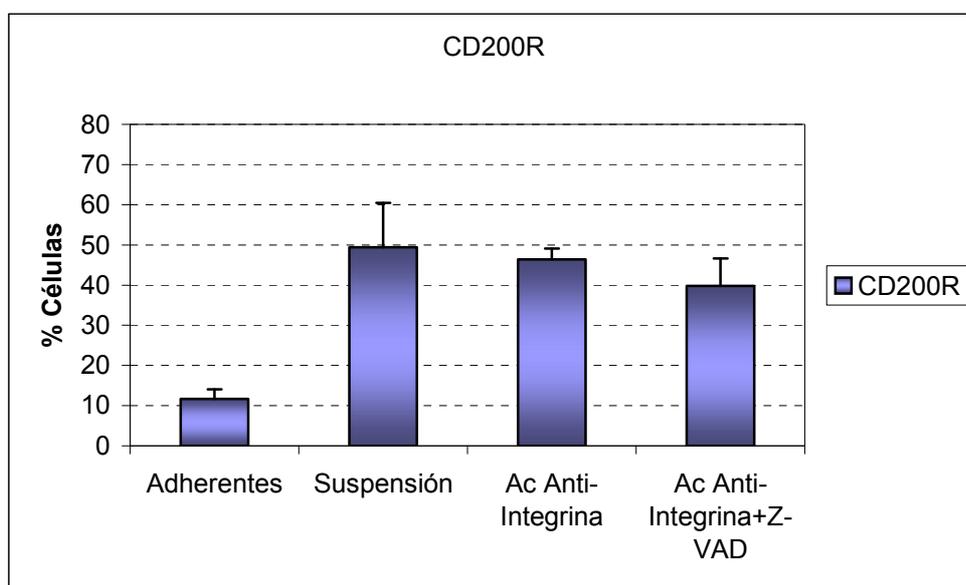


Figura 31.- Expresión de CD200R por las células por acción del anticuerpo P4G11(anti-integrina $\beta 1$).

La presencia en el medio de cultivo del anticuerpo anti- $\beta 1$ ejerce un efecto antiapoptótico lo que conlleva una disminución de la expresión de CD200R, lo cual nos está indicando que la unión de las integrinas está relacionada con la expresión de dicha proteína.

3.6. La anoikis controla la expresión de cd200r por la vía de la PI3K.

La ruta intracelular que se activa por la integrina $\beta 1$ va desencadenando una serie de señales a través de proteínas citoplasmáticas que llevan esta señal hasta el núcleo celular y allí es donde en última instancia se produce el efecto. Las proteínas implicadas en esta ruta están representadas en la siguiente figura:

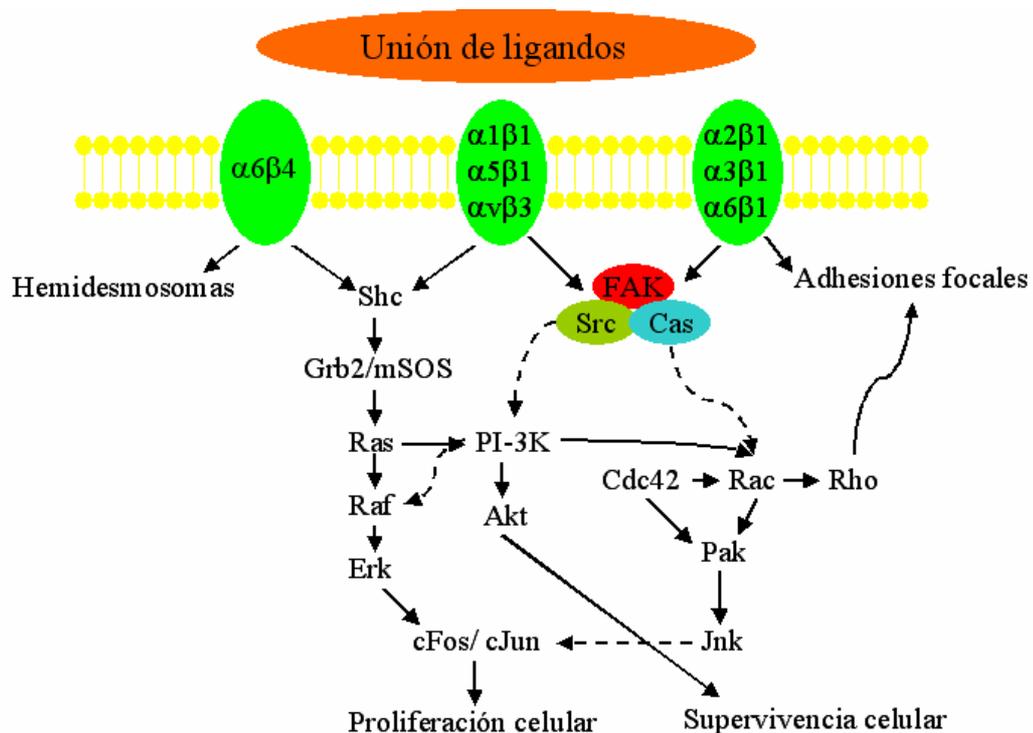
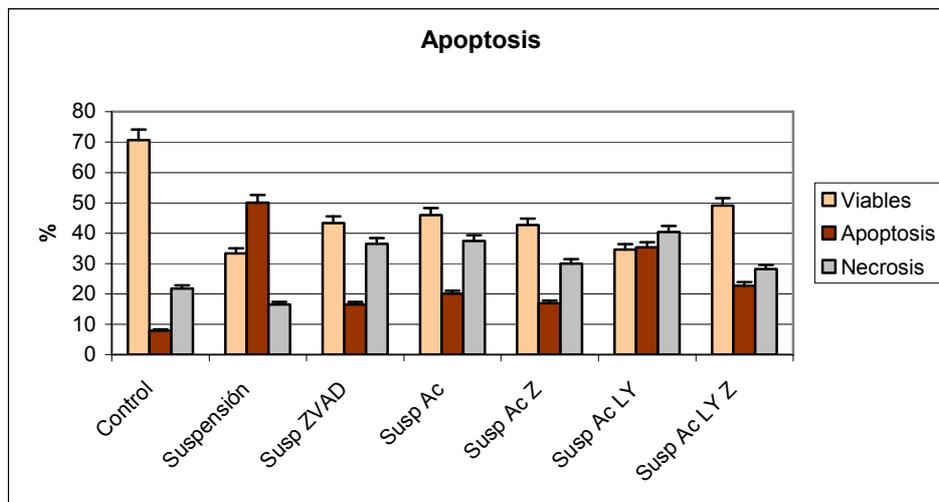


Figura 32.- Esquema que muestra las principales vías de transducción de señales a partir de la unión de las integrinas a sus ligandos.

Como un paso clave en la ruta de señalización, está la proteína PI3K y es por ello que se decidió seguir la investigación interceptando la señal intracelular a este nivel. Para ello, se realizó el experimento empleando un inhibidor de dicha proteína, el LY294002 cuya función es detener la señal iniciada por la integrina $\beta 1$. Para este ensayo se colocaron las células en suspensión y se le añadió el anticuerpo anti- $\beta 1$ para que la señal intracelular se desencadenara. Al mismo tiempo se dispuso otro tubo en el cual se colocaban las células igualmente y en este caso le añadíamos el inhibidor

LY294002 para ver si ejercía su acción interceptando la señal intracelular. Los resultados que obtuvimos se pueden ver en el siguiente gráfico:



Z-VAD-FMK	-	-	+	-	+	-	+
P4G11	-	-	-	+	+	+	+
LY294002	-	-	-	-	-	+	+

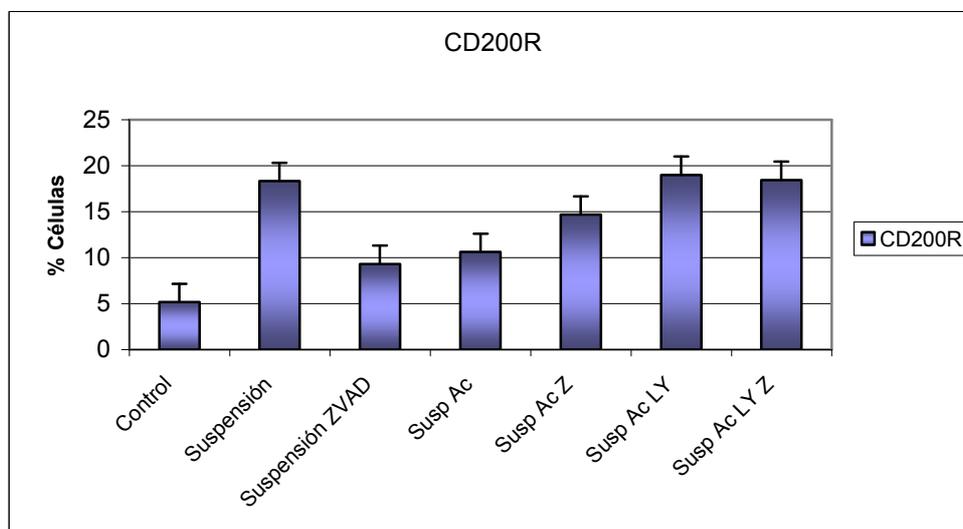


Figura 33.- Porcentaje de células viables, apoptosis y necrosis. Nivel de expresión de CD200R cuando las células están adheridas, en suspensión, en suspensión con Z-VAD-FMK, en suspensión y en presencia del anticuerpo anti- β 1 (P4G11), en suspensión, con el anticuerpo P4G11 y con Z-VAD-FMK, en suspensión, con el anticuerpo y el inhibidor de la PI3K y en suspensión, con el anticuerpo P4G11, el inhibidor de la PI3K y con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK.

Las células sometidas a suspensión, en contacto con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ unido al inhibidor de la PI3K aumentó la expresión de CD200R debido a que las células entraban en apoptosis por anoikis ya que se da una compensación relativa del efecto de la integrina con el inhibidor de la PI3K. Por otro lado cuando ponemos el inhibidor de las caspasas, Z-VAD-FMK se reduce la expresión de CD200R muy ligeramente respecto a la condición anterior. Esto se puede explicar por el bajo efecto que causa el Z-VAD-FMK sobre estas células ya que aquellas que han entrado en la fase irreversible ya no pueden volver atrás.

El empleo del inhibidor de la PI3K nos permitió confirmar que este enzima es clave en la señalización que lleva a la muerte celular y que esta muerte por descamación es la causa que provoca el incremento de la expresión de la proteína CD200R.

3.7. La anoikis regula la expresión de cd200r a nivel transcripcional

Para el aislamiento de la región promotora debíamos obtener un fragmento de ADN genómico delante del gen CD200R1 que pudiera corresponderse con el promotor. Los programas de predicción de promotores identificaron la presencia de un posible promotor del gen *CD200R1* en la región entre 2000 pb antes del inicio de la transcripción y 200 pb por detrás.

PROGRAMA	COMIENZO DE CAJA TATA PREVISTAS
Neural Network Promoter Prediction	-(643-693) -(1269-1219)
TSSW	-684
TSSG	-684
Promoter 2.0	-494

Tabla 2.- Se indica la localización desde el inicio del mensajero previsto en NCBI (número de acceso NM 138806)

Con lo cual partimos de DNA genómico humano y usamos los cebadores PRCD200RFW y PRCD200RRV. La imagen que obtuvimos fue ésta:

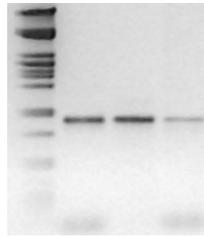


Figura 34.- Productos de PCR obtenidos con los cebadores PRCD200RFW y PRCD200RRV

La secuencia clonada fue la siguiente:

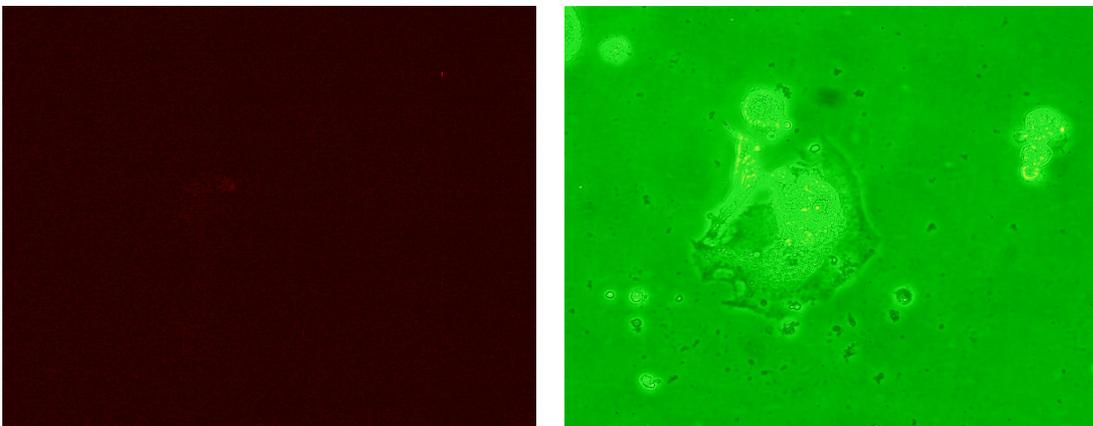
GTTGGATTATTGGGTGGACCAAAAATAATCACAAGGTCTTTATAAAAGGGAGGCATA
AGGGTCACAGTCAGAGAAGATGTGACAGTGGACCAGAGGTCCGAATGATGTAGCTGC
AAGCCAAGAAATGCAGGCATTCTCAAATCGCTGGAAAAGGCAGGGAGCAAATTCTGCC
CGAGCCTCCAGATGGAGTGCAGCCCTTCCAACACCTTGATTTTAGTCCCCTAAGATCC
ATTTCAGACTTCTGATCACCAGAACTGTAAGATAATAAATGTTGTGTTGTGTTAAGCC
ACTGAGTTTGTGGTAATTTCTTACAGTAGCAATAGGAAACTAATACACATATGATGTT
TACAGGGTTGTGTGTTGACTCCCATTATAGACAGGAATTTCACACAATAATTTTCAAG
AAAACATATTGTATTCCAGACTCAAATACTAAGGCCGTAAAGCTCTTCAACCTGGAGA
AAGCCTCTAAAAGTCATCATAATTGGGAAATTTACAAGGATGGGCCAAAGTAGATCAA
TATTCTGTTTTACTTTTTGGTGCAAGTTTAGACAAATCTGTTTATCTTGGACACGTTCA
ATGCCTTACTGTAAAGTTTGTCTGTGTACAGCAGAAGTGAGAGGAGAACCAATGAGCT
GAGAGATAATTCAATCAATCTGCTTCTCCGCTTTGCTTCAGGGCTTCATACAGGAA
ATCTATTGCTGTGTCAAGTTCAGAGAAAAGCTTCTGTTCGTCCAAGTTACTAACCAG
GCTAAACCACATAGACGTGAAGGAAGGGGCTAGAAGGAAGGGAGTGCCCCACTGTTG
ATGGGGTAAGAGGATCCTGTACTGAGAAGTTGACCAGAGAGGGTCTCACCATGCGCA
CAGTTCCTTCTGTACCTGTGTGGAGGAAAAGTACTGAGTGAAGGGCAGAAAAAGAGAA
AACAGAAATGCTCTGCCCTGGGAGAACTGCTAACCTAGGGCTACTGTTGATTTT**GACT**
ATCTTCTTAGTGGCCGGT

Figura 35.- Secuencia del extremo 5' del gen *CD200R1* clonada en el vector pDSRed-Express-1. En amarillo se representa el primer exón del mensajero. La secuencia subrayada es el promotor predicho por GenomatixSuite. Se marcan en verde y rojo las regiones donde hibridan los cebadores empleados para la clonación.

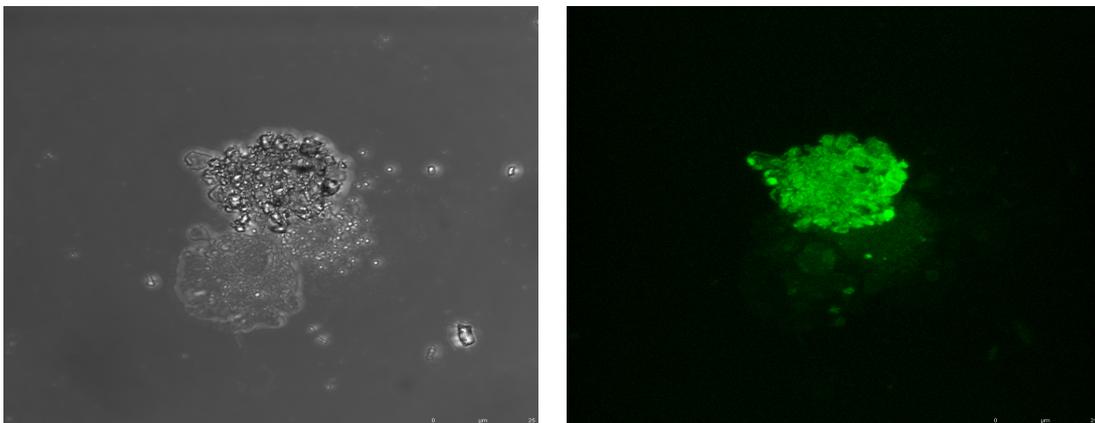
El promotor fue digerido para ver si el patrón de digestión era el correcto, una vez comprobado fue purificado y clonado en pGEMT, de donde fue sacado digiriendo con los enzimas de restricción Bgl II y Sal I.

Para el estudio del promotor de *CD200R1* procedimos a introducirlo en el vector pDsRed-Express-1, que expresa la proteína roja fluorescente cuando se le inserta un promotor funcional delante. Según nuestra hipótesis, las células que se encuentren en suspensión deberían emitir fluorescencia, lo que comprobamos que ocurría realmente, como muestran las fotografías:

a) en las células que no están en suspensión no se ve fluorescencia:



b) en las células en suspensión se produce la transcripción y se ven fluorescentes:



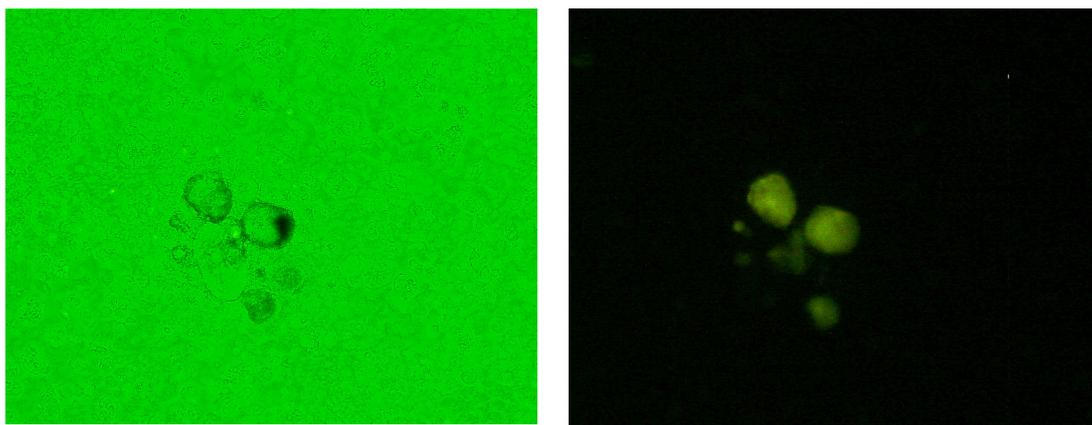


Figura 36.-Fotografías de las células Caco-2 transfectadas con el promotor de CD200R incluido en el vector pDS-Red-Express-1. Las células que están pegadas y vivas no emiten fluorescencia pero las que están despegadas y por consiguiente en apoptosis sí emiten fluorescencia.

Si observamos el nivel de fluorescencia por citometría de flujo obtenemos la confirmación de los datos de microscopía, por lo que se demuestra que el promotor se activa cuando las células se encuentran en suspensión.

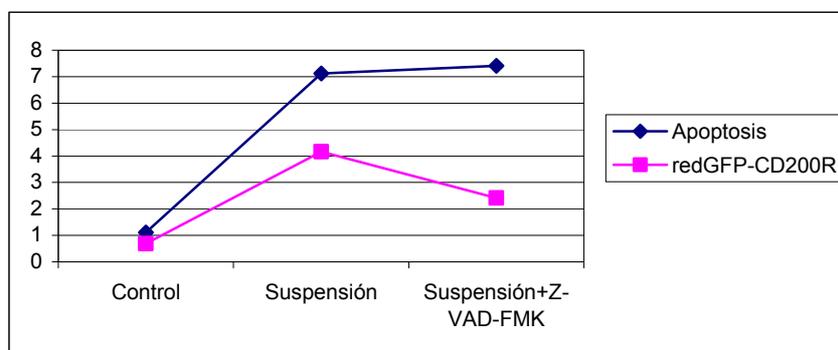


Figura 37.- Expresión de red GFP:CD200R y de la apoptosis cuando las células entran en suspensión y con el tratamiento con Z-VAD-FMK.

En esta gráfica podemos ver como se correlaciona el aumento de apoptosis con el incremento en la expresión de CD200R en las células en suspensión con respecto a los controles. Cuando ponemos el inhibidor de la apoptosis Z-VAD-FMK, se puede apreciar que la apoptosis no varía mucho sin embargo la expresión de CD200R sí disminuye un poco. Esto puede explicarse de forma que aunque el inhibidor de caspasas es capaz de actuar sobre el promotor a nivel de detener la expresión de la proteína posiblemente las células ya han entrado en la vía irreversible de la apoptosis y al ir por la vía

alternativa a las caspasas este proceso no se puede detener pero el inhibidor si afecta al promotor.

Cuando hacemos el experimento para cuantificar los cambios en los niveles de expresión de CD200R a nivel de promotor insertado en el vector (Figura 38) observamos que, de la misma manera que en condiciones normales la expresión de CD200R aumenta con la suspensión, el promotor también se ve afectado por esta circunstancia lo que nos indica que debe haber algún sitio de regulación relacionado con la activación de las integrinas, como se había visto anteriormente. Como se puede apreciar las células en suspensión con ZVAD-FMK ven un poco disminuida su expresión al igual que las células que han estado en contacto con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. Esto puede deberse a que la señal intracelular desencadenada por las integrinas llega hasta algún sitio del promotor y reprime la expresión de CD200R.

Cuando ponemos las células en suspensión con el anticuerpo (P4G11) anti-integrina $\beta 1$ y le añadimos el inhibidor de la PI3K (LY294002) observamos que ocurre una disminución de la expresión de CD200R que va asociada a una disminución de la apoptosis.

Cuando ponemos las células en las mismas condiciones que antes y además le añadimos el Z-VAD-FMK no apreciamos un cambio significativo respecto al anterior.

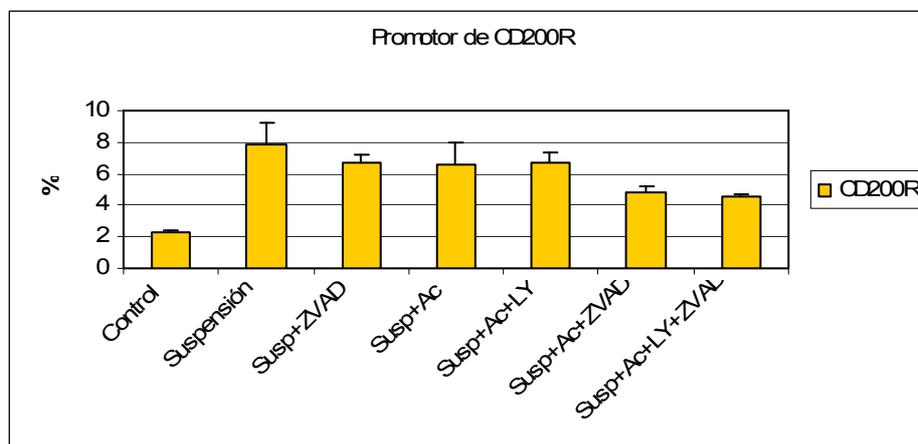


Figura 38.- Variaciones en la expresión de la fusión CD200R:redGFP en las células transfectadas con el promotor de CD200R en las condiciones previamente ensayadas.

En este experimento demostramos que las células transfectadas con el vector tienen el mismo comportamiento que las normales (no transfectadas) y que la regulación de la expresión de CD200R está relacionada con la anoikis.

3.8. La anoikis controla la expresión de cd200r *in vivo*.

Simultáneamente decidimos estudiar si este fenómeno de anoikis ocurría también en células intestinales de rata *in vivo* y si los cambios en la expresión de la proteína CD200R también se correspondían con este fenómeno. Para ello se extrajeron los enterocitos del intestino de rata y se dividieron en 2 grupos: uno de ellos quedaron unidos en un trozo mientras que el otro grupo fue puesto en suspensión durante 5 horas. Al hacer el análisis de viabilidad mediante la anexina V obtuvimos los siguientes resultados:

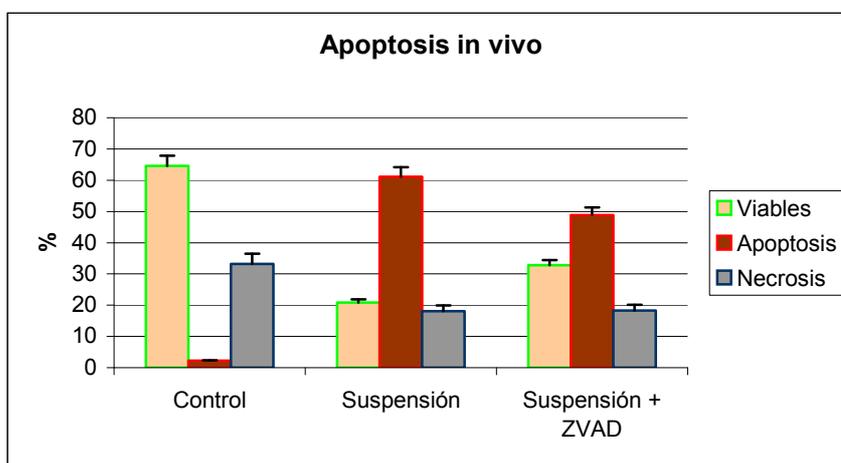


Figura 39.- Viabilidad celular, apoptosis y necrosis obtenidas para los enterocitos obtenidos de rata. Se ha añadido el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK para ver su acción sobre estas células.

Se añadió el inhibidor de caspasas, Z-VAD-FMK, para ver si ejercía su acción antiapoptótica sobre las células normales. Como se puede ver actúa a un pequeño nivel reduciendo la apoptosis en un 10% y aumenta la viabilidad celular. La necrosis no se ve alterada por la presencia o ausencia del Z-VAD-FMK. En estas condiciones se hizo una medición de la expresión de CD200R en estas células y como se puede apreciar en la suspensión también provoca en estas células un aumento de CD200R respecto a los controles y también se observa que el efecto del Z-VAD-FMK sobre la expresión es ínfimo aunque hay una pequeña disminución en la expresión.

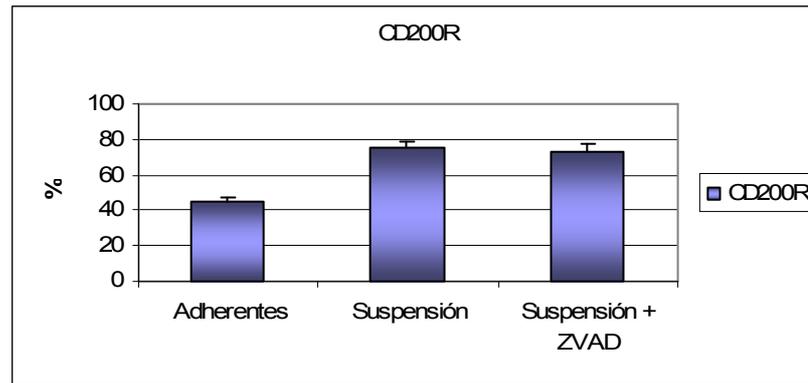


Figura 40.- Expresión de CD200R en las células intestinales de rata en los controles (han permanecido adheridas unas a otras y a la matriz), en suspensión durante 5 horas y en suspensión en presencia de Z-VAD-FMK.

Con este experimento demostramos que la expresión de CD200R está relacionada con la anoikis, también en condiciones fisiológicas.

3.9. Expresión de cd200r en células epiteliales y no epiteliales: MCF-7 (cáncer de mama) y MG-63 (osteosarcoma).

Se hizo un estudio en células de cáncer de mama (MCF-7) que son de morfología epitelial y en células de osteosarcoma (MG-63) que son de morfología tipo fibroblasto para averiguar si el mecanismo de expresión de CD200R estaba restringido a la línea celular de origen epitelial o era un mecanismo generalizado a otras líneas celulares para inhibir la respuesta inflamatoria cuando las células entran en apoptosis. En primer lugar lo que intentamos fue provocar la apoptosis en estos tipos celulares y averiguar si podía ser provocada por la suspensión o pérdida de la matriz extracelular es decir que fuera anoikis. Los datos que obtuvimos en MCF-7 nos indican que la anoikis también es un proceso generalizado a todas las células de origen epitelial e incluso es más efectivo que la provocación de apoptosis por métodos químicos como es la adición de adriamicina.

La adición de Z-VAD-FMK a estas células no produjo variación en la viabilidad celular ni en la reducción de la apoptosis.

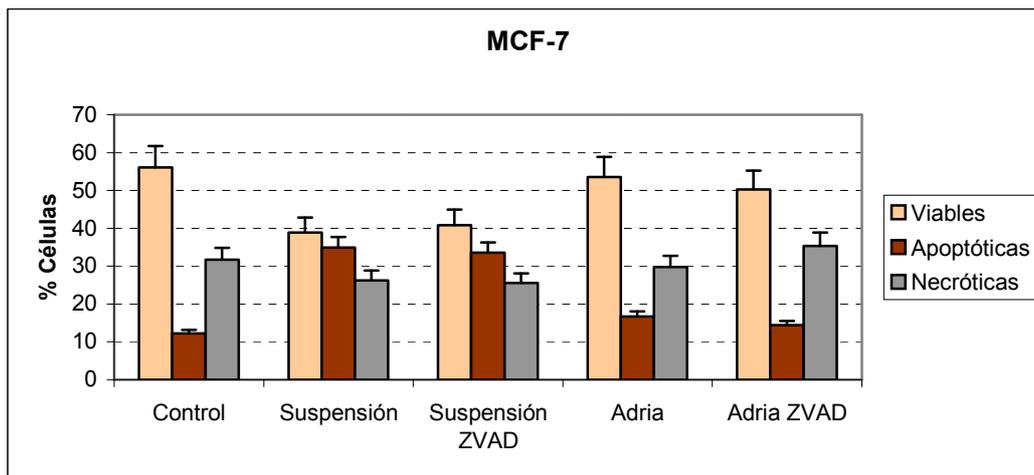


Figura 41.- Este gráfico representa el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas cuando las células MCF-7 son mantenidas en suspensión durante 20 horas y en presencia de un compuesto desencadenante de la apoptosis como es la adriamicina.

Como se observa en la Figura 42, el porcentaje de expresión de CD200R también aumenta con la suspensión, aunque en este caso el Z-VAD-FMK provoca un aumento de esta proteína en vez de disminuir, lo que era esperado pues el inhibidor de caspasa no ejerció su efecto en el grado de apoptosis. Sin embargo, a pesar que el Z-VAD-FMK no varió los niveles de apoptosis en el tratamiento con adriamicina, sí provoca un incremento en los niveles de expresión de CD200R en estas células, incluso son más elevados que los provocados por la suspensión.

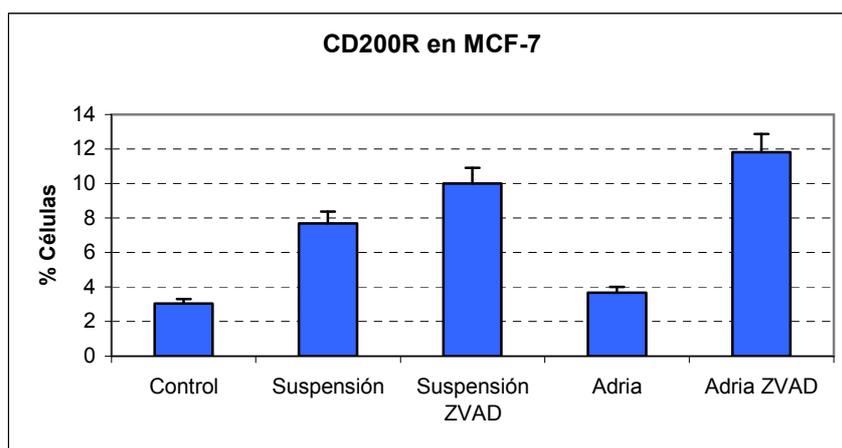


Figura 42.-Gráfico en el que se representan los niveles de expresión de CD200R en las células MCF-7 cuando son mantenidas en suspensión, en presencia de adriamicina y con Z-VAD-FMK.

Cuando provocamos la apoptosis en células MG-63 por agitación suave, observamos que este mecanismo es también efectivo en este tipo celular; la

apoptosis se ve incrementada en una gran proporción y cuando se pone el inhibidor de caspasas, Z-VAD-FMK se aprecia una disminución en la apoptosis provocada por la suspensión.

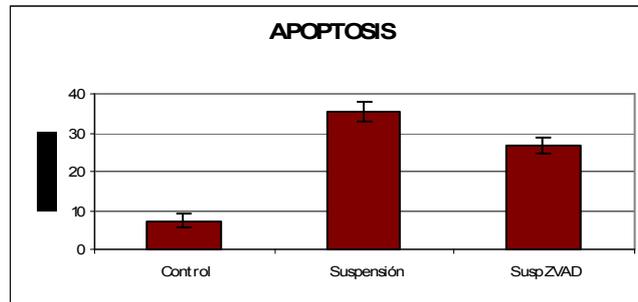


Figura 43.- Porcentaje de células MG-63 apoptóticas producidas por la suspensión durante 20 horas y la acción del Z-VAD-FMK sobre la apoptosis.

Cuando analizamos la expresión de CD200R en estas células se observa que la expresión basal es un poco menor que en las células epiteliales y aunque aumenta dicha expresión con la suspensión; por otro lado, en este caso, el agente inhibidor Z-VAD-FMK no disminuye dicha expresión sino que aumenta.

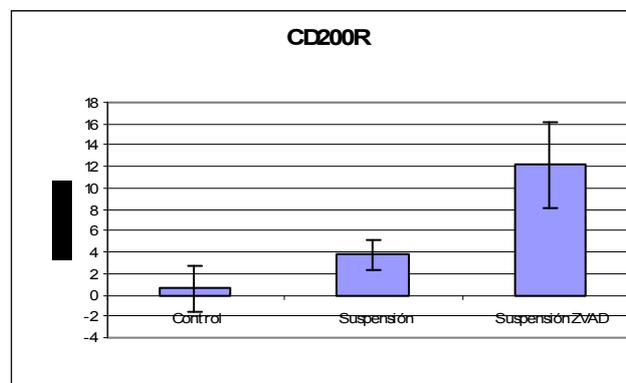


Figura 44.- Expresión de CD200R en las células MG-63 en los controles (células adheridas), en suspensión y en presencia de Z-VAD-FMK.

Estos experimentos nos confirman que la anoikis es un proceso generalizado a distintos tipos celulares y que, igual que en las células intestinales, también regula la expresión de CD200R aunque parece ser por rutas distintas ya que estas células no responden de la misma forma al Z-VAD-FMK que en el caso estudiado.

3.10. Expresión diferencial de las isoformas de cd200r en enfermos de Crohn, colitis ulcerosa e individuos sanos.

En estudios previos de nuestro laboratorio se había observado que CD200R se expresaba en enfermos de Crohn por lo cual se decidió estudiar si esta molécula tenía una expresión diferencial respecto a los enfermos de CU y los individuos sanos. Para ello, se tomaron biopsias de estos grupos de personas, se les extrajo el RNA y se analizó mediante PCR a tiempo real. Se utilizó como control interno la determinación del gen GUS (β -glucuronidasa) y para detectar a CD200R se emplearon dos tipos de oligos: uno era capaz de detectar la isoforma de CD200R que contenía el exón 2 mientras que el otro detectaba la isoforma que no lo presentaba. Ambos cebadores habían sido diseñados por Applied Biosystems.

Por otro lado, también interesaba conocer si el ligando de CD200R, CD200, presentaba también una expresión diferencial entre ambas enfermedades o solo uno de ellos era específico de la enfermedad.

Se hicieron tres experimentos con cada muestra y se calculó la media para los tres. Además se agruparon las muestras por enfermedad e individuos sanos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

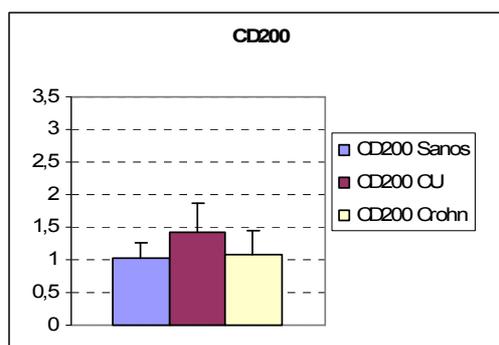


Figura 45.- Expresión del gen *cd200* en los individuos sanos, en los pacientes de CU y los pacientes de enfermedad de Crohn.

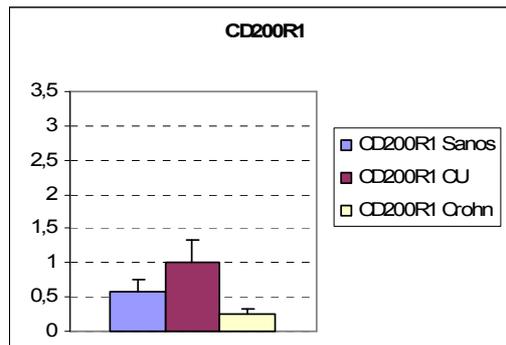


Figura 46.- Expresión de la isoforma R1 (sin exón 2) del gen *cd200r* en los individuos sanos y en los pacientes de CU y enfermedad de Crohn.

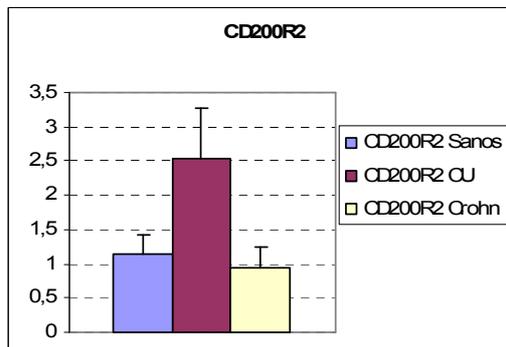


Figura 47.- Expresión de la isoforma R2 (con exón 2) del gen *cd200r* en los individuos sanos y en los pacientes de CU y enfermedad de Crohn.

En la primera gráfica podemos observar que el gen *cd200* no varía prácticamente en los tres grupos analizados por lo cual si su expresión no se modifica podemos deducir que su expresión no está relacionada con la enfermedad. Hay un pequeño incremento en los individuos de CU pero no es considerado significativo.

En la figura 32 están reflejados los cambios de expresión de la isoforma R1, es decir sin exón 2 en los individuos sanos, en los pacientes de colitis ulcerosa y en los enfermos de Crohn. Se aprecia un incremento de la expresión de esta isoforma en los pacientes de CU respecto a los individuos sanos y una disminución de la expresión en los individuos de Crohn respecto tanto a los individuos sanos como a los de CU. En esta isoforma se da una expresión diferencial entre ambas enfermedades ya que la expresión en enfermos de Crohn es 4 veces menor que en los de CU.

En la última gráfica (figura 33) también ocurre un aumento en la expresión de la isoforma R2 (con exón 2) en los enfermos de CU respecto a los individuos sanos. El grupo de pacientes de Crohn presenta una ligera disminución respecto a los individuos sanos y una variación de 2,5 veces respecto a los enfermos del grupo de CU.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La formación del intestino comienza muy temprano en la embriogénesis y el desarrollo de un epitelio maduro requiere la correcta expresión, tanto temporal como espacialmente, de los productos de numerosos genes para que se den los cambios estructurales correctos y la morfogénesis celular que es necesaria para la formación del órgano. En el adulto, aunque el epitelio intestinal está maduro y completamente desarrollado, permanece en un estado de renovación continua. Este recambio depende de un proceso de proliferación altamente regulado de las células madres y de la diferenciación de las células hijas (Guo, Suh, and Lynch, 2004).

En trabajos previos de nuestro laboratorio empleando una modificación de la técnica *differential display*, se identificaron una serie de genes cuya expresión estaba asociada al proceso de diferenciación celular que experimentaban las células cuando eran crecidas sobre una matriz extracelular, denominada Matrigel (Vieites *et al.*, 2005). El Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de ratón, un tumor enriquecido en proteínas de ECM. Está compuesto por componentes de membrana basal, como son la laminina, el colágeno IV y la entactina, y factores de crecimiento (EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF- β)(LeBleu, Macdonald, and Kalluri, 2007). Las células empleadas procedían de una línea celular de intestino de rata (IEC-6).

Los genes que vieron modificada su expresión por esta causa fueron:

- *Nr4a3*
- *Rnd3 (rhoE)*
- *Sh3d19*
- *Gosr1 (Cis-Golgi p28)*
- *Cd200r1*

De este grupo de genes, el más interesante para nosotros fue *Cd200r1* y profundizando en su estudio, en el año 2003, nuestro grupo identificó y caracterizó el gen *CD200R1* en el genoma humano (Vieites *et al.*, 2003). *CD200R1* es un gen que codifica para una proteína denominada CD200R y que actúa de receptor para un ligando denominado CD200. *CD200R1* se descubrió que estaba localizado en la región del cromosoma 3q12-13 muy cercano al gen

CD200. El gen humano consta de una región de 52 kb que conforman 9 exones. Dichos exones codifican para una proteína celular de superficie compuesta de 348 aminoácidos consistentes en dos dominios IgFF (fold-family) en una típica unión V/C2 con los residuos conservados de tirosina, cisteína y triptófano que definen las hebras B a F de la organización IgFF (Halaby, Poupon, and Mornon, 1999). El dominio citoplasmático consta de 59 aminoácidos y tiene 2 residuos de tirosina, uno de los cuales forma parte de un motivo NPXY. Al igual que otros genes IgSF el gen *CD200R* genera distintas isoformas mediante splicing alternativo que da lugar a dos isoformas, una más larga (contiene todos los exones) que codifica para un receptor de membrana y otra más corta (que finaliza en un punto intermedio, exón 5) y que lo hace para una proteína de carácter soluble, sin dominio transmembrana ni intracelular. Ambas formas, tanto la soluble como la receptora pueden presentar una inserción de 23 aminoácidos en la posición 23; dicha inserción conformaría el exón 2 y generaría un dominio putativo de dihidroxiácido dehidratasa.

La interacción de *CD200* con *CD200R* produce un efecto immunoregulator provocando una señal que lleva a la inhibición de los macrófagos. *CD200* está formada por dos dominios IgSF y posee una región citoplasmática corta (Preston *et al.*, 1997). Está estructuralmente relacionado con B7.1 y B7.2 (Borriello *et al.*, 1998) que poseen dos dominios IgSF en unión V/C, un dominio transmembrana y regiones intracelulares divergentes. Además, una variante de *splicing* ha sido descrita para B7.2, carente de zona transmembrana. Ambos presentan dos patrones de expresión diferentes pues mientras que B7.1 es inducible, B7.2 es expresado constitutivamente en las APC y se regula positivamente por la activación de dichas células (Hansen *et al.*, 2009). Los componentes del LRC (complejo receptor leucocitario) también pertenecen a la familia de las IgSF y son receptores de superficie celular. Dentro de este complejo se encuentran los KIR (receptores tipo inmunoglobulina), que se expresan en las células NK y las células T citotóxicas, y los LILRs (receptores de tipo Ig leucocitarios) que son expresados en células de la línea mieloide. Los principales ligandos para estos receptores son las moléculas de MHC clase I. Dentro del grupo de los LILRs existen de tipo inhibidor, activador y pseudogenes (Cao *et al.*, 2006; Liu, 2005). También existen LILRs potencialmente solubles que son producidos por *splicing* y son capaces de desarrollar una respuesta inhibitoria cuando se unen a su ligando

de MHC clase I (Suciu-Foca *et al.*, 2007). Los LILRs son potentes moduladores de la respuesta inmune y como sus homólogos murinos, los PIR, regulan a las células de la línea mieloide. Varios investigadores se han encargado de estudiar las funciones de los receptores LILRs en monocitos *ex vivo* (Colonna *et al.*, 1997; Fanger *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1999) o en células dendríticas (Tenca *et al.*, 2005) pero su significancia biológica se desconoce debido a su complejidad. Los LILRs con ITIM en su tallo citoplasmático llevan una señal que regula negativamente las funciones leucocitarias. Además de éstos, existen una gran variedad de receptores inmunes que pertenecen al LRC (LAIR-1, Fc α R1, NCR1) y moléculas codificadas en zonas adyacentes (CEACAMs, Axl, CD79A, DAP10, DAP12, etc.) las cuales, la mayoría, están implicados en la regulación negativa de la respuesta inmune. Muchas de estas proteínas colaboran con DAP-12 para propagar su señal inhibitoria, aunque su mecanismo es desconocido (Barrow and Trowsdale, 2008).

Gorczynski observó que la interacción de CD200 con CD200R producía un efecto immunoregulador ya que inhibía la producción de citoquinas tipo-1, que son las encargadas de la defensa de tipo celular y producidas por los linfocitos T helper tipo-1. Estos datos apoyan la idea de que las interacciones CD200:CD200R son importantes en la inmunoregulación que contribuye a determinar la susceptibilidad a la enfermedad autoinmune (Gorczynski, 2001). La interacción de CD200 con su receptor provoca una señal inmunosupresora que lleva a la inhibición de los macrófagos, a la inducción de células T reguladoras, cambio del perfil de citoquinas desde Th1 a Th2 e inhibición de la inmunidad específica de tumor de las células T (Moreaux *et al.*, 2008). Muchos estudios sugieren que la señalización producida por la interacción CD200-CD200R disminuye la actividad de las células mieloides (Jenmalm *et al.*, 2006). Se ha descrito una relación entre esta interacción y la enfermedad de Parkinson ya que CD200 transmite una señal immunoreguladora a través del receptor de CD200 para regular la activación de la microglia y este suceso está bastante relacionado con la patogénesis y la progresión de la enfermedad de Parkinson (Wang *et al.*, 2007).

Nuestros resultados preliminares habían comprobado que la expresión de CD200R1 no estaba sólo restringida a células de la línea mieloide (Wright *et al.*, 2000) sino que dicho gen también es expresado por las células intestinales en el proceso de diferenciación celular. Nuestro objetivo a continuación fue

estudiar que factor estaba implicado en la regulación de la expresión del gen *Cd200r1*. En primer lugar, cultivamos y diferenciamos las células IEC-6 sobre Matrigel. Un posible factor que podía influir sobre la expresión de *Cd200r1* podía ser la presencia o ausencia de suero, ya que la ausencia de suero hace que las células detengan su ciclo celular mientras que la presencia de este componente hace que sigan madurando hasta llegar a la muerte celular. El estudio abarcó dos aspectos: proliferación o diferenciación celular y presencia o ausencia de suero. La figura 12 y la tabla 1 nos muestran que la expresión de *Cd200r1* disminuyó por la diferenciación. Con respecto a las distintas isoformas, la isoforma larga es mayoritaria. La isoforma corta desaparece en las células diferenciadas. La presencia de suero contribuye positivamente a la expresión de ambas isoformas ya que las células maduran y entran en apoptosis.

Una vez que habíamos demostrado la expresión de *Cd200r1* en las células intestinales se decidió averiguar en qué localización celular y tisular asociada al desarrollo podíamos hallarlo. El intestino de los mamíferos continua desarrollándose después del nacimiento coincidiendo con cambios dietarios e inmunológicos. En el ratón ocurre una importante transformación a fenotipo adulto en el tiempo del destete (día 20) en los enzimas digestivos y en la función de transporte (Holmes *et al.*, 2006). Respecto a la localización celular, dado que la forma mayoritaria era la isoforma de receptor supusimos que estaría integrado en la membrana citoplasmática. Los resultados de microscopía no revelaron ninguna localización celular definitiva ya que fueron difusos debido a la poca cantidad de proteína expresada en estas células en estado proliferativo. Los receptores tipo Toll (TLRs) son cruciales en la inmunidad innata que reconoce los componentes microbianos (ligandos de los TLRs). La interacción entre ambos conduce a la transcripción de numerosos genes inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-12, etc. pero artículos recientes han demostrado que la activación de los TLRs de las IECs pueden limitar la respuesta inflamatoria a los ligandos que existen en el lumen intestinal. Algunas líneas celulares humanas de IEC expresan mRNA de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9. Los TLR9 se expresan exclusivamente en la superficie de las células IEC mientras que en líneas de células B es expresado intracelularmente. TLR9 es expresado tanto en la zona apical como en la superficie basolateral en células Caco-2 (Lee, Gonzales-Navajas, and Raz,

2008). En cuanto a la localización tisular, comprobamos que CD200R se expresa a lo largo del eje intestinal longitudinal, en todas las porciones intestinales (duodeno, yeyuno, ileon y colon) en las ratas desde el nacimiento y aumentando hasta los 7 días. La expresión disminuye a los 21 días, excepto en colon. Los niveles de expresión cuando la rata tiene 21 días son menores que en ratas más jóvenes lo que indica que el estado de desarrollo del individuo también afecta a CD200R. Varios enzimas están espacialmente restringidos a distintos segmentos en el eje antero-posterior del intestino delgado son temporalmente regulados durante la maduración postnatal. Por ejemplo, la lactasa intestinal es expresada a niveles altos en el yeyuno justo después del nacimiento y disminuye drásticamente justo antes del destete en la mayoría de los mamíferos. La sacarosa-isomaltasa también se expresa a niveles altos en yeyuno pero con un patrón temporal diferente ya que en el nacimiento los niveles son mínimos y aumentan drásticamente en el tiempo de destete (Fang, Olds, and Sibley, 2006). Otras proteínas, como las claudinas, también son expresadas a lo largo del eje longitudinal y en el eje de diferenciación cripta-vellosidad, presentando un complejo patrón espacio-temporal. Son proteínas que forman parte de las uniones estrechas entre células y su función es bloquear el paso de moléculas por la ruta paracelular (Tsukita and Furuse, 1998). Se conocen 19 claudinas, pero no todos los gradientes son continuos sino que algunas claudinas son específicas de determinados segmentos, por ejemplo, la expresión de claudinas 2, 5, 7 y 10 se observó en la zona ileocecal mientras que la claudina 18 solo se detecta en duodeno y yeyuno. Otros genes que codifican para uniones transmembrana, como ocludina, JAM o JAM-4 fueron muy continuos desde el duodeno hasta el colon distal (Holmes *et al.*, 2006). Los genes Cdx-1, Cdx-2 y E2F4 muestran una expresión regional específica en el intestino delgado y en el colon, tanto en el desarrollo como en el adulto (Brittan and Wright, 2004).

Dado que la interacción con la matriz extracelular ha sido implicada en la diferenciación o proliferación en diversos tipos celulares, entre los que destacamos las células epiteliales intestinales, decidimos estudiar si alguno de los componentes de dicha matriz podía regular la expresión del gen Cd200r1. El Matrigel está compuesto de laminina, colágeno IV, nidógeno, heparán sulfato y diferentes factores de crecimiento, entre los que destacan TGF- β , EGF e IGF. La laminina y el colágeno IV son capaces de parar la proliferación de las

células Caco-2 y aumentar las actividades de enzimas indicadoras de diferenciación intestinal, como la fosfatasa alcalina, la sacarasa isomaltasa, la lactasa y la dipeptidil peptidasa (Basson, Turowski, and Emenaker, 1996). Además, la laminina I es capaz de producir la salida del ciclo celular de las células fetales de intestino de rata (Hahn *et al.*, 1990). Por otro lado, las células Caco-2 son capaces de diferenciarse espontáneamente al mantenerse en confluencia, lo que puede deberse a su producción de laminina I, ya que la inhibición de la síntesis de la cadena $\alpha 1$ de lamininas disminuye la diferenciación de estas células (De Arcangelis *et al.*, 1996). En las células IEC-6 existen informes contradictorios sobre la acción de la laminina, indicando que pueden aumentar la proliferación (Yu, Schwartz, and Petryshyn, 1998) o disminuirla e inducir la diferenciación (Wolpert *et al.*, 1999). En el caso de TGF- β , algunos artículos indican que disminuye la proliferación de las células sin inducir la diferenciación (Barnard *et al.*, 1989), mientras que otros defienden que este compuesto es capaz de inducir la diferenciación (Kurokawa, Lynch, and Podolsky, 1987). En el caso de IGF-I, PDGF y EGF, todos estos factores parecen inducir la proliferación de las células IEC-6 (Kojima *et al.*, 1998). Quaroni *et al.* determinaron que tanto la hidrocortisona como la dexametasona a concentraciones muy bajas son capaces de inhibir la proliferación celular y favorecer la aparición de características morfológicas de diferenciación, aunque sin acompañarse de la detección de actividades de enzimas de borde en cepillo (Quaroni *et al.*, 1999).

Sin embargo, en nuestros experimentos ninguno de los elementos de la matriz extracelular ni la dexametasona, usada como control para inducir la diferenciación, fueron capaces de producir por sí solos la diferenciación morfológica de las células IEC-6, a pesar que en la bibliografía existían artículos previos que indicaban este hecho. Desde el punto de vista de la expresión de *Cd200r1* (Figura 17) ninguno de los compuestos estudiados fue capaz de producir una disminución en los niveles de mRNA. Tampoco apreciamos cambios significativos cuando mezclamos todos los componentes para hacer una matriz extracelular similar al Matrigel.

El estado de confluencia parece ser de gran importancia en la diferenciación de algunas líneas celulares de epitelio intestinal, siendo utilizado de hecho, como otro modelo de inducción de diferenciación. Este es el caso de las células Caco-2, que se diferencian cuando se mantienen en cultivo post-confluente (Vachon and Beaulieu, 1992). Como se habían descrito cambios en

la expresión de genes asociados al estado de confluencia total o la parada del crecimiento (Bello *et al.*, 2003) y dado que no habíamos encontrado un elemento de la matriz extracelular que redujera la expresión del gen *Cd200r1*, decidimos estudiar si la diferenciación inducida por confluencia podía influir en la expresión de éste. Sorprendentemente, la confluencia aumentó los niveles de expresión del gen *Cd200r1* respecto al Matrigel y a las células en proliferación (Figura 18 Y 19) lo que hacía que estuviéramos ante unos resultados aparentemente contradictorios.

Para intentar aclarar este punto, analizamos qué podía estar ocurriendo en estos dos estados celulares. En la práctica se observa que el porcentaje de células que se adhieren al Matrigel, respecto a las que se añaden para el experimento, es bastante bajo lo que indica que la mayoría no se adhieren y quedan en el medio donde mueren. La muerte de estas células hace que se liberen al medio sustancias proinflamatorias que también podrían estar influenciando la expresión de *Cd200r1*. Estudios recientes han demostrado que las células intestinales participan activamente de la respuesta inmune innata además de su función protectora como barrera física (Cario and Podolsky, 2005). Puesto que en el intestino existe una microflora que convive con las células intestinales y su lipopolisacárido (LPS) es un estímulo proinflamatorio (Abreu *et al.*, 2001; Haller *et al.*, 2004) se analizó si éste podía ser el responsable de los cambios en la expresión del gen. Los experimentos no fueron concluyentes, debido sobre todo al uso de lipopolisacáridos de varios lotes con distinto grado de pureza (Figura 20).

Seguidamente decidimos estudiar el efecto de estímulos proapoptóticos. El empleo del H_2O_2 como productor de daño celular está bastante extendido (Saksena *et al.*, 2008) ya que produce modificación de proteínas, oxidación lipídica, daño al DNA y otras alteraciones de las funciones biológicas de células y tejidos (Berlett and Stadtman, 1997). En este sentido, el estrés oxidativo actúa sobre receptores de factores de crecimiento como EGFR, para activar las rutas de ERK y JNK (Guyton *et al.*, 1996; Seomun *et al.*, 2005). Asimismo, la VCAM-1 se creía que se expresaba únicamente en células endoteliales cuando estas células son activadas por estímulos inflamatorios como estrés oxidativo, LPS, etc. pero se ha observado que el peróxido de hidrógeno induce la expresión de VCAM-1 en islotes pancreáticos y células β (Lee *et al.*, 2008). Analizamos el efecto del H_2O_2 a varias concentraciones sobre la expresión del gen *Cd200r1* (Figura 21). La conclusión a la que llegamos con este experimento

fue que el daño celular estaba elevando los niveles de mRNA del gen *Cd200r1* pero el gran número de células muertas debido al daño celular nos impedía detectar si era por apoptosis o por necrosis.

Una revisión bibliográfica nos mostró que la suspensión celular es, de hecho, un método de inducción de la apoptosis (Dufour *et al.*, 2004; Hyoh *et al.*, 2002) en células epiteliales. Además algunos investigadores (Sterling and Cutroneo, 2002) observaron que las células crecidas sobre Matrigel sufren apoptosis. En trabajos previos se había inducido la muerte celular de IEC-18 y células Caco-2 por mantenimiento en suspensión (Joseph *et al.*, 2005; Morozevich *et al.*, 2003; Rosen *et al.*, 2001). Este fenómeno de muerte celular por falta de anclaje es conocido como anoikis (Wang, 2004) y se da en muchos tipos de células epiteliales. En el caso del intestino, se piensa que se produce cuando las células llegan a la cima de la vellosidad y son eliminadas al lumen intestinal (Karam, 1999). Por ello, decidimos comprobar la regulación de *Cd200r1* en células epiteliales intestinales en anoikis.

El estudio se dirigió en dos direcciones: una empleando el butirato como agente proapoptótico y otra empleando la suspensión celular en el medio de cultivo como método para inducir la apoptosis. Se ha demostrado que el butirato inhibe el crecimiento celular *in vitro* favoreciendo la parada del ciclo celular, promueve la diferenciación en células normales y transformadas y es capaz de inducir apoptosis en algunos tipos de cáncer (Andoh, Tsujikawa, and Fujiyama, 2003; Giuliano *et al.*, 1999; Myzak, Ho, and Dashwood, 2006). El butirato es un ácido graso de cadena corta que es producido por la fermentación de las bacterias en el lumen intestinal. Produce dos efectos en las células: por un lado diferenciación y por otro apoptosis (Gibson, 2004; Olmo *et al.*, 2007) aunque ambos parecen estar íntimamente relacionados ya que las células que mueren son las que presentan mayor actividad de enzimas marcadoras de diferenciación (Ruemmele *et al.*, 2003). En las células Caco-2 se había observado que la adición de butirato al medio de cultivo induce la muerte por necrosis y apoptosis, además de inhibir la adhesión de las células a la matriz y disminuir la expresión de las integrinas (Basson *et al.*, 1996). Al realizar los experimentos observamos que la apoptosis provocada por butirato es de tipo independiente de caspasas (Figura 23) ya que el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK no redujo la apoptosis. Por otro lado, produce un patrón mixto de necrosis y apoptosis. Todo esto junto a que requiere tiempos

prolongados de exposición al compuesto (72 horas mínimo) hizo que no lo consideráramos un método adecuado.

Respecto de la anoikis, utilizamos una técnica en la que mayoritariamente se provocara la apoptosis de las células. Lo primero que se hizo fue confirmar que este método provocaba un porcentaje relativamente alto de apoptosis en células IEC-18 (Figura 24); esto se conseguía después de 20 horas de suspensión mientras que con el butirato eran necesarias un mínimo de 72 horas. Además, la apoptosis provocada era fundamentalmente dependiente de caspasas ya que el Z-VAD-FMK produjo una recuperación importante de la viabilidad y el porcentaje de células necróticas no era muy elevado lo cual lo hacía idóneo para continuar el estudio. En estas condiciones, el análisis de la expresión de la proteína CD200R nos confirmó que durante la anoikis aumentaba la expresión del gen.

Se hizo el mismo estudio en las células Caco-2 para observar si este fenómeno se extendía a otras líneas de células intestinales. Pudimos comprobar que efectivamente los resultados eran similares.

Mediante la técnica de PCR a tiempo real probamos que la expresión de CD200R1 se debía a un incremento en la transcripción ya que la cantidad de mRNA aumentaba en las primeras horas de la suspensión aunque luego descendía, posiblemente por la degradación intracelular que sufren las células cuando entran en un estado irreversible de apoptosis.

Para comprobar que la regulación de la expresión del gen *CD200R1* se debía a la descamación celular o anoikis, se analizó el control por contacto con la cadena $\beta 1$ de las integrinas sobre las células en suspensión. Estas integrinas son muy abundantes en las células Caco-2, y no sólo son las responsables del contacto físico con la matriz extracelular sino que la señalización celular a través de ellas está relacionada con la supervivencia celular dependiente de anclaje (Frisch and Ruoslahti, 1997; Martin and Vuori, 2004; Reddig and Juliano, 2005). La mayoría de los estudios sobre eventos de señalización mediados por integrinas han sido desarrollados en células que se adhieren a la fibronectina a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$, una de las mejor caracterizadas que reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp. Esta asociación entre fibronectina y $\alpha 5\beta 1$ está implicada tanto en la regulación de adhesión celular y la migración como en la diferenciación y apoptosis (Frisch and Ruoslahti, 1997; Ruoslahti, 1996). Por otro lado, otra de las principales integrinas en las células epiteliales es la $\alpha 3\beta 1$, que media la adhesión a las lamininas de la ECM, promoviendo

preferentemente la migración celular y previniendo la apoptosis (Gu and Taniguchi, 2004). Estas interacciones son críticas para la adhesión celular y para la señalización dependiente de anclaje tanto en estados normales, por ejemplo hemostasis o desarrollo, como patológicos (metástasis de tumores e inflamación) (Diamond and Springer, 1994; Mousa, 2008).

Los resultados mostraron que la viabilidad celular aumentó presencia de anticuerpo anti- $\beta 1$ (Figura 30), y por tanto se confirma que las integrinas tienen un papel importante en la señalización de supervivencia celular anclaje dependiente. Al analizar la expresión de la proteína CD200R (Figura 31) se observó que la disminución de la apoptosis está asociada con la disminución en la expresión de la proteína CD200R. Asimismo, el doble efecto del anticuerpo anti- $\beta 1$ y el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK también redujo la apoptosis y la expresión de CD200R.

Estos resultados no nos permitían conocer qué eventos intracelulares determinan la supervivencia celular y la expresión de CD200R. Al estudiar las rutas intracelulares relacionadas con la señalización de las integrinas observamos que existen varias vías implicadas como son la ruta de FAK, Src y MEK/Erk y la ruta de la PI3K/Akt, funcionando una u otra dependiendo del tejido y el contexto celular (Manning and Cantley, 2007; Mitra and Schlaepfer, 2006). También está confirmado que la ruta integrina/Fak/Src puede estimular a la rutas PI3K/Akt y MEK/Erk, tanto individualmente como en combinación, dependiendo del tipo celular analizado (Stupack and Cheresch, 2002; Vachon, 2006). En células epiteliales intestinales se ha observado que la activación de la vía de la PI3K está relacionada con un aumento de la viabilidad celular (Zhang et al., 2004a). Además numerosos estudios han relacionado la falta de unión de las integrinas a sus ligandos con la actividad de esta vía, lo que da lugar finalmente a la muerte de aquellas células que han perdido el contacto con la matriz extracelular (Tian *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2004). Al ensayar el efecto de la inactivación de esta vía por el compuesto LY294002, inhibidor de la PI3K, observamos que se bloquea la protección del anticuerpo anti- $\beta 1$, P4G11, que produjo un aumento de la muerte celular y un incremento en la expresión de CD200R comparable a las células en suspensión sin anticuerpo (Figura 33). Esto nos induce a pensar que la señalización desde la integrina $\beta 1$ a través de la PI3K es la fundamental para la muerte por anoikis y el control de la expresión de *CD200R1*, al menos en células Caco-2.

Puesto que en los experimentos realizados habíamos empleado una línea celular, derivada de un cáncer de colon, decidimos comprobar si ocurría de igual forma *in vivo*. Para ello, utilizamos enterocitos extraídos de intestino de rata según el método de Grossman et al. (1998), con algunas modificaciones. Obtuvimos una población de enterocitos primarios, extraídos por procedimientos mecánicos, tras debilitar las uniones intracelulares y con la matriz extracelular mediante el empleo de EDTA y DTT. Las células así obtenidas han sido empleadas por otros grupos en el estudio de la activación de caspasas durante el proceso de anoikis y estudios de respuesta de enterocitos a interleuquinas implicadas en la enfermedad inflamatoria intestinal (Grossmann et al., 1998; Grossmann et al., 2001; Kiessling et al., 2004; Schlottmann et al., 2004). Al someter a los enterocitos a descamación observamos una respuesta similar a las células Caco-2 y que el Z-VAD-FMK también ejercía efecto inhibitorio de la apoptosis. Igualmente se correspondía con un incremento en los niveles de expresión de CD200R en estas células. Por tanto podemos confirmar que este fenómeno ocurre también de forma fisiológica en las células epiteliales de intestino.

En paralelo, procedimos a la identificación y caracterización de la región promotora del gen *CD200R1*. Para el estudio del promotor, el primer paso consistió en la identificación del sitio de inicio de la transcripción. Para ello usamos la técnica de extensión de cebadores (*primer extensión*) y programas bioinformáticos de predicción de promotores. Se seleccionó un fragmento de 1000 pb donde se localizaba el promotor. Una vez identificado éste, fue clonado en el vector pDS-Red-Express-1, dejando la proteína fluorescente bajo control del promotor de *CD200R1*. El empleo de este vector nos permitió obtener clones de células Caco-2 transfectadas establemente con los cuales reproducir los experimentos realizados en las células Caco-2.

A nivel microscópico, pudimos observar que la emisión de fluorescencia se daba en las células en suspensión y no en las células pegadas lo que confirma que la transcripción se produce en condiciones de anoikis. De nuevo, al analizar los niveles de expresión por citometría de flujo comprobamos que tanto apoptosis como expresión de CD200R aumentan con la apoptosis y que es dependiente de caspasas.

En nuestros experimentos demostramos que las células con el vector insertado se comportan de la misma manera que las normales, que la anoikis

es la responsable del incremento en los niveles de expresión de la proteína y que están reguladas por la misma ruta.

Para completar el estudio decidimos comprobar si CD200R se expresaba en otros tipos celulares diferentes. Para ello, realizamos el experimento utilizando dos líneas celulares de diferente origen pero de naturaleza adherente: MCF7, son células de tipo epitelial pero proceden de un cáncer de mama y MG63, que son de tipo fibroblasto y proceden de un osteosarcoma. De nuestros resultados se deduce que el sustrato es imprescindible para que estas células mantengan su viabilidad ya que la suspensión hace que se produzca la apoptosis. La proteína CD200R también es expresada en las células MCF7 y aumenta en apoptosis. En este caso, la presencia del Z-VAD-FMK no ejerce efecto inhibitor de apoptosis (Figuras 41 y 42) por lo que deducimos que este mecanismo es independiente de caspasas.

Las células MG63 cuando son expuestas a distintas sustancias anticancerígenas entran en apoptosis e incrementan los niveles de mRNA de FasL y FasR (Tanaka *et al.*, 2007). Asimismo se ha observado que alguna de estas sustancias induce una apoptosis dependiente de caspasas a través de la vía de la PI3K (Jin *et al.*, 2007). La suspensión provoca en estas células un aumento de la apoptosis y la expresión de CD200R. La presencia del inhibidor de caspasas (Figura 44) recupera la viabilidad celular pero no va acompañada de la disminución de la expresión de la proteína CD200R.

Para finalizar, decidimos estudiar la expresión de CD200R en enfermos de colitis ulcerosa (UC) y enfermos de Crohn. Aún no se identificado la causa de la IBD aunque sus mecanismos fisiopatológicos se han investigado extensamente. Se sabe que tanto una apoptosis defectuosa de las células T como el desajuste de la función de la barrera epitelial intestinal intervienen en la patogénesis (Gordon, Di Sabatino, and Macdonald, 2005). Se han observado diferencias en la respuesta de las células T entre la enfermedad de Crohn y la UC (Dignass, Baumgart, and Sturm, 2004). En ambas enfermedades, la activación de los macrófagos conduce a un incremento en la producción de citoquinas como son TNF, IL-1 e IL-6 (Kolios, Petoumenos, and Nakos, 1998). Las interacciones epitelio-leucocito son especialmente interesantes ya que la exposición de los TLRs a los ligandos microbianos desencadena una activación de mediadores inflamatorios, mientras que esta exposición en leucocitos modula la respuesta microbiana específica (Liew *et al.*, 2005). La interacción intensa entre células epiteliales intestinales y células inmunológicamente

competentes es crítica en el mantenimiento y perpetuación del proceso inflamatorio crónico característico de la IBD (Tsianos and Katsanos, 2009). Numerosos investigadores están dedicándose a encontrar algún marcador diferencial entre ambas enfermedades ya que en muchas ocasiones debido a la similitud de los síntomas es difícil distinguirlas (von Stein *et al.*, 2008). Un ejemplo es el estudio realizado por Laerum *et al.* en el cual han observado una expresión diferencial entre PAI-1 y uPAR en las neuronas del plexo mientérico de enfermos de Crohn y UC (Laerum *et al.*, 2008). También se han identificado como determinantes de la enfermedad de Crohn al gen del receptor de la interleukina-23, al gen ATG16L1 y al gen M de la familia de GTPasas relacionadas con la inmunidad (Satsangi, 2008).

En estudios anteriores de nuestro laboratorio, se había observado que los enfermos de Crohn expresaban el RNA mensajero de *CD200R1*. Por ello, se procedió a analizar si existía una expresión diferencial entre ambas enfermedades. También se analizó la expresión del ligando de CD200R, CD200, por si también podía tener una expresión diferente entre los grupos. La conclusión del estudio fue que la expresión de CD200 no varía entre los distintos grupos mientras que la de CD200R sí presenta variaciones entre ambas enfermedades, que dependen de la isoforma que analicemos (Figura 45). En el caso de la isoforma sin exón 2 (R1) los enfermos de Crohn tienen dicha isoforma disminuida respecto a los individuos normales y respecto a los enfermos de UC (Figura 46). En el caso de la isoforma completa (con exón 2) los que presentan una mayor diferencia son los enfermos de UC que tienen dicha isoforma incrementada (Figura 47). Estas diferencias postulan a que el patrón de expresión de CD200R pudiese utilizarse como marcador diferencial de patología.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbi, S., and Guan, J. L. (2002). Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. *Histol Histopathol* **17**(4), 1163-71.
- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**(3), 1609-16.
- Alahari, S. K., Reddig, P. J., and Juliano, R. L. (2002). Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol* **220**, 145-84.
- Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D., and Damsky, C. H. (2000). Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* **149**(3), 741-54.
- Altieri, D. C. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* **7**(12), 542-7.
- Andoh, A., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2003). Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* **9**(4), 347-58.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., and Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* **132**(6), 1443-51.
- Ardoin, S. P., Shanahan, J. C., and Pisetsky, D. S. (2007). The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* **66**(2-3), 159-65.
- Attwell, S., Roskelley, C., and Dedhar, S. (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* **19**(33), 3811-5.
- Barberis, L., Wary, K. K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G., and Giancotti, F. G. (2000). Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem* **275**(47), 36532-40.
- Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G., and Brown, M. H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* **23**(6), 285-90.
- Barnard, J. A., Beauchamp, R. D., Coffey, R. J., and Moses, H. L. (1989). Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(5), 1578-82.
- Barrow, A. D., and Trowsdale, J. (2008). The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunol Rev* **224**, 98-123.
- Basora, N., Vachon, P. H., Herring-Gillam, F. E., Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1997). Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* **113**(5), 1510-21.
- Basson, M. D., Turowski, G., and Emenaker, N. J. (1996). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res* **225**(2), 301-5.
- Basson, M. D., Turowski, G. A., Rashid, Z., Hong, F., and Madri, J. A. (1996). Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* **41**(10), 1989-93.

- Beaulieu, J. F. (1997). Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* **31**(4), 1-78.
- Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* **4**, D310-21.
- Beaulieu, J. F., and Vachon, P. H. (1994). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* **106**(4), 829-39.
- Bello, R. I., Alcain, F. J., Gomez-Diaz, C., Lopez-Lluch, G., Navas, P., and Villalba, J. M. (2003). Hydrogen peroxide- and cell-density-regulated expression of NADH-cytochrome b5 reductase in HeLa cells. *J Bioenerg Biomembr* **35**(2), 169-79.
- Bergin, E., Levine, J. S., Koh, J. S., and Lieberthal, W. (2000). Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(5), F758-68.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**(33), 20313-6.
- Borriello, F., Tizard, R., Rue, E., and Reeves, R. (1998). Characterization and localization of Mox2, the gene encoding the murine homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Mamm Genome* **9**(2), 114-8.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**(Pt 8), 1567-74.
- Brittan, M., and Wright, N. A. (2004). Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* **53**(6), 899-910.
- Broker, L. E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**(9), 3155-62.
- Butikofer, P., Kuypers, F. A., Xu, C. M., Chiu, D. T., and Lubin, B. (1989). Enrichment of two glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, acetylcholinesterase and decay accelerating factor, in vesicles released from human red blood cells. *Blood* **74**(5), 1481-5.
- Cai, S., Bulus, N., Fonseca-Siesser, P. M., Chen, D., Hanks, S. K., Pozzi, A., and Zent, R. (2005). CD98 modulates integrin beta1 function in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 5), 889-99.
- Calderwood, D. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* **275**(30), 22607-10.
- Cameron, C. M., Barrett, J. W., Liu, L., Lucas, A. R., and McFadden, G. (2005). Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *J Virol* **79**(10), 6052-67.
- Cao, W., Rosen, D. B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* **203**(6), 1399-405.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392), 1318-21.
- Cario, E., and Podolsky, D. K. (2005). Intestinal epithelial TOLLerance versus IntOLLerance of commensals. *Mol Immunol* **42**(8), 887-93.

- Carroll, K. M., Wong, T. T., Drabik, D. L., and Chang, E. B. (1988). Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol* **254**(3 Pt 1), G355-60.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**(16), 2825-37.
- Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., and Brouckaert, P. (2003). Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* **4**(4), 387-93.
- Clark, D. A., Keil, A., Chen, Z., Markert, U., Manuel, J., and Gorczynski, R. M. (2003). Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2). *Am J Reprod Immunol* **50**(3), 187-95.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* **186**(11), 1809-18.
- Coll, J. L., Ben-Ze'ev, A., Ezzell, R. M., Rodriguez Fernandez, J. L., Baribault, H., Oshima, R. G., and Adamson, E. D. (1995). Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20), 9161-5.
- Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1), 133-9.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**(3), 705-11.
- Cheng, T. L., Symons, M., and Jou, T. S. (2004). Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res* **295**(2), 497-511.
- Cherwinski, H. M., Murphy, C. A., Joyce, B. L., Bigler, M. E., Song, Y. S., Zurawski, S. M., Moshrefi, M. M., Gorman, D. M., Miller, K. L., Zhang, S., Sedgwick, J. D., and Phillips, J. H. (2005). The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol* **174**(3), 1348-56.
- Chiarugi, P., and Giannoni, E. (2008). Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*.
- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**(6524), 733-6.
- Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B., and Greenberg, M. E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* **6**(1), 41-51.
- De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* **133**(2), 417-30.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* **22**(53), 8543-67.
- Del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N. B., Meller, N., Hahn, K. M., and Schwartz, M. A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **4**(3), 232-9.

- Diamond, M. S., and Springer, T. A. (1994). The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* **4**(6), 506-17.
- Dignass, A. U., Baumgart, D. C., and Sturm, A. (2004). Review article: the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease--immunology and repair mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4**, 9-17.
- Distler, J. H., Huber, L. C., Hueber, A. J., Reich, C. F., 3rd, Gay, S., Distler, O., and Pisetsky, D. S. (2005). The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* **10**(4), 731-41.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E., and Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**(7003), 1034-9.
- Dufour, G., Demers, M. J., Gagne, D., Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J. F., Cheng, J. Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallee, K., and Vachon, P. H. (2004). Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* **279**(42), 44113-22.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**(3), 929-35.
- Fang, R., Olds, L. C., and Sibley, E. (2006). Spatio-temporal patterns of intestine-specific transcription factor expression during postnatal mouse gut development. *Gene Expr Patterns* **6**(4), 426-32.
- Fanger, N. A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R., and Borges, L. (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* **28**(11), 3423-34.
- Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C. L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., Radlwimmer, B., and Stange, E. F. (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* **79**(3), 439-48.
- Foster-Cuevas, M., Wright, G. J., Puklavec, M. J., Brown, M. H., and Barclay, A. N. (2004). Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol* **78**(14), 7667-76.
- Frisch, S. M. (1999). Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr Biol* **9**(18), 1047-9.
- Frisch, S. M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**(4), 619-26.
- Frisch, S. M., and Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**(5), 701-6.
- Frisch, S. M., and Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**(5), 555-62.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(11), 793-805.
- Gelderman, M. P., and Simak, J. (2008). Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* **484**, 79-93.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Grimaldi, G., Parri, M., Cialdai, F., Taddei, M. L., Raugei, G., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2008). Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ* **15**(5), 867-78.

- Gibson, P. R. (2004). Apoptosis or necrosis--colonic epithelial cell survival. *Novartis Found Symp* **263**, 133-45; discussion 145-50, 211-8.
- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1473-7.
- Gilley, J., Coffey, P. J., and Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* **162**(4), 613-22.
- Giuliano, M., Lauricella, M., Calvaruso, G., Carabillo, M., Emanuele, S., Vento, R., and Tesoriere, G. (1999). The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells. *Cancer Res* **59**(21), 5586-95.
- Gorczynski, R. M. (2001). Evidence for an immunoregulatory role of OX2 with its counter ligand (OX2L) in the regulation of transplant rejection, fetal loss, autoimmunity and tumor growth. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **49**(4), 303-9.
- Gorczynski, R. M., Chen, Z., Clark, D. A., Kai, Y., Lee, L., Nachman, J., Wong, S., and Marsden, P. (2004). Structural and functional heterogeneity in the CD200R family of immunoregulatory molecules and their expression at the feto-maternal interface. *Am J Reprod Immunol* **52**(2), 147-63.
- Gordon, J. N., Di Sabatino, A., and Macdonald, T. T. (2005). The pathophysiologic rationale for biological therapies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **21**(4), 431-7.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**(1), 1-4.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., and Hickman, J. A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5), 903-14.
- Grossmann, J., Maxson, J. M., Whitacre, C. M., Orosz, D. E., Berger, N. A., Fiocchi, C., and Levine, A. D. (1998). New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **153**(1), 53-62.
- Grossmann, J., Walther, K., Artinger, M., Kiessling, S., and Scholmerich, J. (2001). Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* **12**(3), 147-55.
- Gu, J., and Taniguchi, N. (2004). Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* **21**(1-2), 9-15.
- Guo, R. J., Suh, E. R., and Lynch, J. P. (2004). The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther* **3**(7), 593-601.
- Gutierrez-Gonzalez, L., and Wright, N. A. (2008). Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. *Dig Liver Dis* **40**(7), 510-22.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* **271**(8), 4138-42.
- Hahn, U., Stallmach, A., Hahn, E. G., and Riecken, E. O. (1990). Basement membrane components are potent promoters of rat intestinal epithelial cell differentiation in vitro. *Gastroenterology* **98**(2), 322-35.
- Halaby, D. M., Poupon, A., and Mornon, J. (1999). The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng* **12**(7), 563-71.
- Haller, D., Holt, L., Parlesak, A., Zanga, J., Bauerlein, A., Sartor, R. B., and Jobin, C. (2004). Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative

- bacteria-induced nuclear factor-kappaB activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells. *Immunology* **112**(2), 310-20.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., and Butcher, E. C. (1994). Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* **152**(7), 3282-93.
- Hansen, J. D., Du Pasquier, L., Lefranc, M. P., Lopez, V., Benmansour, A., and Boudinot, P. (2009). The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Mol Immunol* **46**(3), 457-72.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D., and Korsmeyer, S. J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* **3**(4), 413-22.
- Hauck, A. L., Swanson, K. S., Kenis, P. J., Leckband, D. E., Gaskins, H. R., and Schook, L. B. (2005). Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(1), 58-71.
- Hermiston, M. L., and Gordon, J. I. (1995). In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **129**(2), 489-506.
- Hoek, R. M., Ruuls, S. R., Murphy, C. A., Wright, G. J., Goddard, R., Zurawski, S. M., Blom, B., Homola, M. E., Streit, W. J., Brown, M. H., Barclay, A. N., and Sedgwick, J. D. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* **290**(5497), 1768-71.
- Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., and Anderson, J. M. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* **6**(6), 581-8.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**(4), 387-96.
- Huber, L. C., Jungel, A., Distler, J. H., Moritz, F., Gay, R. E., Michel, B. A., Pisetsky, D. S., Gay, S., and Distler, O. (2007). The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis* **12**(2), 363-74.
- Hungerford, J. E., Compton, M. T., Matter, M. L., Hoffstrom, B. G., and Otey, C. A. (1996). Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J Cell Biol* **135**(5), 1383-90.
- Hyoh, Y., Ishizaka, S., Horii, T., Fujiwara, A., Tegoshi, T., Yamada, M., and Arizono, N. (2002). Activation of caspases in intestinal villus epithelial cells of normal and nematode infected rats. *Gut* **50**(1), 71-7.
- Ilic, D., Almeida, E. A., Schlaepfer, D. D., Dazin, P., Aizawa, S., and Damsky, C. H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* **143**(2), 547-60.
- Jan, Y., Matter, M., Pai, J. T., Chen, Y. L., Pilch, J., Komatsu, M., Ong, E., Fukuda, M., and Ruoslahti, E. (2004). A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell* **116**(5), 751-62.
- Jenmalm, M. C., Cherwinski, H., Bowman, E. P., Phillips, J. H., and Sedgwick, J. D. (2006). Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol* **176**(1), 191-9.

- Jin, S., Pang, R. P., Shen, J. N., Huang, G., Wang, J., and Zhou, J. G. (2007). Grifolin induces apoptosis via inhibition of PI3K/AKT signalling pathway in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* **12**(7), 1317-26.
- Johnson, R. P., and Craig, S. W. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem* **269**(17), 12611-9.
- Johnson, R. P., and Craig, S. W. (1995). F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature* **373**(6511), 261-4.
- Joseph, R. R., Yazer, E., Hanakawa, Y., and Stadnyk, A. W. (2005). Prostaglandins and activation of AC/cAMP prevents anoikis in IEC-18. *Apoptosis* **10**(6), 1221-33.
- Karam, S. M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**, D286-98.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4), 239-57.
- Kiessling, S., Muller-Newen, G., Leeb, S. N., Hausmann, M., Rath, H. C., Strater, J., Spottl, T., Schlottmann, K., Grossmann, J., Montero-Julian, F. A., Scholmerich, J., Andus, T., Buschauer, A., Heinrich, P. C., and Rogler, G. (2004). Functional expression of the interleukin-11 receptor alpha-chain and evidence of antiapoptotic effects in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* **279**(11), 10304-15.
- Kim, D. K., Cho, E. S., and Um, H. D. (2000). Caspase-dependent and -independent events in apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* **257**(1), 82-8.
- Kleinman, H. K., and Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **15**(5), 378-86.
- Kojima, H., Tanaka, Y., Tanaka, T., Miyazaki, H., Shiwa, M., Kamide, Y., and Moriyama, H. (1998). Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**(3), 261-4.
- Kolios, G., Petoumenos, C., and Nakos, A. (1998). Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. *Hepatology* **45**(23), 1601-9.
- Koning, N., Bo, L., Hoek, R. M., and Huitinga, I. (2007). Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **62**(5), 504-14.
- Kook, S., Shim, S. R., Choi, S. J., Ahn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., Jung, Y. K., Paik, S. G., and Song, W. K. (2000). Caspase-mediated cleavage of p130cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells. *Mol Biol Cell* **11**(3), 929-39.
- Kops, G. J., and Burgering, B. M. (1999). Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* **77**(9), 656-65.
- Krestow, J. K., Rak, J., Filmus, J., and Kerbel, R. S. (1999). Functional dissociation of anoikis-like cell death and activity of stress activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1), 48-53.
- Kriegelstein, C. F., Cerwinka, W. H., Sprague, A. G., Laroux, F. S., Grisham, M. B., Kotliansky, V. E., Senninger, N., Granger, D. N., and de Fougères, A. R. (2002). Collagen-binding integrin alpha1beta1 regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Invest* **110**(12), 1773-82.
- Kurokawa, M., Lynch, K., and Podolsky, D. K. (1987). Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits

- proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **142**(3), 775-82.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**(3), 331-42.
- Laerum, O. D., Illemann, M., Skarstein, A., Helgeland, L., Ovrebo, K., Dano, K., and Nielsen, B. S. (2008). Crohn's disease but not chronic ulcerative colitis induces the expression of PAI-1 in enteric neurons. *Am J Gastroenterol* **103**(9), 2350-8.
- Landowski, C. P., Anderle, P., Sun, D., Sadee, W., and Amidon, G. L. (2004). Transporter and ion channel gene expression after Caco-2 cell differentiation using 2 different microarray technologies. *AAPS J* **6**(3), e21.
- Lanzoni, G., Roda, G., Belluzzi, A., Roda, E., and Bagnara, G. P. (2008). Inflammatory bowel disease: Moving toward a stem cell-based therapy. *World J Gastroenterol* **14**(29), 4616-26.
- LeBleu, V. S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**(9), 1121-9.
- Lee, J., Gonzales-Navajas, J. M., and Raz, E. (2008). The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol* **30**(1), 3-9.
- Lee, S., Ha, I. S., Kim, J. H., Park, K. S., Han, K. H., Kim, S. H., Chae, Y. C., Kim, Y. H., Suh, P. G., Ryu, S. H., Kim, J. E., Bang, K., Hwang, J. I., Yang, J., Park, K. W., Chung, J., and Ahn, C. (2008). Hydrogen peroxide-induced VCAM-1 expression in pancreatic islets and beta-cells through extracellular Ca²⁺ influx. *Transplantation* **86**(9), 1257-66.
- Leroyer, A. S., Tedgui, A., and Boulanger, C. M. (2008). Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* **263**(5), 528-37.
- Levy, P., Loreal, O., Munier, A., Yamada, Y., Picard, J., Cherqui, G., Clement, B., and Capeau, J. (1994). Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line is correlated with down-regulation of fibronectin and laminin. *FEBS Lett* **338**(3), 272-6.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., and O'Neill, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **5**(6), 446-58.
- Liu, Y. J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* **23**, 275-306.
- Lugering, A., Lebedez, P., Koch, S., and Kucharzik, T. (2006). Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann N Y Acad Sci* **1072**, 62-77.
- Lussier, C., Basora, N., Bouatrous, Y., and Beaulieu, J. F. (2000). Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* **51**(2), 169-78.
- Maheshwari, A., Misro, M. M., Aggarwal, A., Sharma, R. K., and Nandan, D. (2009). Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H₂O₂ in vitro. *FEBS J* **276**(3), 870-81.
- Mahoney, Z. X., Stappenbeck, T. S., and Miner, J. H. (2008). Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J Cell Sci* **121**(Pt 15), 2493-502.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**(7), 1261-74.

- Marani, M., Hancock, D., Lopes, R., Tenev, T., Downward, J., and Lemoine, N. R. (2004). Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* **23**(14), 2431-41.
- Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., and Mongiat, M. (2008). Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* **49**(3), 203-6.
- Mariadason, J. M., Arango, D., Corner, G. A., Aranes, M. J., Hotchkiss, K. A., Yang, W., and Augenlicht, L. H. (2002). A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro. *Cancer Res* **62**(16), 4791-804.
- Mariadason, J. M., Nicholas, C., L'Italien, K. E., Zhuang, M., Smartt, H. J., Heerdt, B. G., Yang, W., Corner, G. A., Wilson, A. J., Klampfer, L., Arango, D., and Augenlicht, L. H. (2005). Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology* **128**(4), 1081-8.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24**(1), 91-8.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**(5), 1545-56.
- Martin, S. S., and Vuori, K. (2004). Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3), 145-57.
- Martinou, J. C., and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1), 63-7.
- Mathiasen, I. S., Sergeev, I. N., Bastholm, L., Elling, F., Norman, A. W., and Jaattela, M. (2002). Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem* **277**(34), 30738-45.
- Matter, M. L., and Ruoslahti, E. (2001). A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* **276**(30), 27757-63.
- McWhirter, J. R., Kretz-Rommel, A., Saven, A., Maruyama, T., Potter, K. N., Mockridge, C. I., Ravey, E. P., Qin, F., and Bowdish, K. S. (2006). Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4), 1041-6.
- Mitra, S. K., and Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* **18**(5), 516-23.
- Miyazaki, T., Shen, M., Fujikura, D., Tosa, N., Kim, H. R., Kon, S., Uede, T., and Reed, J. C. (2004). Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem* **279**(43), 44667-72.
- Moreaux, J., Veyrune, J. L., Reme, T., De Vos, J., and Klein, B. (2008). CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **366**(1), 117-22.
- Morozevich, G. E., Kozlova, N. I., Chubukina, A. N., and Berman, A. E. (2003). Role of integrin alphavbeta3 in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)* **68**(4), 416-23.
- Mousa, S. A. (2008). Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Mol Biotechnol* **38**(1), 33-40.
- Myzak, M. C., Ho, E., and Dashwood, R. H. (2006). Dietary agents as histone deacetylase inhibitors. *Mol Carcinog* **45**(6), 443-6.

- Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L., and Colonna, M. (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* **162**(1), 5-8.
- Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3), 683-94.
- Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**(5), 381-95.
- Okada, H., and Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**(8), 592-603.
- Olmo, N., Turnay, J., Perez-Ramos, P., Lecona, E., Barrasa, J. I., Lopez de Silanes, I., and Lizarbe, M. A. (2007). In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* **21**(2), 262-270.
- Oshima, A., Tsuji, A., Nagao, Y., Sakuraba, H., and Suzuki, Y. (1988). Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human beta-galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* **157**(1), 238-44.
- Pankov, R., Cukierman, E., Clark, K., Matsumoto, K., Hahn, C., Poulin, B., and Yamada, K. M. (2003). Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **278**(20), 18671-81.
- Pasterkamp, G., and de Kleijn, D. (2008). Microparticles, debris that hurts. *J Am Coll Cardiol* **52**(16), 1312-3.
- Perfettini, J. L., and Kroemer, G. (2003). Caspase activation is not death. *Nat Immunol* **4**(4), 308-10.
- Perreault, N., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (1995). Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Rec* **242**(2), 242-50.
- Piccin, A., Murphy, W. G., and Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* **21**(3), 157-71.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., and Ganz, T. (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* **59**(1), 156-70.
- Potten, C. S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* **115**(Pt 11), 2381-8.
- Preston, S., Wright, G. J., Starr, K., Barclay, A. N., and Brown, M. H. (1997). The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. *Eur J Immunol* **27**(8), 1911-8.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**(3), 287-96.
- Quaroni, A., Tian, J. Q., Goke, M., and Podolsky, D. K. (1999). Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol* **277**(5 Pt 1), G1027-40.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., and Kroemer, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**(9), 839-43.
- Reddig, P. J., and Juliano, R. L. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* **24**(3), 425-39.
- Reginato, M. J., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2003). Integrins and EGFR coordinately

- regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* **5**(8), 733-40.
- Riedl, S., Kadmon, M., Tandara, A., Hinz, U., Moller, P., Herfarth, C., and Faissner, A. (1998). Mucosal tenascin C content in inflammatory and neoplastic diseases of the large bowel. *Dis Colon Rectum* **41**(1), 86-92.
- Rijkers, E. S., de Ruiter, T., Baridi, A., Veninga, H., Hoek, R. M., and Meyaard, L. (2008). The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol Immunol* **45**(4), 1126-35.
- Rijkers, E. S., de Ruiter, T., Buitenhuis, M., Veninga, H., Hoek, R. M., and Meyaard, L. (2007). Ligation of CD200R by CD200 is not required for normal murine myelopoiesis. *Eur J Haematol* **79**(5), 410-6.
- Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**(6748), 86-90.
- Rosen, K., Coll, M. L., Li, A., and Filmus, J. (2001). Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **276**(40), 37273-9.
- Rosenblum, M. D., Olasz, E., Woodliff, J. E., Johnson, B. D., Konkol, M. C., Gerber, K. A., Orentas, R. J., Sandford, G., and Truitt, R. L. (2004). CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* **103**(7), 2691-8.
- Ruemmele, F. M., Schwartz, S., Seidman, E. G., Dionne, S., Levy, E., and Lentze, M. J. (2003). Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* **52**(1), 94-100.
- Ruoslahti, E. (1996). Integrin signaling and matrix assembly. *Tumour Biol* **17**(2), 117-24.
- Saksena, S., Gill, R. K., Tyagi, S., Alrefai, W. A., Ramaswamy, K., and Dudeja, P. K. (2008). Role of Fyn and PI3K in H2O2-induced inhibition of apical Cl-/OH-exchange activity in human intestinal epithelial cells. *Biochem J* **416**(1), 99-108.
- Sambrook, J. F., EF., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual."
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **15**(6), 763-70.
- Sanders, D. S. (2005). Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease. *J Clin Pathol* **58**(6), 568-72.
- Sanders, M. A., and Basson, M. D. (2004). Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**(4), G547-57.
- Satsangi, J. (2008). Gene discovery in IBD: a decade of progress. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **46 Suppl 1**, E1-2.
- Scheele, S., Nystrom, A., Durbeej, M., Talts, J. F., Ekblom, M., and Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med* **85**(8), 825-36.
- Schlottmann, K., Wachs, F. P., Grossmann, J., Vogl, D., Maendel, M., Falk, W., Scholmerich, J., Andus, T., and Rogler, G. (2004). Interferon gamma downregulates IL-8 production in primary human colonic epithelial cells without induction of apoptosis. *Int J Colorectal Dis* **19**(5), 421-9.
- Seomun, Y., Kim, J. T., Kim, H. S., Park, J. Y., and Joo, C. K. (2005). Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H2O2-treated lens epithelial cells. *Mol Vis* **11**, 764-74.

- Shen, X., and Kramer, R. H. (2004). Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* **165**(4), 1315-29.
- Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**(18), 2233-8.
- Shim, S. R., Kook, S., Kim, J. I., and Song, W. K. (2001). Degradation of focal adhesion proteins paxillin and p130cas by caspases or calpains in apoptotic rat-1 and L929 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(3), 601-8.
- Shintani, T., and Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**(5698), 990-5.
- Shiratori, I., Yamaguchi, M., Suzukawa, M., Yamamoto, K., Lanier, L. L., Saito, T., and Arase, H. (2005). Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *J Immunol* **175**(7), 4441-9.
- Silberg, D. G., Swain, G. P., Suh, E. R., and Traber, P. G. (2000). Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* **119**(4), 961-71.
- Simelyte, E., Criado, G., Essex, D., Uger, R. A., Feldmann, M., and Williams, R. O. (2008). CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(4), 1038-43.
- Simon-Assmann, P., Duclos, B., Orian-Rousseau, V., Arnold, C., Mathelin, C., Engvall, E., and Kedinger, M. (1994). Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* **201**(1), 71-85.
- Simon-Assmann, P., and Kedinger, M. (2000). Tissue recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. *Methods Mol Biol* **139**, 311-9.
- Snoeck, V., Goddeeris, B., and Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* **7**(7-8), 997-1004.
- Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J., and Bredesen, D. E. (2004). Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* **11**(10), 1066-75.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**(2), 301-14.
- Sterling, K. M., Jr., and Cutroneo, K. R. (2002). Differentiation-dependent induction of CYP1A1 in cultured rat small intestinal epithelial cells, colonocytes, and human colon carcinoma cells: basement membrane-mediated apoptosis. *J Cell Biochem* **86**(3), 440-50.
- Strader, A. D., and Woods, S. C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* **128**(1), 175-91.
- Stupack, D. G., and Chersesh, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* **115**(Pt 19), 3729-38.
- Suciu-Foca, N., Feirt, N., Zhang, Q. Y., Vlad, G., Liu, Z., Lin, H., Chang, C. C., Ho, E. K., Colovai, A. I., Kaufman, H., D'Agati, V. D., Thaker, H. M., Remotti, H., Galluzzo, S., Cinti, P., Rabitti, C., Allendorf, J., Chabot, J., Caricato, M., Coppola, R., Berloco, P., and Cortesini, R. (2007). Soluble Ig-like transcript 3 inhibits tumor allograft rejection in humanized SCID mice and T cell responses in cancer patients. *J Immunol* **178**(11), 7432-41.

- Tanaka, H., Yoshida, K., Okamura, H., Morimoto, H., Nagata, T., and Haneji, T. (2007). Calyculin A induces apoptosis and stimulates phosphorylation of p65NF-kappaB in human osteoblastic osteosarcoma MG63 cells. *Int J Oncol* **31**(2), 389-96.
- Taylor, C. T. (2004). Regulation of intestinal epithelial gene expression in hypoxia. *Kidney Int* **66**(2), 528-31.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., and Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Moll Cell Biol* **9**, 10.
- Tenca, C., Merlo, A., Merck, E., Bates, E. E., Saverino, D., Simone, R., Zarcone, D., Trinchieri, G., Grossi, C. E., and Ciccone, E. (2005). CD85j (leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2) inhibits human osteoclast-associated receptor-mediated activation of human dendritic cells. *J Immunol* **174**(11), 6757-63.
- Thomas, R. P., Rajaraman, S., and Evers, B. M. (2003). Effect of ileocolonic transposition on gut morphology, gene expression, and function. *J Surg Res* **109**(1), 31-6.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-80.
- Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. (2002). beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* **277**(27), 24667-75.
- Torres, M. I., and Rios, A. (2008). Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* **14**(13), 1972-80.
- Traber, P. G., and Silberg, D. G. (1996). Intestine-specific gene transcription. *Annu Rev Physiol* **58**, 275-97.
- Tsianos, E. V., and Katsanos, K. (2009). Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol* **15**(5), 521-5.
- Tsukamoto, T., Mizoshita, T., and Tatematsu, M. (2006). Gastric-and-intestinal mixed-type intestinal metaplasia: aberrant expression of transcription factors and stem cell intestinalization. *Gastric Cancer* **9**(3), 156-66.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells* **3**(9), 569-73.
- Tumbarello, D. A., Brown, M. C., and Turner, C. E. (2002). The paxillin LD motifs. *FEBS Lett* **513**(1), 114-8.
- Vachon, P. H. (2006). [Cell survival: differences and differentiation]. *Med Sci (Paris)* **22**(4), 423-9.
- Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* **103**(2), 414-23.
- Valentijn, A. J., Zouq, N., and Gilmore, A. P. (2004). Anoikis. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3), 421-5.
- Van Beers, E. H., Buller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W., and Dekker, J. (1995). Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**(3), 197-262.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression

- on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**(1), 39-51.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **84**(10), 627-39.
- Vieites, J. M., de la Torre, R., Ortega, M. A., Montero, T., Peco, J. M., Sanchez-Pozo, A., Gil, A., and Suarez, A. (2003). Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13. *Gene* **311**, 99-104.
- Vieites, J. M., Sánchez-Pozo, A., G., A., and Suárez, A. (2005). Desarrollo de un protocolo de análisis de la expresión génica mediante "differential display" que reduce el número de falsos positivos. *Ars Pharmaceutica* **46**, 193-204.
- Viertlboeck, B. C., Hanczaruk, M. A., Schmitt, F. C., Schmitt, R., and Gobel, T. W. (2008). Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Mol Immunol* **45**(7), 2097-105.
- von Stein, P., Lofberg, R., Kuznetsov, N. V., Gielen, A. W., Persson, J. O., Sundberg, R., Hellstrom, K., Eriksson, A., Befrits, R., Ost, A., and von Stein, O. D. (2008). Multigene analysis can discriminate between ulcerative colitis, Crohn's disease, and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **134**(7), 1869-81; quiz 2153-4.
- Wang, L. H. (2004). Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* **71**(6), 361-7.
- Wang, P., Valentijn, A. J., Gilmore, A. P., and Streuli, C. H. (2003). Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. *J Biol Chem* **278**(22), 19917-25.
- Wang, X. J., Ye, M., Zhang, Y. H., and Chen, S. D. (2007). CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**(3), 259-64.
- Wang, Y., Li, X., Wang, L., Ding, P., Zhang, Y., Han, W., and Ma, D. (2004). An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J Cell Sci* **117**(Pt 8), 1525-32.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**(5), 625-34.
- Widmann, C., Gibson, S., and Johnson, G. L. (1998). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* **273**(12), 7141-7.
- Wolpert, S. I., Lally, K. M., Li, J., Wang, J. Y., and Bass, B. L. (1999). Extracellular matrix modulates enterocyte growth via downregulation of c-jun but is independent of p21 and p27 expression. *J Gastrointest Surg* **3**(3), 319-24.
- Wright, G. J., Cherwinski, H., Foster-Cuevas, M., Brooke, G., Puklavec, M. J., Bigler, M., Song, Y., Jenmalm, M., Gorman, D., McClanahan, T., Liu, M. R., Brown, M. H., Sedgwick, J. D., Phillips, J. H., and Barclay, A. N. (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* **171**(6), 3034-46.
- Wright, G. J., Puklavec, M. J., Willis, A. C., Hoek, R. M., Sedgwick, J. D., Brown, M. H., and Barclay, A. N. (2000). Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* **13**(2), 233-42.
- Wu, C. (2001). ILK interactions. *J Cell Sci* **114**(Pt 14), 2549-50.
- Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. A. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast

- survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* **279**(31), 33024-34.
- Yamada, K. M., and Miyamoto, S. (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* **7**(5), 681-9.
- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* **356**(6364), 63-6.
- Young B, H. J. (2000). "Wheater's functional histology." 4th ed. C. Livingstone, St. Louis.
- Yu, D., Schwartz, M. Z., and Petryshyn, R. (1998). Effect of laminin on the nuclear localization of nucleolin in rat intestinal epithelial IEC-6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1), 186-92.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1), 67-71.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**(4), 619-28.
- Zhang, H. M., Rao, J. N., Guo, X., Liu, L., Zou, T., Turner, D. J., and Wang, J. Y. (2004a). Akt kinase activation blocks apoptosis in intestinal epithelial cells by inhibiting caspase-3 after polyamine depletion. *J Biol Chem* **279**(21), 22539-47.
- Zhang, S., Cherwinski, H., Sedgwick, J. D., and Phillips, J. H. (2004b). Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol* **173**(11), 6786-93.
- Zhang, S., and Phillips, J. H. (2006). Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol* **79**(2), 363-8.