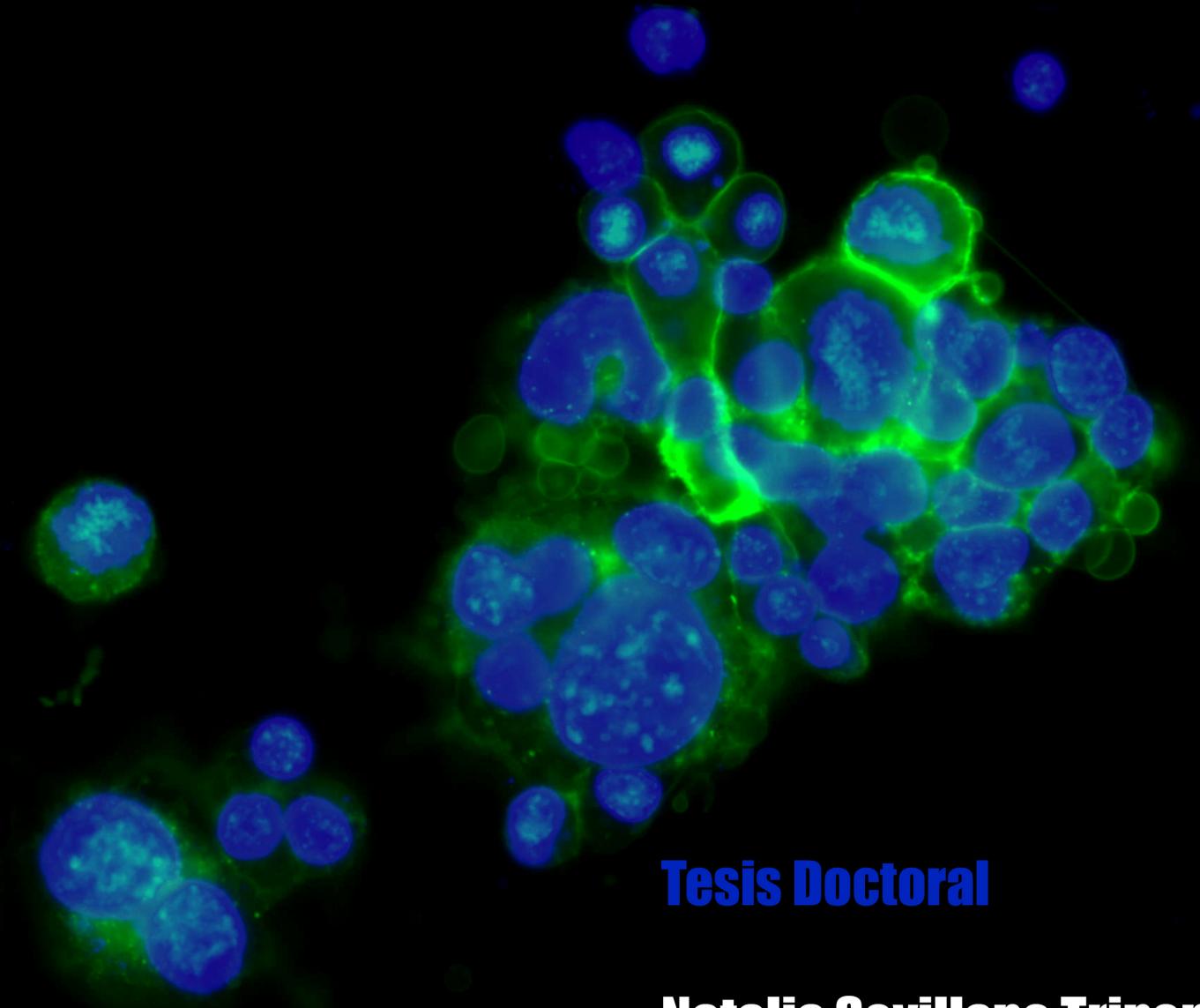


Mecanismos de Modulación de la Transducción de Señales Dependiente del Receptor de Productos Avanzados de Glicación



Tesis Doctoral

Natalia Sevillano Tripero



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

**Mecanismos de Modulación de la Transducción de
Señales Dependiente del Receptor de Productos
Avanzados de Glicación**



Natalia Sevillano Tripero

Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
2008

Mecanismos de Modulación de la Transducción de Señales Dependiente del Receptor de Productos Avanzados de Glicación

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctora en Farmacia por la Licenciada Dña. Natalia Sevillano Tripero, dirigida por los Drs. María Dolores Girón González y Rafael Salto González.

Directores:

María Dolores Girón González

Rafael Salto González

Licenciada:

Natalia Sevillano Tripero

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada durante los cursos académicos 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007 y 2007-2008 para lo cual la doctoranda ha disfrutado de una Beca Predoctoral de la Fundación Ramón Areces. Los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por los Proyectos PB98-1292 *“Expresión diferencial y caracterización de las diferentes isoformas del receptor de productos avanzados de glicosilación (RAGEs)”*, PAI-2003 *“Efecto Antidiabético del Tungstato Sódico. Implicaciones en el Transporte de Glucosa al Músculo y en la Prevención del Síndrome Diabético Tardío”* y por las ayudas a la investigación de la Junta de Andalucía al grupo CVI-212.

Parte de los resultados que se recogen en esta Tesis Doctoral han sido presentados en los XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX y XXX Congresos de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

AGRADECIMIENTOS

“Tener gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo” William Arthur Ward

A mis directores de tesis, por toda vuestra ayuda durante todos estos años, a Rafa, porque a pesar de todo, has confiado en mí para hacer este trabajo, por tus consejos, no sólo en temas de trabajo, por tu “sentido del humor” y por el diseño de la portada de la tesis. A Loles, por ser compañera, amiga, cómplice, por esos momentos de “cotilleo” que nos hacían olvidarnos de los problemillas, por hacerme sentir útil e importante. Muchas gracias a los dos.

A Alberto, por aceptar que formara parte de tu grupo de investigación, por seguir de cerca este trabajo y por tu ayuda para conseguir el próximo contrato. A M^a Lola, la directora del departamento, gracias por el interés mostrado, por animarnos a seguir en la investigación, aunque nosotras lo veamos todo negro, por firmar todos los papeles..., muchas gracias y suerte en tu nueva etapa como vicerrectora.

A todos los profesores del departamento en especial a Mercedes por “sufrir” con nosotros esta tesis, por tus consejos y apoyo. A María del Mar, por tu interés durante toda la tesis, a Marina y a Paloma, por tener siempre una sonrisa y algo agradable que decir, a Fermín por tu sentido del humor y por enseñarnos un poquito de ciencia en las sobremesas, a Luis por dejarnos tu microscopio de fluorescencia, que ha sido muy útil para las fotos de última hora. A Olga y Fermín Jr. por vuestro interés y compañía en comidas y sobremesas. A Antonio Suárez, por animar las fiestas con tu música y bailes. A Ángel, M^a Flor, M^a José, José Luis y Antonio Sánchez Pozo.

A José Antonio Girón y a Clotilde Fernández “Cloti”, por acogerme durante una semana en Cádiz, y hacerme sentir como en casa. A José Vilches y a Mercedes Salido, por toda vuestra ayuda con la microscopía confocal, parte del trabajo de esta tesis no hubiera sido posible sin vuestra ayuda, muchas gracias.

A Antonio González y a Nicolás por vuestra ayuda en la obtención de los anticuerpos, por hacernos las “excursiones” a Restabal mucho más divertidas y agradables.

A todo el Departamento de Investigación de Abbott, por dejarnos su microscopio de fluorescencia, en especial a Manolo Manzano, por su ayuda con la citometría de flujo. Al Departamento de Farmacología, por dejarnos usar su luminómetro siempre que nos ha hecho falta.

A Carmen y a Lola, por venir sin protestar algunos días de fiesta para terminar la tesis, por poner el toque divertido a la Navidad trabajando, muchas gracias a las dos.

A Carmen, la secretaria del departamento, gracias por tu ayuda en todo el papeleo, dietas de los congresos, cartas de la fundación..., sin los que no hubiera sido posible hacer esta tesis. A Pablo y a José Manuel por su ayuda en las prácticas.

A mi hermana Laura, aunque en tan poco espacio no puedo decir todo lo que me gustaría, gracias por ser el principal y a veces el único apoyo que he tenido durante esta tesis, y en todos y cada uno de los segundos de nuestras vidas, gracias por acompañarme al laboratorio los fines de semana para cambiar las células y por “sufrir” igual que yo esta tesis, que también es tuya, y como decías en tu tesis ya somos doctoras del todo, MUCHAS GRACIAS.

A todos mis compañeros de laboratorio, por todos los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio, por el viernes de la cerveza que nos hacía olvidarnos un rato de los malos ratos de la ciencia, por la compañía en las comidas, por las sobremesas..., por si después me olvido de alguno gracias a todos.

A José Juan, que me enseñó a dar los primeros pasos en la ciencia, a Quique, Nieves y en especial a Alex, que aunque ha sido poco el tiempo compartido, todos habéis tenido algo que ver en esta tesis.

A Dámaso por tu ayuda en todo momento, por ser durante estos cinco años un apoyo importante en todo lo relacionado con la tesis, y por todos los buenos momentos que hemos pasado jugando a la *Play*, también a Vanesa que ya es una más del grupo. A Pili, gracias por estar siempre dispuesta a animarnos, por tus consejos (que hemos echado de menos estos tres meses), por supuesto también a Baldo, por todos los días que hemos ido de tapillas, cafés.... A Anabel, por tu compañía, por tu amistad, muchísimas gracias. A María, que aunque acaba de llegar, es una muy buena amiga.

A M^a José y a M^a Ángeles, gracias por vuestros consejos al principio y al final de la tesis, por preocuparos por todos. A Raúl, un amigo para toda la vida, gracias por tu interés a pesar de la distancia. A Olga F., por tu amistad y apoyo, mucho ánimo, que todo llega.

A Trini, que empezó con nosotras. A Alí, Víctor, José María, Enrique, Sergio, Asmae, M^a Carmen, gracias a todos.

A todos mis compañeros de carrera y amigos, Sandra, Eva, Nieves, Isa, Irene, María, Javi, Nama'a, Ía, Teresa, Pilar, Ana, Cristina, y las nuevas incorporaciones del

grupo, gracias porque gracias a vosotros es fácil desconectar por los menos el fin de semana, y habéis hecho que esto sea mucho más fácil y divertido. Muchas gracias también a todos los compañeros del departamento de Microbiología, en especial a Magda, por tu ayuda en todo momento, por las charlas al final de la tarde (o noche) en el laboratorio, que hacían el trabajo más ameno y por dejarme algunas células.

A mi familia, a mi hermano Alberto, por todos tus consejos y ayuda, por entendernos, por ser tan especial, no cambies nunca. A mi hermana Silvia y a Eduardo, porque también han sido importantes en esta tesis. A mis padres, porque esto no hubiera sido posible sin vuestro apoyo y ayuda, muchas gracias.

ABREVIATURAS

A β : Amiloide β -péptido

AGEs: Productos Avanzados de Glicación

Apo E: Apolipoproteína E

ARE: Secuencia Rica en Adeninas y Timinas

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CML: N-Carboximetil-Lisina

CREB: Proteína de unión al Elemento de Respuesta al cAMP

DAPI: Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol

dATP: desoxi Adenosina Trifosfato

DEPC: Dietil Pirocarbonato

DM: Diabetes mellitus

DMEM: Dulbeco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

DN-RAGE: Delección del dominio citosólico del RAGE

DO: Densidad Óptica

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetraacético

EGTA: Ácido Etilen Glicol Tetraacético

EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

ERK: Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares Dependientes de MAPK

FEEL: Receptor *scavenger "fasciclin EGF-like", "laminin-type EGF-like"*

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

G-418: Geneticina

GFP: Proteína Fluorescente Verde

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico

Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleuquinas
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IRS: Insulin Receptor Substrate
JAK/STAT: Janus Quinasa/Transductores y Activadores de la Transcripción
LB: medio Luria-Bertani
LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad
LOX-1: Receptor "*lectin-like*" de Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidadas
MALDI-TOF: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo
MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
MBP: Proteína de unión a maltosa
MMPs: Metaloproteinasas de matriz
NADPH: Nicotiamida Adenina Dinucleotido Fosfato reducido
NF- κ B: Factor Nuclear κ B
NP-40: Nonidet P-40
OST: Complejo de la Oligosacaril Transferasa
PAGE: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampón Fosfato Salino)
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG: Polietilenglicol
PKC: Proteína Kinasa C
PMSF: Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
poly dI-dC: poli(desoxi-inosina- desoxi-citidina), sal sódica
PPAR: Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales
5'-RACE: 5'-*Rapid Amplification cDNA ends*
RAGE: Receptor de Productos Avanzados de Glicación

RNA: Ácido Ribonucleico
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rpm: Revoluciones por minuto
SDS: Dodecil Sulfato Sódico
Sp1: Proteína Estimuladora 1
sRAGE: RAGE soluble
SSC: Tampón Citrato Sódico
STZ: Estreptozotocina
TAE: Tampón Tris Acetato EDTA
TBE: Tampón Tris Borato EDTA
TBS: Tampón Tris Salino
TE: Tampón Tris/EDTA
TEMED: N, N, N', N' - Tetrametilendiamina
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TGS: Tampón Tris Glicina SDS
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α
Tris: Tris Hidroximetil Amino Metano
UTR: Región No Traducida
VCAM: Molécula de Adhesión de Células Vasculares
VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
 Δ : Delección

INDICE

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	23
II.- ANTECEDENTES	29
II.1.-DIABETES	31
II.2.-PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICACIÓN	35
II.2.1.- Formación de AGEs	36
II.2.2.- Mecanismos de toxicidad de los AGEs	40
II.2.2.1.- Alteración de la estructura y función de proteínas intracelulares	40
II.2.2.2.- Alteración de proteínas de la matriz extracelular	40
II.2.2.3.- Interacción con receptores celulares	42
II.3.- RECEPTORES DE LOS AGEs	43
II.4.- RECEPTOR DE PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICACIÓN (RAGE)	45
II.4.1.- Ligandos del RAGE	46
II.4.2.- Señalización celular inducida por RAGE	48
II.5.- INTERACCIÓN RAGE-LIGANDOS. PATOLOGÍAS ASOCIADAS	50
II.5.1.- Interacción AGE-RAGE. Complicaciones de la diabetes	51
II.5.1.1.- RAGE y enfermedad macrovascular diabética	51
II.5.1.2.- RAGE y enfermedad microvascular diabética	53
II.5.1.3.- RAGE y otras complicaciones de la diabetes	56
II.5.2.-Interacción Fibras en hoja plegada β -RAGE	56
II.5.3.- Interacción S100/calgranulinas-RAGE	57
II.5.4.- Interacción Anfoterina-RAGE	59
II.6.- VARIABILIDAD GENÉTICA DEL RAGE	61
II.7.- PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE. APLICACIONES	67
III.- OBJETIVOS	71

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	75
IV.1.- MATERIALES	77
IV.1.1.- LÍNEAS CELULARES	77
IV.1.1.1.- Cepas Bacterianas	77
IV.1.1.2.- Líneas celulares de mamíferos	77
IV.1.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	79
IV.1.3.- MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR	79
IV.1.3.1.- Vectores	79
IV.1.3.2.- Oligonucleótidos	84
IV.1.3.3.- Reactivos comerciales utilizados en técnicas de Biología Molecular	85
IV.1.4.- MATERIAL PARA CULTIVO DE CÉLULAS	86
IV.1.4.1.- Medios de cultivo para bacterias	86
IV.1.4.2.- Medios de cultivo para líneas celulares de mamíferos	88
IV.1.5.- MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	88
IV.1.5.1.- Reactivos comerciales utilizados en técnicas de análisis de proteínas	88
IV.2.- INSTRUMENTACIÓN	89
IV.2.1.- PARA CULTIVOS BACTERIANOS	89
IV.2.2.- PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS	90
IV.2.3.- PARA EL ANÁLISIS Y LA MANIPULACIÓN DE DNA, RNA Y PROTEÍNAS	90
IV.2.4.- ESPECTROFOTÓMETROS, FLUORÍMETROS Y LUMINÓMETROS	90
IV.2.5.- MICROSCOPIOS ÓPTICOS, DE FLUORESCENCIA Y CONFOCALES	91
IV.2.6.- CENTRÍFUGAS	91

IV.3.- SOFTWARE	91
IV.4.- MÉTODOS	92
IV.4.1.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	92
IV.4.1.1.- Aislamiento de DNA plasmídico	92
IV.4.1.2.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	94
IV.4.1.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos	95
IV.4.1.4.- Técnicas básicas de manipulación de DNA	96
IV.4.1.5.- Técnicas básicas de manipulación de RNA	98
IV.4.1.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
IV.4.1.7.- Secuenciación de DNA	101
IV.4.1.8.- <i>Southern-blot</i>	102
IV.4.1.9.- <i>Northern Blot</i>	105
IV.4.1.10.- <i>5'-Rapid Amplification cDNA ends (5'-RACE)</i>	106
IV.4.1.11.- EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	107
IV.4.1.12.- Análisis de la actividad promotora	110
IV.4.2.- MÉTODOS DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS	111
IV.4.2.1.- Tripsinización	111
IV.4.2.2.- Conservación de líneas celulares	111
IV.4.2.3.- Transfección	112
IV.4.2.4.- Determinación de la fosforilación de proteínas en células eucariotas	113
IV.4.2.5.- Determinación del Transporte de glucosa en células eucariotas	113
IV.4.2.6.- Microscopía confocal	114
IV.4.3.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	115
IV.4.3.1.- Cuantificación de proteínas	115

IV.4.3.2.- Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	116
IV.4.3.3.- <i>Western-blot</i>	118
IV.4.3.4.- Fraccionamiento subcelular	119
IV.4.3.5.- Expresión y purificación de proteínas recombinantes	120
IV.4.3.6.-Preparación de BSA-AGEs	121
IV.4.3.7.-Marcaje de proteínas con fluoróforos	122
IV.4.4.- TÉCNICAS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	122
IV.4.4.1.- Inducción de una diabetes experimental	122
IV.4.4.2.- Obtención y caracterización de anticuerpos	123
V.- RESULTADOS	125
V.1.- EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS DISTINTOS DOMINIOS DEL RAGE	127
V.1.1.- Expresión, Purificación y Caracterización de la proteína de fusión MBP-V1	130
V.1.2.- Expresión, Purificación y Obtención de Anticuerpos frente a la Proteína de Fusión MBP-Cito	134
V.2.- EXPRESIÓN EUCARIOTA DEL RAGE FUSIONADO A LA GFP	137
V.2.1.- Diseño de la construcción	137
V.2.2.- Localización subcelular de la proteína RAGE-GFP	141
V.2.3.- Capacidad de unión a ligandos de la proteína RAGE-GFP	146
V.2.4.- Capacidad de Generación de Señales Intracelulares mediada por la Proteína RAGE-GFP	149
V.3.- PAPEL DE LA INTERNALIZACIÓN DEL RAGE EN LA GENERACIÓN DE RESPUESTAS INTRACELULARES	153

V.4.- USO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON LA GFP PARA EL ESTUDIO DE LA ISOFORMA DEL RECEPTOR DE AGES CARENTE DEL EXÓN 9	158
V.5.- GENERACIÓN DE ISOFORMAS DEL RAGE DE RATA MEDIANTE EL USO DE INICIOS ALTERNATIVOS DE LA TRANSCRIPCIÓN. RELEVANCIA DE LA ISFORMA GENERADA	168
V.6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE AGEs DE RATA	177
V.6.1.- Estudio de la actividad promotora del RAGE de rata	178
V.6.2.- Influencia de la región 3'-no traducida del mRNA del RAGE de rata en el control de la expresión génica	184
V.7.- NUEVAS VARIANTES DEL mRNA DEL RECEPTOR DE AGEs HUMANO	191
V.7.1.- Análisis de las isoformas generadas por <i>splicing</i> alternativo en la región codificante del mRNA del RAGE humano	191
V.7.2.- Influencia de la región 3'-no traducida del mRNA del RAGE humano en la regulación de la expresión génica	193
V.8.- PAPEL DEL RAGE EN LA MODULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN CÉLULAS MUSCULARES	201
VI.- DISCUSIÓN	205
VII.- CONCLUSIONES	233
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	237

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

Las complicaciones a largo plazo que se producen en los pacientes diabéticos constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las sociedades avanzadas y en desarrollo. A este conjunto de alteraciones, que la diabetes origina a largo plazo, y que se deben a una hiperglucemia mantenida en el tiempo, se les ha dado el nombre de síndrome diabético tardío.

La hiperglucemia crónica asociada a la diabetes da lugar a la glicación no enzimática de proteínas al reaccionar azúcares reductores como la glucosa con los grupos amino libres de las proteínas. Tras la unión del azúcar a la proteína se produce una cascada de reacciones que hacen que las proteínas glicadas reversiblemente, se transformen de manera irreversible en los denominados productos avanzados de glicación (AGEs). Esta glicación es una de las principales causas de las complicaciones a largo plazo de la diabetes.

Se han identificado varios receptores para los productos avanzados de glicación cuya expresión está incrementada en la diabetes. La mayoría de ellos retiran AGEs circulantes por endocitosis, sin embargo, la unión de AGEs al RAGE (Receptor de productos avanzados de glicación), desencadena una serie de respuestas intracelulares que pueden formar parte de la patogénesis de las complicaciones de la diabetes.

Aunque en la diabetes la unión de los AGEs a su receptor no es la única causa de morbilidad, la implicación del receptor de AGEs en estos procesos es clara. Por tanto, la caracterización del receptor y el estudio de las respuestas intracelulares que se generan, como consecuencia de la interacción ligando-receptor, es de interés

para buscar dianas moleculares que prevengan el inicio, la progresión y/o la degeneración de la funcionalidad de los órganos afectados por esta patología.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se ha descrito que el receptor de rata presenta un alto grado de variabilidad. Existen dos isoformas, generadas por *splicing* alternativo (Girón *et al.*, 1998). Además el gen del RAGE de rata presenta dos señales de poliadenilación funcionales, esto hace que se generen dos isoformas que difieren en la región 3' no traducida del mRNA del receptor (Caballero *et al.*, 2004). Más recientemente hemos descrito la posibilidad del uso de dos diferentes inicios de la transcripción del gen. No obstante, al inicio de esta Tesis Doctoral existía un escaso conocimiento del tráfico intracelular del receptor e incluso se desconocía si era necesaria su internalización para la producción de respuestas intracelulares. Además, desconocíamos si las diferentes isoformas descritas presentaban la misma distribución subcelular y si esto podría tener alguna implicación en el síndrome diabético tardío.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado sistemas de expresión eucariota del RAGE fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP). El uso de la proteína verde como compañero del RAGE se ha mostrado como acertado. La expresión en células eucariotas de esta proteína de fusión mantiene todas las propiedades del receptor nativo en lo que hace referencia a su localización subcelular, capacidad de unión a ligandos y desencadenamiento de respuestas intracelulares.

El desarrollo de estos sistemas de expresión eucariota nos ha permitido estudiar la modulación de la generación de señales por el RAGE. Así hemos descubierto, entre otros aspectos, que la internalización del receptor juega un papel fundamental en la generación de respuestas intracelulares y que una isoforma del receptor generada mediante el uso de un inicio de la transcripción alternativo tiene

una localización citosólica y que activa de forma constitutiva la cascada de señalización mediada por el RAGE.

En esta Tesis Doctoral también se ha abordado el estudio de la regulación de la expresión génica del RAGE de rata. Se ha estudiado la respuesta del promotor del gen de rata frente a varios estímulos, se ha estudiado la influencia de la internalización del receptor sobre la inducción de la actividad promotora y se ha prestado especial interés al uso de diferentes señales de poliadenilación como mecanismo de control de la estabilidad del mRNA del receptor en rata y humanos.

Finalmente, hemos detectado que los productos finales de glicación, no sólo los productos tempranos como se creía hasta ahora, bloquean el transporte de glucosa en tejidos periféricos. En músculo este efecto es dependiente del RAGE y se ejerce exclusivamente a través de la ruta de señalización de MAP Kinasas. Una consecuencia relevante de este hallazgo, que también ocurre en tejido adiposo, es que la presencia de AGEs circulantes no sólo es un índice de mal control diabético y de predisposición a complicaciones a largo plazo de la diabetes sino que puede afectar directamente a la eficacia de los diversos tratamientos antidiabéticos al bloquear su principal vía de acción, el incremento del transporte de glucosa a los tejidos periféricos.

II.- ANTECEDENTES

II.- ANTECEDENTES

II.1.-DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, de la sensibilidad a la acción de la hormona, o de ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con daño, disfunción y fallo a largo plazo de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association 2005).

La clasificación actual de los síndromes que constituyen la diabetes se ha hecho siguiendo criterios etiológicos:

Diabetes tipo 1 (anteriormente se llamó diabetes juvenil o diabetes insulino-dependiente): Representa sólo el 5-10 % de casos de diabetes, está causada por una destrucción de las células β que normalmente lleva a una deficiencia absoluta de insulina. Generalmente la destrucción de las células β del páncreas está mediada por el sistema inmune (diabetes tipo 1 autoinmune), lo más frecuente en este tipo de pacientes es la presencia de anticuerpos frente a las células de los islotes. Este tipo de diabetes normalmente ocurre en la infancia y en la adolescencia, pero puede aparecer a cualquier edad. La destrucción autoinmune de las células β tiene una predisposición genética, aunque también está relacionada con factores ambientales aún no totalmente definidos. Estos pacientes son propensos a padecer otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Addison, vitíligo o hepatitis

autoinmune. En algunos pacientes, la diabetes tipo 1 no tiene una etiología conocida (Diabetes tipo 1 idiopática). Esta forma de diabetes se hereda con una alta frecuencia y se ha descrito más en la población africana y asiática (American Diabetes Association, 2005).

Diabetes tipo 2 (Anteriormente se llamó Diabetes del adulto o Diabetes no insulino-dependiente): Representa el 90-95 % de los casos de diabetes. En este tipo de diabetes existe una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una secreción inadecuada de insulina. En este tipo de diabetes la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, por lo que estos pacientes tienen un riesgo elevado de desarrollar complicaciones vasculares. Los niveles de insulina son normales o elevados. De hecho, los elevados niveles de glucosa hacen que las células β secreten altos niveles de insulina lo que conduce al “agotamiento” de las células β . La secreción de insulina en estos pacientes acaba disminuyendo, por lo que acaba siendo insuficiente para compensar la resistencia a insulina (Mattaei *et al.*, 2000). Hay muchas causas de este tipo de diabetes. La mayoría de pacientes con este tipo de diabetes son obesos, sin embargo también puede ser diagnosticada en sujetos no obesos, especialmente en ancianos. El riesgo de desarrollarla aumenta con la edad, la obesidad y la pérdida de actividad física, además es más frecuente en mujeres con antecedentes de diabetes gestacional y en individuos con hipertensión o dislipemia. Su frecuencia varía en los diferentes subgrupos étnicos y raciales y tiene una fuerte predisposición genética (American Diabetes Association, 2005).

Existen otros tipos de diabetes con etiología conocida que se incluyen en un grupo denominado **otros tipos específicos de diabetes**. Este grupo incluye Diabetes Mellitus causada por: defectos genéticos de la función de las células β , anteriormente llamada diabetes juvenil de inicio en el adulto (MODY: *Maturity Onset Diabetes of the*

Young); defectos genéticos en la acción de la insulina; enfermedades del páncreas exocrino como pancreatitis, o carcinoma pancreático; endocrinopatías como la acromegalia o el síndrome de Cushing; drogas o productos químicos; infecciones como la rubeola; formas inusuales de diabetes provocadas por el sistema inmune y otros síndromes genéticos (American Diabetes Association, 2005).

Diabetes gestacional: Se define como algún grado de tolerancia a la glucosa con comienzo o que se diagnostica por primera vez durante el embarazo.

Tabla II.1.- *Clasificación etiológica de la diabetes mellitus (American Diabetes Association 2005)*

Diabetes tipo 1	1.-Autoinmune 2.-Idiopática
Diabetes tipo 2	
Otros tipos específicos	1.- Defectos genéticos de la función de las células β 2.- Defectos genéticos en la acción de la insulina 3.- Enfermedades del páncreas exocrino 4.- Endocrinopatías 5.- Inducida por drogas o productos químicos 6.- Infecciones 7.- Formas inusuales de diabetes provocadas por el sistema inmune. 8.- Otros síndromes genéticos
Diabetes gestacional	

Todas las formas de diabetes se caracterizan por el desarrollo de complicaciones microvasculares específicas que incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía. Además, la diabetes también está asociada a la enfermedad macrovascular, como la aterosclerosis, con una mayor prevalencia y severidad que en personas no diabéticas, siendo la principal causa de mortalidad (Brownlee, 2001; Hudson y Schmidt, 2004). En conjunto, estas complicaciones a largo plazo reciben el nombre de síndrome diabético tardío y constituyen la principal causa de morbilidad y de mortalidad en estos pacientes.

Aunque el mecanismo que provoca estas complicaciones no es del todo conocido (Brownlee, 2001; Peppia & Vlassara, 2005), varios estudios indican que la hiperglucemia crónica es el principal iniciador de las complicaciones microvasculares de la diabetes, ya que se ha comprobado que un estricto control de la glucemia reduce el riesgo de aparición de estas complicaciones, tanto en la diabetes tipo 1 (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993) como en la diabetes tipo 2 (UK Prospective Diabetes Study Group 1998). Sin embargo, la relación entre un estricto control de la glucosa y las complicaciones macrovasculares no está del todo clara (Singh *et al.*, 2001).

Los mecanismos por los que la hiperglucemia es responsable de las complicaciones a largo plazo de la diabetes son múltiples, los más estudiados son: la ruta de los polioles (Lee *et al.*, 1995), la activación de las isoformas de la proteína quinasa C (Koya & King, 1998) y la glicación no enzimática de proteínas que da lugar a la formación de productos avanzados de glicación (AGEs). Estos mecanismos no son independientes (Brownlee, 2001; Gugliucci, 2000). Así, el elevado flujo de metabolitos a través de la ruta de polioles produce un aumento en la generación de sorbitol, una disminución de la entrada de monoinositol y una disminución de

actividad Na^+/K^+ ATPasa. La activación de la PKC causa un aumento en la permeabilidad vascular (Schmidt *et al.*, 1999; Koya & King, 1998) y los AGEs tienen efectos químicos, celulares y tisulares implicados en el desarrollo y progresión de las complicaciones diabéticas (Vlassara & Palace, 2002).

II.2.-PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICACIÓN

Los resultados experimentales de la importancia de los AGEs en las complicaciones vasculares son cuatro: los AGEs se encuentran en concentraciones elevadas en los sitios donde se desarrollan las complicaciones diabéticas, glomérulo renal, retina y nervios periféricos; la exposición experimental a precursores de AGEs o proteínas modificadas por AGEs produce una enfermedad vascular similar a la originada por las complicaciones diabéticas; estudios en células vasculares *in vitro*, utilizando proteínas modificadas por AGEs, han sugerido un papel para la glicación de proteínas en la disfunción bioquímica unida a las complicaciones de la diabetes; por último, estudios con inhibidores de la formación de AGEs, como la aminoguanidina, en modelos animales de diabetes experimental han puesto de manifiesto una disminución en el desarrollo de las complicaciones vasculares (Ahmed & Thornalley, 2007).

Además de la diabetes mellitus se han descrito otras enfermedades en las que los niveles de AGEs están incrementados: artritis reumatoide, enfermedades asociadas con formación de amiloides como la amiloidosis secundaria y la enfermedad de Alzheimer.

II.2.1.- Formación de AGEs

La formación de AGEs ocurre naturalmente con el envejecimiento y de forma acelerada en situaciones de hiperglicemia como la diabetes y en ambientes inflamatorios y prooxidativos como en la aterosclerosis (Hudson & Schmidt, 2004). La glicación ocurre preferentemente en las proteínas, pero también otras biomoléculas presentan grupos funcionales capaces de reaccionar con el grupo aldehído de la glucosa, como los lípidos y los ácidos nucleicos. Es dependiente del grado y duración de la hiperglicemia, la vida media de la proteína y la permeabilidad del tejido a la glucosa (Ahmed, 2005).

La glicación de proteínas, también denominada reacción de Maillard, se inicia por una reacción entre un grupo amino libre de una proteína, principalmente los grupos amino de los residuos de lisina y arginina, y un grupo carbonílico (aldehído o cetona) de un azúcar reductor para formar una base de Schiff. En el caso de la glucosa esta reacción ocurre en un periodo de horas. Una vez formada la base de Schiff se transforma en un compuesto más estable, producto de Amadori o fructosamina, que se forma en días (Singh *et al.*, 2001; Ahmed, 2005). La determinación de la hemoglobina glicosilada y de la fructosamina, que son productos de Amadori, se utilizan como herramienta para monitorizar el control glicémico en pacientes diabéticos. A continuación, se producen una serie de reacciones de deshidratación, condensación, ciclación y oxidación que dan lugar a la formación de los productos avanzados de glicación (AGEs), reacciones que tienen lugar en semanas o meses (Kikuchi *et al.*, 2003; Wautier & Schmidt, 2004) (Figura II.1). Los AGEs se definen como estructuras complejas y heterogéneas, con entrecruzamientos intra- e intermoleculares, son marrones y algunos son fluorescentes, aunque no todos comparten estas propiedades (Wautier & Schmidt, 2004; Huebschmann *et al.*, 2006).

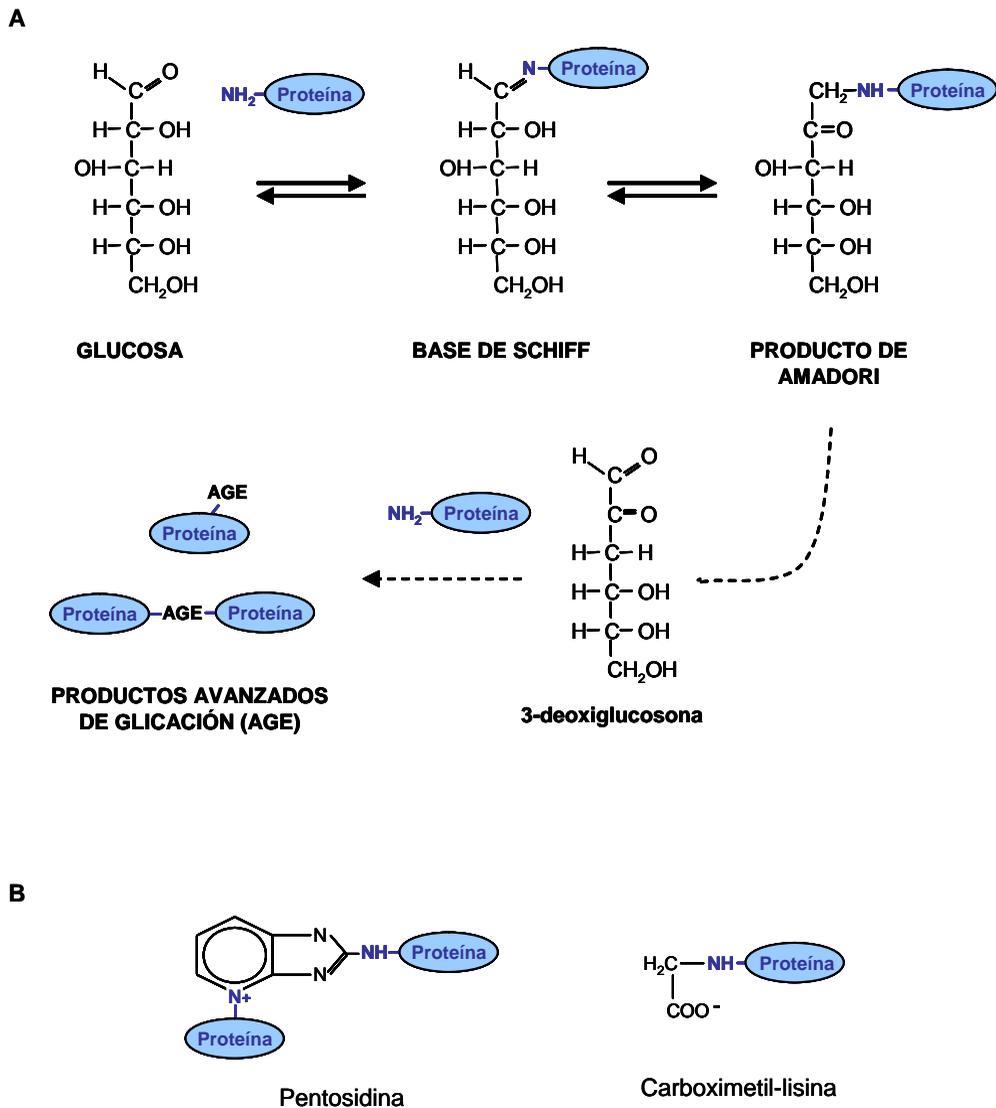


Figura II.1.- Productos avanzados de glicación (Ahmed, 2005). **A-** Reacción de Maillard. **B-** Estructura de los dos AGEs más abundantes en vasos diabéticos humanos.

La glicación es una reacción espontánea y reversible hasta la formación del producto de Amadori, sin embargo una vez formados los aductos AGE- proteínas, son bastante estables y irreversibles (Ahmed, 2005). La glucosa no es el único precursor de AGEs, otras aldosas reaccionan más rápidamente con las proteínas que la glucosa, incluyendo metabolitos procedentes de la glucólisis y de la ruta de los polioles (Bierhaus *et al.*, 1998; Ahmed, 2005). Existen mecanismos alternativos para la formación de AGEs, como el denominado estrés carbonilo o rutas no dependientes de glucosa (Huebschmann *et al.*, 2006).

Lo más relevante en la biología de los AGEs es su asociación con el estrés oxidativo ya que en situaciones donde existe estrés oxidativo, como en inflamación o en pacientes con fallo renal, la formación de AGEs está aumentada (Baynes *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Las reacciones de oxidación pueden llevar a la formación de AGEs, de hecho han sido identificados en lesiones ateroscleróticas en pacientes no diabéticos (Schmidt *et al.*, 1999). Por otro lado, la reacción de glicación se caracteriza por la producción de especies reactivas de oxígeno (Kikuchi *et al.*, 2003).

Debido a la heterogeneidad de los AGEs generados *in vivo* y la complejidad de las reacciones implicadas en su formación, sólo se ha determinado la estructura de algunos AGEs. La carboximetil-lisina (CML, el principal AGE encontrado *in vivo*) y la pentosidina, son los mejor caracterizados (Figura II.1). Ambos se acumulan en el colágeno de la piel al envejecer y de forma acelerada en la diabetes mellitus (Bierhaus *et al.*, 1998).

La glicación altera la actividad biológica de las proteínas y sus procesos de degradación. El entrecruzamiento de proteínas por AGEs da lugar a la formación de agregados de proteínas insolubles y resistentes a proteasas (Kikuchi *et al.*, 2003).

Debido a su formación lenta, en un principio, se pensó que los AGEs sólo se formaban a partir de proteínas extracelulares de vida media larga, y en función del tiempo, representando una forma de senescencia molecular. Sin embargo, los AGEs también se forman a partir de moléculas de vida media corta, como las proteínas del plasma y los lípidos (Makita *et al.*, 1994; Vlassara & Palace, 2002). Esta modificación de moléculas de vida media corta implica la oxidación de proteínas y lípidos, altera su conformación molecular, modifica sus actividades enzimáticas, reduce su capacidad de degradación y resulta en un reconocimiento y aclaramiento anormal por parte de receptores (Vlassara & Palace, 2002).

Los AGEs son reconocidos por macrófagos, endocitados y degradados parcialmente y como consecuencia se liberan a la circulación AGEs de bajo peso molecular conocidos como AGEs de “segunda generación”. Estos péptidos contienen intermediarios dicarbonílicos de la reacción de Maillard y son mucho más reactivos que la glucosa, por lo que pueden amplificar el daño tisular (Peppia & Vlassara, 2005). Estos péptidos son excretados por el riñón, parte se reabsorben y se catabolizan en el túbulo contorneado proximal y el resto se excreta por la orina; por tanto su eliminación efectiva es dependiente de la función renal (Makita *et al.*, 1991; Peppia & Vlassara, 2005). Estudios *in vitro* han propuesto que la insulina también contribuye a la eliminación de AGEs desde el plasma a través de la ruta mediada por el IRS (*Insulin Receptor Substrate*) y la activación de la fosfatidil-inositol-3 kinasa (Sano *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2001).

A nivel celular existen sistemas protectores intracelulares que limitan la acumulación de intermediarios reactivos de AGEs. Uno de estos sistemas es el de las enzimas degradativas glioxalasa (Shinohara *et al.*, 1991; Peppia & Vlassara, 2005).

II.2.2.- Mecanismos de toxicidad de los AGEs

Hay un gran número de estudios que han confirmado una fuerte relación entre la formación de AGEs y los cambios fisiológicos observados en la enfermedad vascular, diabetes, aterosclerosis y envejecimiento (Bierhaus *et al.*, 1998). Existen tres mecanismos principales por los que los AGEs producen efectos tóxicos en la célula (Brownlee, 2000; 2001): modificación de la estructura y función de proteínas intracelulares, alteración de proteínas de la matriz extracelular e interacción con receptores celulares.

II.2.2.1.- Alteración de la estructura y función de proteínas intracelulares

Los AGEs no sólo se forman en proteínas extracelulares. La rápida formación de AGEs intracelulares, a través de intermediarios altamente reactivos del metabolismo de la glucosa, pueden alterar la estructura y función de proteínas intracelulares, principalmente en células que no requieren insulina para el transporte de glucosa, como las células endoteliales de la microvasculatura y las neuronas (Brownlee, 2000). El factor de crecimiento fibroblástico es una de las principales proteínas modificadas por AGEs (Giardino *et al.*, 1994; Brownlee, 2001).

II.2.2.2.- Alteración de proteínas de la matriz extracelular

La formación de AGEs en los componentes de la matriz extracelular altera propiedades fundamentales de moléculas claves de la matriz, dando lugar a anomalías en las interacciones matriz-matriz y matriz-célula (Brownlee, 2000). Las proteínas que constituyen la matriz extracelular y las membranas basales vasculares, están entre las proteínas con una vida media más larga, y por tanto, son altamente susceptibles a la modificación por AGEs. Funcionalmente, los entrecruzamientos en

la membrana basal mediados por AGEs, reducen la solubilidad y disminuyen la digestión enzimática de proteínas (Vlassara & Palace, 2002).

En el colágeno se producen enlaces covalentes intermoleculares producidos por AGEs (Tanaka *et al.*, 1988). La formación de AGEs en el colágeno tipo IV interfiere en el correcto ensamblaje de otras proteínas para formar la matriz extracelular (Brownlee, 2000). El estrechamiento luminal, característico de los vasos diabéticos, se debe en parte a la acumulación en el subendotelio de proteínas del plasma como albúmina, LDL e Ig G, que quedan atrapadas por los AGEs en el colágeno tipo I de la membrana basal. La formación de AGEs en la laminina, disminuye la unión de otros componentes principales de la membrana basal, como el colágeno y el heparán sulfato (Charonis *et al.*, 1988), que es la molécula que proporciona la carga negativa a la membrana basal del glomérulo. Como consecuencia se produce proteinuria y además se estimula la sobreproducción de otros componentes de la matriz en la pared de los vasos (Brownlee, 2000; Goldin *et al.*, 2006).

La formación de AGEs en la matriz también altera las interacciones de las proteínas de la matriz con los receptores de las células (integrinas), por ejemplo la modificación de los dominios de unión del colágeno tipo IV a células produce una disminución de la adhesión de las células endoteliales (Haitoglou *et al.*, 1992). Todas estas anomalías en la matriz extracelular alteran la estructura y función de los vasos (Goldin *et al.*, 2006).

En los vasos de mayor calibre, los AGEs disminuyen la elasticidad. Además, los AGEs formados en las proteínas de la matriz vascular, producen trastornos en la respuesta vasodilatadora al óxido nítrico, debido a una inactivación dosis-dependiente (Bucala *et al.*, 1991; Wautier & Guillausseau, 2001).

II.2.2.3.- Interacción con receptores celulares

Los AGEs son reconocidos por receptores celulares que internalizan y degradan AGEs, pero que también pueden desencadenar rutas de transducción de señales, como es el caso principalmente del receptor de productos avanzados de glicación (RAGE), interacción que aumenta la expresión de genes de una gran variedad de moléculas implicadas en la enfermedad vascular y neural (Bierhaus *et al.*, 1997).

En macrófagos, la unión de AGEs a sus receptores estimula la producción de IL-1, el factor de crecimiento I, TNF- α y el factor estimulante de colonias de granulocitos. Esta estimulación aumenta la síntesis glomerular del colágeno tipo IV y la proliferación de macrófagos y células del músculo liso arterial (Tornalley *et al.*, 1998).

La unión de AGEs a sus receptores celulares produce una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante en la célula (Bierhaus *et al.*, 1997) y la generación de radicales libres de oxígeno. Como consecuencia del aumento del estrés oxidativo se produce la activación del factor de transcripción NF- κ B y por tanto un aumento de la expresión de genes regulados por este factor, como el factor procoagulante tisular y la molécula de adhesión VCAM-1 (Schmidt *et al.*, 1995; Bierhaus *et al.*, 1997). La inducción de VCAM-1 hace que aumente la interacción con monocitos circulantes. El aumento de la expresión del factor tisular y la paralela reducción de la actividad de la trombomodulina, dependiente de AGE, cambia el balance endotelial desde un estado anticoagulante a un estado procoagulante resultando en trombosis focal y vasoconstricción (Wautier *et al.*, 1996).

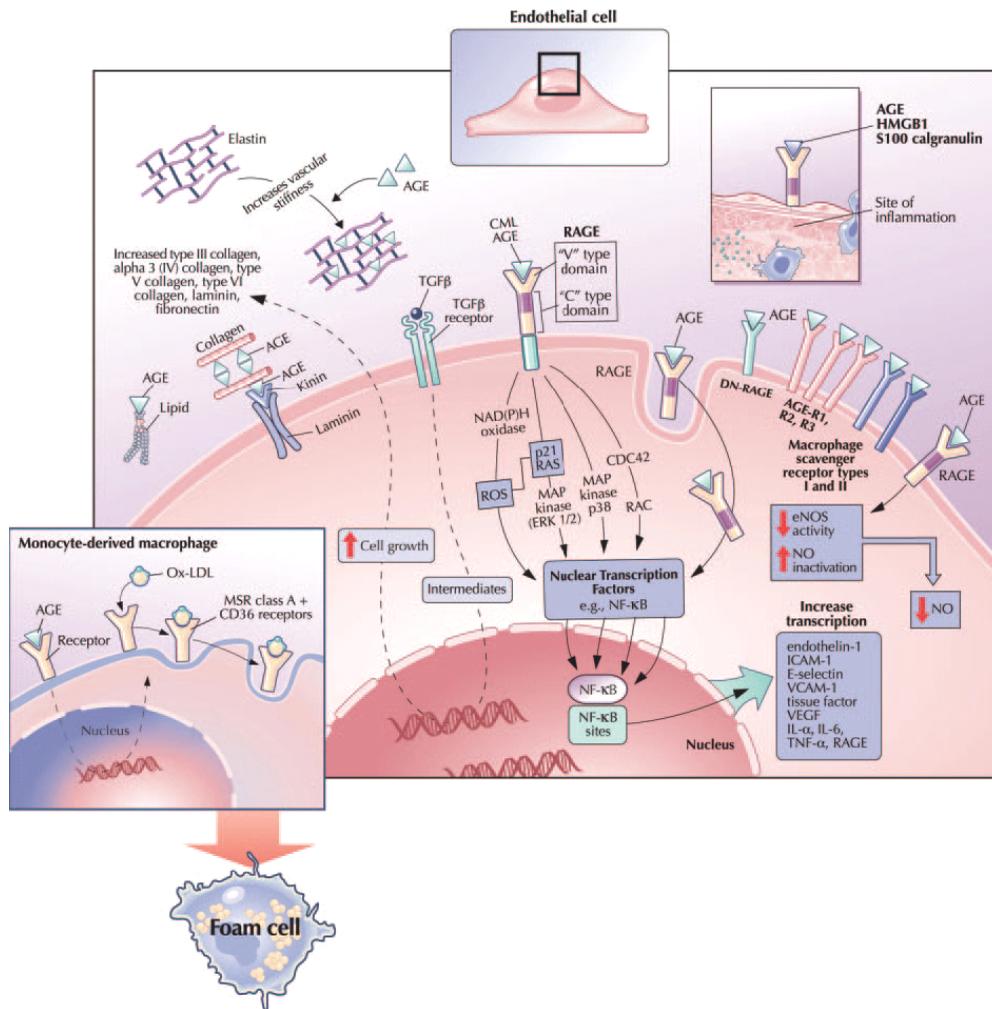


Figura II.2.- Efectos mediados por los AGEs (Ilustración tomada de Goldin *et al.*, 2006)

II.3.- RECEPTORES DE LOS AGEs

Se han identificado varios receptores que reconocen los AGEs. El primer receptor identificado fue AGE-R1 o p60 (Yang *et al.*, 1991), una proteína integral de membrana de 48 kD. Esta proteína se encontró en el retículo endoplásmico, se vió

que era homólogo al componente de 50 kD del sistema oligosacariltransferasa (OST), por eso se llamó OST-48 (Li *et al.*, 1996; Vlassara, 2001).

AGE-R1 fue purificado con otra proteína de 80-90 kD que se denominó AGE-R2 (Yang *et al.*, 1991). Esta proteína está implicada en la señalización intracelular de varios receptores. Las especies fosforiladas en tirosina están localizadas en la membrana plasmática y pueden unir otras moléculas como Shc y GRB-2 (Li *et al.*, 1996; Vlassara, 2001). Aunque no ha mostrado una unión directa a AGEs, su alta fosforilación por AGEs ha sugerido un papel de esta proteína en las etapas tempranas de señalización de los AGEs (Stitt *et al.*, 1999).

AGE-R2 está unido a otra proteína que también une AGEs, AGE-R3 o galectina-3. Se trata de una proteína que une carbohidratos y se ha relacionado con muchas funciones celulares como la apoptosis, inflamación y crecimiento tumoral. Es una proteína abundante en el citoplasma y núcleo, también ha sido encontrada en la superficie de macrófagos y otras células y une AGEs con alta afinidad (Vlassara *et al.*, 1995). El dominio de unión a AGEs está en el dominio C-terminal, y muy próximo a la región de unión a carbohidratos. Se ha visto que es capaz de translocar desde el citoplasma a la superficie celular cuando la célula es expuesta a AGEs. La expresión en la superficie de AGE-R3 aumenta con la unión y endocitosis de AGEs por macrófagos (Vlassara *et al.*, 1995; Vlassara, 2001). El papel preciso de este receptor en la señalización dependiente de AGEs no ha sido determinado, pero parece tener un papel importante en la regulación del recambio de AGEs y en el mantenimiento de la integridad tisular (Pugliese *et al.*, 2000).

También se han identificado como receptores de AGEs algunos miembros de la familia de los receptores *scavenger* de macrófagos (Miyazaki *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2003) de clase A: I (Araki *et al.*, 1995) y II (Suzuki *et al.*, 1997) y de clase B: CD36

(Ohgami *et al.*, 2001 a) y SR-BI (Ohgami *et al.*, 2001 b); LOX-1 (Jono *et al.*, 2002); FEEL-1 y FEEL-2 (Tamura *et al.*, 2003). Estos receptores dan lugar a cambios celulares, como la formación de células espumosas en lesiones ateromatosas.

Otros receptores también interactúan con los AGEs, como el RAGE (receptor de productos avanzados de glicación) (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992), la lactoferrina que generalmente está asociada de forma no covalente al dominio extracelular del RAGE (Schmidt *et al.*, 1994) o la lisozima, que es una proteína de defensa inmunitaria (Li *et al.*, 1995).

En la diabetes, la expresión de alguno de estos receptores está aumentada, por ejemplo, galectina-3 (Pugliese *et al.*, 2000) y RAGE (Lander *et al.*, 1997).

Recientemente se han descrito nuevos receptores que unen AGEs, como N-glicanos, erzina y megalina. Además, los diferentes receptores pueden interactuar o influir sobre otros, como se ha mostrado recientemente entre AGE-R1 y RAGE (Bierhaus *et al.*, 2005).

II.4.- RECEPTOR DE PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICACIÓN (RAGE)

El RAGE es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas de moléculas de superficie celular (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992). En humanos, el gen del RAGE se localiza en el cromosoma 6, en la región del complejo mayor de histocompatibilidad entre los genes de la clase II y clase III (Sugaya *et al.*, 1994). El RAGE está compuesto por una región extracelular de 332 aminoácidos, que incluye tres regiones del tipo de las inmunoglobulinas: un dominio N-terminal de tipo variable, que es el dominio responsable de la unión de ligandos, y dos dominios de

tipo constante (C y C') que no unen directamente ligandos pero que podrían tener importantes funciones en estabilizar el dominio variable para la unión de ligandos. Tras el dominio extracelular tiene un dominio transmembrana y una cola citosólica de 43 aminoácidos altamente cargada y que, aunque carece de motivos de señalización conocidos, es crítica para la señalización intracelular dependiente de RAGE (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2000).

En el adulto, en condiciones fisiológicas el RAGE se expresa en bajos niveles en la mayoría de los tejidos, excepto en pulmón donde su expresión es muy elevada en animales maduros y sanos (Brett *et al.*, 1993). También existen niveles elevados de RAGE en neuronas del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario (Hori *et al.*, 1995). A nivel celular, el RAGE se expresa en la mayoría de los tipos celulares: células del endotelio y músculo liso vascular, monocitos-macrófagos, células epiteliales glomerulares y células neuronales (Brett *et al.*, 1993).

La expresión del RAGE está aumentada en células de los lugares donde hay una fuerte activación celular o estrés, como la diabetes, inflamación o enfermedad de Alzheimer y está asociada con un acúmulo de sus ligandos (Li *et al.*, 1997; Stern *et al.*, 2002b).

II.4.1.- Ligandos del RAGE

Como otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, el RAGE se caracteriza por tener un gran repertorio de ligandos, entre los que se incluyen los productos avanzados de glicación (AGEs) (Kislinger *et al.*, 1999), fibras amiloides y péptido β -amiloide (Yan *et al.*, 1996), anfoterina (Hori *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 2000) y miembros de la familia de las S100/calgranulinas (Hofmann *et al.*, 1999). Una de las principales características del receptor es el reconocimiento de familias de ligandos

más que un solo polipéptido (Schmidt *et al.*, 2000; Stern *et al.*, 2002a). Esto hace que esté implicado en una gran variedad de procesos fisiopatológicos como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, formación y propagación de tumores, desórdenes inflamatorios y patologías asociadas con la diabetes como la aterosclerosis y la nefropatía diabética (Tabla II.2). Aunque el receptor no es esencial en la patogénesis inicial de estos desórdenes si que está implicado en la amplificación o progresión de los mismos (Schmidt *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2002b; Bucciarelli *et al.*, 2002).

Tabla II.2.- *Ligandos del RAGE y patologías asociadas* (Schmidt *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 2003).

Estado fisiopatológico asociado	Ligandos del RAGE
Complicaciones de la diabetes	AGEs S100/calgranulinas
Amiloidosis	Fibras amieloides S100/calgranulinas AGEs
Desórdenes inflamatorios/inmunológicos	S100/calgranulinas Anfoterina AGEs
Tumores	Anfoterina S100/calgranulinas

La unión de los ligandos al RAGE no acelera su degradación, sino que comienza un periodo de activación celular sostenida mediada por una señalización celular dependiente de receptor.

Una característica importante del RAGE es la presencia de más de un ligando en los tejidos durante un tiempo prolongado, por ejemplo en tejidos diabéticos los AGEs y S100/ calgranulinas están presentes en cantidades elevadas (Stern *et al.*, 2002a).

Otro aspecto importante en la biología del RAGE es que hay una co-localización de ligandos y receptor en los tejidos donde los ligandos tienden a acumularse. Por ejemplo, en vasos diabéticos, las células que expresan altos niveles de RAGE, están frecuentemente próximas a áreas en las que los AGEs se acumulan (Schmidt *et al.*, 1999) y una relación similar se ha visto en los vasos afectados de pacientes con enfermedad de Alzheimer, en los que el RAGE se expresa en los vasos en la proximidad a los depósitos de amiloide β (Yan *et al.*, 1996). La estimulación celular mediada por RAGE produce un aumento de la expresión del receptor, por lo que existe un *feed-back* positivo por el cual la interacción receptor-ligando aumenta la expresión del receptor y la activación celular inducida por el receptor, provoca una activación prolongada del receptor (Schmidt *et al.*, 2000). En el promotor del gen del RAGE, existen dos elementos funcionales para NF- κ B, que pueden ser responsables del aumento de la expresión del RAGE observada en sitios donde se acumulan los ligandos (Li *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2000).

II.4.2.- Señalización celular inducida por RAGE

Las cascadas de señalización activadas por la interacción RAGE-ligando incluye rutas como: p21ras, ERK 1/2 MAP kinasas, p38 y SAPK/JNK MAP kinasas, Rho GTPasas (cdc42 y Rac), fosfoinositol 3 kinasa, y la ruta JAK/STAT (Lander *et al.*, 1997; Deora *et al.*, 1998; Huttunen *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Taguchi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). Esto tiene como consecuencia la activación del factor de transcripción NF- κ B (Huttunen *et al.*, 1999; Bierhaus *et al.*,

2001; Bierhaus *et al.*, 2005b) y de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) (Huttunen *et al.*, 2002). La ruta de señalización que se activa es distinta dependiendo del ligando que se une al RAGE y del estado de diferenciación de la célula (Bucciarelli *et al.*, 2002).

La unión de los ligandos al RAGE desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (Yan *et al.*, 1994), al menos en parte por la activación de la NADPH oxidasa (Wautier *et al.*, 2001). Más recientemente, se ha visto que la cadena de transporte mitocondrial también está implicada en la producción de radicales libres mediada por AGEs (Basta *et al.*, 2005).

El dominio citosólico del RAGE es crítico para la transducción de señales mediada por RAGE y la modulación de la expresión de genes y fenotipo celular (Huttunen *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que la delección del dominio citosólico del RAGE (DN-RAGE) elimina la señalización mediada por los ligandos y su función, incluso en presencia del RAGE (Hofmann *et al.*, 1999; Taguchi *et al.*, 2000). No se conoce exactamente la molécula que se une al RAGE y que desencadena la cascada de señalización. Se ha realizado un estudio *in vitro* utilizando mutantes del RAGE humano con varias deleciones en el extremo carboxilo, que han identificado la región citoplasmática del RAGE como un sitio de unión a ERK, por tanto sugiriendo que la señalización ocurre por la interacción directa RAGE-ERK (Ishihara *et al.*, 2003).

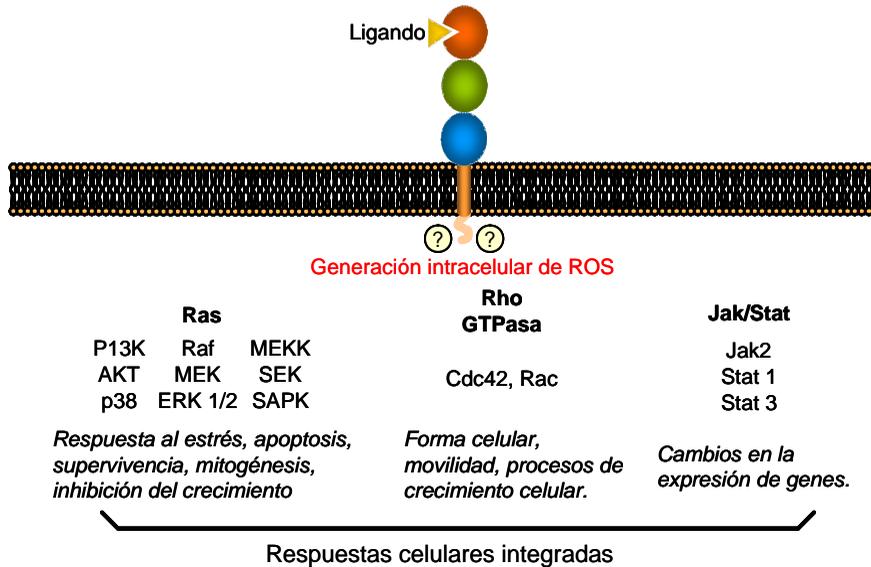


Figura II.3.- Mecanismo de transducción de señal dependiente de RAGE (Stern *et al.*, 2002b).

II.5.- INTERACCIÓN RAGE-LIGANDOS. PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Para determinar si el RAGE tiene un papel central en la perturbación celular inducida por sus ligandos en modelos *in vivo*, ha sido necesario bloquear el RAGE durante largos periodos de tiempo. Se han preparado formas truncadas del RAGE, RAGE soluble (sRAGE), compuesto sólo por el dominio extracelular (Wautier *et al.*, 1996). En presencia de exceso de sRAGE, los ligandos se unen al RAGE soluble, como consecuencia el receptor de la superficie celular queda “desocupado” y se disminuye la activación celular. Tanto en humano como en animales existen bajos niveles de sRAGE en el plasma, generado por procesamiento proteolítico o expresión de formas truncadas, por lo que la administración de sRAGE de la misma especie no produce una respuesta inmune (Schmidt *et al.*, 2000).

II.5.1.- Interacción AGE-RAGE. Complicaciones de la diabetes

Como se indicaba en el apartado II.2.2.3, como consecuencia de la interacción de los AGEs con el RAGE, se desencadenan una serie de efectos que hace que esté implicado en la enfermedad vascular.

II.5.1.1.- RAGE y enfermedad macrovascular diabética

El primer marcador de la enfermedad vascular diabética es un aumento de permeabilidad del endotelio vascular (Schmidt *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2003). Se ha estudiado la implicación del RAGE en esta patología en modelos animales diabéticos, en los que se ha visto que la infusión de AGEs produce un aumento de la permeabilidad vascular. Para determinar el papel del RAGE en este proceso, se bloqueó la interacción RAGE-ligandos utilizando sRAGE o anticuerpos frente al RAGE, y se observó que se bloqueaba el incremento de la permeabilidad vascular. Además, el bloqueo del RAGE revertía la hiperpermeabilidad vascular ya establecida (Wautier *et al.*, 1996).

La aterosclerosis es la principal complicación de la diabetes, siendo la principal causa de mortalidad y morbilidad en pacientes diabéticos. Se ha demostrado que en las placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos hay una sobreexpresión del RAGE, que co-localiza con marcadores de inflamación (como metaloproteinasas de la matriz y prostaglandinas), principalmente en macrófagos, lo que sugiere que el RAGE podría estar implicado en la enfermedad (Cipollone *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 2007). Para demostrarlo, se utilizó como modelo ratones sin apolipoproteína E (Apo E) que se hicieron diabéticos con estreptozotocina (Park *et al.*, 1998). Estos animales desarrollan aterosclerosis de forma más rápida y con lesiones más complejas que los animales no diabéticos. Además en las lesiones

ateroscleróticas de este modelo se observa una expresión aumentada del RAGE y acumulación de AGEs y de S100/calgranulinas (Yan *et al.*, 2003). Los animales tratados con sRAGE manifestaron una disminución en el número y complejidad de las lesiones ateroscleróticas de manera dosis dependiente. Estudios posteriores realizados con ratones sin Apo E y con lesiones ateroscleróticas ya establecidas demostraron que el bloqueo con sRAGE prevenía la progresión de la aterosclerosis y producía una regresión de la complejidad de la lesión (Kislinger *et al.*, 2001; Bucciarelli *et al.*, 2002). Además también se observó una disminución de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1), del factor tisular, de la proteína quimiotáctica de macrófagos y de metaloproteinasas de la matriz (Kislinger *et al.* 2001). A nivel celular, la administración de sRAGE bloqueó la proliferación y migración de células de músculo liso y de fagocitos mononucleares.

Se han observado resultados similares en otros modelos animales con resistencia a insulina (ratones db/db) (Wendt *et al.*, 2000) y en modelos animales sin receptor de LDL (Lee *et al.* 1997).

Es importante destacar que los efectos beneficiosos del bloqueo del RAGE se producen sin cambios en los niveles de lípidos y glucosa en sangre (Park *et al.*, 1998), aunque sí que se observa una importante disminución de AGEs y de S100/calgranulinas en los vasos y en los tejidos, que puede deberse a una menor formación de AGEs y/o un mayor aclaramiento (Schmidt *et al.*, 1999 y 2000). La formación disminuida de AGEs puede ser debida a la supresión del estrés oxidativo mediado por RAGE en la pared de los vasos. Los AGEs si son detectados en el plasma complejados con sRAGE, pero estos complejos se degradan rápidamente (Schmidt *et al.*, 2001).

El papel del RAGE en la progresión de la aterosclerosis es independiente de la diabetes, ya que la administración de sRAGE también disminuye las lesiones ateroscleróticas en ratones no diabéticos (Bucciarelli *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2004).

Los efectos del bloqueo del RAGE en la proliferación y migración de células de músculo liso de la pared arterial, hizo que se estudiara el efecto del RAGE en otra enfermedad macrovascular típica de la diabetes, la restenosis inducida por angioplastia, donde la expansión de la neointima es el principal mecanismo y se caracteriza por un aumento en la migración y proliferación de células de músculo liso vascular y producción de matriz extracelular (Yan *et al.*, 2004). En un modelo experimental en ratas, se ha visto un aumento de la expresión del RAGE, y que la administración de sRAGE reduce la proliferación de células de músculo liso (Zhou *et al.*, 2003). En modelos de ratones no diabéticos, después de la angioplastia, se produce un aumento de la expresión del RAGE y también se acumulan AGEs y S100/calgranulinas. La administración de sRAGE, suprime la expansión de la neointima de una manera dosis dependiente (Sakaguchi *et al.*, 2003). Además, estos autores, estudiaron la patología en ratones modificados genéticamente para que no expresaran RAGE (RAGE *knockout*) y en ratones transgénicos que expresaban DN-RAGE (el RAGE sin el dominio citosólico) selectivamente en células de músculo liso. Estos ratones eran resistentes a la expansión de la neointima después de la lesión en la arteria femoral, indicando que tanto el RAGE, como la señalización celular mediada por RAGE son importantes. La fosforilación de JAK 2 y STAT 3 es la vía de señalización implicada en este proceso (Sakaguchi *et al.*, 2003).

II.5.1.2.- RAGE y enfermedad microvascular diabética

Aparte de la enfermedad macrovascular, la enfermedad vascular diabética también afecta a la microvasculatura de los ojos, riñones y nervios periféricos. La más

importante es la enfermedad renal, que aunque ocurre con menos frecuencia que la retinopatía, es la que tiene un mayor porcentaje de mortalidad (Hudson & Schmidt, 2004). La colocalización de los AGEs y RAGE en sitios de enfermedad vascular diabética, sugiere que la interacción receptor-ligando puede representar un mecanismo importante en la génesis de estas complicaciones de la diabetes (Soulis *et al.*, 1997).

La nefropatía diabética se caracteriza por hipertrofia glomerular, aumento de albuminuria y expansión mesangial. El principal lugar de expresión del RAGE en el riñón diabético es en los podocitos del glomérulo, acompañado por un acúmulo de los ligandos (Tanji *et al.*, 2000). El VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) es un factor implicado en la glomeruloesclerosis diabética, mediante dos mecanismos, la hiperpermeabilidad y la atracción de células inflamatorias; además se ha demostrado que los AGEs aumentan la expresión de VEGF. Para probar el papel del RAGE en la activación de los podocitos, se han utilizado modelos de animales con resistencia a insulina (ratones db/db). La administración de sRAGE en ratones db/db bloquea la expresión de VEGF, produce una disminución del número de células inflamatorias en el glomérulo, y del RNA de TGF- β , lo que produce una disminución de la expansión mesangial, de la albuminuria y un aumento del aclaramiento de creatinina (Wend *et al.*, 2003b). Se han extendido estos estudios a ratones que no expresan RAGE (RAGE *knockout*), en los que se suprime la expansión de la matriz mesangial y la albuminuria. Yamamoto *et al.* (2001) desarrollaron un modelo de ratones diabéticos que sobreexpresan RAGE en el endotelio vascular, en los que la enfermedad renal está significativamente aumentada.

Cambios similares se han observado en la neuropatía diabética. Los ratones que sobreexpresan RAGE mostraron un incremento de déficit funcionales y una

disminución en la velocidad de conducción del nervio motor. Por el contrario, en experimentos con ratones sin RAGE se ha observado que estaban parcialmente protegidos de la pérdida de función inducida por la diabetes (Bierhaus *et al.*, 2005).

La retinopatía diabética es una enfermedad de los vasos sanguíneos intrarretinales provocada por la hiperglicemia y caracterizada por un aumento de la permeabilidad a la albúmina y otras macromoléculas, una pérdida progresiva de pericitos retinales y de células endoteliales y engrosamiento de la membrana basal, que conduce a un cierre de los capilares e isquemia de la retina. Diversos estudios han localizado AGEs en los vasos de la retina de pacientes diabéticos (Stitt *et al.*, 1997; Hames *et al.*, 1998; Stitt, 2003), y aunque el papel que pueden tener en la retinopatía diabética no está bien definido (Hammes *et al.*, 1998), el aumento de los AGEs es paralelo a la severidad de la retinopatía. Se ha observado en ratas que inhibidores de los AGEs, como anticuerpos anti-albúmina glicada (Clements *et al.*, 1998) o aminoguanidina, pueden prevenir o retardar el desarrollo de lesiones vasculares características de la diabetes (Hammes *et al.*, 1998). Así, la aminoguanidina reduce la pérdida de pericitos en un 80%, el desarrollo de aneurismas y la proliferación del endotelio (Chibber *et al.*, 1997).

Por último, una característica común a la retinopatía y nefropatía diabética es la neovascularización (crecimiento de células endoteliales microvasculares) que es inducida por agentes angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiogenina y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Urata *et al.* (2002) han demostrado que los AGEs inducen la expresión de VEGF y angiogenina en cultivos celulares de macrófagos. La inducción de VEGF está mediada por el factor de transcripción AP1 y se encuentra acelerada por especies reactivas de oxígeno. Al mismo tiempo, los AGEs estimulan la neovascularización al

inhibir la producción de prostaciclina PGI₂ y aumentar la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (Yamagishi *et al.*, 1998).

II.5.1.3.- RAGE y otras complicaciones de la diabetes

La lenta cicatrización de heridas es una de las complicaciones que aparecen en la diabetes a largo plazo, además es importante, porque en la mayoría de los casos puede llevar a la amputación de miembros (Bucciarelli *et al.*, 2002; Hudson *et al.*, 2003). Para estudiar la implicación del RAGE, se administró sRAGE a ratones db/db en los que se había provocado una herida por escisión y se comprobó que en ratones tratados se aceleraba la cicatrización (Goova *et al.*, 2001). Se cree que en diabéticos la fase inflamatoria de la cicatrización de heridas persiste durante un largo periodo de tiempo y que el bloqueo del RAGE limitaría la respuesta inflamatoria.

La diabetes está también asociada con un incremento en la prevalencia, severidad y progresión de enfermedad periodontal. Para estudiar el papel del RAGE en la patogénesis de la enfermedad periodontal, se usó un modelo de ratones infectados con el patógeno causante de la infección. El bloqueo del RAGE con sRAGE disminuyó la pérdida de hueso alveolar (Lalla *et al.* 2000).

II.5.2.-Interacción de fibras en hoja plegada β -RAGE

En desórdenes asociados con amiloidosis, se han encontrado fibras de amiloide en la pared de los vasos, especialmente en la matriz extracelular próxima al endotelio y en células de músculo liso (Stern *et al.*, 2002b).

La expresión del RAGE está incrementada en pacientes con enfermedad de Alzheimer, especialmente en neuronas y microglia (Lue *et al.*, 2001). El RAGE interacciona con preparaciones de péptido amiloide β (A β) fibrilar y soluble (Yan *et*

al., 1996, Stern *et al.*, 2002a), posteriormente se demostró que en realidad el RAGE se une a las estructuras fibrilares (Yan *et al.*, 2000). La unión amiloide-RAGE activa los mismos mecanismos de transducción de señales que otros ligandos del receptor (activación de MAPKs y de NF- κ B). Las consecuencias de esta interacción son bastante diferentes en neuronas y en microglia, en células neuronales resulta en el desencadenamiento de apoptosis mientras que en células de la microglia causa una activación sostenida con expresión de citoquinas proinflamatorias (Stern *et al.*, 2002b).

La contribución del RAGE a la perturbación celular observada en un ambiente rico en amiloide fue demostrado utilizando un modelo de amiloidosis sistémica (Yan *et al.*, 2000). La deposición de amiloide A en el bazo fue inducida por administración de nitrato de plata y factor estimulante de amiloide. Se observó un aumento de la expresión del RAGE en el bazo, principalmente en fagocitos mononucleares. El bloqueo del RAGE con sRAGE o con anticuerpos anti-RAGE disminuyó el acúmulo de amiloide en el bazo y la expresión de mediadores de la inflamación como IL 6 y el factor estimulante de colonias de macrófagos. Estos datos sugieren un papel del RAGE en la acumulación de amiloide y en la activación celular en este modelo de amiloidosis sistémica (Schmidt *et al.*, 2000; Bucciarelli *et al.*, 2002).

II.5.3.- Interacción S100/calgranulinas-RAGE.

Las S100/calgranulinas constituyen una familia de proteínas de más de 15 miembros que contienen dos dominios de mano EF unidos por un péptido que las conecta (Donato 2001). Estas moléculas se expresan en células inflamatorias y dentro de la célula, están implicadas en la unión de calcio, fagocitosis y motilidad celular (Donato, 2001). Son liberadas al espacio extracelular, donde tienen propiedades parecidas a las citoquinas proinflamatorias. Se acumulan en sitios de inflamación

crónica como la fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide (Wautier & Guillauseau, 2001).

Estudios realizados por Hofmann *et al.* (1999), demostraron que en células endoteliales se produce una expresión de VCAM-1 y de factor tisular dependiente de RAGE después de la exposición a S100A12. La interacción S100A12-RAGE da lugar a quimiotaxis y expresión del factor tisular en fagocitos mononucleares y en linfocitos se produce expresión de IL-2 y un aumento de su proliferación. Estos hechos sugieren un efecto proinflamatorio de la interacción S100A12-RAGE (Stern *et al.* 2002 a y b).

Estos efectos se probaron *in vivo* utilizando diferentes modelos de inflamación. Así, en el modelo de hipersensibilidad reducida (“delayed-type hypersensitivity”), un modelo de inflamación clásica, se sensibilizaron ratones con BSA metilado lo que condujo a infiltración del tejido con células inflamatorias, activación de NF- κ B y expresión de citoquinas proinflamatorias. La contribución de la interacción S100/calgranulinas-RAGE en la patogénesis de la inflamación en este modelo se comprobó ya que la administración de sRAGE y anticuerpos frente al RAGE o frente a S100A12 provocó una fuerte inhibición de la respuesta inflamatoria (Hofmann *et al.*, 1999). En modelos de colitis crónica en ratones sin IL-10, de artritis inducida por colágeno y de encefalitis autoinmune se ha observado una supresión de la respuesta inflamatoria por bloqueo de la interacción S100/calgranulinas-RAGE (Schmidt *et al.*, 2001).

En todos estos procesos la interacción S100-RAGE no es la causa de los desórdenes inflamatorios, sino que una vez que las células inflamatorias están en el lugar de la inflamación, éstas liberan S100/calgranulinas que se unen al RAGE y

perpetúan la activación celular aumentando la probabilidad de enfermedad crónica (Bucciarelli *et al.*, 2002).

II.5.4.- Interacción Anfoterina-RAGE.

La anfoterina es una proteína cromosómica de unión al DNA no histona (Hori *et al.*, 1995). Su papel en la estructura/regulación de genes no se conoce, aunque al existir también extracelularmente y en la superficie de las células, puede tener un papel en el desarrollo neuronal y en la biología tumoral (Rauvala *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 2002b).

Estudios *in vitro* han mostrado que la anfoterina promueve el crecimiento de la neurita, y que durante el desarrollo del sistema nervioso central el RAGE y anfoterina presentan un patrón de expresión espacial y temporal similar (Hori *et al.*, 1995; Bucciarelli *et al.*, 2002). En el promotor del RAGE existen elementos de unión de Sp 1 que podrían mediar el efecto de la anfoterina en aumentar la expresión neuronal del RAGE (Li *et al.*, 1998).

Los efectos de la anfoterina en el crecimiento de la neurita son mediados por el RAGE ya que el bloqueo del RAGE, usando sRAGE o anticuerpos frente al RAGE suprimen este efecto (Hori *et al.*, 1995). Además se ha demostrado que la unión de la anfoterina al RAGE desencadena la activación de proteínas pertenecientes a la familia Rho GTPasas (Cdc 42 y Rac) implicadas en la reorganización del citoesqueleto durante el movimiento celular (Huttunen *et al.*, 1999).

La expresión de la anfoterina (Parkkinen *et al.*, 1993) y del RAGE (Taguchi *et al.*, 2000) también está aumentada en tumores. Debido al efecto de la anfoterina y el RAGE en el crecimiento de la neurita, se pensó que la interacción anfoterina-RAGE,

podría estar relacionada con la migración y/o invasión del tumor. Para estudiar la relevancia del RAGE en la migración de células tumorales se han utilizado dos modelos experimentales de tumor: glioma C6 como modelo de tumor de crecimiento local y el carcinoma de pulmón de Lewis como un modelo de tumor formador de metástasis.

Se generaron tumores en ratones inmunocomprometidos por inyección de células de glioma C6, y se comprobó que el tamaño del tumor disminuía significativamente por la administración de sRAGE o anticuerpos frente al RAGE (Taguchi *et al.*, 2000). Para confirmar el papel del RAGE en el crecimiento del tumor se realizó un experimento similar pero utilizando células de glioma C6 transfectadas de forma estable con el RAGE, con sRAGE (el extremo extracelular del RAGE) o con DN-RAGE (una forma truncada del RAGE que carece del dominio citosólico). Se observó una importante diferencia en los tumores procedentes de cada uno de los clones. Así, los tumores procedentes de las células que sobreexpresaban el RAGE eran mucho más grandes y más invasivos. En paralelo con el volumen e invasividad del tumor, los niveles de MMPs (metaloproteinasas de matriz) también eran mucho menores en las células donde el RAGE estaba bloqueado (Taguchi *et al.*, 2000).

También se ha observado el efecto del bloqueo del RAGE en la metástasis del tumor en el carcinoma de pulmón de Lewis, y se ha visto que la administración de sRAGE cuando se elimina el tumor primario, produce una reducción significativa en el número de metástasis en la superficie del pulmón (Taguchi *et al.*, 2000).

El principal efecto del RAGE se produce en la migración e invasividad del tumor, más que en la apoptosis o proliferación, aunque el bloqueo del RAGE también puede reducir el crecimiento celular. Además los niveles de MMPs 2 y 9, que están relacionadas con la invasión del tumor, están disminuidas en tumores en los que el

RAGE se ha bloqueado. La interacción RAGE-anfoterina no parece afectar a la angiogénesis del tumor (Schmidt *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios para conocer los mecanismos por el que el bloqueo del RAGE tiene este efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor, y se ha visto que en células transfectadas con sRAGE y con DN-RAGE, hay una reducción en la activación de las MAP kinasas (ERK 1/2, p38 y SAP/JNK), en comparación con las células transfectadas con el RAGE completo (Taguchi *et al.*, 2000).

La anfoterina, también puede ser liberada de células inflamatorias, como los monocitos activados, aumentando por tanto los mecanismos inflamatorios (Andersson *et al.*, 2000). Además, células necróticas también pueden liberar anfoterina, causando una respuesta inflamatoria, por tanto proporcionando una señal de estimulación proinflamatoria más allá de la desencadenada por el evento iniciador (Scaffidi *et al.*, 2002). El papel del RAGE en los mecanismos relacionados con la respuesta inflamatoria no está directamente demostrado (Hudson *et al.*, 2003).

II.6.- VARIABILIDAD GENÉTICA DEL RAGE

En rata, nuestro grupo de investigación ha descrito que el receptor presenta un alto grado de variabilidad. Se ha descrito la existencia de dos isoformas generadas por *splicing* alternativo del exón 9, que pueden tener diferente afinidad y/o especificidad por los ligandos (Girón *et al.*, 1998). Más recientemente, hemos descrito que el gen del RAGE de rata presenta dos señales de poliadenilación funcionales, que hace que se generen dos isoformas que difieren en la región 3' no traducida del mRNA del receptor. El uso de la segunda señal de poliadenilación genera una

isoforma del mRNA que contiene una secuencia ARE (secuencia rica en adenina y uracilo) que actúa disminuyendo la estabilidad del mRNA (Caballero *et al.*, 2004).

En humanos, también se ha descrito un alto grado de variabilidad para el receptor del RAGE. Existen diferentes isoformas generadas por *splicing* alternativo, algunas de ellas son formas solubles del receptor, que mantienen la capacidad de unir ligandos pero que carecen de la región transmembrana y por tanto, han perdido la capacidad de generar respuestas intracelulares.

La primera isoforma generada por *splicing* alternativo fue descrita por Malherbe *et al.*, en 1999. En esta isoforma denominada hRAGEsec, se pierde el principio del exón 3, se mantiene parte del intrón 7 y se pierde el exón 8, lo que hace que se pierda el dominio transmembrana y se produzca un cambio en el dominio C-terminal. Esta isoforma es secretada al espacio extracelular pero es muy inestable y es parcialmente degradada (Malherbe *et al.*, 1999).

Posteriormente, Yonekura *et al.* (2003), describieron dos nuevas isoformas del RAGE en células endoteliales y pericitos, una isoforma truncada en el extremo amino y otra en el extremo carboxilo. La isoforma truncada en el extremo amino, se genera por la presencia de un codón de parada en fase de lectura en el intrón 1, como consecuencia se pierden los exones 1 y 2 y la metionina presente en el exón 3 se utiliza como inicio de la proteína. Esta proteína, al carecer del dominio variable, no tiene la capacidad de unir ligandos. Esta isoforma del RAGE, parece que tiene una función importante en la regulación de la angiogénesis, al menos en parte por regular la migración de células endoteliales, que puede ser independiente de la ruta de señalización de AGEs. La isoforma truncada en el extremo carboxilo contiene parte del intrón 9 y pierde el exón 10, que codifica para el dominio transmembrana. En el intrón 9 se genera una señal de parada en fase de lectura, lo que hace que se pierda el

exón 11, por lo que la proteína generada es secretada extracelularmente y es bastante estable. Esta isoforma mantiene la capacidad de unir ligandos y además se ha visto que neutraliza la acción de los AGEs. Por tanto, la producción de esta isoforma por células vasculares podría ser fisiológicamente relevante ya que captaría AGEs y protegería a las células vasculares de la activación de los receptores de la superficie celular que llevaría a daño vascular (Yonekura *et al.*, 2003).

La abundancia de las distintas isoformas es diferente en células endoteliales y pericitos, esto podría ser la causa de las diferentes respuestas a los AGEs observadas en los distintos tipos celulares.

Posteriormente se han descrito tres nuevas isoformas solubles para el receptor de AGEs generadas por *splicing* alternativo (Schlueter *et al.*, 2003). Estos nuevos transcritos descritos tienen diferente patrón de expresión en los distintos tejidos estudiados, así, en los tejidos no proliferativos, como por ejemplo el pulmón, existe una mayor cantidad de RAGE en la membrana que no compite por sus ligandos con formas solubles del receptor.

Estudios de otros autores (Park *et al.*, 2004) describieron otra isoforma soluble del RAGE humano que se genera por una delección del exón 8. Ding *et al.*, 2005, estudiaron las isoformas del receptor presentes en cerebro y identificaron 6 isoformas, las tres ya conocidas (RAGE completo, isoforma N-truncada y la isoforma C-truncada) y tres nuevas isoformas, dos de ellas solubles y una que pierde parte del dominio citosólico y que por tanto puede tener un patrón de transducción de señales diferente. La alta variabilidad del receptor en cerebro sugiere que en este tejido hay una regulación de la expresión del RAGE, y posiblemente de la función muy especializada, vía *splicing* alternativo (Ding *et al.*, 2005). Este trabajo estudia la abundancia relativa de las distintas isoformas en cerebro y se observa que en

cerebros procedentes de pacientes sanos predomina la isoforma soluble del RAGE, que previene el inicio de la transducción de señales mediada por RAGE.

En ratón, se ha descrito una forma soluble del receptor generada por proteólisis, sugiriendo que en humanos la producción de isoformas solubles se podría generar también por un mecanismo distinto al *splicing* (Handford *et al.*, 2004).

Todos estos estudios parecen indicar que el papel de la señalización del RAGE no es mediado por la acción de único tipo de receptor, sino que es la suma de los efectos derivados de las distintas isoformas del RAGE. Por eso, es importante entender la totalidad de la expresión del RAGE en los diferentes tejidos. Se ha sugerido que cada una de las isoformas del RAGE se expresa de una manera tejido-específica para cubrir los ligandos específicos y endógenos a cada tejido individual (Ding *et al.*, 2005 b). Además, los niveles de expresión de las diferentes variantes del RAGE también pueden variar entre personas, esta diversidad puede ser un factor que dote a los diferentes individuos de diferente susceptibilidad o resistencia al desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas (Yonekura *et al.*, 2003).

Estudios epidemiológicos en pacientes con enfermedad vascular diabética, han sugerido un fuerte componente genético en estas enfermedades. El papel del RAGE en la enfermedad vascular en diabetes, hace que sea un gen candidato para el estudio de variaciones alélicas y su papel en la patogénesis mediada por RAGE (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1997; Hudson y Schmidt 2004). El gen del RAGE está localizado en el cromosoma 6, en el complejo mayor de histocompatibilidad, una región del genoma que contiene muchos genes inflamatorios, además es la región más densa de genes del genoma, con muchos genes solapados (Sugaya *et al.*, 1994).

Se han estudiado varios polimorfismos en el gen del RAGE, en la región codificante y en las regiones reguladoras que pueden afectar a la función y expresión del RAGE. Los estudios se han centrado en un polimorfismo común en el exón 3 Gly82Ser, que se encuentra en el dominio de unión a ligandos. La importancia de este polimorfismo se ha estudiado en células CHO transfectadas con las dos isoformas (con glicina o con serina en la posición 82) y en macrófagos aislados de sujetos humanos que portan las dos isoformas. En estas células se observó que la isoforma con serina tenía una mayor afinidad por S100/calgranulinas y que cuando era activado por el ligando se producía un aumento de la activación de proteínas proinflamatorias, TNF- α , IL-6 y metaloproteinasas de la matriz (Hofmann *et al.*, 2002). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que el alelo Ser82 podría tener un papel importante en el componente inflamatorio de la enfermedad vascular, por eso se realizaron varios estudios para evaluar la prevalencia de este polimorfismo en la enfermedad vascular en sujetos diabéticos y no diabéticos, pero no encontraron diferencias en la frecuencia de alelos en sujetos con o sin enfermedad macrovascular o microvascular (Hudson *et al.*, 1998). Si se ha observado un aumento del alelo Ser82 en sujetos diabéticos con dermatosis microvascular (Kankova *et al.*, 2001), psoriasis (Kankova *et al.*, 1999) y en sujetos con artritis reumatoide (Hofmann *et al.*, 2002).

También se han estudiado polimorfismos presentes en las regiones reguladoras del receptor. Se han identificado varios sitios de regulación positiva y negativa en la región 5' del receptor (desde -1700 a +1 pares de bases). Un primer estudio identificó un posible polimorfismo en la posición -1152 del promotor del RAGE (-1159 C/A), que estaba relacionado con la nefropatía en pacientes con diabetes tipo 1 (Poirier *et al.*, 2001). Estudios posteriores demostraron que en realidad no se trataba de un polimorfismo del gen del RAGE sino una diferencia de la región

3' no traducida del gen PBX localizado en el cromosoma 6, junto al gen del RAGE y su pseudogen, presente en el cromosoma 3 (Hudson *et al.*, 2001b).

Los polimorfismos más comunes de la región promotora del RAGE son tres: -374 T/A, -429 T/C y una delección de 63 pares de bases entre la posición -407 y -345. En estudios con genes reporteros, todos los alelos menos frecuentes (-374 A, -429 C y la delección de 63 pares de bases) mostraron un aumento de la expresión del receptor con respecto a la forma "normal". En estudios de retardo en gel, se observó que en el alelo -374 A se producía una pérdida de la unión de proteínas a esta región del promotor, lo que sugiere que este polimorfismo afecta a la unión de una molécula represora y por lo tanto se produce un aumento en la expresión del gen (Hudson *et al.*, 2001). Estudios en la prevalencia de estos polimorfismos en sujetos diabéticos, no han encontrado diferencias en la frecuencia de expresión de estos alelos en pacientes con o sin enfermedad macrovascular. Sin embargo, si que se observó una asociación significativa entre el polimorfismo -429 T/C y la retinopatía, en sujetos con diabetes tipo 2 con retinopatía se observa una prevalencia más alta del alelo C con respecto a los pacientes sin retinopatía. En el polimorfismo -374 T/A no se observan diferencias significativas entre los grupos, pero si existe una tendencia de incremento del alelo A en pacientes diabéticos con retinopatía (Hudson *et al.*, 2001).

En estudios posteriores, realizados en diabéticos tipo 1 se ha visto que en pacientes con un pobre control metabólico, el alelo -374 A tenía un efecto protector para la enfermedad cardiovascular y para la nefropatía diabética (albuminuria) (Pettersson-Fernholm *et al.*, 2003). Finalmente, se ha hecho un estudio que muestra una asociación del polimorfismo -374 T/A con la nefropatía diabética y la retinopatía en pacientes con diabetes tipo 1. Según este estudio el alelo A es un factor de riesgo para la nefropatía diabética, una asociación que es independiente del control

metabólico, de la presión sanguínea y de otros factores de riesgo (Lindholm *et al.*, 2006).

II.7.- PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE. APLICACIONES

Las proteínas fluorescentes verdes (GFP) son encontradas en numerosos organismos, sin embargo la mayoría de los estudios utilizan la GFP procedente de la medusa *Aequorea aequorea*, comúnmente conocida como *Aequorea victoria* y *Aequorea forskalea*. En los últimos quince años, la proteína fluorescente verde ha pasado de ser una proteína prácticamente desconocida a ser una herramienta comúnmente utilizada en biología molecular, medicina y biología molecular (Zimmer, 2002).

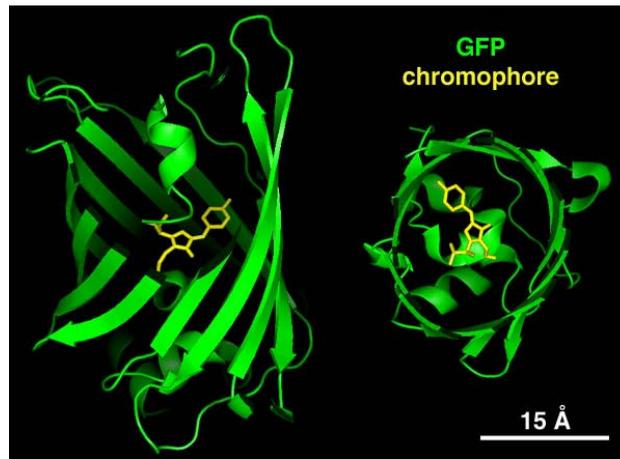


Figura II.4.- Estructura de la proteína fluorescente verde. Se muestra un modelo de cintas. Se destaca la presencia del grupo cromóforo generado por la interacción de cadenas laterales de aminoácidos de la proteína.

La fluorescencia de la GFP ha sido utilizada para investigar un amplio rango de propiedades y comportamientos. Las principales razones de su uso son: su elevada estabilidad; que el cromóforo de la GFP es producido a través de una ciclación interna autocatalítica postransduccional que no requiere cofactores o sustratos; que la fusión de la GFP a una proteína, raramente afecta a la actividad o movilidad de la proteína, y que en la mayoría de los casos no es tóxica. La GFP es resistente al calor, al pH alcalino, a sales orgánicas y a la mayoría de las proteasas. Se han creado mutantes con codones optimizados para mamíferos, plantas, levaduras y hongos (Zimmer, 2002).

Hay que señalar que algunas mutaciones en la secuencia de la GFP conducen a un incremento en el rendimiento de la misma. La mutación de este tipo mejor caracterizada es la EGFP (Enhancer Green Fluorescent Protein). También, mutaciones puntuales en la secuencia de la GFP pueden conducir a una modificación del espectro de emisión y excitación de la proteína dando lugar a variantes rojas, cian y amarillas de la GFP (Zimmer, 2002).

Algunas de las limitaciones de la GFP son la baja formación postransduccional del cromóforo, el requerimiento de oxígeno y la dificultad para distinguir la GFP de la fluorescencia de fondo cuando la GFP no se expresa en cantidades elevadas o no se localiza en altas concentraciones locales.

Las aplicaciones biológicas de la GFP pueden ser divididas en uso como marcador y en uso como indicador. En las aplicaciones como marcador, la fluorescencia de la GFP refleja los niveles de la expresión de genes o localizaciones subcelulares de dominios de proteínas o proteínas que se han fusionado a la GFP. Como un indicador, la fluorescencia de la GFP puede ser modificada

postransduccionalmente por su ambiente químico y en interacciones proteína-proteína (Tsien, 1998).

La primera aplicación propuesta para la GFP fue como gen reportero para detectar la expresión de genes *in vivo* (Tsien, 1998; Zimmer, 2002; March *et al.*, 2003). La expresión de la GFP puede ser monitorizada usando un gen de la GFP que está bajo el control de un promotor de interés, y medir la fluorescencia de la GFP, que indica directamente el nivel de expresión del gen en células vivas o en tejidos. Sin embargo, la GFP necesita promotores muy fuertes para producir suficiente expresión y ser detectada, especialmente en células de mamífero. La mayoría de los trabajos publicados utilizan promotores constitutivos de virus como el de citomegalovirus o fuertes reguladores externos (Tsien, 1998; Zimmer, 2002).

La GFP también ha sido muy utilizada como gen reportero, especialmente en imagen espacial de la expresión de genes en células vivas, sin embargo, su baja sensibilidad, debido al hecho de que no hay amplificación de señal ya que cada GFP tiene sólo un cromóforo, ha limitado este uso de la GFP (Tsien, 1998; Zimmer, 2002).

La aplicación de la GFP más común y con mejores resultados ha sido fusionarla a proteínas para monitorizar su localización y destino. La GFP es ideal como marcador fluorescente de proteínas de fusión porque no requiere la presencia de cofactores o sustratos, el cromóforo es producido *in vivo*, y en la mayoría de los casos la quimera resultante no afecta a la localización o actividad de la proteína marcada. El gen que codifica a la GFP se fusiona en fase de lectura con el gen que codifica la proteína endógena, la quimera resultante se expresa en la célula u organismo de interés, y puede ser utilizada para visualizar eventos celulares y para monitorizar la localización celular. El resultado es una proteína de fusión que

mantiene las funciones y la localización de la proteína inicial, pero que es fluorescente (Tsien, 1998; Zimmer, 2002).

La GFP ha sido utilizada con éxito para marcar los principales orgánulos de la célula, incluyendo membrana plasmática, aparato de Golgi, vesículas secretoras, mitocondrias, peroxisomas, vacuolas y fagosomas. Además, las proteínas de fusión con GFP han sido usadas en la mayoría de organismos, desde virus a células de mamíferos. La mayoría de quimeras de GFP han sido creadas fusionando la proteína de interés en el extremo amino o carboxilo de la GFP (Tsien, 1998).

Otra aplicación de la GFP es en el estudio de las interacciones proteína-proteína. Así, la GFP se ha utilizado en experimentos de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) que consiste en un intercambio de energía desde un fluoróforo donador excitado a un fluoróforo aceptor que está a 10-100 Å del donador (Zimmer, 2002; March *et al.*, 2003). Para que se produzca el FRET, el espectro de emisión del donador tiene que solaparse con el espectro de excitación del aceptor. Los espectros de emisión y de excitación de las distintas variantes de las proteínas fluorescentes, se solapan, por lo que son potenciales parejas para ser utilizadas en FRET. Además la GFP también ha sido usada en aplicaciones basadas en FRET con otros fluoróforos distintos a proteínas fluorescentes (Roessel & Brand, 2001; Zimmer, 2002).

Otro método para el estudio de las interacciones proteína-proteína utilizando GFP, es haciendo proteínas de fusión con las dos proteínas de interés, una de ellas se une al extremo amino de la mitad de la GFP, la otra proteína se une a la otra mitad de la GFP, si se produce la interacción entre las dos proteínas las dos mitades de la GFP se juntan y se produce emisión de fluorescencia (Zimmer, 2002).

III.- OBJETIVOS

III.- OBJETIVOS

En el síndrome diabético es fundamental el acúmulo de productos avanzados de glicación (AGEs). Estos productos se acumulan en los tejidos susceptibles en un proceso de captación que se encuentra mediado por el receptor de AGEs. Este receptor, que se sobre-expresa durante la diabetes en los tejidos diana, es responsable no sólo de internalizar los AGEs sino de desencadenar respuestas proliferativas en estos tejidos.

En nuestro grupo de investigación hemos descubierto que el receptor de AGEs de rata tiene una gran variabilidad génica producida mediante *splicing* alternativo, uso diferencial de señales de poliadenilación y probablemente el empleo de dos inicios de la transcripción. Hasta ahora, estos trabajos han descrito la existencia de esta variabilidad del receptor, pero es necesaria la determinación de las propiedades y funcionalidad de estas isoformas del receptor.

Por tanto, el objetivo general que persigue esta Tesis Doctoral es la caracterización funcional de la variabilidad del receptor de AGEs de rata, prestando especial atención a los mecanismos de transducción de señales que desencadena el receptor. Para conseguir este objetivo general nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1.- Obtención de herramientas para el estudio in vitro y en cultivos celulares del receptor de productos avanzados de glicación de rata. Pretendemos obtener las herramientas necesarias que nos permitan la caracterización del receptor de productos avanzados de glicación y el estudio de la modulación de la transducción de respuestas intracelulares mediadas por el mismo. Para ello, proponemos:

1A.- La expresión recombinante del RAGE o sus dominios en bacterias, la caracterización de las proteínas expresadas y la obtención de anticuerpos.

1B.- Desarrollar un sistema de expresión en células eucariotas del RAGE que permita estudiar la localización subcelular, su capacidad de unión a ligandos y la generación de respuestas intracelulares.

2.- *Estudiar la funcionalidad de las diferentes isoformas del RAGE de rata.* Hemos descrito ya la existencia de al menos dos isoformas del mRNA del receptor de AGES de rata generadas mediante *splicing* alternativo, y es probable la existencia de otra isoforma generada por el uso de diferentes inicios de la transcripción. Proponemos, utilizando las herramientas generadas en el objetivo 1, realizar un estudio de la funcionalidad de estas isoformas. Este objetivo se centrará en la determinación de la localización subcelular, capacidad de unión a ligandos y desencadenamiento de señales intracelulares mediadas por cada isoforma.

3.- *Estudio de los mecanismos de regulación de la expresión del RAGE de rata.* El incremento de AGEs circulantes conduce a una sobre-expresión de su receptor. Pretendemos estudiar los mecanismos implicados en la regulación de su expresión. Por ello es relevante la caracterización del promotor del RAGE de rata, mediante el estudio de la capacidad de respuesta a diferentes estímulos. Así mismo, hemos descubierto que el extremo 3' no traducido del mRNA del RAGE de rata contiene señales de poliadenilación alternativas y secuencias ricas en adeninas y timinas que pueden regular la expresión. El estudio del papel de este extremo 3' del mRNA en respuesta a diferentes estímulos también será un objetivo de esta Tesis Doctoral.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- MATERIALES

IV.1.1.- LÍNEAS CELULARES

IV.1.1.1.- Cepas Bacterianas

Para los experimentos de clonación y de expresión de proteínas se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (F', recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, glnV44, relA1, lac) (Bullock *et al.*, 1987).

Para la expresión de algunas proteínas recombinantes se utilizó la cepa de *Escherichia coli* M-15 (Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺) (Zamenhof & Villarejo, 1972), por su menor contenido en proteasas.

IV.1.1.2.- Líneas celulares de mamíferos

Las líneas celulares eucariotas utilizadas en esta Tesis Doctoral se resumen en la tabla IV.1. En ella se ha incluido una breve descripción de ellas.

Tabla IV.1. Líneas celulares eucariotas utilizadas

Nombre	ATCC	Descripción	Expresión endógena de RAGE
CHO-k1	CCL-61	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> . Se trata de una línea celular epitelial de ovario de hamster (Puck <i>et al.</i> , 1958) muy empleada por la facilidad de cultivo y transfección.	-
Neuro-2A	CCL-131	<i>Mouse neuroblastoma cell line</i> . Es una línea celular derivada de un neuroblastoma de ratón albino. Alrededor del 30 % de las células crecen como células neuronales y el 70 % son redondeadas y se adhieren poco a la superficie. (Olmsted <i>et al.</i> , 1970).	+
L6.C11	CRL-1458	<i>Rat Skeletal Muscle Myoblast line</i> . Esta línea celular, tras la disminución de suero en el medio de crecimiento se diferencia espontáneamente a miotúbulos. Es un buen modelo para el estudio del transporte de glucosa mediado por el transportador GLUT4 (Tortorella & Pilch, 2002).	+
NRK-52F	CRL-6509	<i>Normal Rat Kidney Cells</i> . Es una línea celular derivada de túbulos proximales de riñón de rata, que mantiene muchas de las propiedades de los mismos (Yang <i>et al.</i> 1976). Así, tiene capacidad de producir colágeno, secretar péptido natriurético-C y expresar receptores EGF (Fan <i>et al.</i> , 1999).	+
ECV-304	CRL-1998	Es una línea celular endotelial derivada de cordón umbilical humano, se caracteriza por tener un alto potencial de proliferación en ausencia de factores de crecimiento (Takahasi <i>et al.</i> , 1990 y 1992).	+
MLE-12	CRL-2110	<i>Murine Lung Epithelial</i> . Es una línea celular de ratón que mantiene las características morfológicas y funcionales de las células del epitelio respiratorio distal (Wikenheiser <i>et al.</i> , 1993).	++
3T3-L1	CCL-92.1	Es una línea celular de pre-adipocitos de ratón, con morfología fibroblástica. Cuando llegan a confluencia se diferencian a adipocitos en presencia de diversos efectores, detectable microscópicamente por la presencia de gotas lipídicas en el citosol (Green & Meuth, 1974).	+

IV.1.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han usado ratas Wistar hembra de 120-150 g de peso suministradas por la Unidad de Animales de la Universidad de Granada para el desarrollo de un modelo experimental de diabetes inducida con estreptozotocina.

Para la obtención de anticuerpos frente a los distintos fragmentos del RAGE o frente a proteínas reporteras se han utilizado conejos de la raza New Zealand de 2 - 2,5 kg de peso.

Los experimentos realizados con animales en esta Tesis Doctoral se encontraban aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Granada. Para el mantenimiento de los animales se siguieron las normas del *Animal Welfare Committee*.

V.1.3.- MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

IV.1.3.1.- Vectores

- **pSTBlue-1** (Novagen): Este vector se utilizó para la clonación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR. El vector linealizado comercial posee una timina desapareada adicional en 5' que hibrida con la adenina que agrega la *Taq* polimerasa en las reacciones de amplificación, facilitando así la clonación de los productos de PCR. Este vector codifica para genes de resistencia a ampicilina y kanamicina lo que permite la selección de transformantes y también, la selección azul-blanca por α -complementación.

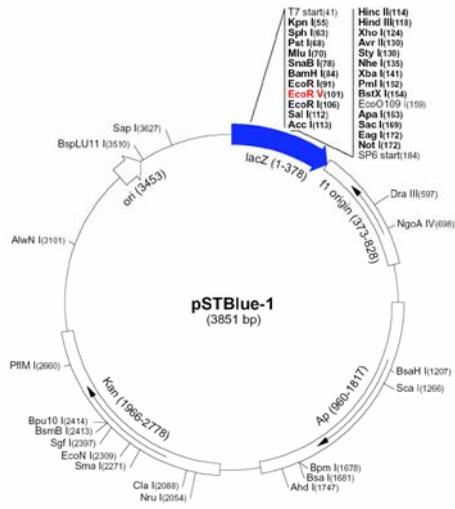


Figura IV.1.- Mapa de restricción del plásmido *pSTBlue-1*. Se incluyen los sitios de restricción del sitio múltiple de clonaje. Se indica en rojo el sitio de restricción *EcoRI*, en el que se incluyen las timinas necesarias para posibilitar el clonaje TA de productos de PCR.

- **pEGFP-N3** y **pEGFP-C1** (Clontech): Estos vectores permiten la expresión de fragmentos de DNA en células de mamífero fusionados en el extremo amino o carboxilo de la proteína fluorescente verde. Contienen el promotor de citomegalovirus para promover la expresión constitutiva de fragmentos de DNA clonados en células de mamíferos. Además, presenta el gen de la neomicina fosfotransferasa, un marcador de selección en células de mamíferos. Asimismo, incluye en 3' secuencias de poliadenilación de SV-40 para favorecer el adecuado procesamiento del mRNA que codifica para la proteína de fusión.

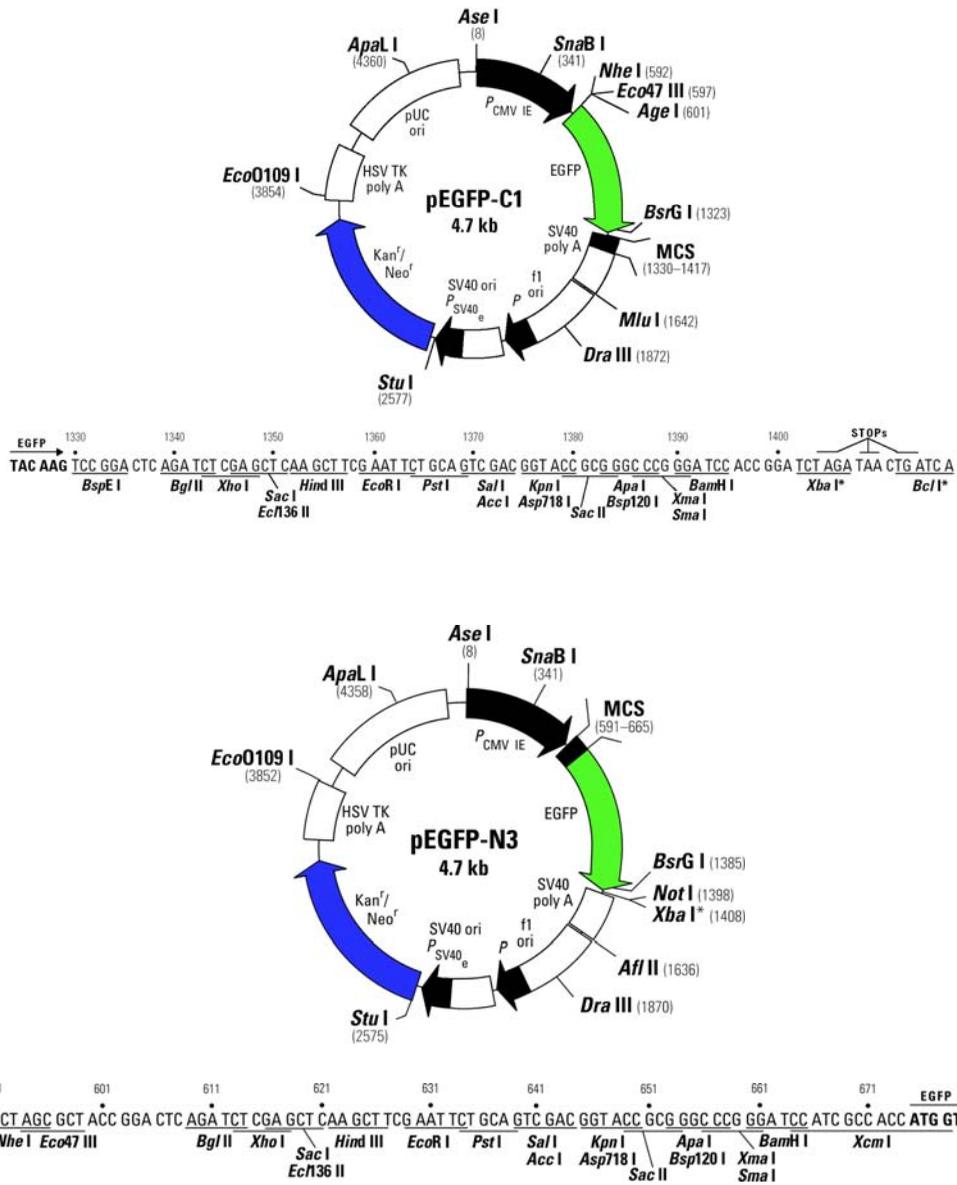


Figura IV.2.- Mapas de restricción de los plásmidos pEGFP-C1 y pEGFP-N3. Se incluyen los enzimas de restricción presentes en el sitio múltiple de clonaje.

- **pMAL-c2X** (New England Biolabs): Este vector permite la expresión en bacterias de proteínas fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP) (Guan *et al.*, 1987). El gen de interés es clonado después del gen *malE*, que codifica para la MBP. Además contiene un promotor fuerte, *tac*, que produce un alto nivel de expresión de la proteína de fusión. La proteína de interés puede ser separada de la MBP por proteólisis con el factor Xa.

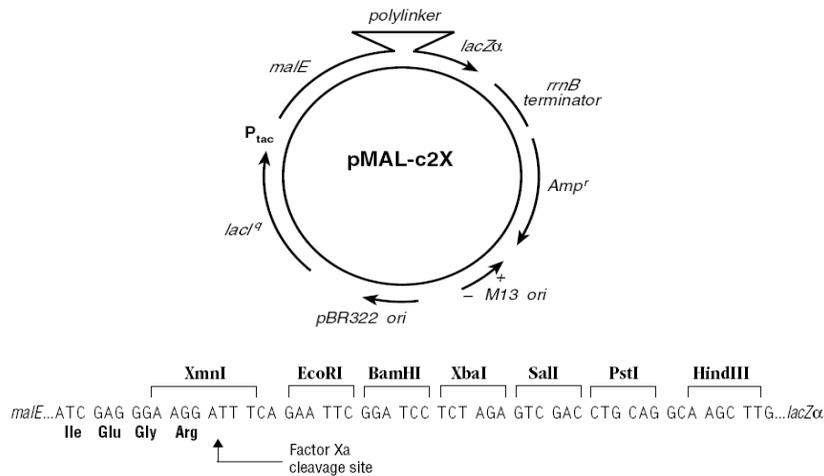


Figura IV.3.- Mapa de restricción del plásmido pMAL-C2X. Se incluyen los enzimas de restricción del sitio múltiple de clonaje. Asimismo, se incluye la secuencia de corte para la proteasa Xa.

- **pGL3-basic, pGL3-control y pRL-TK** (Promega). El vector reportero pGL3-basic permite analizar de forma cuantitativa regiones de DNA que potencialmente puedan regular la expresión génica. Este vector contiene el sitio múltiple de clonaje delante del gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), de forma que la expresión de la luciferasa estará regulada por la región promotora clonada en el sitio múltiple de clonaje. Aunque la familia de vectores pGL3 presentan en 3' secuencias potenciadoras de SV-40 para favorecer la transcripción de la luciferasa, el vector pGL3-basic carece de

dichas secuencias. El vector pGL3-Control se ha utilizado como control positivo de las transfecciones realizadas. Este vector contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga precedido del promotor de SV40, que proporciona un nivel de expresión elevado.

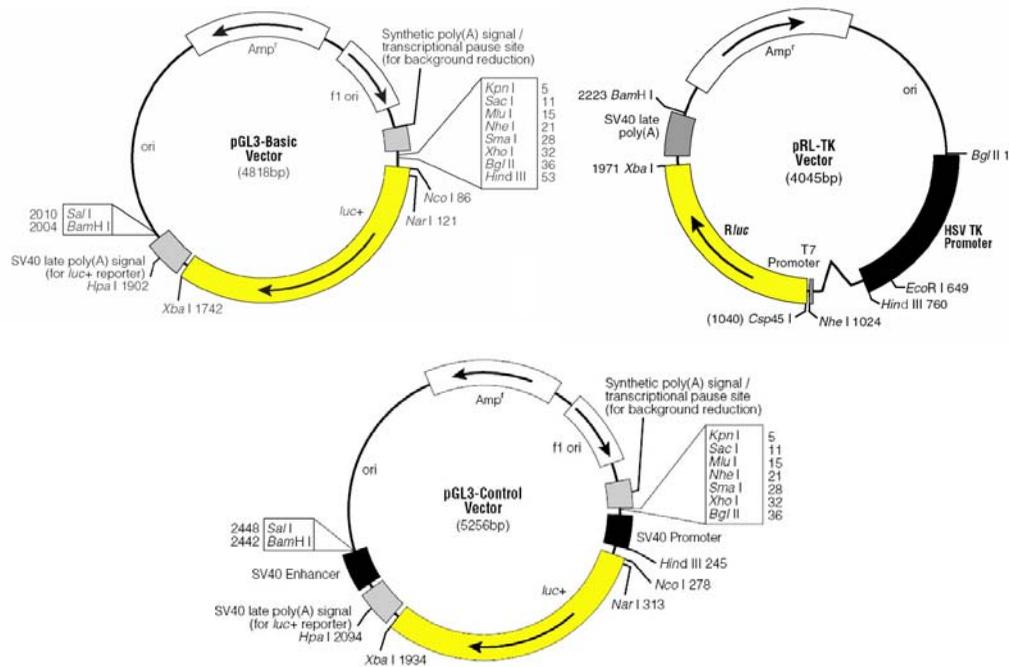


Figura IV.4.- Mapas de restricción de los plásmidos reporteros pGL3-basic, pGL3-Control y pRL-TK.

Para normalizar la eficiencia de transfección de los derivados de pGL3-basic se ha utilizado el vector pRL-TK. Este vector codifica para una luciferasa de renilla (*Renilla reniformis*) bajo el control del promotor de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-TK). Este promotor produce un elevado nivel de expresión de la luciferasa de renilla, que se caracteriza por poder ser medida de una forma independiente a la luciferasa de luciérnaga. Por tanto, este método de normalización de la eficiencia permite la utilización de un

sistema dual de ensayo, en el que en el mismo cultivo celular se determinan las actividades de ambas luciferasas de una manera secuencial y permite una fácil normalización de los resultados.

IV.1.3.2.- Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR han sido sintetizados por IBA BioTAGnology y suministrados por Proteolabs (Parque Tecnológico de la Salud, Granada). En la Tabla IV.2 se indica el nombre de cada oligonucleótido, su orientación y secuencia. Se muestran subrayados los sitios de restricción que se han incluido para el clonaje.

Tabla IV.2. *Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis Doctoral*

Nombre	Orientación	Secuencia (5' → 3')
NH ₂ -Green	Sentido	<u>AGATCT</u> GCCATGCCAACGGGGACAG
COOH-Green	Antisentido	<u>GTCGAC</u> AGGTCCCCCTGCAC
RAGE-FO2	Sentido	GGTAGGGCATGAGGATGAGGGC
RAGE-RE	Antisentido	CGCCACAGGATGGCCCC
GFP-N	Antisentido	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
GFP-F	Sentido	GGCCACCCTCGTGACC
GFP-R	Antisentido	CCGTCTCCTTGAAGAAGATGG
NFκB-F	Sentido	AGTTGAGGGGACTTCCAGGC
NFκB-R	Antisentido	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
RAGE-11	Antisentido	GCATAAGTGGCTCTCCGATCC
RACE-1	Antisentido	GACAATCCGATAGCTGGAAGGA
RACE-2	Antisentido	TTCTAGCTTCTGGGTTGGCTTCT
NotI-oligo(dT)	Sentido/ Antisentido	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT ₁₈
NotI	Sentido/ Antisentido	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGG
RAGE-NH ₂	Sentido	ATGCCAACGGGGACAGTAGC
RAGE-50	Sentido	<u>AGATCT</u> ACGGGGACAGTAGCTAGAGCC
RAGEHU-FF	Sentido	<u>AGATCT</u> TGAGGGGCCACAGAC

RAGEHU-FR	Antisentido	<u>ACGCGTCCAGGAAGGCCTGG</u>
GFP-C	Sentido	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
RAGEHU-D1	Sentido	<u>AGATCTTGA</u> ACTGTTCTGGCCTCAG
RAGEHU-D2	Sentido	<u>AGATCTTA</u> ACCCACCTTGCCAAG
RAGE-100	Sentido	<u>GAATTC</u> AGGGAGCCCCTGCCTCCAG
RAGEV1-F	Sentido	<u>GAATTC</u> ACAGCCCGGATCGGAG
RAGEV1-R	Antisentido	<u>GTCGACT</u> AGACTCGGACTCGGTAGTTGG
RAGEHU-FO	Sentido	CACCTTCTCCTGTAGCTTCA
RAGEHU-RE	Antisentido	TGCCACAAAGAATGACCCC

IV.1.3.3.- Reactivos comerciales utilizados en técnicas de Biología Molecular

- **Ambion:**

- *Northern Max Prehyb/Hyb buffer*, tampón de hibridación utilizado en la técnica de *Northern-blot*.

- **Bio-Rad:**

- Agarosa, para la realización de electroforesis de DNA y RNA, 20X SSC.
- Acrilamida/Bisacrilamida, TEMED y persulfato amónico para la realización de los geles de poliacrilamida.

- **GE Healthcare:**

- *GFX™ Micro Plasmid Prep* kit para el aislamiento de DNA plasmídico.
- [α - 32 P] Desoxicitidina 5'-trifosfato para marcar fragmentos de DNA. [γ - 32 P] Adenosina 5'-trifosfato para el marcaje radiactivo de oligonucleótidos en la técnica de EMSA.
- *First-Strand cDNA synthesis* kit utilizado en la síntesis de cDNA en las reacciones de RT-PCR y en la extensión de cebadores.
- CDP-Star, sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina para el revelado de las membranas de nylon en la técnica del *Southern-blot*.

- Endonucleasas de restricción, Fosfatasa alcalina, *Taq* DNA polimerasa, fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, Desoxirribonucleótidos y T4 Polinucleótido quinasa.
- **-Macherey-Nagel:**
 - *NucleoSpin® Extract II* kit utilizado para eluir fragmentos de DNA de geles de agarosa.
- **Promega:**
 - Vectores pGL3-basic, PGL3-Control y pRL-TK.
 - *Dual Luciferase Assay kit*, utilizado para ensayar la actividad promotora mediante la utilización de vectores reporteros.
- **Roche Molecular Biochemicals:**
 - *DIG High Prime Labeling and Detection Starter kit* para el marcaje con digoxigenina de fragmentos de cDNA. Tampón de hibridación para *Southern-blot DIG Easy Hib*.
- **Schleicher & Schuell:**
 - Membranas nylon *Nytran Super Charge*.
- **Sigma (Molecular Biology Reagents):**
 - DNasa, RNAsa. Dietil-pirocarbonato y tiocianato de guanidinio para la purificación de RNA. Sephadex G-25 y Glass beads para la purificación de sondas marcadas radiactivamente. Películas para autorradiografía.

IV.1.4.- MATERIAL PARA CULTIVO DE CÉLULAS

IV.1.4.1.- Medios de cultivo para bacterias

Como medio normal de crecimiento de bacterias se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

Bactotriptona.....	1 %
Extracto de levadura.....	0,5 %
Cloruro Sódico.....	0,5 %

Para la preparación del medio sólido se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1,5 % (p/v). Los medios de cultivo usados para el crecimiento de bacterias se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos.

Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con diferentes antibióticos para seleccionar las bacterias portadoras de diferentes genes de resistencia a antibióticos. Las soluciones de antibióticos se prepararon 1000 veces concentradas; los antibióticos preparados en agua se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0,22 µm de diámetro de poro y se conservaron a -20 °C. La concentración final de los antibióticos en el medio de cultivo fue: Ampicilina 50 µg/mL (en agua destilada), Kanamicina 25 µg/mL (en agua destilada) y Tetraciclina 15 µg/mL (en metanol).

Cuando se utilizaron bacterias transformadas con plásmidos que poseen el sistema de selección por α -complementación, los medios de cultivo se suplementaron con IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), lo que permite detectar clones positivos o negativos mediante el color de las colonias. Ambos se adicionaron en una concentración final de 20 µg/mL de medio de cultivo. La disolución de partida de IPTG se preparó a una concentración de 200 mg/mL en agua destilada y se esterilizó por filtración y la de X-Gal a 20 mg/mL en dimetilformamida. Ambas se conservaron a -20 °C.

IV.1.4.2.- Medios de cultivo para líneas celulares de mamíferos

Como medio normal de crecimiento se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (o suero bovino para la línea celular 3T3-L1), 2 mM L- glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Para el cultivo de algunas líneas celulares (NRK-52F y Neuro-2A) el medio de cultivo se suplementó con aminoácidos no esenciales en una concentración 1X. La línea celular CHO-k1 se cultivó en medio HAM'S F-12 y la línea celular ECV-304 se cultivó en medio RPMI 1640, suplementados de la misma manera.

Para la selección de células transfectadas con vectores eucariotas que contienen el gen de la neomicina fosfotransferasa (*Neo*), el medio de cultivo se suplementó con 0,5 mg/mL de Geneticina (G-418).

Los medios de cultivo, los antibióticos y los aminoácidos no esenciales se obtuvieron de Sigma. La geneticina y los sueros bovinos son de Life Technologies. El material plástico para el cultivo de células eucariotas, como placas, frascos o pipetas, procede de Cultek y VWR.

IV.1.5.- MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

IV.1.5.1.- Reactivos comerciales utilizados en técnicas de análisis de proteínas

- **Bio-Rad:**

- o Acrilamida/Bisacrilamida, TEMED y persulfato amónico para la realización de los geles. Reactivos generales como Tris, SDS o Glicocola para la separación electroforética y su transferencia a nitrocelulosa. Marcadores de proteínas preteñidos de peso molecular de amplio rango.

- **Cell Signaling:**
 - o Anticuerpo anti p-ERK 1/2
- **GE Healthcare:**
 - o Reactivos ECL™ para la detección mediante quimioluminiscencia en la técnica de *Western-blot*.
- **Roche Molecular Biochemicals:**
 - o PMSF usado como inhibidor de proteasas.
- **Schleicher & Schuell:**
 - o Membranas de nitrocelulosa.
- **Sigma (Molecular Biology Reagents):**
 - o Comassie Brilliant Blue G-250 y Albúmina Sérica Bovina para la medida de proteínas por el método de Bradford. β -Mercaptoetanol y glicerol para la preparación del tampón de carga de las proteínas.
 - o Anticuerpos anti-GFP y anti-IgG de conejo y de ratón conjugados a peroxidasa.
 - o Inhibidor de proteasas de uso en extractos bacterianos
 - o Coadyuvante de Freund
- **Upstate**
 - o Anticuerpo anti ERK 1/2 totales

IV.2.- INSTRUMENTACIÓN

IV.2.1.- PARA CULTIVOS BACTERIANOS

- **Gallenkamp:** Incubadores termostatzados con agitación orbital
- **Memmert:** Estufas de temperatura controlada para el crecimiento de bacterias
- **Telstar:** Cabina estéril de flujo laminar modelo Micro V

IV.2.2.- PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

- **MDH:** Cabina de flujo laminar
- **REVCO:** Incubador con atmósfera controlada enriquecida en CO₂

IV.2.3.- PARA EL ANÁLISIS Y LA MANIPULACIÓN DE DNA, RNA Y PROTEÍNAS

- **Bio-Rad:** Cubetas de electroforesis para DNA *MiniSub Cell GT*, fuente de alimentación *Power Pac 300*, cubeta de electroforesis para Proteínas *Mini Protean Cell II*, cubeta de transferencia *Mini Trans-blot*.
- **IKA Labortechnik:** Homogenizador de tejidos *Ultraturrax*
- **Life Technologies:** Cubeta de electroforesis para RNA *Horizon 11·14*
- **LKB Bromma:** Fuente de alimentación modelo 2197
- **New Brunswick Scientific:** Transiluminador de UV
- **Perkin Elmer:** Termociclador *GeneAmp PCR System 9700*
- **Precisa Selecta:** Autoclave, Balanzas estándar y de precisión, Baños termostatzados con y sin agitación, Termobloques y Agitadores (orbitales, vortex y magnéticos).
- **Stratagene:** UV Stratalinker 1800
- **Techne:** Horno de hibridación *HB-1D*

IV.2.4.- ESPECTROFOTÓMETROS, FLUORÍMETROS Y LUMINÓMETROS

- **Beckman:** Espectrofotómetro *DU 640 (UV/Visible)*
- **Berthold Technologies:** Luminómetro *Lumat LB9507*
- **Labsystems:** Lector de placas *iEMS Reader MF*
- **Shimadzu:** Fluorímetro *RF 5301PC*

IV.2.5.- MICROSCOPIOS ÓPTICOS, DE FLUORESCENCIA Y CONFOCALES

- **Leica:** Microscopio confocal DMI6000 (Servicios Técnicos Centrales de la Universidad de Granada).
- **Olympus:** Microscopio óptico invertido modelo CK2 y Microscopios de Fluorescencia IX-50 y IX-71 con filtros de fluorescencia WU, WB y WG. El microscopio IX-71 está acoplado a una cámara digital CCD refrigerada Olympus DP71.

IV.2.6.- CENTRÍFUGAS

- **Beckman:** Centrífugas refrigeradas J2-21, rotores JA-14 y JA-20, Ultracentrífuga L8-70M, Ultracentrífuga de sobremesa TL-100
- **Eppendorf:** Microcentrífugas de mesa 5415D

IV.3.- SOFTWARE

Los programas informáticos utilizados para la realización de esta tesis doctoral han sido:

- Microsoft Office XP Profesional (Word, Excel y Power Point).
- Internet Explorer 7.
- Adobe Photoshop CS3 como programa de tratamiento de imágenes.
- Scion Image Beta 4.0.2 e Image J como programas de cuantificación de la intensidad de bandas en geles.
- Vector NTI Suite 10.3 y Gene Runner como programas para el tratamiento de secuencias de DNA y proteínas.
- Kodak Digital Science 1D como sistema para la captura de imágenes de geles de DNA y RNA y proteínas.

- Olympus Soft Imaging Solutions Cell^F ver. 2.5 para la captura y tratamiento de imágenes de fluorescencia.
- Leica Confocal Software LCS ver. 2.1.1.

Además se han empleado diversas páginas y bases de datos de Internet para la obtención de secuencias de plásmidos y protocolos.

IV.4.- MÉTODOS

IV.4.1.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

IV.4.1.1.- Aislamiento de DNA plasmídico

Se han utilizado distintos métodos dependiendo de la pureza de DNA que quisiéramos conseguir o de la cantidad necesaria:

Método de la lisis alcalina

Este método permitió la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala que fue utilizado para su posterior manipulación en reacciones rutinarias (Sambrook *et al.*, 1989).

Se partió de 3 mL de un cultivo líquido de la cepa bacteriana que contiene el plásmido que queremos aislar, esta cepa se cultivó con agitación a 37 °C durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 16.000 xg durante 3 minutos y posterior eliminación del sobrenadante. A continuación, se resuspendieron las bacterias en 100 µL de solución P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM) y a la suspensión bacteriana se le añadieron 200 µL de solución de lisis (NaOH 200 mM,

SDS 1 % (p/v)); el SDS, un detergente que desorganiza las membranas, se mezcló con suavidad y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 200 μ L de Acetato potásico 3 M pH 5,5 que precipita la pared bacteriana, el DNA cromosómico y el SDS (al formar lauril sulfato potásico insoluble) y se incubó durante 15 minutos en hielo. Tras la incubación se centrifugó durante 10 minutos a 16.000 xg con lo que se consiguió precipitar todos los restos celulares grandes y en el sobrenadante quedó el DNA plasmídico. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se añadieron 500 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8. El fenol desnatura las proteínas y a este pH el DNA pasa a la fase acuosa. Tras una agitación fuerte se centrifugó durante 3 minutos a 10.000 xg con lo que se consiguieron tres fases: una fase superior acuosa que contiene el DNA plasmídico, una fase intermedia con proteínas desnaturizadas y una fase inferior fenólica. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio y se añadieron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol que pudieran quedar, se agitó fuertemente y se centrifugó durante 3 minutos a 16.000 xg. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases y la fase superior acuosa se pasó a un tubo limpio. Se añadieron 1000 μ L de isopropanol que hace que el DNA precipite y se incubó durante 30 minutos a -20 °C. Tras la incubación se centrifugó durante 15 minutos a 16.000 xg a 4 °C con lo que se consiguió precipitar el DNA plasmídico, se eliminó el sobrenadante y al precipitado de DNA se le añadieron 1000 μ L de etanol 75 % para eliminar el exceso de sales. Se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 xg y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de DNA se dejó secar en *speed-vac* o al aire y a continuación se resuspendió en la cantidad suficiente de agua o de tampón TE.

Método GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare)

Este método se utilizó para obtener DNA libre de RNA de alta pureza y utilizarlo posteriormente para hacer digestiones con enzimas de restricción, ligaciones.... Se partió de 3 mL de un cultivo líquido de la cepa bacteriana que contiene el plásmido que queremos aislar, esta cepa se cultivó con agitación a 37 °C durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Midi Preps.

Este método se utilizó para obtener grandes cantidades de DNA de elevada pureza y utilizarlo posteriormente para transfectarlo en células eucariotas. Se partió de 500 mL de un cultivo líquido de la cepa bacteriana que contiene el plásmido de interés y se cultivó con agitación a 37 °C durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. El protocolo seguido es muy similar al de la lisis alcalina pero utilizando volúmenes más grandes. El método incluye precipitaciones adicionales de proteínas contaminantes con cloruro de litio 4M y del DNA mediante la adición de PEG8000 en presencia de NaCl.

IV.4.1.2.-Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las electroforesis de muestras de DNA se llevaron a cabo en geles de agarosa preparados en tampón TAE (Tris-base 40 mM, Ácido acético glacial 0,11 % (v/v), EDTA-Na₂ 1 mM pH 8). Se utilizaron concentraciones de agarosa del 0,8 al 2 % dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La electroforesis se realizó a un voltaje entre 80-90 V en tampón TAE hasta que el frente de la

electroforesis marcado por el azul de bromofenol llegó hasta dos tercios del final del gel.

Las muestras para electroforesis se prepararon mezclando la muestra a analizar con tampón de carga (glicerol 40 % (v/v) y azul de bromofenol en agua destilada) en proporción 4:1 (v/v). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos de DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción *HindIII* (λ /*HindIII*) y el marcador de peso molecular comercial de 50 pares de bases de Sigma.

Para visualizar el DNA, después de la electroforesis, los geles se tiñeron por inmersión durante 15 minutos en una solución de Bromuro de Etidio (1,5 mg/mL en tampón TAE) y tras lavar con agua, se expusieron a luz UV (254 - 300 nm) en un transiluminador y se fotografiaron.

IV.4.1.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación de ácidos nucleicos se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al* (1989), basado en la absorción a 260 nm de los ácidos nucleicos y utilizando como blanco la solución en la que se haya disuelto el DNA o el RNA (agua destilada, buffer de elución, PBS estéril o agua DEPC). Este método también permite determinar su pureza. Para ello se midió la absorción a 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas), considerándose una relación A_{260} / A_{280} comprendida entre 1,8 y 2 como un indicador de pureza adecuada para DNA, mientras que un valor por debajo de 1,8 indica contaminación por proteínas o por fenol. En el caso de RNA se consideró un valor óptimo el comprendido entre 1,6 y 1,8. Se consideró un valor estándar de $A_{260} = 1$ para una solución de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de DNA de cadena doble y para una solución de 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de RNA.

En el caso de la cuantificación de DNA se utilizó un método fluorimétrico alternativo utilizando el reactivo comercial Hoechst 33258 (Sigma). La determinación se basa en la emisión de fluorescencia de este reactivo cuando se intercala al DNA. Para la determinación se preparó una curva patrón con DNA de esperma de salmón de concentración conocida, con un rango de concentraciones comprendidas entre 0 y 5 mg/mL, y se midió la fluorescencia en tampón TNE (NaCl 0,2M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y 460 nm de emisión. La concentración de DNA y la fluorescencia medida presentan una relación lineal. La concentración de DNA se calculó por interpolación de los valores de fluorescencia de la muestra en la curva patrón.

IV.4.1.4.-Técnicas básicas de manipulación de DNA

Digestión con enzimas de restricción

Todas las enzimas de restricción empleadas para la realización de este trabajo se han utilizado siguiendo las instrucciones de los proveedores. Usualmente las reacciones se realizaron con 0,1-0,5 µg de DNA, 1 µL del tampón 10X suministrado por la casa comercial y 0,5-10 U de enzima de restricción en un volumen final de 10 µL. Las digestiones se realizaron por incubación durante 2 horas a la temperatura óptima para el enzima de restricción utilizado, generalmente a 37 °C.

Ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o mediante PCR se realizaron utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Normalmente se realizaron en un volumen final de 10 µL que contenían la cantidad adecuada de

vector e inserto en proporción molar 1:5, 1 μL de tampón de ligación 10X y 1 μL de T4 DNA ligasa. La mezcla de reacción se incubó a 10-12 °C durante toda la noche.

Recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

En aquellos casos en los que era necesario recuperar fragmentos de DNA de un gel de agarosa, una vez terminada la electroforesis, se cortó el trozo de agarosa que contenía el fragmento con un bisturí. El DNA se eluyó de la agarosa utilizando el kit comercial NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de células competentes

La preparación de células competentes de *E. coli* se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al* (1990). La cepa de *E. coli* se inoculó en 3 mL de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se cultivó en agitación y a 37 °C durante toda la noche. De este cultivo saturado se inocularon 0,5 mL en 50 mL de medio A (LB suplementado con glucosa 0,2 % (p/v) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM) y se incubó en agitación y a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($\text{D.O.}_{660} = 0,6$). A partir de este momento se trabajó en hielo para aumentar la eficiencia de transformación. Así, se mantuvieron 10 minutos en hielo y las bacterias se recogieron por centrifugación a 1500 xg durante 10 minutos a 4 °C. A continuación se resuspendieron en 250 μL de medio A (conservado en hielo) y se añadieron 1250 μL de Solución B (LB suplementado con glicerina 36 % (p/v), PEG 7500 12 % (p/v) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 12 mM), se mezclaron suavemente y las células competentes fueron divididas en alícuotas de 0,1 mL y almacenadas a - 80 °C hasta su uso.

Transformación de células competentes

La transformación de DNA plasmídico en células competentes de *E. coli*, se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al* (1990).

Para la transformación, se adicionó a una alícuota de células competentes (preparadas por el método descrito anteriormente) la cantidad adecuada de DNA. La mezcla se incubó en hielo durante 1 hora y a continuación se sometieron a un choque térmico (2 minutos a 42 °C), después se incubaron en hielo durante 10 minutos y se añadieron 900 µL de LB. Las células transformadas se incubaron durante una 1 hora a 37 °C para que se expresen los genes de resistencia a los antibióticos codificados por el plásmido. Las bacterias que han adquirido el plásmido se seleccionan sembrando 250 µL en placas de LB-agar suplementado con los antibióticos correspondientes e incubándolas a 37 °C durante 24 horas.

IV.4.1.5.- Técnicas básicas de manipulación de RNA

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la extracción de RNA a partir de tejidos se partió de 100 mg de tejido, que se introdujo en un eppendorf con 1 mL de tiocianato de guanidinio 4 M / 2-mercaptoetanol y se homogeneizó con un *politrón* hasta obtener una suspensión uniforme. A continuación, se añadieron 0,1 mL de 2 M acetato sódico pH 4, 1 mL de fenol pH 4 y 0,2 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), agitando en vortex tras cada adición. La mezcla se incubó 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos a 4 °C y tras la centrifugación se obtuvieron tres fases; la fase superior acuosa que contiene el RNA se pasó a un tubo

limpio. Se añadió 1 mL de isopropanol frío y se incubó durante 1 hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó a $10.000\text{ } \times g$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el precipitado se resuspendió en $300\text{ }\mu\text{L}$ de tiocianato de guanidinio 4 M / 2-mercaptoetanol y se añadieron $300\text{ }\mu\text{L}$ de isopropanol frío, la mezcla se incubó durante 1 hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El RNA se precipitó por centrifugación a $10.000\text{ } \times g$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se lavó con etanol al 70 %. El precipitado se secó al aire y se resuspendió en $50\text{-}100\text{ }\mu\text{L}$ de agua DEPC, dependiendo del tamaño del precipitado.

Para la extracción de RNA a partir de cultivos de células eucariotas, se partió de placas de 100 mm de diámetro que se lavaron 2 veces con PBS. Las células se despegaron con un raspador en $750\text{ }\mu\text{L}$ de tiocianato de guanidinio 4 M / 2-mercaptoetanol que se añadió sobre la placa. La suspensión de células se pasó a un eppendorf de 2 mL . A continuación, se añadieron $75\text{ }\mu\text{L}$ de acetato sódico 2 M pH 4, $750\text{ }\mu\text{L}$ de fenol pH 4 y $150\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), agitando en vortex tras cada adición. La mezcla se incubó 15 minutos en hielo. A partir de este punto, la extracción de RNA continuó igual que en la extracción a partir de tejidos.

Electroforesis de RNA

Para la separación electroforética de RNA total se utilizaron geles desnaturalizantes de agarosa (agarosa 1 % (p/v), formaldehído 8 % (v/v)) en tampón borato 1X (ácido bórico 50 mM, borato sódico 5 mM, sulfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, DEPC 0,1 % (v/v)).

Para la preparación de las muestras, $1\text{-}5\text{ }\mu\text{g}$ de RNA se disolvieron en un volumen final de $10\text{ }\mu\text{l}$ con agua-DEPC, se añadieron $4\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de carga desnaturalizante (formamida 50 % (v/v), formaldehído 15 % (v/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v) y glicerol 10,4 % (v/v) en tampón borato 1X) y $1\text{ }\mu\text{L}$ de

bromuro de etidio al 2 % (v/v). Las muestras se calentaron a 65 °C durante 10 minutos para desnaturalizar el RNA y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a 60 V en tampón borato 1X. Una vez realizada la electroforesis, los geles se visualizaron con luz UV (254 nm - 300 nm), de modo que se podían observar las bandas correspondientes al RNA ribosómico para establecer la integridad del RNA purificado a partir de las diferentes muestras.

Reacción de Retro-transcripción (RT) de RNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit *First-Strand cDNA synthesis* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 1-5 µg de RNA total contenido en 8 µL de agua tratada con DEPC y se desnaturalizó incubándolo a 65 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, el tubo se enfrió rápidamente en hielo. A continuación, se añadieron 5 µL de *Bulk first-strand cDNA reaction mix* (compuesta por FPLCpure™ transcriptasa inversa murina, RNAGuard™, albúmina y desoxinucleótidos), 1 µL de 200 mM DTT, 1 µL de oligonucleótido 14 µM (oligonucleótido dT para retrotranscribir todos los mRNAs o un oligonucleótido específico para retrotranscribir sólo el mRNA del RAGE). La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos y se inactivó incubando durante 5 minutos a 90 °C.

IV.4.1.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 de Perkin Elmer. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µL que contenían DNA molde, 50 pmol de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido), 5 µL de tampón *Taq* DNA-polimerasa 10X, 0,1 mM de cada dNTP y 5 U de *Taq* DNA Polimerasa (*T. aquaticus*). Las condiciones de PCR fueron específicas para cada amplificación. En general, las condiciones de las reacciones de

amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 25-40 ciclos compuestos de una etapa de desnaturalización de 30-60 segundos a 94 °C, una etapa de hibridación de 30-60 segundos a la temperatura adecuada en cada caso y una etapa de extensión a 72 °C durante 30-60 segundos. Se concluyó con una extensión a 72 °C durante 7 minutos.

La temperatura de hibridación se fijó en función de la temperatura media de fusión de los oligonucleótidos usados y la duración de la etapa de extensión, en función de la longitud del fragmento de DNA a amplificar, aplicándose como norma general 1 minuto/kilobase.

Para evitar amplificaciones inespecíficas, todas las reacciones de PCR se han realizado utilizando la técnica denominada *hot start*, que consiste en añadir la mezcla de reacción (compuesta por la *Taq* polimerasa y los dNTPs) durante una incubación inicial de 5 minutos a 94 °C, a la mezcla de DNA molde y oligonucleótidos.

IV.4.1.7.- Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC de Granada, utilizando un secuenciador modelo 373 STRECHT (Applied Biosystems). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin-Elmer, *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* que utiliza en la reacción de extensión el enzima *AmpliTaq® FS DNA* polimerasa y emplea didesoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes. En cada reacción de secuenciación se emplearon de 300-500 ng de DNA puro y de 6,4 pmol de oligonucleótido en un volumen final de 12 µL.

IV.4.1.8.- *Southern-blot*

La técnica de *Southern-blot* permite la identificación de secuencias específicas de DNA que han sido previamente separadas mediante electroforesis en geles de agarosa. La detección se basa en reacciones de hibridación, utilizando sondas marcadas complementarias a las secuencias a detectar, en nuestro caso hemos utilizado como sondas oligonucleótidos o fragmentos de cDNA marcados con digoxigenina-dUTP. Para la realización de estas hibridaciones, las muestras de DNA son transferidas desde un gel de agarosa a un soporte sólido. Hemos utilizado como soporte sólido una membrana de nylon cargada positivamente y la transferencia se llevó a cabo mediante capilaridad.

- **Marcaje de la sonda:** El marcaje de sondas de cDNA con digoxigenina se realizó utilizando el método comercial *DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit* (Roche). Para ello, se partió de 100 ng de sonda en un volumen de 16 μ L de agua destilada. Esta sonda se desnaturalizó calentándola durante 10 minutos en agua hirviendo y posteriormente se pasó rápidamente a hielo. Seguidamente se añadieron 4 μ L de *Dig High Prime* (vial 1) y la mezcla se incubó a 37 °C durante toda la noche. La reacción se paró con 2 μ L de una solución de 0,2 M EDTA pH 8 y a continuación se calentó durante 10 minutos a 65 °C.

Cuando se utilizó como sonda un oligonucleótido el marcaje se realizó utilizando el método comercial *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit* (Roche). Las reacciones de marcaje contenían 100 pmoles del oligonucleótido, CoCl_2 5 mM, DIG-dUTP 0,05 mM y 1 U de transferasa terminal en el tampón suministrado por el fabricante. Tras 30 minutos de incubación a 37 °C la reacción se detuvo con 2 μ L de una solución 0,2 M EDTA pH 8.

- **Transferencia:** Para facilitar la transferencia del DNA, una vez realizada la electroforesis, el gel fue incubado con distintas soluciones para depurinar y desnaturalizar el DNA. La depurinización se realizó en medio ácido con el objeto de fragmentar las muestras de DNA, para ello se incubó el gel de agarosa durante 10 minutos en una solución de HCl 0,25 N con agitación y a continuación, se lavó con agua destilada. Para desnaturalizar el DNA, el gel se incubó durante 30 minutos en una solución que contiene NaCl 1 M y NaOH 0,5 N y tras lavar con agua destilada, se procedió a su neutralización, incubando durante 30 minutos en una solución con Tris-HCl pH 7,5 0,5 M y NaCl 1,5 M. Finalmente, el gel se equilibró en una solución de 20X SSC (NaCl 3 M y Citrato Sódico 0,3 M) durante 30 minutos.

La transferencia del DNA a la membrana de nylon se hizo por capilaridad desde arriba hacia abajo. Para ello se realizó el siguiente montaje: En una superficie limpia y seca se colocó una columna de papel de filtro cortado a la medida del gel. Sobre esta columna se puso un papel Whatman 3MM humedecido en 20X SSC y a continuación la membrana de nylon humedecida secuencialmente en agua destilada, 2X SSC y finalmente 20X SSC. Sobre la membrana de nylon se colocó el gel de agarosa previamente depurinado y desnaturalizado. Por último, encima del gel se colocó otro papel Whatman 3MM humedecido en 20X SSC y sobre él, un puente de papel Whatman que conecta con un recipiente que contiene 20X SSC y que por capilaridad transferirá el DNA a la membrana. La transferencia se realizó a lo largo de toda la noche. Por último, se procedió a la fijación de forma covalente del DNA a la membrana mediante radiación UV (*UV Stratalinker 1800*, Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Hibridación:** En primer lugar se realizó una prehibridación de la membrana incubándola durante 4 horas a 42 °C, con agitación suave y constante en una solución

de prehibridación *DIG Easy Hyb* precalentada a 42 °C. Para la hibridación, se desnaturalizó la sonda marcada calentándola en agua hirviendo durante 5 minutos y pasándola a hielo rápidamente. A continuación, se añadió la sonda desnaturalizada a la solución de prehibridación y se incubó a 42 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se retiró la solución de hibridación y se lavó la membrana 2 veces con una solución de 2X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a 42 °C durante 5 minutos y 2 veces con una solución de 0,2X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a 42 °C durante 5 minutos.

- **Detección:** La detección de los ácidos nucleicos marcados con digoxigenina se realizó a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, la membrana se lavó durante 1 minuto con tampón de lavado (Ácido Maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween 20 0,3 % (v/v)) y a continuación se bloqueó durante 30 minutos con solución de bloqueo (dilución 1:10 del vial 6 en Ácido Maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5). Seguidamente, se incubó con una dilución 1:5000 de un anticuerpo policlonal anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en solución de bloqueo durante 30 minutos. Se lavó 2 veces durante 15 minutos con el tampón de lavado y la membrana se incubó durante 5 minutos en el tampón de detección (Tris-HCl pH 9,5 0,1 M, NaCl 0,1 M).

Generalmente el revelado se hizo por quimioluminiscencia, para ello la membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato CDP-Start, y se expuso en un *cassette* con una película radiográfica durante un tiempo variable en función de la señal obtenida. El revelado de la película se hizo de forma manual. En algunas ocasiones el revelado se hizo utilizando el sustrato NBT/BCIP que origina un precipitado coloreado, para ello la membrana se incubó con la solución de revelado en la oscuridad y sin agitación hasta que las bandas alcanzaron la intensidad óptima. La reacción se paró lavando la membrana con agua destilada durante 5 minutos.

IV.4.1.9.- Northern Blot

La técnica de *Northern-blot* consiste en la detección de secuencias específicas de RNA por técnicas de hibridación tras su separación electroforética. Para ello es necesario transferir el RNA desde un gel de agarosa a un soporte sólido. Esta transferencia se ha realizado mediante capilaridad. El soporte sólido empleado fue una membrana de nylon cargada positivamente. En este caso hemos utilizado sondas de cDNA marcadas radiactivamente.

- **Marcaje de la sonda:** El marcaje de estas sondas se realizó mediante el método de *random priming* (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando [α - 32 P] dCTP. Para ello, se mezclaron en un eppendorf: 30 ng de sonda de cDNA, 0,5 μ L de *N6 random primers* (5 μ g/ μ L) y agua en un volumen final de 14 μ L. La mezcla se hirvió a 100 °C durante 3 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. A continuación se adicionó el siguiente cocktail a cada una de las reacciones: 2,5 μ L de 10X Tampón Klenow (Tris HCl 500 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM, 0,5 mg/mL BSA), 2,5 μ L de dNTP Δ dCTP 1,66 mM, 5 μ L de [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol) y 1 μ L de Polimerasa Klenow (6U/ μ L). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3-4 horas. La reacción se paró añadiendo 25 μ L de solución A (Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM pH 8, SDS 0,5 % (p/v)).

Los 50 μ L resultantes de la reacción anterior se filtraron mediante cromatografía de exclusión en Sephadex G-50 en microfiltros mediante centrifugación, para eliminar el sustrato radiactivo que no se ha incorporado, y la sonda purificada se utilizó en la hibridación.

- **Transferencia:** Este proceso no requiere tratamiento previo del gel de agarosa ya que las muestras están desnaturalizadas. Una vez corrido el gel

desnaturalizante se incubó en agua-DEPC durante 10 minutos y se transfirió siguiendo un procedimiento similar al indicado para transferir DNA, con la diferencia que el tampón de transferencia fue una solución de 10X SSC. Tras la transferencia, la membrana se neutralizó en el tampón de electroforesis (tampón borato 1X) y, a continuación, se fijó el RNA a la membrana por entrecruzamiento con luz ultravioleta.

- **Hibridación:** Las membranas se prehibridaron 3 horas a 42 °C en *Northern Max Prehyb/Hyb buffer* (Ambion) y después se hibridaron durante 18 horas a 42 °C con la sonda marcada radiactivamente (5×10^4 Bq/mL). Tras la hibridación, la membrana se lavó tres veces en 2X SSC y 0,1 % SDS a 42 °C y una vez con 0,1X de SSC con SDS 0,1 % a 42 °C.

La membrana se expuso a una película fotográfica en un *cassette* que contenía dos pantallas intensificadoras a - 80 °C. La duración de la exposición dependió de la cantidad de radioactividad que fue detectada con un contador Geiger-Müller. Tras el revelado, se cuantificaron las cantidades relativas de mRNA de cada muestra por densitometría. Los datos obtenidos fueron en cada caso normalizados respecto al mRNA correspondiente al gen de la β -actina.

IV.4.1.10.- 5'-Rapid Amplification cDNA ends (5'-RACE)

Esta técnica permite amplificar los extremos del cDNA, en este caso el extremo 5'. El protocolo que hemos utilizado consiste en la obtención de cDNA a partir de RNA de distintos tejidos utilizando un oligonucleótido específico antisentido. A continuación, el cDNA es modificado por la adición de una cola de poli A en el extremo 5' y el producto deseado se obtiene por amplificaciones por

PCR. La identificación de las secuencias específicas de DNA se realizó por *Southern-blot* (IV.4.1.8).

Se partió de 5 µg de RNA y se retrotranscribió con el kit comercial *First-Strand cDNA synthesis*, según las instrucciones del proveedor (IV.4.1.5.- Técnicas básicas de manipulación de RNA) utilizando un oligonucleótido específico antisentido que hibrida en una posición cercana al inicio de la transcripción. El producto de retrotranscripción se purificó mediante precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 60 mM de acetato sódico durante 30 minutos a -20 °C. El cDNA se recogió por centrifugación a 16.000 xg a 4 °C durante 20 minutos y se resuspendió en 10 µl de agua. El cDNA se desnaturalizó incubando a 100 °C durante 2 minutos seguidos de 5 minutos en hielo. A continuación, se añadió una cola de poliA en el extremo 5' del cDNA mediante incubación durante 30 minutos, a 37 °C, con transferasa terminal (GE Healthcare) en presencia de dATP. Finalmente, el enzima se inactivó incubando durante 2 minutos a 65 °C. El producto obtenido se amplificó por PCR mediante dos rondas de amplificación. Para ello, se emplearon dos oligonucleótidos específicos anidados y un oligonucleótido dT complementario a la cola de poli A añadida.

IV.4.1.11.- EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

La técnica de EMSA permite detectar interacciones entre DNA y proteínas. Esta técnica se basa en que los complejos DNA-proteína migran más lentamente que el DNA libre cuando se separan mediante electroforesis en geles de poliacríamida no desnaturalizantes.

- **Obtención de extractos nucleares:** Para la preparación de extractos nucleares se siguió el protocolo descrito por Bhavsar *et al.* (2000). Para ello, las células

se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro hasta que llegaron a confluencia. Las células se lavaron con PBS y se despegaron con un raspador en 500 μ L de HEPES 10 mM pH 7,9, NaCl 0,15 mM, EDTA 1 mM. La suspensión de células se pasó a un eppendorf y se centrifugó a 11.000 xg durante 1 minuto a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 400 μ L de tampón de lisis frío (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM) y se incubó 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo se añadió 24 μ L de NP-40 10 % (v/v) y se mezcló por inversión. Esta concentración del detergente NP-40 solubiliza la membrana plasmática, mientras que conserva la integridad de la membrana nuclear. Inmediatamente, se precipitaron los núcleos por centrifugación a 11.000 xg durante 1 minuto a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 50 μ L de tampón de extracción frío (HEPES 20 mM pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM) y se incubó 30 minutos en hielo. A continuación, se eliminaron los restos de membranas nucleares por centrifugación a 11.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contenía los extractos nucleares se almacenó a -70 °C hasta su uso.

- **Marcaje de la sonda:** Se ha utilizado como sonda oligonucleótidos complementarios que contienen la secuencia de reconocimiento del factor de transcripción NF- κ B marcados radioactivamente. En primer lugar se hibridaron los oligonucleótidos, para ello 500 pmol de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) se incubaron a 95 °C durante 5 minutos en 100 μ L de Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM. A continuación se dejó disminuir lentamente la temperatura hasta 40 °C y se incubaron en hielo hasta su uso.

Los oligonucleótidos hibridados se marcaron utilizando T4 polinucleótido quinasa, para ello se mezclaron en un eppendorf: 4 μ L de oligonucleótidos (5 pmol/ μ L), 5 μ L de tampón T4 polinucleótido quinasa 10X (Tris-HCl 700 mM pH 7,6, MgCl₂

100 mM, DTT 50 mM), 5 μ L [γ - 32 P] ATP (3000 Ci/mmol), 2 μ L de T4 polinucleótido quinasa (3U/ μ L) y 34 μ L de agua destilada. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo se inactivó el enzima calentando a 65 °C durante 5 minutos, posteriormente la sonda se filtró mediante cromatografía de exclusión con Sephadex G-25.

- **Reacción de unión DNA-proteína:** 10 μ g de extractos nucleares se incubaron con 200 fmoles de sonda durante 45 minutos en hielo en “tampón de unión” (DTT 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, glicerol 10 % (v/v), BSA 0,1 mg/mL, poly dI-dC 30 ng/ μ L, HEPES 20 mM pH 7,9). Para analizar la especificidad de la unión DNA-proteína, en algunas muestras se añadió 100 veces exceso de sonda sin marcar 10 minutos antes de añadir la sonda. La reacción se paró por adición de tampón de carga (60 % (v/v) TBE 0,25 X, 40 % (v/v) glicerol, 0,2 % (p/v) azul de bromofenol) a las muestras.

- **Electroforesis:** La electroforesis se hizo en geles de acrilamida al 5 % en tampón TBE 0,5 X (Tris 44,5 mM, Ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8). Antes de cargar las muestras, los geles se pre-corrieron durante 30 minutos a 50 voltios a 4 °C, a continuación se cargaron las muestras y la electroforesis se llevó a cabo a 50 voltios hasta que el frente llegó al final del gel.

Tras la electroforesis, el gel se secó en un secador de geles con vacío durante 1 hora y se expuso a una película radiográfica en un *cassette* con pantallas intensificadoras a -80 °C. La duración de la exposición dependió de la emisión de radioactividad, que se monitorizó con un contador de radioactividad Geiger-Müller. El revelado se hizo de forma manual.

IV.4.1.12.- Análisis de la actividad promotora

El estudio de la actividad del promotor del receptor de productos avanzados de glicación de rata se ha realizado utilizando un sistema de genes reporteros basado en la luciferasa. Este método consiste en realizar una cotransfección de las células con dos plásmidos: el vector pRL-TK que codifica para una luciferasa de *Renilla* y que se emplea para normalizar la eficiencia de transfección y el vector pGL3-basic que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* y se utiliza para monitorizar la actividad promotora de secuencias promotoras clonadas en el sitio múltiple de clonaje del vector.

La relación de concentraciones de los plásmidos utilizados en la cotransfección ha sido 1:5 (pRL-TK: pGL3-basic). Tras la transfección, las células se han cultivado durante 48 horas en un medio de cultivo completo y posteriormente se han mantenido durante 8 horas en un medio sin suero bovino fetal. En este medio se han realizado incubaciones en presencia o ausencia de una serie de moléculas efectoras durante 18 horas. Posteriormente, se han lisado las células y se ha ensayado la actividad luciferasa.

La determinación de la actividad luciferasa se ha realizado utilizando el sistema comercial *Dual Luciferase Assay kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema de medida permite discriminar entre la actividad luciferasa de *Photinus pyralis* y de *Renilla* realizando dos medidas secuenciales de luminiscencia tras la adición de un reactivo de bloqueo de la actividad luciferasa de *Photinus* y activación de la de *Renilla*. Los resultados obtenidos se han validado realizando el análisis de la actividad luciferasa de células transfectadas con un único plásmido.

IV.4.2.- MÉTODOS DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

El manejo de las líneas celulares eucariotas se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. Las células se cultivaron en sus correspondientes medios a 37 °C en un incubador con una atmósfera de aire: CO₂ (95 %: 5 %).

IV.4.2.1.- Tripsinización

La separación de las células adherentes de las placas de cultivo para su subcultivo y/o congelación, se hizo por tripsinización. Para ello, las células se dejaron crecer hasta un 80-90 % de confluencia, se eliminó el medio de la placa de cultivo y se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos de suero del medio que pueden inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadió una solución de tripsina-EDTA (volumen suficiente para que se cubra la superficie de la placa) y se incubó a temperatura ambiente hasta que las células se separaron de la placa. La suspensión de células obtenida se dividió en otras placas con medio de cultivo o se congelaron.

IV.4.2.2.- Conservación de líneas celulares

La conservación de las líneas celulares se realizó a -80 °C en medio de congelación (dimetilsulfóxido al 10 % (v/v) en Suero Bovino Fetal). Tras la tripsinización de las células, se añadió en un criovial 0,5 mL de suspensión de células y 1 mL de medio de congelación. El proceso de congelación se llevó a cabo en un contenedor de congelación *NALGENE Crio -1 °C*, en un congelador de -80 °C, durante al menos 4 horas. Para su uso, el criovial se descongeló a 37 °C y su contenido se añadió a una placa con medio de cultivo completo.

IV.4.2.3.- Transfección

La transfección de células eucariotas se realizó siguiendo un método basado en la introducción del DNA plasmídico mediante la utilización de lípidos catiónicos que debido a su carga positiva se unen a las cargas negativas de los fosfatos del DNA y facilitan la fusión del DNA con la membrana celular, en este caso se utilizó *Lipofectamina 2000* (Invitrogen).

El día antes de la transfección, las células se sembraron en cantidad suficiente para que el día de la transfección estuviesen a un 70-80 % de confluencia. El DNA y la lipofectamina se disolvieron en tubos por separado en 250 μ l medio de cultivo sin suero y sin antibióticos y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se mezcló la solución de DNA y la de lipofectamina 2000, se agitaron y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente, para que se formara el complejo DNA-lipofectamina. Por último, se añadió el complejo sobre las células que están creciendo (previamente las células se lavaron con medio sin suero). Las cantidades óptimas de DNA y de Lipofectamina 2000 para la transfección fueron optimizadas para cada tipo celular utilizado, para placas de 6 pocillos (Tabla IV.3.)

Tabla IV.3. *Cantidades de DNA y Lipofectina 2000 óptimas para cada tipo celular.*

Tipo celular	Cantidad de DNA	Cantidad de <i>Lipofectamina 2000</i>
CHO-k1	4 μ g	10 μ L
Neuro-2A	2 μ g	5 μ L
L6	4 μ g	5 μ L
NRK-52F	4 μ g	10 μ L
ECV-304	2 μ g	2,5 μ L
MLE-12	2 μ g	5 μ l

Las células se incubaron 24 horas a 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de CO₂, pasado este tiempo se cambió el medio y se añadió medio de cultivo completo (medio *DMEM* suplementado con suero, glutamina y antibióticos) y se incubaron a 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Para conseguir una transfección estable a las 24 horas se añadió medio con el antibiótico de selección G-418 (0,5 mg/mL).

Para la obtención de clones aislados, las células transfectadas se diluyeron 500 veces en el medio de selección. Una vez que éstos crecieron, se seleccionaron los fluorescentes por observación al microscopio y se aislaron utilizando “cloning-discs” (Sigma).

IV.4.2.4.- Determinación de la fosforilación de proteínas en células eucariotas

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo completo hasta confluencia. Para el ensayo de fosforilación, las células se ayunaron durante 24 horas y pasado este tiempo, se adicionó al medio de cultivo las moléculas a ensayar durante 30 minutos. A continuación, se eliminó rápidamente el medio de cultivo de las placas y éstas se congelaron a -80 °C durante 20 minutos. Las células fueron raspadas en 50 µL de Tris-HCl 30 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, Tritón X-100 1% (v/v), SDS 0,1%, fluoruro sódico 10 mM, pirofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM y tras incubarse en hielo durante 10 minutos se centrifugaron. Se determinó la cantidad de proteínas del sobrenadante y el nivel de fosforilación se estimó mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos específicos.

IV.4.2.5.- Determinación del transporte de glucosa en células eucariotas

Los ensayos de transporte de glucosa se han hecho en la línea celular L6. Las células se cultivaron en un medio de cultivo completo hasta que llegaron a

confluencia y posteriormente se diferenciaron a miotúbulos por incubación con medio de cultivo suplementado con un 2 % (v/v) de suero bovino fetal durante aproximadamente una semana.

Para el ensayo de transporte de glucosa los miotúbulos se mantuvieron durante una noche en medio de cultivo sin suero bovino fetal, y posteriormente se incubaron en este medio en presencia o ausencia de una serie de moléculas efectoras de 2 a 24 horas dependiendo del experimento. La entrada de glucosa se midió por incubación durante 10 minutos con 10 μM de 2-desoxiglucosa marcada radiactivamente con tritio en medio HEPES-Krebs (NaCl 118 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, HEPES 30 mM, CaCl_2 1,3 mM, pH 7,4). Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con 0,5 M de NaOH; el lisado de células se neutralizó por adición de 0,5 M de HCl. La radiactividad incorporada a las células se determinó utilizando un contador de centelleo líquido (Servicio de Radiofarmacia de la Universidad de Granada).

IV.4.2.6.- Microscopía confocal.

Para la preparación de muestras para microscopía confocal, las células crecieron sobre un cubre estéril en medio de cultivo completo hasta una confluencia del 50-60 %. A continuación, se eliminó el medio de cultivo de la placa, se lavaron con PBS y se incubaron durante veinte minutos en 1 % de BSA en PBS a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en 2 % de paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el paraformaldehído de la placa y se hicieron tres lavados de 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Por último, se retiró el cubre de la placa y se colocó sobre un portaobjetos en el que previamente se había puesto una gota de medio de montaje (Vectashield).

Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio confocal LEICA usando los siguientes parámetros: para la proteína fluorescente verde se usó una longitud de onda de excitación del láser de 488 nm y una ventana de emisión de 500-530 nm; para las preparaciones que contenían rodamina B se usó un láser de longitud de onda de excitación de 496 nm y una ventana de emisión de 530 a 600 nm y para las preparaciones que contenían Texas-Red se usó un láser de 514 nm de longitud de onda de excitación y una ventana de emisión de 560 a 640 nm. El objetivo usado fue una lente de 63x con aceite de inmersión. En el caso de doble marcaje, las células fueron excitadas secuencialmente para la captura de imágenes.

IV.4.3.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

IV.4.3.1.- Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se han utilizado dos métodos dependiendo de la composición de las muestras:

Método de Bradford (1976): Este método se utilizó de forma rutinaria. La técnica se basa en la afinidad del colorante *Comassie Brilliant Blue G-250* por las proteínas, virando de color rojo a color azul cuando se une a ellas. El complejo proteína colorante presenta un máximo de absorción a 595 nm con un coeficiente de extinción molar muy elevado, lo que hace que sea un método de análisis muy sensible.

Para la determinación se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina con un margen de concentraciones comprendidos entre 0 y 0,2 mg/mL. Las muestras se diluyeron apropiadamente. Todos los tubos se llevaron a un volumen final de 100 μ L, se añadió 1 mL de reactivo de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant

Blue G-250, 50 mL etanol 95 % (v/v), 100 mL ácido fosfórico 85 % (p/v), agua hasta un volumen final de 1 L) y se midió la densidad óptica a 595 nm.

Mediante este método la concentración de proteínas y la densidad óptica medida presentan una relación no lineal. La concentración de proteínas de las muestras problema se calculó por interpolación de los valores de densidad óptica en la curva patrón.

RC DC Protein Assay (Bio-Rad). Este kit comercial se utilizó cuando la muestra problema contenía sustancias que podían interferir con el reactivo de Bradford, como detergentes o agentes reductores.

Este ensayo colorimétrico está basado en el método de Lowry pero que ha sido modificado para que sea compatible con la presencia en la muestra de agentes reductores (RC) y de detergentes (DC). Como en el método de Lowry, el desarrollo de color se produce en dos pasos: reacción entre las proteínas y el ión cobre en medio alcalino y posterior reducción del reactivo de Folin por estos complejos produciendo una o más especies reducidas que tienen un máximo de absorción a 750 nm.

La medida de la concentración de proteínas se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.4.3.2.-Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida se realizó según el método de Laemli (1970) utilizando el sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La preparación de las muestras para su electroforesis se realizó resuspendiendo una cantidad determinada de proteínas (25-50 μg) en tampón de carga 2X (Tris HCl pH 6,8 200 mM, SDS 2 %, Glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 5 %, Azul de bromofenol 0,1 %). Para ello, se añadió el tampón de carga al volumen de muestra, se agitó y se incubó a 100 °C durante 5 minutos. Para lograr una buena lisis celular en muestras con una elevada concentración proteica, tras el calentamiento, se enfrió a -80 °C durante 10 minutos y se volvió a calentar a 100 °C durante 5 minutos. Este proceso se puede repetir 2-3 veces.

Se prepararon geles de poli(acrilamida) de 0,75 ó 1,5 mm de grosor, de separación (10 o 12 % de poli(acrilamida)) y de concentración (4 % de poli(acrilamida)) (Tabla IV.4.). En el gel separador se moldearon pocillos para la carga de las muestras y del marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 150 voltios en tampón de electroforesis TGS (Tris 25 mM, Glicocola 192 mM, SDS 0,1 % (p/v)) hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel.

Tabla IV.4. *Composición de los geles de acrilamida.*

	Gel separador	Gel concentrador
Arcilamida/Bisacrilamida	10 % ó 12 % (p/v)	4% (p/v)
Tris HCl pH 8,8	0,375 M	-----
Tris HCl pH 6,8	-----	0,125 M
SDS	0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)
Persulfato amónico	0,05 % (p/v)	0,05 % (p/v)
TEMED	0,05 % (v/v)	0,05 % (v/v)

Las proteínas separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se visualizaron utilizando el colorante *Comassie Brilliant Blue G-250*. Para ello, el gel se sumergió en la solución de tinción (Comassie Brilliant Blue G-250 0,2 % (p/v), Metanol 40 % (v/v) y Ácido acético 15 % (v/v)) durante 1 hora con agitación permanente y a temperatura ambiente. A continuación, se destiñó el color del fondo del gel lavando varias veces con agitación con una solución de metanol 40 % (v/v) y ácido acético 15 % (v/v) en agua destilada. Finalmente, el gel se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con Metanol 40 % (v/v) y Glicerol 5 % (v/v) en agua destilada durante 10 minutos y se secó entre papel de celofán para su conservación.

IV.4.3.3.-Western-blot

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la transferencia se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Cell® de Bio-Rad. Se montó el *cassette* de transferencia, colocando el gel en el polo negativo y la membrana de nitrocelulosa en el polo positivo del portageles. El *cassette* se introdujo en la cubeta que se llenó con tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicocola 192 mM, Metanol 20 % (v/v)) que había sido conservado a 4 °C. Para que la transferencia de proteínas se mantuviese en frío, se introdujo una unidad refrigerante con hielo en la cubeta y se desarrolló bajo agitación permanente. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 V.

Una vez terminada la transferencia, los sitios de unión libres de la membrana se bloquearon en una solución de leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-Tween (Tris HCl pH 7,6 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1 % (v/v)), durante un tiempo mínimo de 1 hora. Seguidamente, la membrana se incubó con una dilución adecuada del correspondiente anticuerpo específico en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C con agitación. Pasado este tiempo, se lavó la membrana con TBS-Tween

cuatro veces durante 5 minutos cada vez, con agitación a temperatura ambiente. Tras los lavados se adicionó una dilución adecuada de la correspondiente anti-inmunoglobulina marcada con peroxidasa en la solución de bloqueo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Por último, se lavó la membrana 4 veces con TBS-Tween durante 5 minutos cada vez y una vez con TBS.

Finalmente se procedió al revelado por quimioluminiscencia, que se realizó con el kit comercial *ECL Plus* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del proveedor. La nitrocelulosa se expuso a una película fotográfica (*BioMax MS-1 Film*, Sigma) y pasado un tiempo, que dependió de la intensidad de la luz emitida, se procedió al revelado de la película que se hizo de forma manual con revelador de Kodak, lavado y fijación.

En algunas ocasiones, la membrana se reveló con diaminobencidina. La diaminobencidina es oxidada por la peroxidasa formándose un producto marrón insoluble. Después de los lavados la membrana se incubó con una disolución de diaminobencidina (Diaminobencidina 1,11 mM, Tris HCl pH 8 0,05 M, Sulfato amónico 12,66 mM, Sulfato de Niquel 12,66 mM, H₂O₂ 0,04 % (v/v)) hasta que aparecieron las bandas, la reacción se paró lavando con agua destilada.

IV.4.3.4.- Fraccionamiento subcelular

Para la obtención de fracciones subcelulares a partir de cultivos de células eucariotas, se partió de tres placas de 100 mm de diámetro. Las células se lavaron con PBS y se despegaron con un raspador en 750 µL de PBS. La suspensión de células se adicionó a un eppendorf y se centrifugó a 800 xg. El precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón TSE (Tris 50 mM, Sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Azida 1 mM), se homogeneizó en un *potter* de teflón-vidrio 10 veces y se centrifugó a 800 xg durante

10 minutos, de esta forma precipitan los restos celulares. Se cogió una alícuota del sobrenadante (fracción total) y el resto se centrifugó a 9.000 xg durante 10 minutos, de esta forma precipitan las mitocondrias. El sobrenadante se centrifugó a 31.000 xg durante 1 hora de forma que precipitan las membranas plasmáticas. El sobrenadante de la centrifugación anterior se centrifugó a 190.000 xg durante 1 hora, el sobrenadante obtenido es el citosol de la célula y en el precipitado se encuentra enriquecido en microsomas.

IV.4.3.5.- Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Hemos expresado distintos dominios del RAGE fusionados al extremo carboxilo de la proteína de unión a maltosa, lo que ha facilitado la expresión y la posterior purificación de la proteína de fusión. Una vez obtenidas las construcciones recogidas en el apartado V.1, se transformaron en M15 o *XL1-Blue*, y la expresión de las proteínas de fusión se indujo por adición de IPTG en una concentración final de 0,3 mM. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de la inducción que fueron lisadas en tampón de carga de SDS-PAGE (la cantidad de tampón de carga añadido fue proporcional a la densidad óptica a 600 nm de la muestra) y separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida. Los geles se tiñeron con azul *comassie* para observar la inducción de la síntesis de la proteína de fusión. Una vez que se comprobó que la proteína de fusión se expresaba de forma soluble se procedió a su purificación.

Para la purificación, se crecieron bacterias que contenían las construcciones de la proteínas de fusión en 500 mL de medio LB enriquecido con glucosa al 0,2 % (p/v) y se indujo la expresión por adición de IPTG. Las bacterias se recogieron por centrifugación 4 horas después de la inducción, se resuspendieron en “tampón de

columna" (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM) y se congelaron durante toda la noche a -20°C .

Al día siguiente se descongeló el precipitado bacteriano, se adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas bacterianas (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se lisó por sonicación con pulsos cortos durante 5 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó y el sobrenadante resultante se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna con una resina de amilosa que retiene la proteína de fusión (New England Biolabs). La proteína de fusión se recuperó de la columna mediante una elución con maltosa 10 mM en el tampón de columna. Las distintas fracciones recogidas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida para comprobar qué fracción contenía la proteína de fusión.

En algunos casos, se realizó una etapa adicional de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacell. Las muestras fueron eluidas de la columna de cromatografía mediante un gradiente de NaCl de 0 a 1 M.

IV.4.3.6.-Preparación de BSA-AGEs

Para la preparación de BSA-AGEs, en un tubo estéril se adicionó BSA (albúmina bovina fracción V) 25 mg/mL, Glucosa 6-fosfato 100 mM, PMSF 1 mM, Apoprotinina 1 μM , EDTA 1mM y Azida sódica 1 mM. Se preparó otro tubo igual pero sin glucosa 6-fosfato que sirvió como control de BSA no glicado. La mezcla se esterilizó por filtración, utilizando filtros de 0,2 μm de diámetro de poro y se mantuvo a 37°C durante 8 semanas. Pasado este tiempo se dializaron en PBS para eliminar el exceso de glucosa y se midió la emisión de fluorescencia a 440 nm (longitud de onda de excitación 370 nm), para comprobar la formación de AGEs.

Alternativamente, el grado de glicación de la albumina se determinó mediante dot-blot utilizando anticuerpos anti-RNAsa-AGE obtenidos en nuestro laboratorio.

IV.4.3.7.-Marcaje de proteínas con fluoróforos

Para poder visualizar los AGEs mediante microscopía se han marcado con dos fluoróforos: Rodamina y Texas-Red.

El marcaje de BSA-AGEs con Rodamina 10 μ g de BSA-AGEs disueltos en 1 mL de PBS se mezclaron con una disolución 10 mM de isotiocianato de rodamina B (Sigma) durante dos horas en hielo. La mezcla se dializó con PBS a 4 °C para eliminar el colorante que no se había unido a la proteína.

Para el marcaje de BSA-AGEs con Texas-Red se siguió el protocolo descrito por Titus *et al.* (1982). Para ello 10 μ g de BSA-AGEs disueltos en 1 mL de tampón carbonato pH 9 se mezclaron con 1 mg de Texas-Red sulfonil cloruro (Sigma) durante 1 hora en hielo. La mezcla se dializó con PBS a 4 °C para eliminar el Texas-Red que no se había conjugado con la proteína.

IV.4.4.- TÉCNICAS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

IV.4.4.1.- Inducción de una diabetes experimental

Las ratas Wistar hembra de 250 g de peso fueron mantenidas durante una semana con una dieta estándar. Posteriormente, se indujo una diabetes experimental mediante la inyección por vía intraperitoneal de una única dosis de estreptozotocina (STZ) de 60 mg/Kg de peso del animal, disuelta en tampón citrato 0,05 M pH 4.5, en un volumen aproximado de 1 mL. Los animales controles recibieron tampón citrato

únicamente. Tras la administración de STZ, las ratas se mantuvieron durante 48 horas con una solución de glucosa al 5 % como agua de bebida, para prevenir una hipoglucemia severa. La comprobación de la aparición de la diabetes en los animales tratados se realizó determinando la glucemia mediante el método *Glucocard stick*. Como muestra se utilizó la sangre obtenida mediante una pequeña incisión en la cola del animal. Se consideraron diabéticas aquellas ratas con una glucemia superior a 17 mM.

El sacrificio se realizó por decapitación siete semanas después de la confirmación de la diabetes, obteniéndose muestras de sangre total, pulmón, hígado, cerebro y riñón. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La sangre fue sometida, tras la coagulación, a una centrifugación a 1100 xg durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ obteniéndose la fracción de suero que fue conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

IV.4.4.2.- Obtención y caracterización de anticuerpos.

La obtención de anticuerpos se ha hecho en conejos, inoculándolos con cuatro antígenos distintos: los dos fragmentos del RAGE unidos a la proteína de unión a maltosa, MBP-Cito y MBP-V1, la proteína de unión a maltosa (MBP) y la proteína fluorescente verde (GFP).

Para la obtención de los anticuerpos se administraron intramuscularmente cinco dosis de antígeno con un intervalo de 15 días entre una dosis y otra. Cada una de ellas estaba constituida por 0,2 mg de antígeno en un volumen final de 500 μL del tampón en el que se han purificado, y un volumen similar de coadyuvante de Freund incompleto (Sigma) que se emulsionaron perfectamente antes de inyectárselas en las patas posteriores de los conejos.

A partir de la tercera dosis se procedió al sangrado de los conejos cada 15 días. Se hicieron un total de cinco sangrados, haciendo una pequeña incisión en la oreja del conejo con un bisturí, en cada uno de ellos se sacó un volumen aproximado de 10 mL de sangre. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero, que contenía los anticuerpos. El suero se conservó a -80 °C hasta su uso.

Los anticuerpos obtenidos se han caracterizado por *Western-blot* y por la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando en ambos casos como primer anticuerpo el suero de los conejos inoculados y como secundario anti-inmunoglobulina de conejo marcada con peroxidasa.

V.- RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS DISTINTOS DOMINIOS DEL RAGE

Con el fin de disponer de proteína suficiente para obtener anticuerpos frente al RAGE, nos planteamos su expresión heteróloga. El RAGE es una proteína integral de membrana, anclada en la membrana plasmática mediante un único dominio transmembrana. Este hecho dificulta su expresión en bacterias. Pese a ello, hemos empleado diversas estrategias de expresión en *E. coli*. Así, hemos tratado de expresar la proteína completa, el dominio extracelular o bien el dominio intracelular. Estos intentos de expresión los hemos realizado utilizando los vectores pET-5a, pET-16b y pQE-30, que expresan las proteínas recombinantes solas (pET-5a) o bien fusionadas a colas de poli-histidinas. En ninguno de los casos ha sido posible lograr niveles adecuados de expresión de la proteína soluble.

Por tanto, en primer lugar, debido a la imposibilidad de obtener un sistema de expresión heterólogo en bacterias del RAGE completo optamos por expresar los diferentes dominios del receptor de forma individual. Además, para facilitar la expresión, la solubilidad y la posterior purificación de la proteína expresada, se ha elegido un sistema que permite obtener una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP). Hemos expresado por una parte un fragmento correspondiente a una porción del RAGE que carece de gran parte dominio extracelular (que hemos denominado pMAL-Cito) y por otra, la región comprendida entre el aminoácido 27 y el aminoácido 116 del RAGE (dominio variable), que ha sido propuesta como responsable de la unión a ligandos (que hemos denominado pMAL-V1).

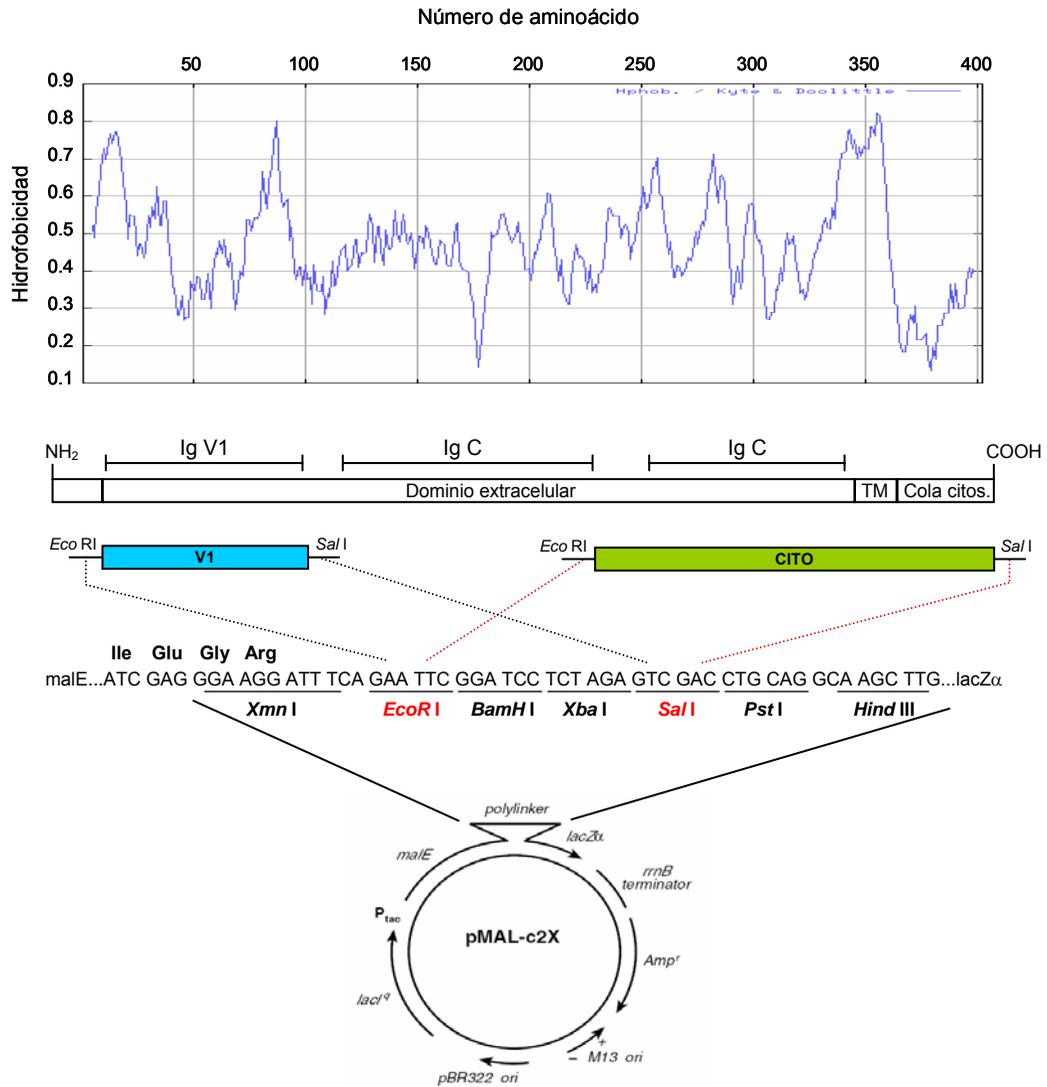


Figura V.1.- Sistema de expresión heteróloga de fragmentos del receptor de productos avanzados de glicación de rata. Se muestra un esquema de los distintos dominios del receptor (en blanco), y un perfil de hidrofobicidad de los mismos. TM: dominio transmembrana, Cola citos: cola citosólica.

Para la obtención de estas construcciones en el vector pMAL-c2X, en primer lugar se amplificaron por PCR los fragmentos del RAGE que queríamos expresar a partir de cDNA obtenido mediante retrotranscripción de RNA total de pulmón de ratas diabéticas. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que incluyen sitios de restricción que permiten clonar los fragmentos en fase con el gen *malE* (que codifica para MBP). Los productos de PCR se clonaron entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* del sitio múltiple de clonaje del vector pMAL. (Figura V.1).

Una vez obtenidas las construcciones se secuenciaron y se transformaron en las cepas bacterianas de *E. coli*, *XL1-Blue* o M15, y se indujo su expresión a 37 °C mediante la adición de IPTG (0,3 mM). Se recogieron muestras a distintos tiempos después de la inducción, que fueron lisadas y separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida.

Cuando en células *XL1-blue* que contienen nuestras construcciones se induce la expresión de proteínas, se produce el acúmulo de una proteína de peso molecular similar al esperado (61 kD para pMAL-Cito y 53 kD para pMAL-V1), aunque en niveles significativamente inferiores a los observados cuando se induce la expresión del vector pMAL-c2X en la cepa *XL1-blue*. Probablemente nuestras proteínas de fusión sean parcialmente tóxicas para las bacterias. No obstante, en comparación con los niveles obtenidos cuando se expresa el receptor completo, la expresión por dominios proporciona niveles adecuados para purificar las proteínas de fusión a partir de volúmenes de 1 litro de medio de cultivo.

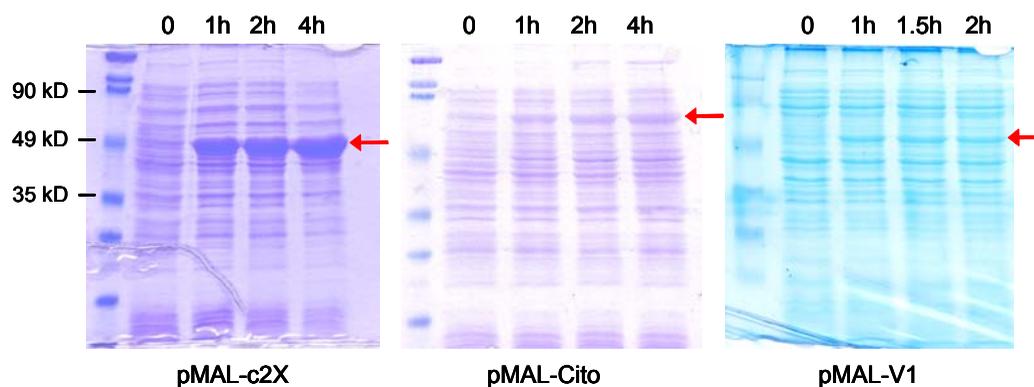


Figura V.2.- Expresión heteróloga del RAGE en la cepa XL1-Blue. Se compara la expresión de los distintos dominios del RAGE fusionados a MBP (pMAL-Cito y pMAL-V1), con la expresión de la MBP sola (pMAL-c2X). Las flechas indican las proteínas cuya expresión se induce.

V.1.1.- Expresión, purificación y caracterización de la proteína de fusión MBP-V1

Aunque la expresión en la cepa XL1-blue daba lugar a niveles significativos de la proteína de fusión MBP-V1, en esta cepa bacteriana se produce una rápida degradación proteolítica de la misma (datos no mostrados). Ello nos llevó a ensayar la expresión en la cepa M15/pREP4. Para la purificación de la proteína de fusión se indujo su expresión en bacterias M15 durante 2 horas, y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas con una resina de amilosa que retiene la proteína de fusión. Como puede observarse en la figura V.3, en las fracciones recogidas aparece principalmente una proteína con un tamaño compatible al estimado para nuestras proteínas de fusión. También se observa que a pesar de utilizar inhibidores de proteasas durante todo el proceso de purificación, nuestra proteína se proteoliza parcialmente.

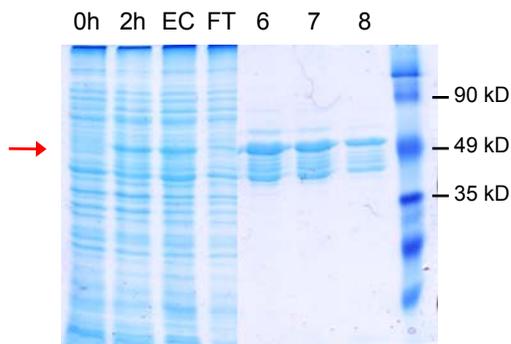


Figura V.3.- Purificación de la proteína de fusión MBP-V1. 0h y 2h: Extractos crudos bacterianos antes y tras dos horas de inducción de la expresión con IPTG. EC: Fracción soluble tras la sonicación del pellet bacteriano cargada en la columna de afinidad. FT: Proteínas que no se retienen en la columna. 6-7: Los números corresponden a las fracciones recogidas después de eluir la proteína de fusión con maltosa 10 mM. La flecha indica el tamaño esperado para la proteína de fusión.

Las fracciones purificadas mediante cromatografía de afinidad fueron posteriormente sometidas a una cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephacel y eluidas con un gradiente de NaCl (0-1 M). Esta cromatografía se empleó para eliminar la maltosa unida a la MBP procedente de la cromatografía de afinidad.

La proteína así purificada se empleó para estudiar la capacidad de unión a ligandos del dominio V1 del receptor. Para ello, la proteína MBP-V1 purificada, se incubó en presencia de AGEs o BSA marcados con rodamina durante dos horas a 4°C. Además, para comprobar la especificidad de la unión ligando-MBP-V1 se incubó al mismo tiempo la proteína en presencia de AGEs marcados con rodamina y AGEs sin marcar, de forma que ambos compiten por la unión al receptor. Posteriormente, los complejos formados se unieron a una columna de resina de amilosa, y las fracciones eluidas de la columna se analizaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron con luz UV para detectar la presencia de los ligandos marcados con rodamina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura V.4.

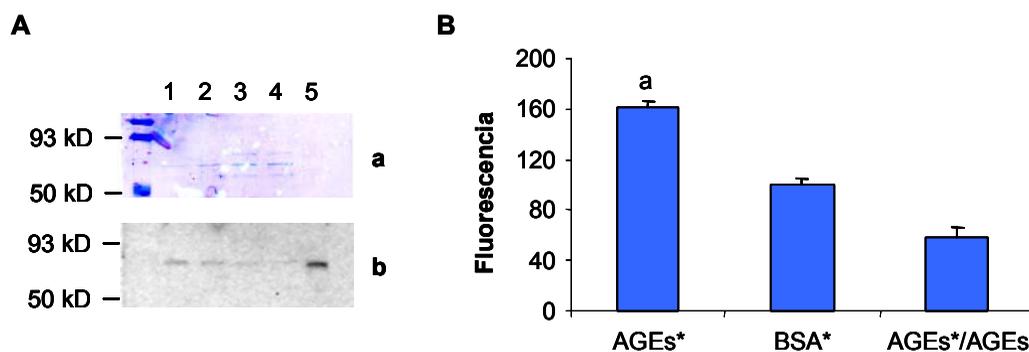


Figura V.4.- Determinación de la capacidad de unión a ligandos del dominio V1 del RAGE. **A-** Gel de poliacrilamida: a: tinción con comassie, b: visualizado con luz UV. 1: MBP-V1 incubado en presencia de AGEs-Rodamina, 2: MBP-V1 con BSA-Rodamina, 3 y 4: MBP-V1 incubado con una mezcla de AGEs-Rodamina/ AGEs sin marcar (1:50). 5: AGEs-Rodamina libres. **B-** Cuantificación densitométrica de las bandas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. (n=5). a: $p < 0,05$ con respecto a la MBP-V1 incubado con BSA-Rodamina. El asterisco indica aquellas moléculas marcadas con rodamina.

En la figura V.4 se observa que la unión de AGEs marcados con rodamina es significativamente superior a la de BSA marcada con el fluoróforo. Esta unión de los AGEs marcados con rodamina al dominio V1 es desplazada por la incubación con un exceso de AGEs sin marcar, lo que prueba la especificidad de la unión de los AGEs al dominio V1 del receptor en nuestra proteína de fusión, ya que la incubación en presencia de un exceso de BSA no produce el desplazamiento de la unión de AGEs (datos no mostrados).

Para confirmar estos resultados, se diseñó el siguiente experimento (Figura V.5): se unió la proteína MBP-V1 a una columna de resina de amilosa. A continuación, se pasaron por la columna AGEs marcados con rodamina, de forma que si el dominio V1 era capaz de unir ligandos, éstos debían quedar retenidos en la columna. Por último, la proteína de fusión se recuperó de la columna con una

solución de maltosa. Durante todo el proceso se recogieron fracciones de la columna, a las que se midió la fluorescencia (para detectar la rodamina) y la concentración de proteínas.

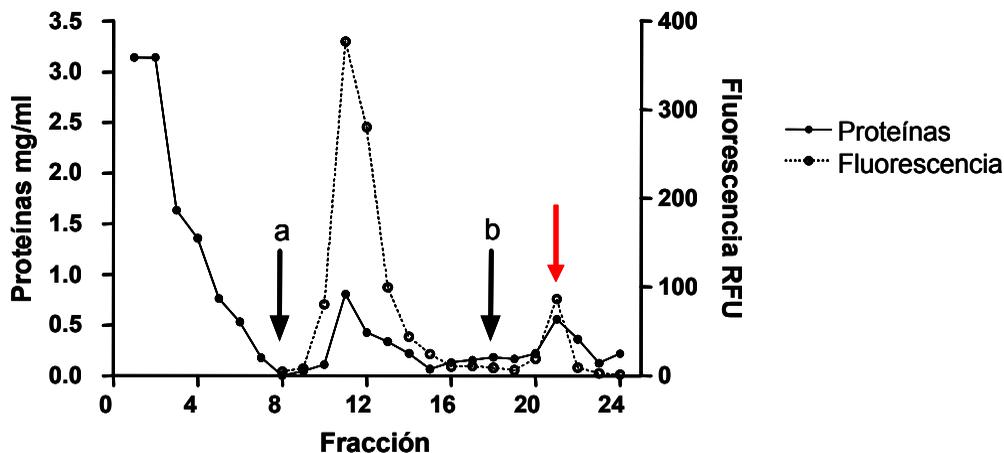


Figura V.5.- Estudio de la unión de AGEs-rodamina a la proteína MBP-V1 en una cromatografía de afinidad. Las flechas “a” y “b” indican las fracciones en las que se añadieron a la columna los AGEs marcados con rodamina y la maltosa, respectivamente. La flecha roja indica el pico de máxima fluorescencia y de proteínas tras la elución con maltosa.

Como se observa en el cromatograma obtenido (Figura V.5), tras la adición de maltosa a la columna (b) se observa un pico de proteínas que corresponde con la fracción donde eluye la proteína de fusión y que coincide con un pico de fluorescencia, lo que indica que la proteína de fusión coeluye con sus ligandos marcados con rodamina.

Estos resultados indican por tanto, que nuestra construcción en la que se ha fusionado el dominio V1 del receptor a la proteína de unión a maltosa es una herramienta útil para el estudio de la unión de ligandos al RAGE. Además, un hecho

relevante es que sólo es necesaria la presencia del dominio extracelular V1 para que el receptor retenga la capacidad de unión a ligandos.

V.1.2.- Expresión, purificación y obtención de anticuerpos frente a la proteína de fusión MBP-Cito

Para la purificación de la proteína de fusión MBP-Cito se ha utilizado la cepa de *E. coli* XL1-Blue en lugar de la cepa M15/pREP4 ya que nuestros resultados indican que en la primera cepa se obtienen mayores niveles de expresión. Tras la inducción de la expresión de proteínas a 37 °C durante 4 horas después de la adición de IPTG (0,3 mM), se han recogido las bacterias mediante centrifugación, se han lisado por sonicación y se ha procedido a la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad en maltosa-agarosa. Los resultados de una purificación típica se muestran en la figura V.6.

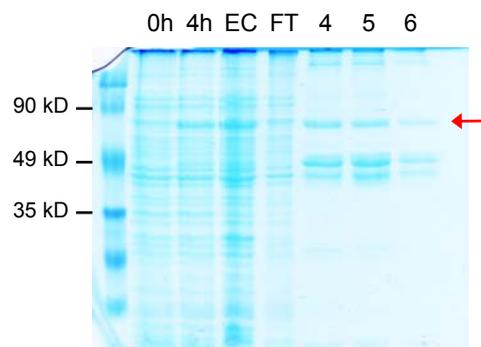


Figura V.6.- Purificación de la proteína de fusión MBP-Cito. 0h y 4h: Extractos crudos bacterianos antes y tras cuatro horas de inducción de la expresión con IPTG. EC: Fracción soluble tras la sonicación del pellet bacteriano cargada en la columna de afinidad. FT: Proteínas que no se retienen en la columna. 4-6: Los números corresponden a las fracciones recogidas después de eluir la proteína de fusión con un maltosa 10 mM. La flecha indica el tamaño esperado para la proteína de fusión.

Como puede observarse en la figura V.6, la cromatografía de afinidad permite la elución de nuestra proteína de fusión de una manera específica. No obstante, puede observarse que también se eluye una segunda proteína. Esta proteína se origina mediante proteólisis de la proteína de fusión durante la inducción de la expresión en las propias bacterias y aunque se ha realizado la lisis y la purificación en presencia de inhibidores de proteasas, esta proteólisis no ha podido ser evitada al producirse durante la inducción. El fragmento proteolítico que se observa en la figura V.6 corresponde con la proteína MBP, ya que es detectado específicamente por anticuerpos frente a la MBP (datos no mostrados), coeluye específicamente con la proteína de fusión MBP-Cito tras la adición de maltosa en la cromatografía de afinidad y tiene el peso molecular correspondiente a la MBP procesada.

Las fracciones así purificadas mediante la cromatografía de afinidad de la proteína MBP-Cito, así como fracciones purificadas de la proteína de fusión MBP-V1, se han empleado para la obtención de anticuerpos policlonales en conejos. Estos anticuerpos, ya que no existen en el mercado unos anticuerpos comerciales frente al RAGE lo suficientemente sensibles y específicos, constituirían una herramienta útil para monitorizar la expresión génica del receptor de AGEs. El suero obtenido a partir de los animales inmunizados se ha pasado por una columna de cromatografía de amilosa-agarosa en la que se ha inmovilizado la proteína MBP, con el objeto de eliminar aquellos anticuerpos que reconocen el epítipo MBP. El suero así pasado por esta columna ha sido utilizado para la detección del RAGE en células y tejidos eucariotas.

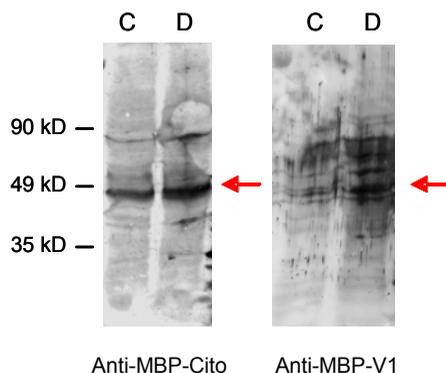


Figura V.7.- Caracterización de los anticuerpos frente a MBP-Cito y MBP-V1 por *Western-Blot*. C: Membranas totales de pulmón de rata control. D: Membranas totales de pulmón de rata diabética. La flecha indica la proteína reconocida por el anticuerpo.

La especificidad de los anticuerpos obtenidos se ha determinado por *Western-blot* (Figura V.7). Se han utilizado como muestras fracciones de membranas totales de pulmón de ratas controles y ratas diabéticas, ya que en respuesta a la diabetes se produce un incremento en la expresión de RAGE. Como puede observarse en la figura V.7, la banda reconocida específicamente por el anticuerpo tiene el tamaño correspondiente al RAGE (≈ 43 kD) y su expresión está aumentada en la diabetes. Estos resultados indican por tanto que estos anticuerpos son adecuados para monitorizar la expresión del receptor en distintas condiciones experimentales. Los anticuerpos frente a MBP-Cito tienen un título mayor, por lo que han sido utilizados de forma rutinaria a lo largo de esta Tesis Doctoral para la detección o cuantificación del RAGE mediante *Western blot*.

V.2.- EXPRESIÓN EUCARIOTA DEL RAGE FUSIONADO A LA GFP

Nuestro grupo de investigación ha descrito que en rata, el receptor de productos avanzados de glicación (RAGE) presenta un alto grado de variabilidad. Se desconoce si las diferentes isoformas descritas presentan la misma distribución subcelular y si ello podría tener alguna implicación en el síndrome diabético tardío.

Hemos hecho construcciones en las que las isoformas del receptor de AGEs de rata se han fusionado en su extremo carboxilo a la proteína fluorescente verde (GFP) y se han transfectado en distintas líneas de células eucariotas. Estas construcciones permitirían visualizar *in vivo* el receptor mediante microscopía de fluorescencia y confocal.

En primer lugar hemos estudiado si esta aproximación experimental, que no ha sido empleada hasta ahora en el caso de RAGE, es válida y por tanto si este tipo de construcciones serían útiles para el estudio de las funciones del receptor y sus diferentes isoformas. Por ello, se ha hecho una primera construcción para expresar la región codificante completa del RAGE fusionada con la GFP.

V.2.1.- Diseño de la construcción

Para realizar esta construcción se ha utilizado el vector de expresión eucariota pEGFP-N3 que permite la clonación de la secuencia de interés en el extremo amino de la GFP. En este vector se ha clonado la secuencia codificante del RAGE de manera que el inicio de la expresión del RAGE se encuentre optimizado al contener una secuencia consenso de Kozac. Además, para poder generar la proteína de fusión se ha eliminado la señal de parada de la traducción del RAGE.

La obtención de la construcción en el vector de expresión se hizo según el siguiente procedimiento: En primer lugar se amplificó por PCR la región codificante del RAGE. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplifican desde el codón de inicio hasta el codón final y que incluyen sitios de restricción que permiten clonar la secuencia del RAGE en fase con el gen de la proteína verde fluorescente (NH₂-Green y COOH-Green). El producto de PCR obtenido a partir de un retrotranscrito de pulmón de rata, se clonó en el vector pST1-Blue, y se secuenció. A continuación, se subclonó entre los sitios de restricción *Bgl*II y *Sal*I del sitio múltiple de clonaje del vector de expresión pEGFP-N3 (Figura V.8).

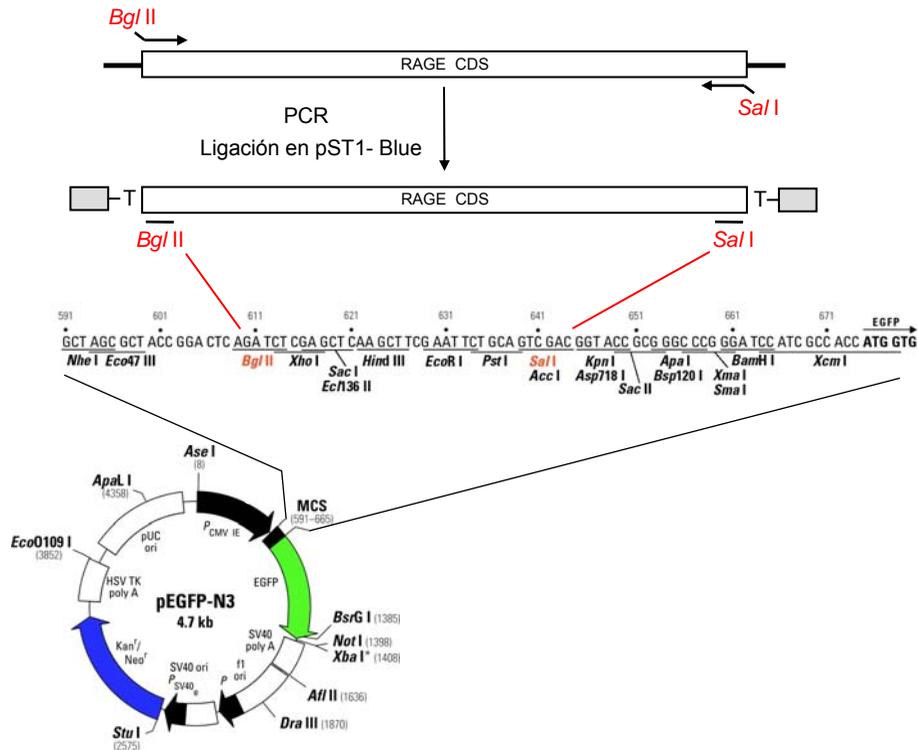


Figura V.8.- Construcción para la expresión eucariota del receptor de productos avanzados de glicación de rata fusionado a GFP.

Una vez obtenida esta construcción, se transfectó transitoriamente en las líneas celulares CHO-k1 y Neuro-2A y se analizó la expresión de la proteína de fusión mediante RT-PCR y *Western-blot*.

Para el análisis del mRNA que codifica para la proteína de fusión se ha aislado RNA total de células Neuro-2A y CHO-k1 transfectadas, se ha retrotranscrito a cDNA y se ha amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos que hibridan de forma específica en la secuencia codificante del RAGE o de la GFP. Como se muestra en la figura V.9, en los dos tipos celulares nuestra construcción se transcribe de forma adecuada y con unos niveles elevados puesto que se obtienen los productos de amplificación esperados.

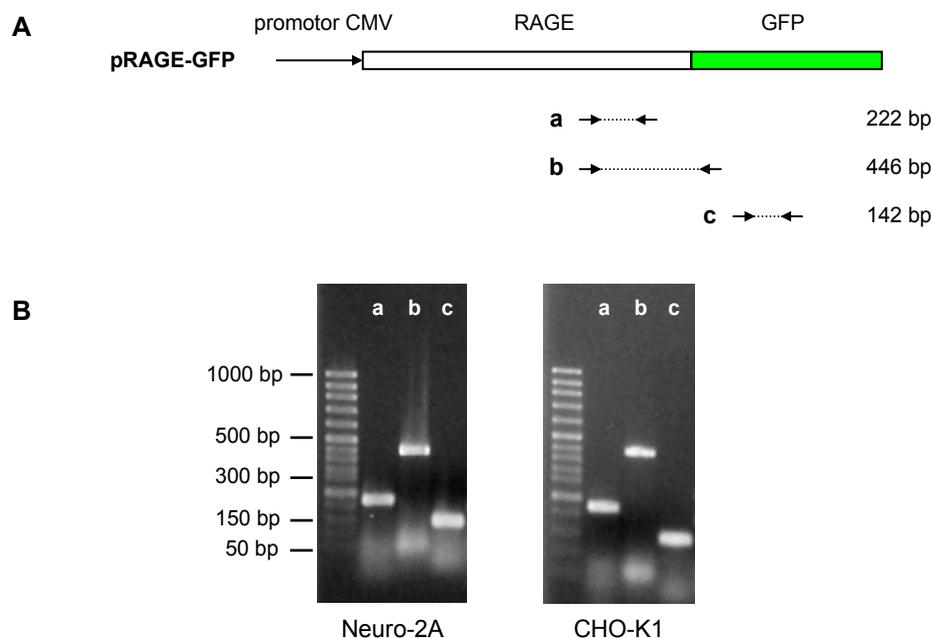


Figura V.9.- Análisis por RT-PCR del mRNA que codifica para la proteína de fusión RAGE-GFP en células CHO-k1 y Neuro-2A transfectadas con el plásmido pRAGE-GFP. **A-** Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados: a: RAGE-FO2 y RAGE-RE, b: RAGE-FO2 y GFP-N, c: GFP-F y GFP-R. **B-** Separación en geles de agarosa de los productos amplificados.

Después, analizamos la expresión de la proteína de fusión por *Western-blot* en extractos celulares totales de células CHO-k1 transfectadas de forma estable con la construcción pRAGE-GFP. Como control se utilizaron células sin transfectar y células transfectadas con el plásmido pEGFP-N3. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce un fragmento del RAGE (frente a MBP-Cito, descrito en el apartado V.1.2) y un anticuerpo monoclonal comercial frente a la GFP. En la figura V.10 se muestra un *Western-blot* representativo: En células transfectadas con el vector pEGFP-N3 se detecta una banda de aproximadamente 30 kD correspondiente a la proteína fluorescente verde, cuando se usa el anticuerpo frente a GFP y no se detectan bandas específicas con el anticuerpo frente al RAGE. En células transfectadas con la construcción pRAGE-GFP se detecta una banda de aproximadamente 80 kD cuando se usan ambos anticuerpos.

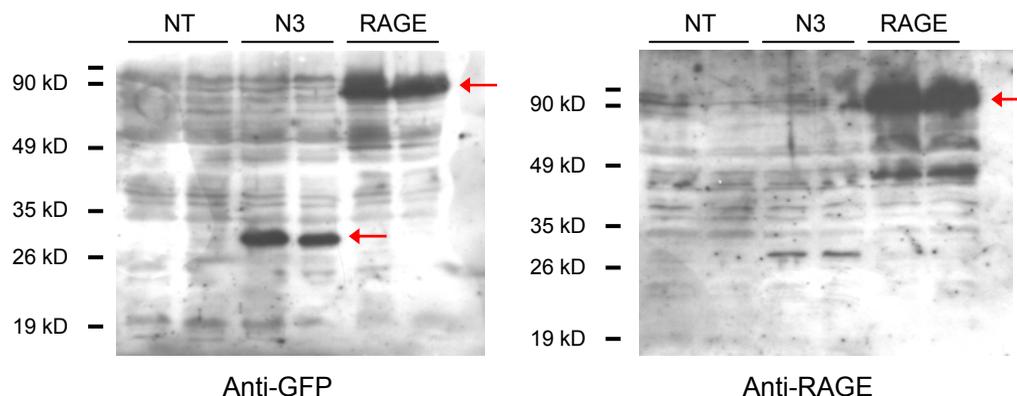


Figura V.10. Análisis mediante *Western-blot* de la expresión de la proteína de fusión RAGE-GFP en células CHO-k1. NT: Células sin transfectar, N3: Células transfectadas con pEGFP-N3, RAGE: Células transfectadas con pRAGE-GFP.

Por tanto, los resultados de RT-PCR y los obtenidos mediante Western-blot indican que la proteína de fusión RAGE-GFP se expresa adecuadamente y de forma estable en los diferentes tipos celulares ensayados.

V.2.2.- Localización subcelular de la proteína RAGE-GFP

A continuación, hemos procedido a estudiar la localización subcelular de la proteína de fusión mediante microscopía de fluorescencia en células CHO-k1 transfectadas de forma estable con la construcción RAGE-GFP. Estas células, que no expresan el RAGE de forma endógena, se han escogido por su facilidad de manipulación y transfección.

Para la obtención de resultados reproducibles decidimos el aislamiento y crecimiento de clones que expresasen de forma estable nuestra proteína de fusión. Para la obtención de estos clones aislados, 48 horas después de la transfección, las células se diluyeron en medio de cultivo con G-418 como antibiótico de selección y una vez que crecieron como clones aislados, se seleccionaron los fluorescentes y se aislaron utilizando “*cloning-discs*” (Sigma). Esto permitió trabajar con poblaciones celulares homogéneas.

En la figura V.11 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de los distintos tipos de clones aislados. En un porcentaje muy elevado de los clones analizados, el receptor presenta una localización en membrana plasmática (1), mientras que existen algunos clones transfectados (en un porcentaje muy bajo) en los que se puede observar una localización del RAGE-GFP en el retículo endoplásmico (2) y en un menor porcentaje de clones una localización en el núcleo celular (3).

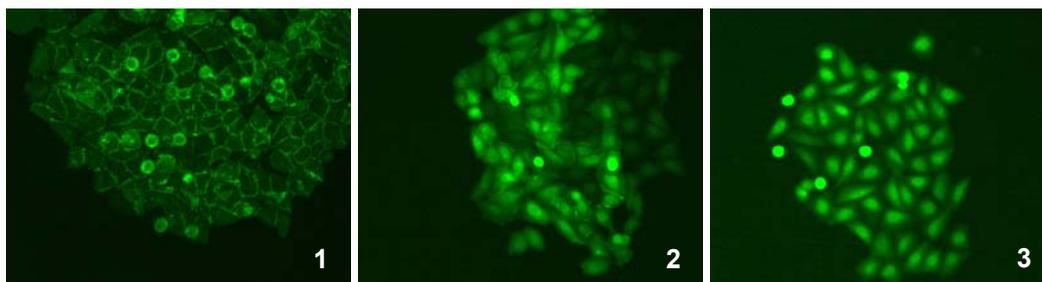


Figura V.11.- Localización subcelular del RAGE fusionado a GFP en células CHO-k1. Se presentan clones con distribución subcelular diferente mediante microscopía de fluorescencia. Para la detección de la expresión de la GFP se ha empleado el filtro WB (Olympus).

Es posible que mutaciones al azar producidas tras la transfección originen proteínas truncadas en las que el receptor se haya eliminado y observemos la localización nuclear propia de la proteína fluorescente verde (de hecho, ha sido descrito que en el caso de la expresión de la proteína fluorescente verde exclusivamente, ésta puede presentar una localización nuclear (Di Liegro *et al.*, 2000). En el caso de los clones con localización en el retículo endoplásmico, esta localización puede ser debida a una pérdida de señales secundarias de destino, o bien se trata de una situación fisiológica en la que diferentes estímulos celulares sean capaces de producir la translocación del receptor desde el retículo hasta la membrana plasmática.

En el caso del mayor número de clones, aquellos que tienen una localización predominante de la fluorescencia en la membrana plasmática, hemos estudiado más detalladamente la localización subcelular del receptor mediante microscopía confocal de fluorescencia. Este estudio se ha realizado en diferentes líneas celulares. Se ha utilizado la línea celular CHO-k1 que no expresa RAGE endógeno y las líneas

celulares NRK-52F y Neuro-2A que sí expresan el receptor de forma endógena. Para ello, las células transfectadas fueron cultivadas sobre un cubre estéril, se fijaron en 2% de paraformaldehído y se montaron en un portaobjetos sobre una gota de medio de montaje (Vectashield). Como control se han utilizado células transfectadas con el vector pEGFP-N3 tal y como se muestra en la figura V.12.

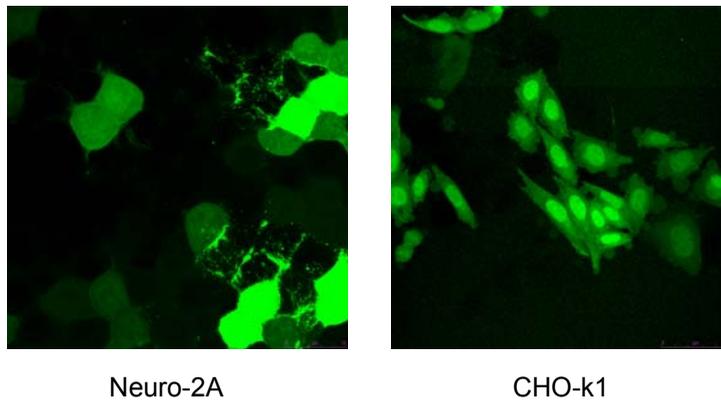


Figura V.12.- *Microscopía confocal de fluorescencia de células Neuro-2A y CHO-k1 transfectadas con el plásmido pEGFP-N3.*

En el caso de la proteína de fusión RAGE-GFP (Figura V.13), en todas las líneas celulares analizadas, el receptor se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática y en menor medida en el retículo endoplásmico, como cabría esperar.

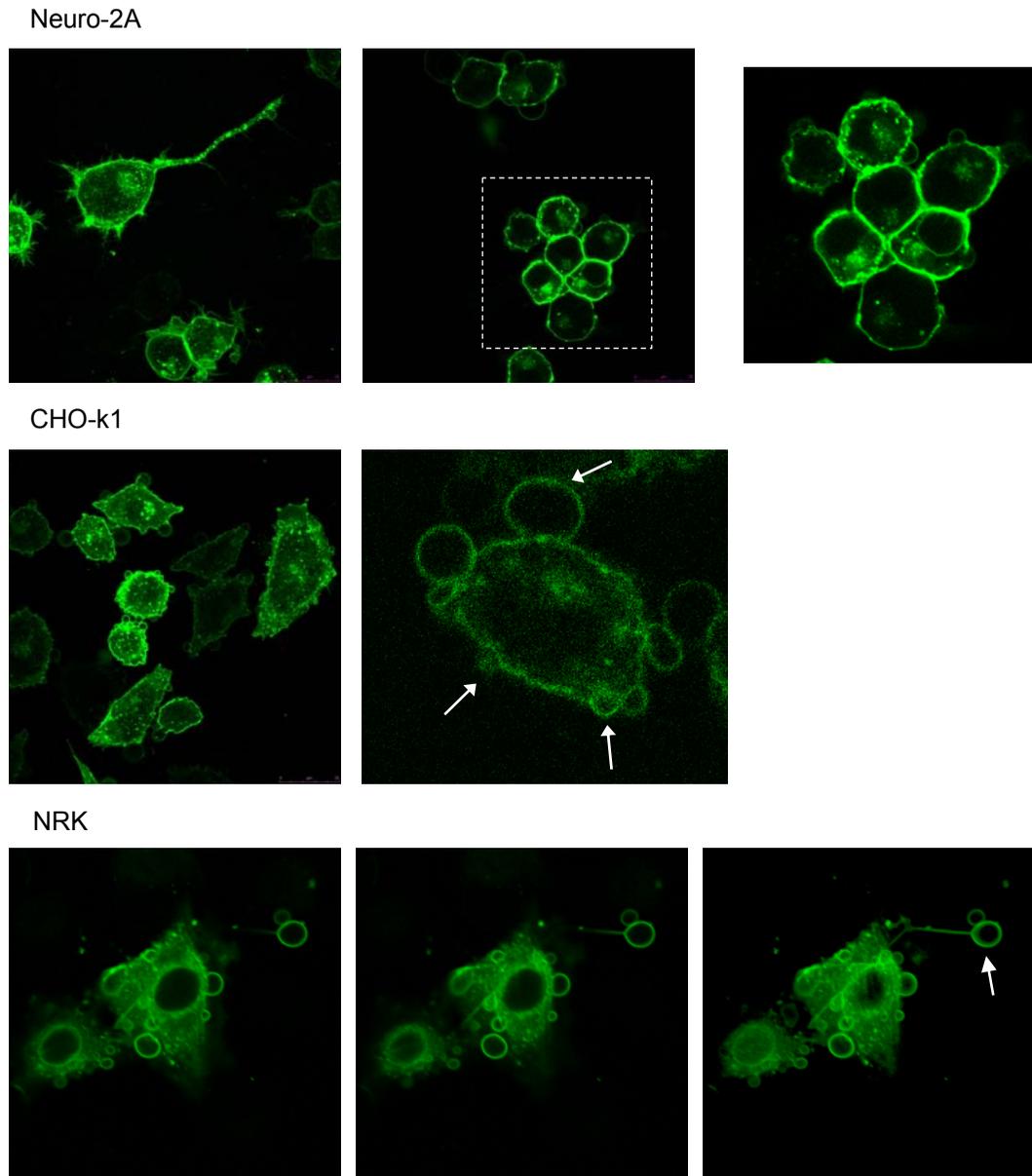


Figura V.13.- *Microscopía confocal de fluorescencia de células Neuro-2A, CHO-k1 y NRK transfectadas con la construcción pRAGE-GFP. La caja de líneas discontinuas corresponde a la zona ampliada para más detalle en la foto de la derecha.*

Además de la localización en la membrana cabe destacar dos resultados complementarios. En primer lugar, en la línea celular Neuro-2A al tratarse de neuroblastomas, se produce la formación de neuritas y en la membrana de ellas se expresa específicamente la proteína RAGE-GFP (Figura V.13). Otro aspecto destacado es la aparición de evaginaciones de la membrana plasmática o “Blebs” (señalados con flechas en la figura), que en principio pudieran ser debidas a que la sobre-expresión del receptor favoreciese fenómenos de apoptosis en estas líneas celulares. Para comprobar esta posibilidad, estudiamos si los núcleos de las células transfectadas presentaban una morfología típica de células en apoptosis. Para ello, las células se montaron en medio de montaje con DAPI (que permite la visualización de la morfología nuclear) y el doble marcaje se analizó mediante microscopía de fluorescencia (Figura V.14).

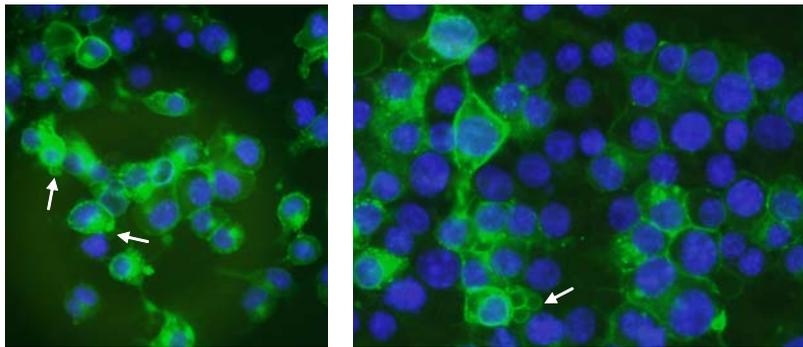


Figura V.14.- Tinción con DAPI de células Neuro-2A transfectadas con la construcción *pRAGE-GFP*. Las flechas indican las evaginaciones de la membrana.

Como puede observarse en la figura representativa V.14, las células en las que aparecen las evaginaciones de la membrana no presentan una morfología nuclear apoptótica. De hecho, la tasa de núcleos apoptóticos es ligeramente superior en las células no transfectadas en comparación con las transfectadas (datos no

mostrados). Aunque una posibilidad es que las evaginaciones puedan deberse a la presencia de restos de los complejos lipídicos de la transfección, el hecho de que estas evaginaciones permanezcan en cultivos estables y que han sido congelados y crecidos tras la transfección, parece eliminar esta posibilidad. Creemos que la sobre-expresión del RAGE conduce a un aumento de la superficie celular, lo que genera las evaginaciones observadas.

V.2.3.- Capacidad de unión a ligandos de la proteína RAGE-GFP

Una vez que comprobamos que la localización subcelular del receptor fusionado a GFP era como cabía esperar, mayoritaria en la membrana plasmática, decidimos estudiar su funcionalidad. En primer lugar, procedimos a determinar si la proteína de fusión mantenía la capacidad de unir ligandos en cultivos celulares. Aunque la GFP se ha fusionado en el extremo carboxilo del RAGE, y en principio no debe afectar a su capacidad de unión de ligandos (en el dominio variable, cerca del extremo amino como mostramos en el apartado V.1.1), hemos estudiado la capacidad de unir ligandos del receptor fusionado a la proteína fluorescente verde en células CHO-k1 y Neuro-2A. Como ligando del RAGE hemos utilizado albúmina bovina glicada irreversiblemente (AGE-BSA). Para algunos estudios los AGEs-BSA se han marcado con diferentes fluoróforos como Rodamina B o Texas-red (Apartado IV.4.3.6. de Materiales y Métodos).

Para el estudio de la capacidad de unión a ligandos de las proteínas de fusión, células CHO-k1 y Neuro-2A transfectadas con el pRAGE-GFP fueron cultivadas sobre un cubre estéril hasta una confluencia del 50-60%. A continuación, se incubaron durante 3 horas con 5 µg/mL de AGEs-BSA marcados con rodamina o 50 µg/mL de AGEs-BSA marcados con Texas-red en medio de bloqueo (DMEM suplementado con 3% de BSA) a 37 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS frío, se

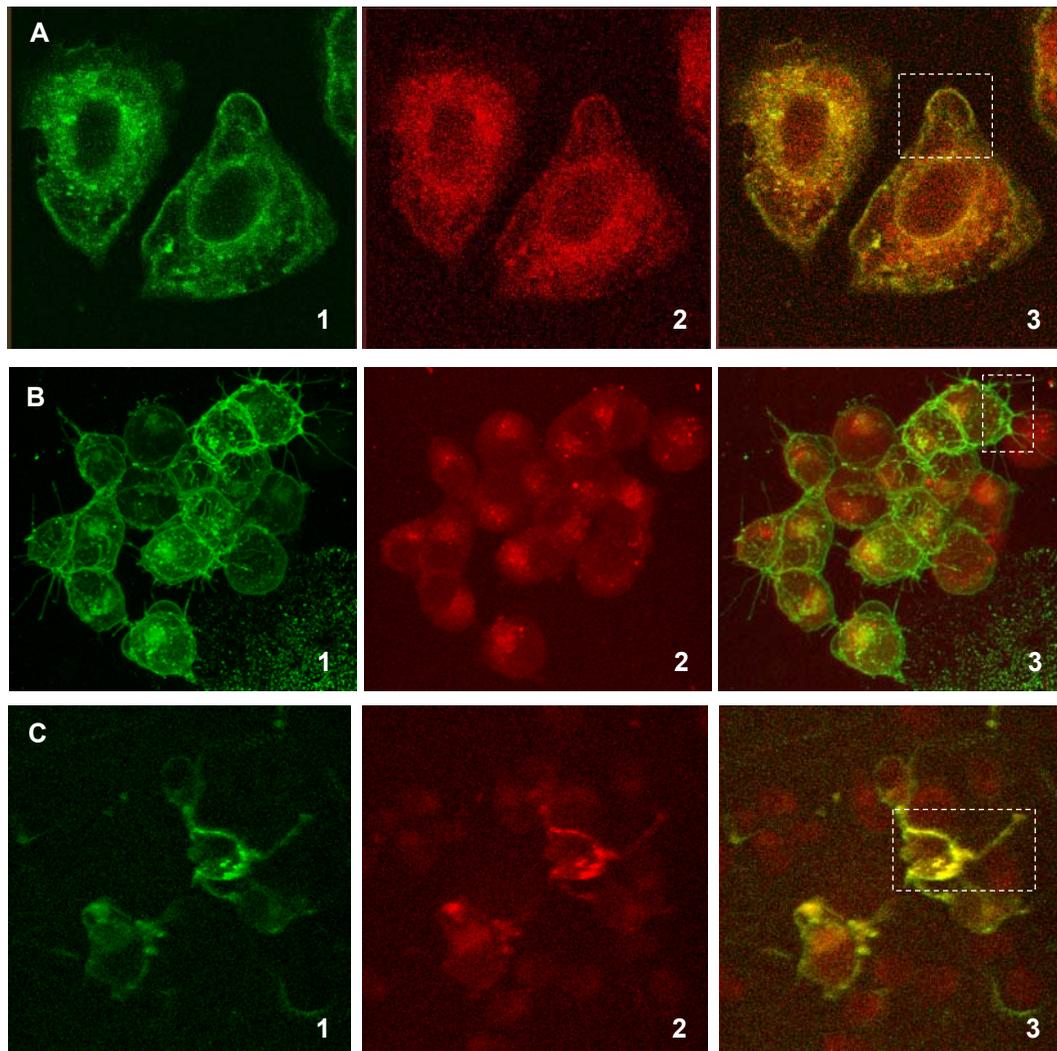


Figura V.15.- Unión de AGEs-Rodamina a células CHO-k1 (A) y de AGEs-Texas-Red a células Neuro-2A (B y C), transfectadas con la construcción pRAGE-GFP. 1: Emisión para GFP. 2: Emisión para Rodamina o Texas-red. 3: Imagen conjunta para GFP y para Rodamina o Texas red. La caja de líneas discontinuas corresponde a una porción de membrana plasmática que se muestra con más detalle en la figura V.16.

fijaron con paraformaldehído y se analizaron mediante microscopía confocal. Para ello se utilizaron láseres de excitación específicos para la GFP y la rodamina o Texas-red, empleados secuencialmente y ventanas de emisión que no se solapaban para los distintos fluoróforos (GFP, rodamina o Texas-red). Experimentos utilizando células marcadas sólo con el RAGE-GFP, rodamina o Texas-red nos permitieron comprobar la especificidad de las señales de emisión detectadas.

Como se observa en la figura V.15, las señales de fluorescencia debidas al receptor (verde) y a los ligandos (rojo) colocalizan en la membrana plasmática (amarillo), por lo que cabe concluir que el receptor fusionado a GFP une ligandos. Un detalle de la membrana plasmática de estas células se muestra en la figura V.16. Además se observa que en el interior de la célula se produce también en cierto grado una colocalización de las fluorescencias verde y roja. Esto sugiere la posibilidad de que tras la unión del receptor al ligando, se produzca una internalización del complejo al citosol de la célula.

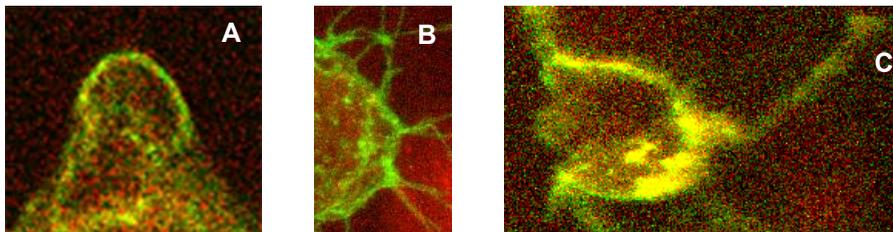


Figura V.16.- Microscopía de fluorescencia de la membrana plasmática de células CHO-k1 (A) y células Neuro-2A (B y C), transfectadas con la construcción pRAGE-GFP y incubadas con BSA-AGEs marcados con Rodamina o Texas -Red.

Por tanto, los resultados de localización subcelular y medida de la capacidad de unión a ligandos, validan el uso de nuestra proteína de fusión para la caracterización del receptor de productos avanzados de glicación de rata y sus distintas isoformas ya que la proteína expresada en células eucariotas tiene la localización subcelular esperada y mantiene la capacidad de unión a ligandos.

V.2.4.- Capacidad de generación de señales intracelulares mediada por la proteína RAGE-GFP

A continuación, hemos procedido al estudio de la capacidad de generar respuestas intracelulares del receptor fusionado a la GFP. Se ha descrito que el dominio citosólico del RAGE es crítico para la señalización intracelular (Huttunen *et al.*, 1999). Sin embargo, ya que en nuestro modelo este dominio citosólico se ha fusionado a la GFP, la determinación de la funcionalidad del receptor era importante para validar su utilidad y descartar un bloqueo de la capacidad de transducción de señales debido a la fusión con la GFP.

Ya que la unión de ligandos al RAGE induce la activación de la ruta de señalización de MAP kinasas mediada por ERK1/2 (Lander *et al.*, 1997), se ha cuantificado la fosforilación de ERKs en respuesta a la unión de AGEs en células Neuro-2A transfectadas de forma estable con la construcción pRAGE-GFP e incubadas con AGE-BSA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos. Como control se han utilizado células sin transfectar y células transfectadas con el plásmido pEGFP-N3, que codifica para la GFP sin fusionar. El nivel de expresión de ERK 1/2 total y de ERKs fosforiladas se ha determinado por *Western-blot* (Figura V.17).

En células Neuro-2A que sobre-expresan el RAGE (transfectadas con el pRAGE-GFP) se observa un incremento muy significativo de la fosforilación de ERK

1/2 cuando se incuban con AGEs, mientras que no hay modificación de los niveles de ERKs totales. Este incremento de la fosforilación de ERK 1/2 tras la adición de AGEs es muy inferior en células sin transfectar o transfectadas con pEGFP-N3, efecto que puede corresponderse con la presencia de RAGE endógeno expresado naturalmente por esta línea celular.

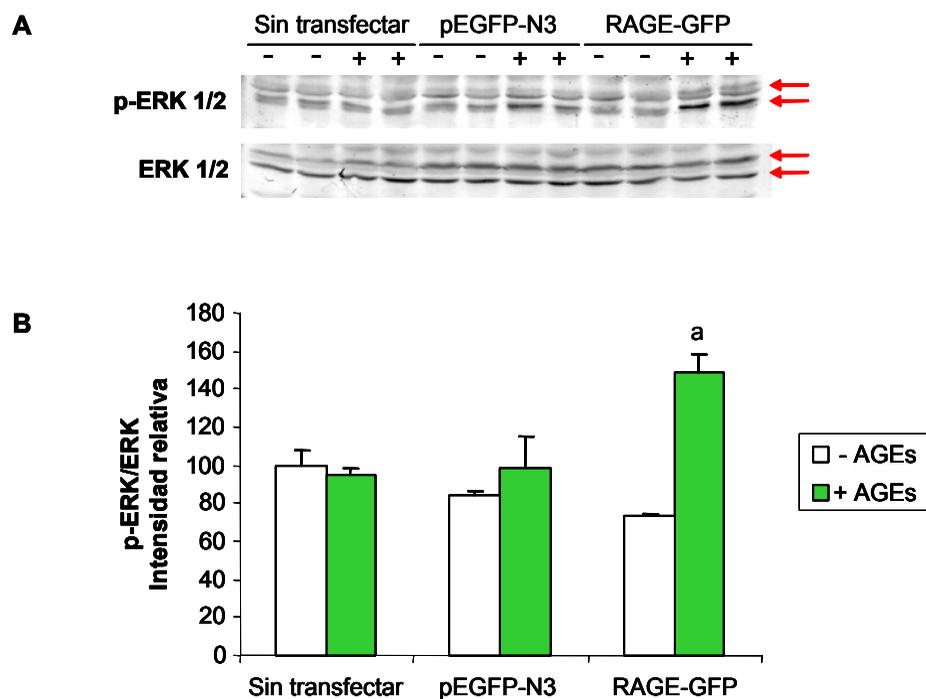


Figura V.17.- Fosforilación de ERKs mediada por RAGE en células Neuro 2A transfectadas con pRAGE-GFP. A- Western-blot con anticuerpos frente a ERK 1/2 y frente a fosfo-ERK 1/2 de células Neuro 2A, transfectadas o no, incubadas con (+) o sin AGEs (-). **B-** Intensidad relativa de las bandas del Western-blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM. (n=4). a: $p < 0,02$ con respecto a las mismas células sin AGEs.

Un aspecto importante al estudiar las cascadas de señalización intracelulares reguladas por fosforilación es la respuesta temporal frente a los efectores. Por ello, hemos estudiado la fosforilación de ERKs mediada por RAGE a lo largo del tiempo (Figura V.18). Como puede observarse en esta figura la fosforilación de ERKs mediada por la unión AGEs-RAGE-GFP es dependiente del tiempo y presenta un máximo de respuesta a los 15 minutos, manteniéndose un grado alto de fosforilación al menos durante 60 minutos.

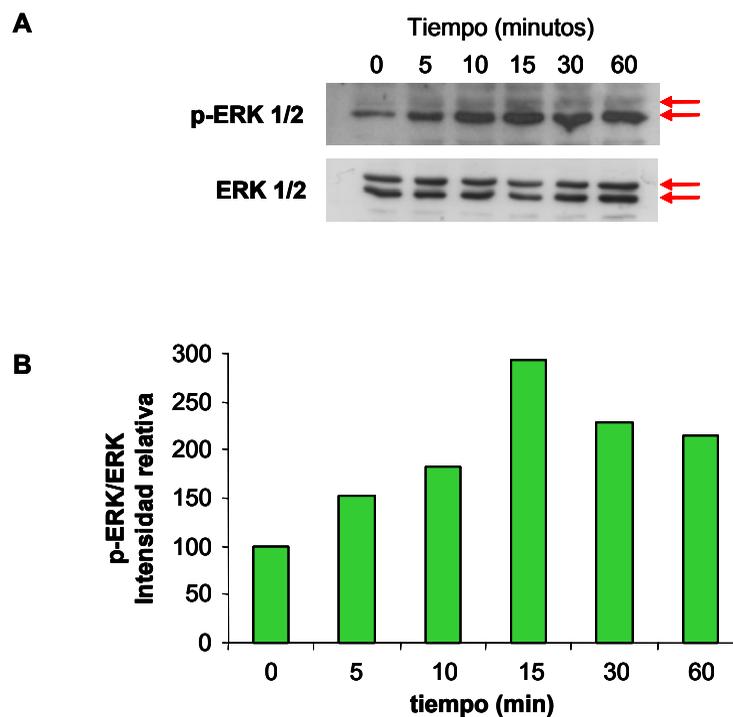


Figura V.18.- Fosforilación de ERKs mediada por RAGE con respecto al tiempo. **A-** Western-blot. **B-** Intensidad relativa de las bandas del Western-blot.

Se ha descrito que como consecuencia de la cadena de transducción de señales mediada por el RAGE se produce la activación del factor de transcripción NF- κ B. Esta activación conduce a su translocación desde el citosol al núcleo (Kislinger *et al.*, 1999). Para determinar la posible activación de NF- κ B en respuesta a la adición de AGEs, se ha realizado un EMSA en extractos nucleares de células CHO-k1 transfectadas de forma estable con la construcción pRAGE-GFP. Cabe destacar que esta línea celular no expresa de forma endógena el receptor de AGEs y que por tanto carece de capacidad de responder a los mismos. En estos experimentos hemos usado como control células sin transfectar y células transfectadas con el plásmido pEGFP-N3.

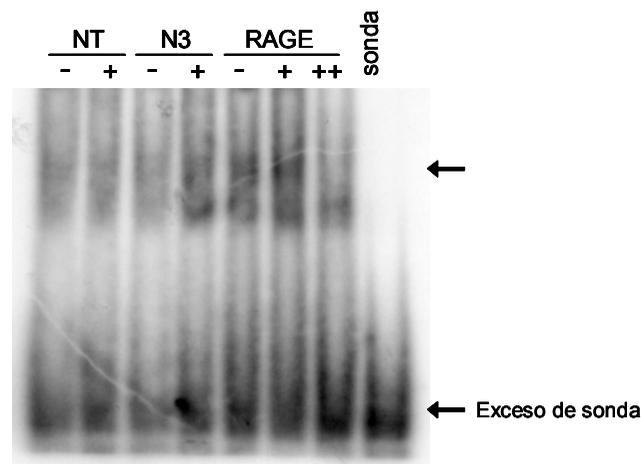


Figura V.19.- Activación de la unión de NF- κ B a DNA mediada por RAGE en células CHO-k1 transfectadas con pRAGE-GFP. Extractos nucleares obtenidos de células CHO-k1 con (+) o sin AGEs (-) se incubaron con la secuencia consenso del factor de transcripción NF- κ B marcada radioactivamente. Para comprobar la especificidad de la unión se añadió a una muestra de células transfectadas con la construcción pRAGE-GFP e incubadas con AGEs un exceso de sonda sin marcar (++). La calle marcada como sonda corresponde a una muestra con sonda en ausencia de extractos nucleares.

En células CHO-k1 transfectadas con la construcción pRAGE-GFP se observa una activación significativa de NF- κ B, que se ve incrementada cuando se incuban con AGEs; la activación es menor en las células control (Figura V.19). Aunque esta línea celular no expresa RAGE de forma endógena, la actividad observada en células no transfectadas con el RAGE, puede deberse a la presencia en estas células de otros receptores capaces de estimular la translocación al núcleo de NF- κ B. Se ha descrito que la localización nuclear de la GFP produce una activación celular (Agbulut *et al.*, 2006), lo que puede explicar la activación de NF- κ B observada en las células transfectadas con el vector pEGFP-N3. Sin embargo, este artefacto debido a la localización nuclear de la GFP en ausencia de señales específicas de destino de la misma, no debe aplicarse a nuestra proteína de fusión, ya que ésta se localiza en la membrana plasmática.

Por tanto, nuestro sistema de expresión en células eucariotas del RAGE como proteína de fusión con la GFP cumple todos los requisitos para ser considerado válido: Se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática, conserva la capacidad de unir ligandos, media el estímulo de cascadas de transducción de señales y desencadena respuestas intracelulares.

V.3.- PAPEL DE LA INTERNALIZACIÓN DEL RAGE EN LA GENERACIÓN DE RESPUESTAS INTRACELULARES

En los estudios de unión a ligandos al receptor de AGEs fusionado a GFP, hemos observado que la unión del RAGE a sus ligandos puede conducir a una internalización del complejo al interior de la célula (Figura V.20).

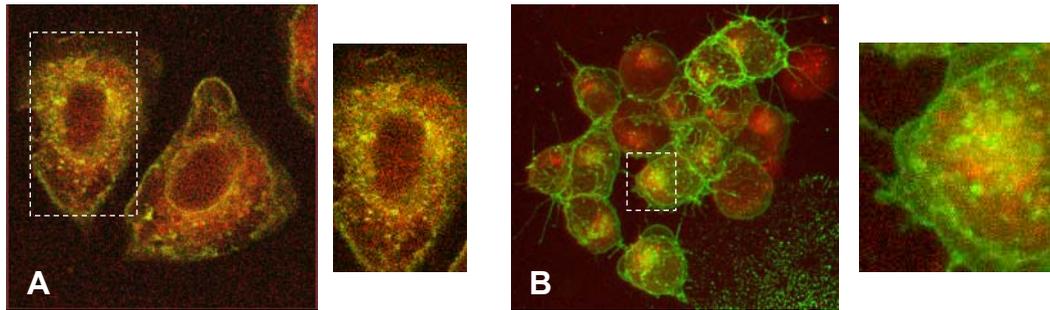


Figura V.20.- Detalle del interior celular de las células mostradas en la figura V.15. **A-** Células CHO-k1. **B-** Células Neuro-2A.

Para confirmar este resultado y determinar qué importancia puede tener en la producción de señales intracelulares, células Neuro 2A transfectadas con la construcción pRAGE-GFP se han incubado con AGEs-BSA sin marcar durante 12 horas y se ha estudiado la localización subcelular del receptor antes y después de la adición del ligando al cultivo celular mediante microscopía de fluorescencia.

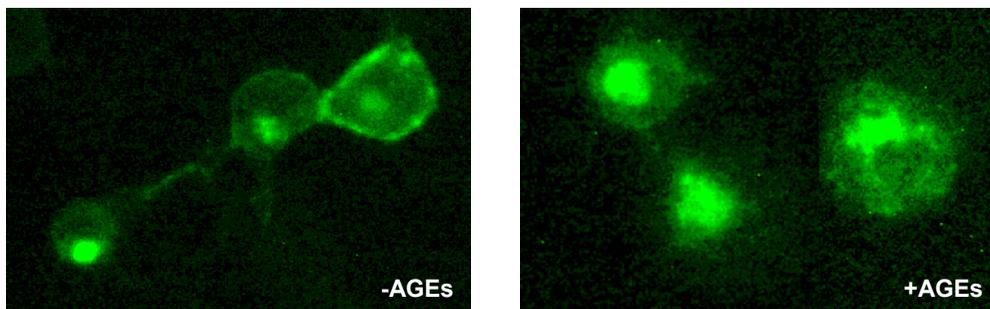


Figura V.21.- Localización subcelular del RAGE tras la adición de ligandos. Células Neuro 2A se transfectaron con la construcción pRAGE-GFP y se incubaron con AGEs durante 12 horas. La localización de la fluorescencia se analizó mediante microscopía de fluorescencia.

Como puede verse en la figura V.21, antes de la adición de AGEs, el receptor se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática y en menor medida en el retículo endoplásmico. Tras la unión de los ligandos a su receptor, la fluorescencia asociada a la proteína fluorescente verde fusionada al RAGE se localiza tanto en la membrana plasmática como en el interior de la célula, por lo que el patrón de distribución de las intensidades relativas entre la membrana plasmática y el interior celular parece indicar que ocurre un proceso de internalización.

Puesto que la unión del receptor a ligandos parece promover un fenómeno de internalización, hemos procedido a estudiar la importancia de este proceso en el desencadenamiento de señales intracelulares. Para ello, hemos preincubado células Neuro-2A transfectadas con la construcción pRAGE-GFP con un inhibidor específico de la internalización de receptores, dansyl-cadaverina (100 μ M) (Schütze *et al.*, 1999), durante 30 minutos antes de la adición de los AGEs. A continuación y ya que la unión de AGEs a su receptor promueve la transducción de señales mediante la ruta de MAP kinasas, se ha cuantificado la fosforilación de ERKs mediada por la unión RAGE-AGEs.

La preincubación con dansyl-cadaverina del cultivo celular es capaz de prevenir la fosforilación de ERK en respuesta a la adición de AGEs y por tanto parece mostrar que el proceso de internalización es relevante en el desencadenamiento de respuestas intracelulares (Figura V.22).

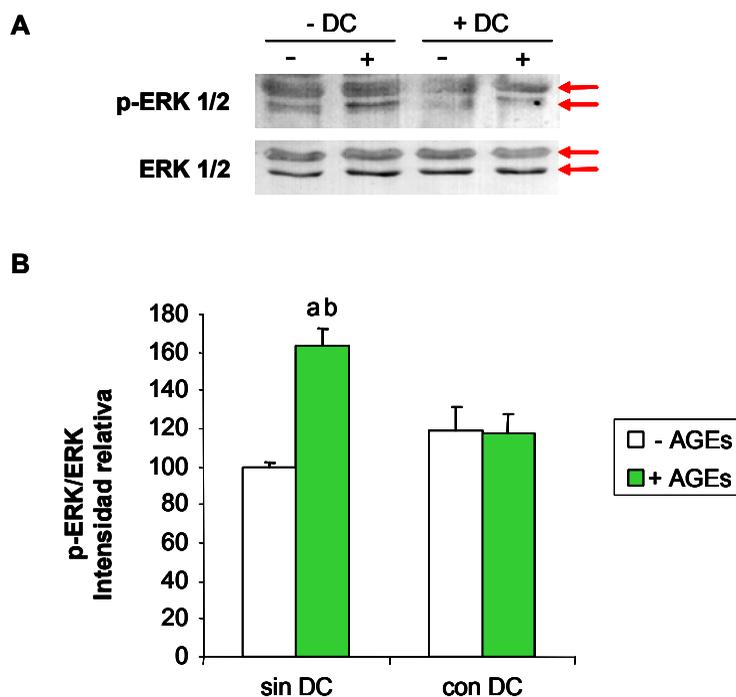


Figura V.22.- Inhibición de la fosforilación de ERKs por bloqueo de la internalización del RAGE. **A-** Western-blot a partir de células Neuro-2A transfectadas con pRAGE-GFP y incubadas con (+) o sin AGEs (-), DC: dansyl-cadaverina. **B-** Intensidad relativa de las bandas del Western-blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,02$ con respecto a las mismas células sin AGEs; b: $p < 0,03$ con respecto a las mismas células con AGEs y con dansyl-cadaverina ($n = 4$).

Se ha descrito que en el promotor del receptor de productos avanzados de glicación existen dos sitios de unión de NF- κ B (Li & Schmidt, 1997). Por tanto, el incremento de la concentración de AGEs, desencadena a través del propio receptor un aumento de los niveles nucleares de NF- κ B lo que produce un aumento de la expresión del receptor. Una forma de estudiar la vía completa de señalización desencadenada por la unión de AGEs al receptor, es midiendo la estimulación de la actividad promotora del gen del RAGE en respuesta a AGEs. Para ello, se han transfectado células Neuro-2A con un plásmido en el que la región promotora del

RAGE controla la expresión del gen de la luciferasa (ver apartado V.6.1. correspondiente al estudio del promotor del RAGE de rata), y se ha determinado la actividad luciferasa tras la adición de AGEs al medio de cultivo en presencia o ausencia de dansyl-cadaverina (Figura V.23).

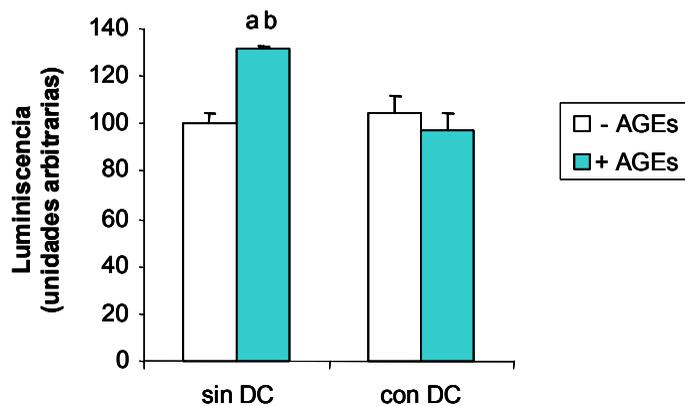


Figura V.23.- Niveles de expresión de luciferasa mediados por el promotor del RAGE. DC: dansyl-cadaverina. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ con respecto a las mismas células sin AGEs; b: $p < 0,01$ con respecto a las mismas células con AGEs y con dansylcadaverina ($n=5$).

Por tanto, nuestros resultados indican que la unión de ligandos al receptor promueve la internalización del mismo y que este fenómeno de internalización parece ser un proceso clave en el desencadenamiento de repuestas intracelulares, ya que en células pre-incubadas con dansyl-cadaverina, se bloquea la fosforilación de ERKs mediada por AGEs-RAGE así como la sobre-expresión del propio receptor mediada por un incremento de la actividad promotora en su gen debida a la interacción AGEs-RAGE.

V.4.- USO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON LA GFP PARA EL ESTUDIO DE LA ISOFORMA DEL RECEPTOR DE AGES CARENTE DEL EXÓN 9

Existen dos isoformas del RAGE de rata generadas por *splicing* alternativo que difieren en la presencia o ausencia del exón 9 que codifica para 9 aminoácidos del dominio extracelular, estos aminoácidos se localizan en una región próxima al dominio transmembrana. (Girón *et al.*, 1998). Aunque estas dos isoformas del RAGE se diferencian solamente en nueve aminoácidos (cuatro de ellos de carácter netamente ácido) nos planteamos la posibilidad de que esta isoforma del receptor presentara una diferente afinidad y/o especificidad por los ligandos, una diferente distribución subcelular, alterase el proceso de transducción de señales al interior celular tras la adición de ligandos o finalmente tuviese un papel en el control post-transcripcional de la expresión del receptor.

Una vez que hemos validado nuestra aproximación experimental en la que el RAGE ha sido fusionado a GFP, hemos aplicado esta estrategia para estudiar el comportamiento de la isoforma del RAGE carente del exón 9. Para ello, se ha hecho una construcción similar a la que ya teníamos para el receptor completo pero con el RAGE sin exón 9 (Figura V.24).

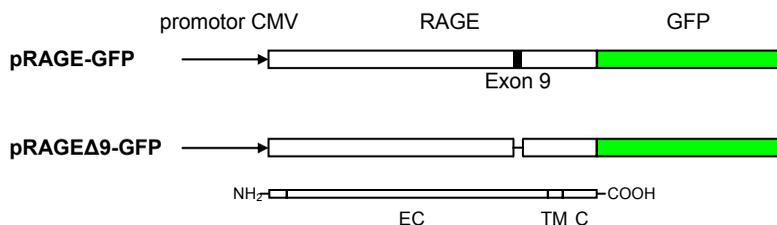


Figura V.24. Esquema de la construcción que codifica para la proteína de fusión RAGE Δ 9-GFP, comparada con la construcción pRAGE-GFP. En la parte inferior se muestra un esquema de los dominios del RAGE. EC: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; C: dominio citosólico.

En primer lugar, hemos analizado la localización subcelular de esta isoforma en células CHO-k1 transfectadas de forma estable con esta construcción. La inmensa mayoría de los clones analizados presentan la fluorescencia en la membrana plasmática (Figura V.25), aunque también, al igual que sucede con la isoforma completa del receptor, existen algunos clones en los que la proteína de fusión RAGE Δ 9-GFP se encuentra en el retículo endoplásmico o en el núcleo.

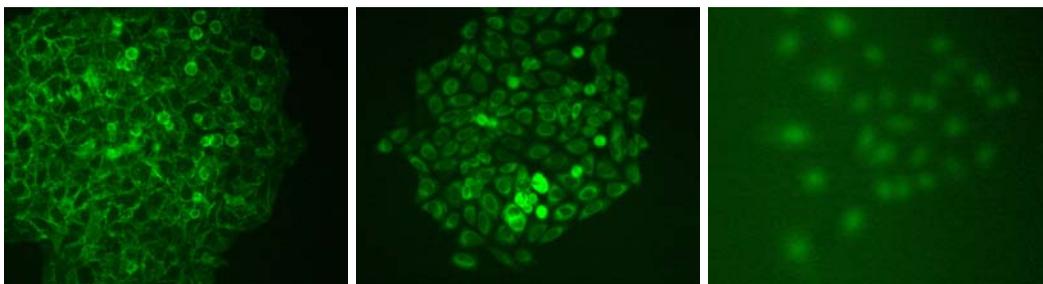


Figura V.25.- Localización subcelular del RAGE Δ 9 fusionado a GFP en células CHO-k1. Se presentan clones con distribución subcelular diferente: 1- Membrana plasmática, 2- Retículo endoplásmico, 3- Núcleo.

Además, hemos estudiado la localización subcelular de esta isoforma del receptor mediante microscopía confocal de fluorescencia en las líneas celulares CHO-k1 y Neuro-2A (Figura V.26). Se observa de nuevo que la isoforma del receptor sin exón 9 se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico.

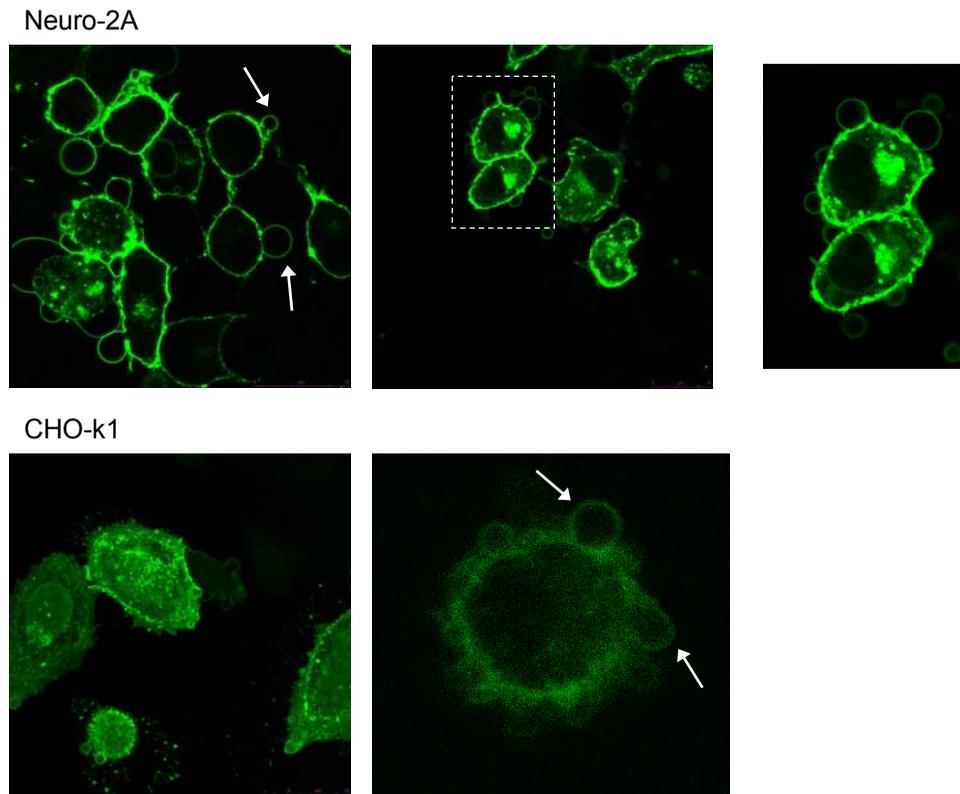


Figura V.26.- *Microscopía confocal de fluorescencia de células Neuro-2A y CHO-k1 transfectadas con la construcción pRAGE Δ 9-GFP. La caja de líneas discontinuas corresponde a la zona ampliada para más detalle en la foto de la derecha.*

También aparecen las evaginaciones de la membrana observadas para la isoforma completa del receptor (señaladas con flechas en la figura V.26). Los resultados de la tinción con DAPI, indican que tampoco se deben a apoptosis (figura V.27), por tanto esto nos confirma nuestra hipótesis que las evaginaciones observadas se deben a un incremento de la superficie celular por la sobreexpresión del receptor.

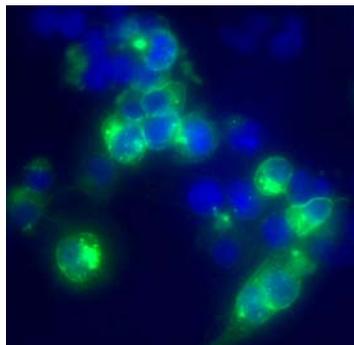


Figura V.27.- Tinción con DAPI de células Neuro-2A transfectadas con la construcción pRAGE Δ 9-GFP.

Además, hemos confirmado la distribución subcelular del receptor de AGEs, forma completa y carente del exón 9, fusionadas a GFP mediante *Western-blot*. Se ha partido de clones transfectados con las construcciones pRAGE Δ 9-GFP y pRAGE-GFP y se ha aislado la fracción de membranas plasmáticas mediante centrifugación diferencial. Se ha analizado la presencia del receptor de AGEs fusionado a GFP en la fracción de membranas plasmáticas mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a GFP y frente al RAGE (Figura V.28).

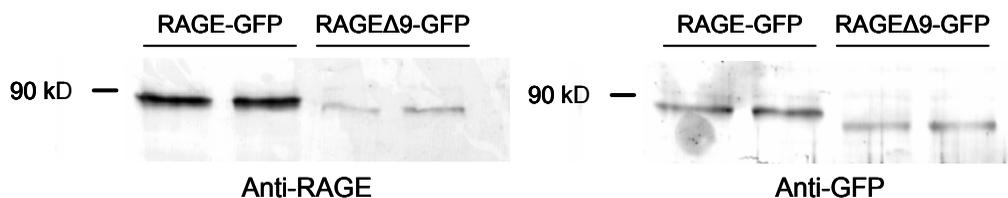


Figura V.28. Análisis mediante *Western-blot* de la expresión en membrana plasmática de las proteínas RAGE-GFP y RAGE Δ 9-GFP en células CHO-k1.

Por tanto, los resultados de microscopía confocal y *Western-blot* indican que el receptor de AGEs de rata, tanto cuando el exón 9 se encuentra presente como cuando este exón se ha eliminado por *splicing* alternativo, tiene un patrón de localización subcelular idéntico.

Los resultados de *Western-blot*, obtenidos a partir de membranas plasmáticas de clones aislados, parecen indicar que el nivel de expresión de la isoforma RAGE Δ 9 es menor. Para comprobar si es cierto que la isoforma carente del exón 9 presenta una menor expresión en la membrana plasmática y descartar que las diferencias de intensidad de las bandas del *Western-blot* se debiesen a que los clones comparados no presentasen el mismo porcentaje de células transfectadas (aunque se trata de clones aislados), se ha cuantificado la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de células transfectadas con cada una de las isoformas del receptor (Figura V.29). La intensidad de fluorescencia total es igual en las dos isoformas, sin embargo la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática es significativamente mayor en la isoforma completa del receptor.

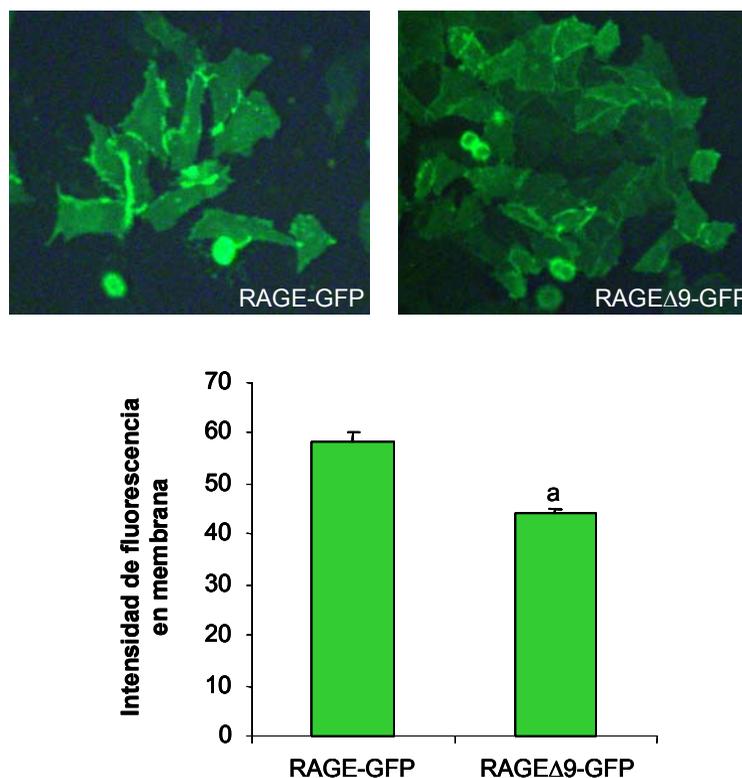


Figura V.29. Expresión en la membrana plasmática de las isoformas RAGE-GFP y RAGEΔ9-GFP. **A-** Microscopía de fluorescencia de células CHO-k1 transfectadas con la construcción pRAGE-GFP y pRAGEΔ9-GFP. **B-** Medida de la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática de las células. Los resultados se expresan como media ± SEM. a: $p < 0,01$ con respecto a las células transfectadas con pRAGE-GFP. (n=10).

Aunque la ausencia del exón 9 origine una menor expresión en la membrana plasmática, la isoforma mantiene una localización subcelular predominante en la membrana plasmática y por tanto nos planteamos si se trataba de una isoforma funcional capaz de unir ligandos y desencadenar respuestas intracelulares. Por ello, en primer lugar nos planteamos estudiar su capacidad para unir ligandos. Así, células CHO-k1 y Neuro-2A transfectadas con pRAGEΔ9-GFP se incubaron con

AGEs-BSA marcados con rodamina o AGEs-BSA marcados con texas-red y se analizaron mediante microscopía confocal (Figura V.30).

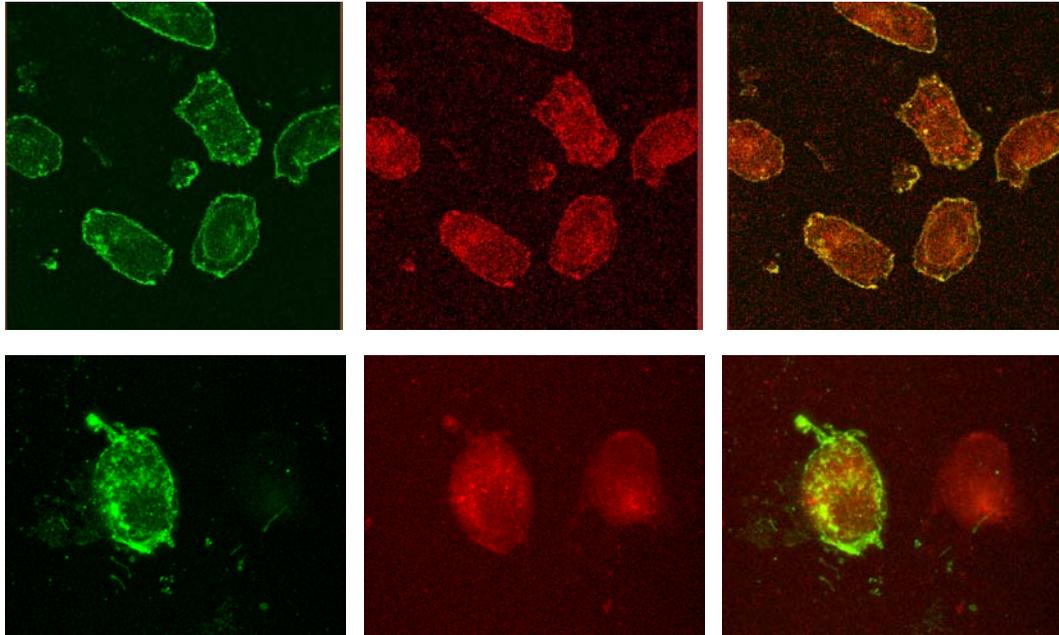


Figura V.30.- Unión de AGEs-Rodamina a células CHO-k1 transfectadas con el plásmido *pRAGE Δ 9-GFP* (A) y de AGEs-Texas-Red a células Neuro-2A transfectadas con la construcción *pRAGE Δ 9-GFP* (B). 1: Emisión para GFP. 2: Emisión para Rodamina o Texas-red. 3: Imagen conjunta para GFP y para Rodamina o Texas red.

Como se observa en la figura V.30, la isoforma RAGE Δ 9 conserva también la capacidad de unir ligandos. Así mismo, la colocación de fluorescencia verde y roja en la membrana plasmática y en el interior celular parece indicar que esta isoforma no sólo une ligandos sino que es capaz de promover la internalización del complejo receptor-ligando al interior de la célula. Como se mostrará más adelante en

este apartado, resultados obtenidos en presencia o ausencia de dansyl-cadaverina apoyan la idea de un proceso de internalización del receptor carente del exón 9.

En vista de los resultados obtenidos, nos planteamos como una segunda hipótesis que esta isoforma podría tener una función similar a la isoforma soluble descrita para el RAGE humano (sRAGE) (Yonekura *et al.*, 2003). Esta isoforma carece del dominio transmembrana y citosólico del receptor, por lo que une ligandos pero no desencadena señales intracelulares, bloqueando las respuestas intracelulares debidas al receptor por “secuestro” de sus ligandos. En nuestro caso, el receptor conservaría la localización en la membrana plasmática pero carecería de la capacidad de estimular rutas de transducción de señales como las de las MAP kinasas.

Para comprobarlo, se ha cuantificado por *Western-blot* la fosforilación de ERKs en respuesta a la adición AGEs, en células Neuro-2A transfectadas con la construcción pRAGE Δ 9-GFP. Como se observa en la figura V.31, la unión de AGEs aumenta la fosforilación de ERK 1/2 mediada por la proteína RAGE Δ 9-GFP y por tanto daría lugar a una activación celular.

Además hemos ensayado si la generación de respuestas intracelulares requiere también la internalización de la proteína RAGE Δ 9-GFP, para ello, se ha determinado la fosforilación de ERKs en respuesta a AGEs en presencia de dansyl-cadaverina (Figura V.31). La preincubación con dansyl-cadaverina bloquea la fosforilación de ERKs mediada por la interacción AGEs-RAGE Δ 9, por tanto parece mostrar que en esta isoforma, el proceso de internalización también es relevante en el desencadenamiento de respuestas intracelulares.

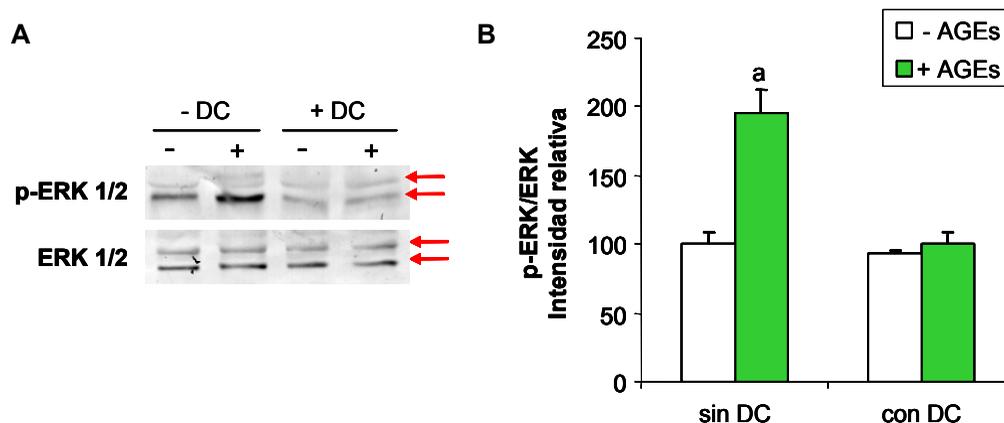


Figura V.31.- Fosforilación de ERKs mediada por RAGE Δ 9-GFP. A- Western-blot con anticuerpos frente a ERK 1/2 y frente a fosfo-ERK 1/2 de células Neuro 2A incubadas con (+) o sin AGEs (-). DC: dansyl-cadaverina. **B-** Intensidad relativa de las bandas del Western-blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,03$ con respecto a las mismas células sin AGEs o las mismas células con AGEs y con dansyl-cadaverina (n=4).

Además, hemos determinado la activación de NF- κ B en extractos nucleares de células Neuro-2A transfectadas con la construcción pRAGE Δ 9-GFP, en respuesta a la adición de AGEs al medio de cultivo. La activación de NF- κ B en estas células se ha comparado con la activación en células sin transfectar y células transfectadas con la construcción RAGE-GFP (Figura V.32).

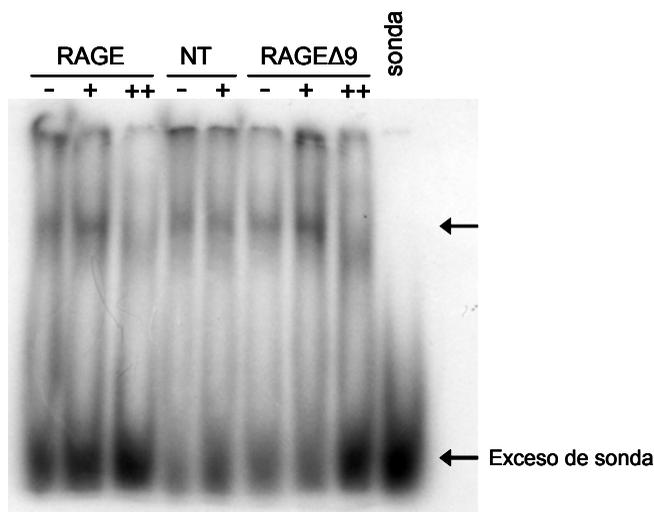


Figura V.32.- Activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por la isoforma $\text{RAGE}\Delta 9$. Extractos nucleares obtenidos de células Neuro-2A con (+) o sin AGEs (-) se incubaron con la secuencia de reconocimiento del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$ marcada radioactivamente. (++): con AGEs y con un exceso de sonda sin marcar. La flecha indica la posición de la sonda retardada por su unión a $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Así, los resultados del EMSA y de la fosforilación de ERKs indican que la isoforma del receptor de AGEs de rata que carece del exón 9 es capaz de producir activación celular.

Por tanto, nuestros resultados acerca de la funcionalidad de la isoforma carente del exón 9 del receptor de AGEs de rata parecen indicar que es una isoforma funcional, capaz de unir ligandos y desencadenar respuestas intracelulares tras la internalización del complejo ligando-receptor y que sólo se diferencia de la forma completa del RAGE en que se expresa menos la membrana plasmática celular. Puesto que nuestras construcciones se expresan todas ellas desde un promotor fuerte, esta menor expresión en la membrana se debería a una regulación post-traduccional de la expresión en la que estuviese implicado el exón 9.

V.5.- GENERACIÓN DE ISOFORMAS DEL RAGE DE RATA MEDIANTE EL USO DE INICIOS ALTERNATIVOS DE LA TRANSCRIPCIÓN. RELEVANCIA DE LA ISFORMA GENERADA

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, hemos descrito la posibilidad de uso de dos diferentes inicios de la transcripción del gen del RAGE mediante técnicas de extensión de cebadores.

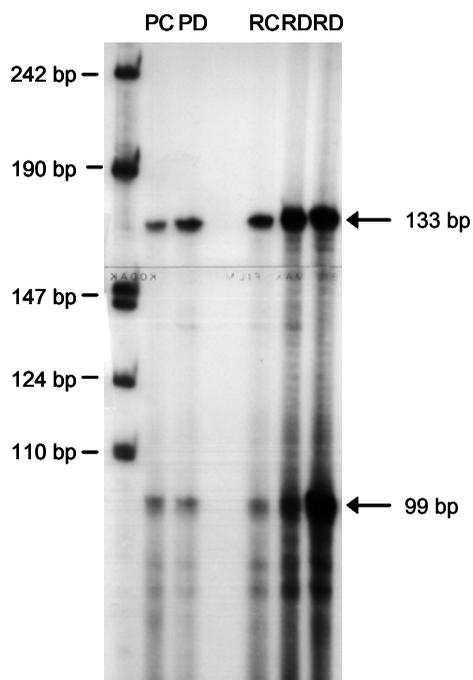


Figura V.33.- Extensión de cebadores del extremo 5' del mRNA del RAGE. RNA total aislado de pulmón y riñón de rata se retrotranscribieron con el oligonucleótido RAGE-11 marcado con radioactividad. Los productos extendidos se analizaron mediante eletroforesis desnaturalizante. PC: Pulmón control; PD: Pulmón diabético; RC: Riñón control; RD: Riñón diabético. Las flechas indican las bandas detectadas.

Estos resultados iniciales indicaban la posibilidad de que el uso del segundo inicio de la transcripción diese lugar a un transcrito que codificase para una proteína

más pequeña que, manteniendo la misma pauta de lectura, careciese de la señal de exportación al retículo endoplásmico.

Los resultados mostrados en la figura V.33 confirman resultados preliminares anteriores al inicio de esta Tesis Doctoral (Caballero, 2004). Puesto que la técnica de extensión de cebadores origina en algunas ocasiones artefactos que conducen a la suposición de la existencia de más inicios de la transcripción de los reales, en primer lugar decidimos confirmar el uso de los dos supuestos inicios de la transcripción para el RAGE de rata. Para ello, hemos utilizado una técnica alternativa que complementa los resultados obtenidos en la extensión de cebadores, la técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNA ends*).

Para realizar esta técnica, hemos aislado RNA total de pulmón, cerebro y riñón de rata que se ha retrotranscrito utilizando un oligonucleótido específico, RACE-1 que hibrida en el exón 3 del gen del RAGE de rata. A continuación, se ha adicionado una cola de poli A en el extremo 5' del cDNA sintetizado utilizando transferasa terminal y se han realizado reacciones de PCR para amplificar los productos obtenidos. En la primera reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido RACE-1 y un oligonucleótido dT-*NotI* complementario a la cola de poli A, y en la segunda reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido RACE-2 que hibrida en el exón 2 y el oligonucleótido *NotI*. Para la identificación de las secuencias específicas de DNA hemos utilizado la técnica de *Southern-blot* utilizando como sonda el oligonucleótido RAGE-NH₂ marcado con dUTP-digoxigenina. Un esquema de las posiciones relativas de los oligonucleótidos utilizados se indica en la figura V.34A.

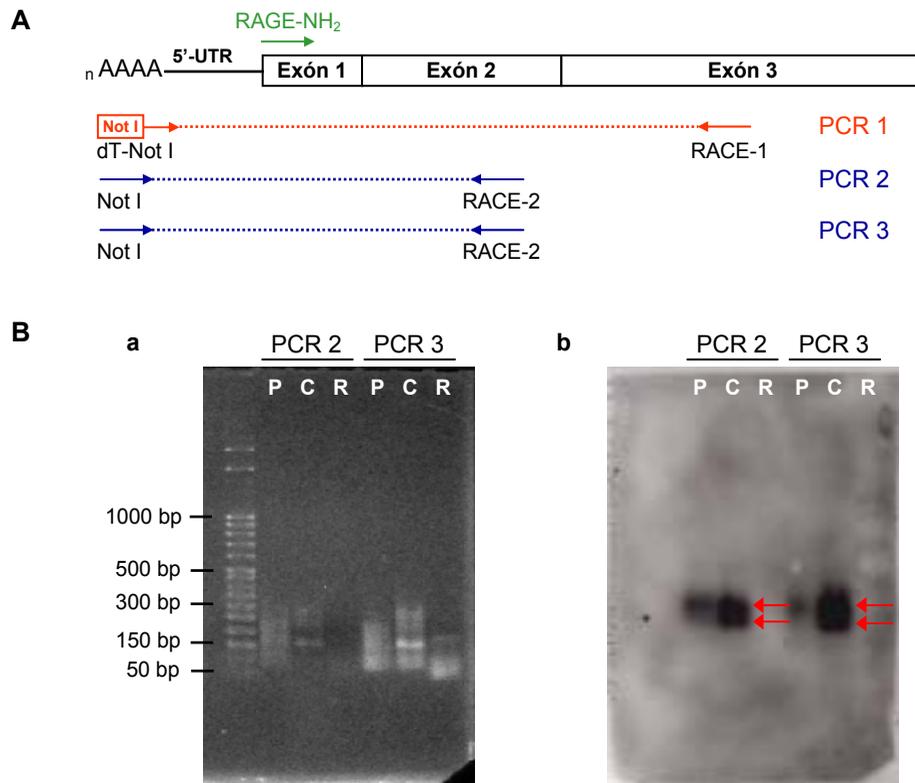


Figura V.34.- Amplificación por la técnica de RACE del extremo 5'-UTR del mRNA del RAGE de rata. **A-** Esquema de la hibridación de los oligonucleótidos utilizados. **B-** Southern-blot. a: Gel transferido. b: Película revelada con quimioluminiscencia. P: Pulmón, C: Cerebro, R: Riñón. Las flechas indican las bandas identificadas.

Como puede verse en la figura V.34B, en cerebro y en pulmón se detectan dos bandas cuyo tamaño coincide con el esperado según la secuencia deducida para los dos posibles transcritos del gen del RAGE. Para poder confirmar inequívocamente que se trata de los dos transcritos esperados, las dos bandas detectadas se han eluido del gel de agarosa, y se han clonado en el vector pST1-Blue para su secuenciación.

Tras secuenciar dos clones aislados correspondientes a cada banda, las secuencias obtenidas se han comparado con la secuencia del RAGE y se han mapeado los inicios de la transcripción. Nuestros resultados obtenidos mediante la técnica de RACE, en al menos dos tejidos diferentes confirman los resultados que se obtuvieron mediante extensión de cebadores y por tanto hemos dado por establecida la existencia de dos transcritos del gen del RAGE. Un esquema de las dos posiciones del inicio de la transcripción hallada mediante la técnica de RACE se muestra en la figura V.35.

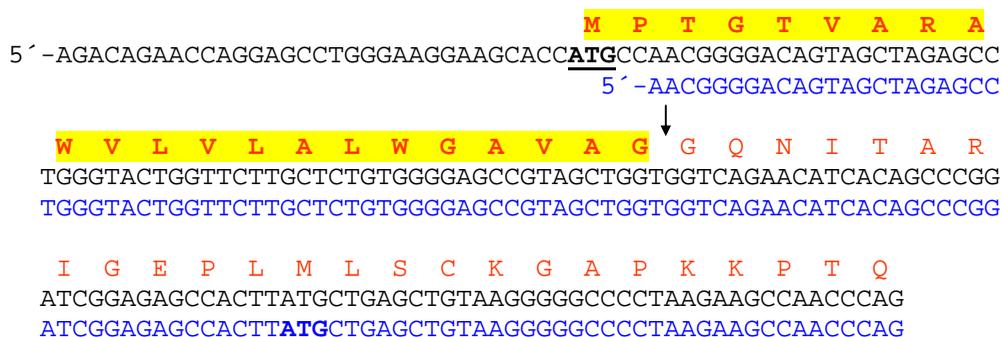


Figura V.35.- Secuencias correspondientes al extremo 5' del mRNA del RAGE de rata deducidas a partir de los distintos clones obtenidos. Negro: secuencia de la banda de mayor tamaño. Azul: secuencia de la banda de menor tamaño. Rojo: secuencia de aminoácidos. Los posibles codones de inicio de la traducción están en negrita y subrayados. La secuencia de exportación al retículo endoplásmico se muestra en amarillo. El punto de procesamiento de la misma se marca con una flecha.

Puesto que aunque ambos transcritos deben codificar prácticamente para la misma proteína madura procesada del RAGE, es probable que la localización subcelular de las proteínas codificadas por estos dos transcritos sea diferente al carecer uno de ellos de la señal de exportación al retículo endoplásmico.

Para confirmar la posible localización citosólica de la proteína codificada por el transcrito de menor tamaño hemos estudiado la distribución subcelular del receptor en distintos tejidos de rata. Se ha hecho un fraccionamiento subcelular a partir de pulmón y cerebro de rata y en las fracciones obtenidas se ha analizado la presencia del receptor mediante *Western-blot* utilizando los anticuerpos frente al receptor obtenidos en nuestro laboratorio (Apartado V.1.2.). Como puede verse en la figura V.36, en cerebro y en pulmón de rata existe una isoforma del receptor con localización citosólica.

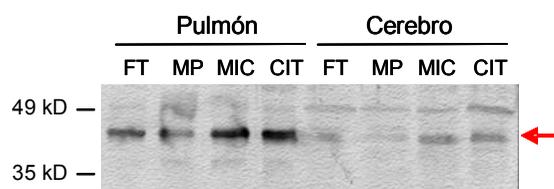


Figura V.36.- Distribución subcelular del RAGE. FT: Fracción Total. MP: Membrana plasmática. MIC: Microsomas. CIT: Citosol.

Hemos hecho una construcción que expresa en células eucariotas una proteína de fusión de la proteína codificada por el transcrito de menor tamaño (que a partir de ahora denominaremos RAGE intracelular) con la proteína fluorescente verde (GFP), similar a las construcciones que ya teníamos para la proteína codificada por el transcrito de mayor tamaño (RAGE-GFP). Estas construcciones nos permiten detectar de forma rápida diferencias de localización entre ambas proteínas.

Para la obtención de esta construcción se siguió un procedimiento similar al utilizado para la obtención de proteínas de fusión entre la GFP y las dos isoformas del RAGE que difieren en la presencia o ausencia del exón 9 (Figura V.37). Para que se utilizara sólo el segundo inicio de la transcripción propuesto, se diseñaron

oligonucleótidos que amplifican la región codificante del RAGE desde el nucleótido +7 hasta el codón final. El producto amplificado se corresponde con el transcrito generado al emplearse el segundo inicio de la transcripción y que incluye los sitios de restricción que permiten clonar en fase con el gen de la proteína verde fluorescente (RAGE-50 y COOH-Green). El producto de PCR obtenido con estos oligonucleótidos se clonó en el vector pST1-Blue y se subclonó entre los sitios de restricción *Bgl*III y *Sal*I del sitio múltiple de clonaje del vector pEGFP-N3.

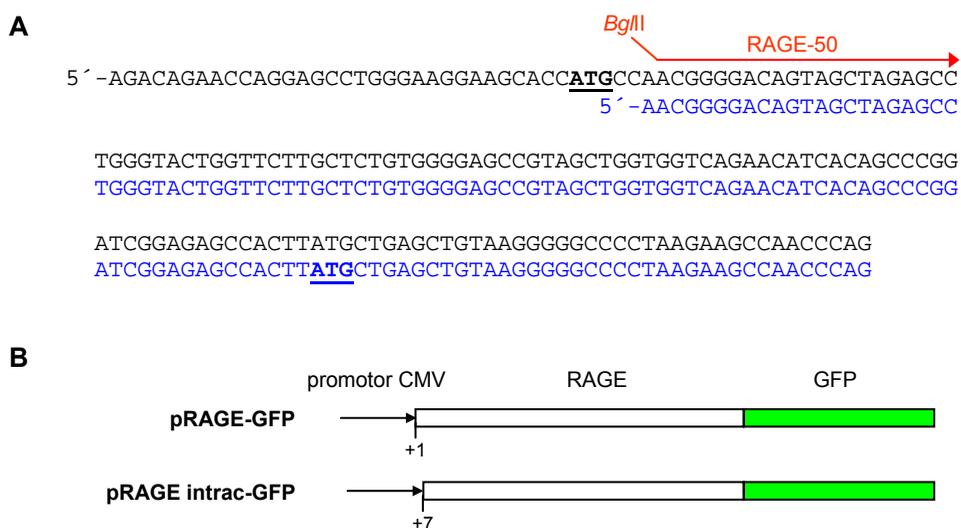


Figura V.37. *Proteína de fusión RAGE intracelular-GFP.* **A-** Localización de la posición de hibridación del oligonucleótido utilizado para hacer la construcción. **B-** Esquema de la construcción que codifica para la proteína de fusión entre el pRAGE intracelular y la GFP, comparada con la construcción que ya teníamos para el transcrito de mayor tamaño (pRAGE-GFP).

La localización subcelular de la proteína de fusión generada se ha estudiado por microscopía confocal de fluorescencia, para ello hemos transfectado células

Neuro-2A y CHO-k1 con esta construcción. Como control hemos utilizado células transfectadas con la construcción pRAGE-GFP, que se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática, y células transfectadas con el vector pEGFP-N3, que expresa exclusivamente la proteína fluorescente verde y que presenta una localización difusa en toda la célula aunque predomina en el núcleo.

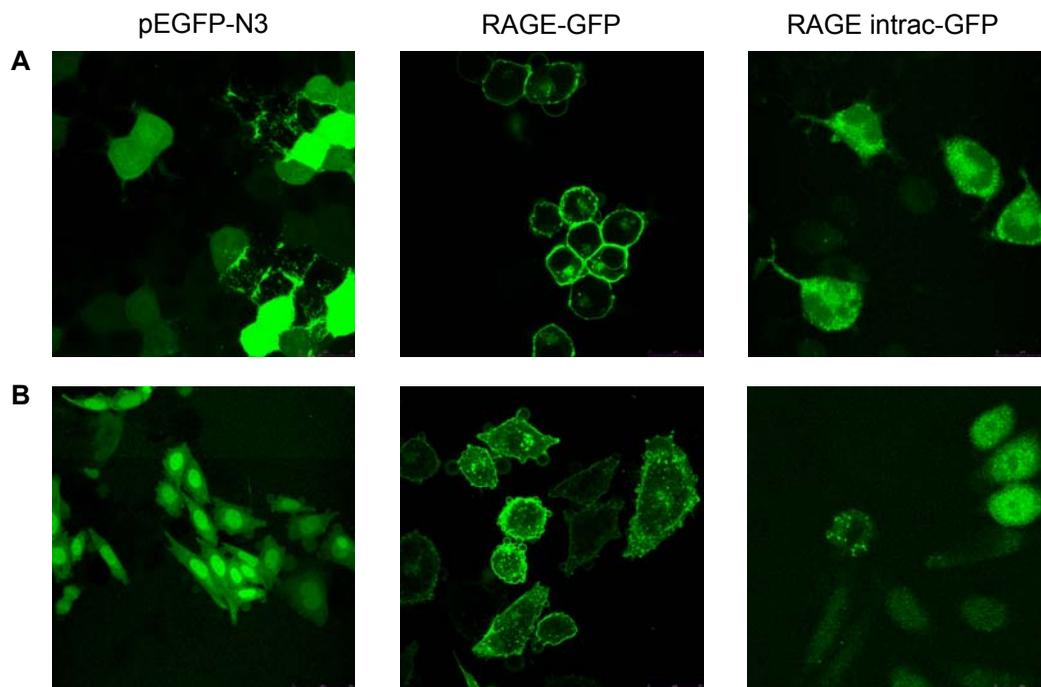


Figura V.38.- Localización subcelular del RAGE intracelular. **A-** Células Neuro-2A. **B-** Células CHO-k1.

Como puede observarse en la figura V.38 la proteína codificada por el transcrito de menor tamaño (RAGE intracelular) tiene una localización en el citosol, a diferencia de la isoforma que tiene la región codificante del RAGE completa incluyendo la señal de exportación, que se localiza principalmente en la membrana

plasmática. Como puede observarse, esta localización citosólica marca muy débilmente el núcleo celular y presenta acúmulos punteados distribuidos en todo el citoplasma.

Por tanto, estos resultados indican que en el caso del gen del RAGE de rata, existe un uso alternativo del inicio de la transcripción que da lugar a un segundo mRNA que codifica para una proteína que es eficientemente traducida y que se localiza en el citoplasma de la célula.

Una vez establecida la existencia de esta isoforma localizada en el citoplasma, estudiamos la capacidad de generar respuestas intracelulares. Para ello, se midió la fosforilación de ERKs en respuesta a la adición de BSA-AGE, en células Neuro-2A transfectadas con esta construcción.

En la figura V.39 se puede observar que en células transfectadas con la isoforma de localización intracelular, se produce una activación constitutiva de la cascada de señalización mediada por MAP-quinasas en ausencia del ligando natural del receptor, los AGEs. Por otra parte, la adición de AGEs en células sin transfectar produce un moderado incremento tanto en las células transfectadas como sin transfectar. El hecho de que la localización intracelular de esta isoforma sea suficiente para activar constitutivamente la ruta de MAP-quinasas es una prueba indirecta de que la internalización del receptor es necesaria para la generación de respuestas intracelulares.

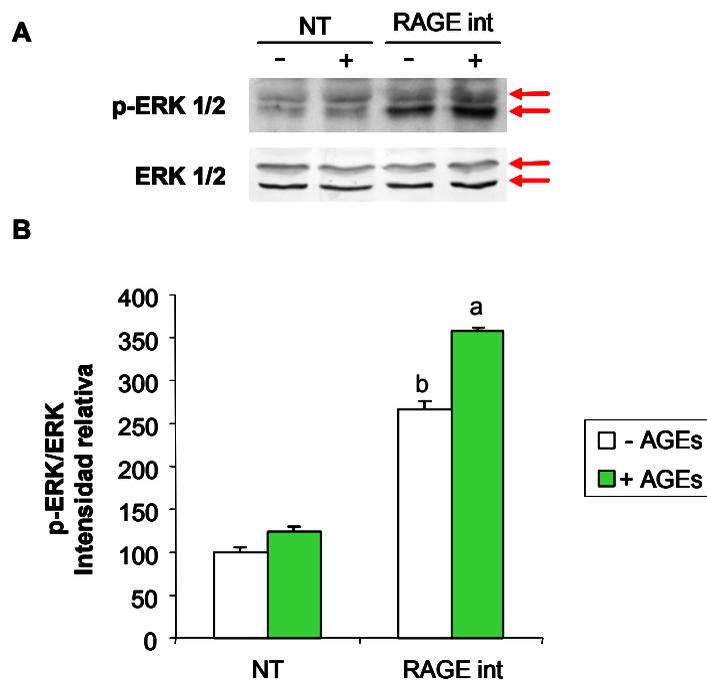


Figura V.39.- Fosforilación de ERKs mediada por RAGE intracelular-GFP. A- Western-blot con anticuerpos frente a ERK 1/2 y frente a fosfo-ERK 1/2 de células Neuro 2A incubadas con (+) o sin AGEs (-). NT: células no transfectadas; RAGE int: células transfectadas con la construcción pRAGE intracelular-GFP. **B-** Intensidad relativa de las bandas del Western-blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,02$ con respecto a las mismas células sin AGEs; b: $p < 0,01$ con respecto a las células sin transfectar (n=5).

Estos resultados parecen estar en concordancia con la unión directa de ERKs a la cola citosólica descrito por algunos autores (Isihara *et al.*, 2003), para lo que la internalización del receptor sería necesaria. Para confirmar la unión de ERKs a la cola citosólica, se han realizado experimentos de *pull-down* con la proteína recombinante MBP-Cito. La proteína MBP-Cito purificada mediante cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico se ha incubado con extractos de pulmón de rata,

posteriormente la mezcla se pasó por una columna de amilosa y las proteínas unidas se eluyeron con maltosa o con SDS, que se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a ERKs. Los resultados obtenidos indican que a nuestra proteína recombinante no se unen ERKs, sin embargo si aparece una banda, de aproximadamente 55-60 kD, que podría corresponderse con otra proteína de la cascada de señalización, y que actualmente estamos intentando identificar mediante técnicas de MALDI-TOF.

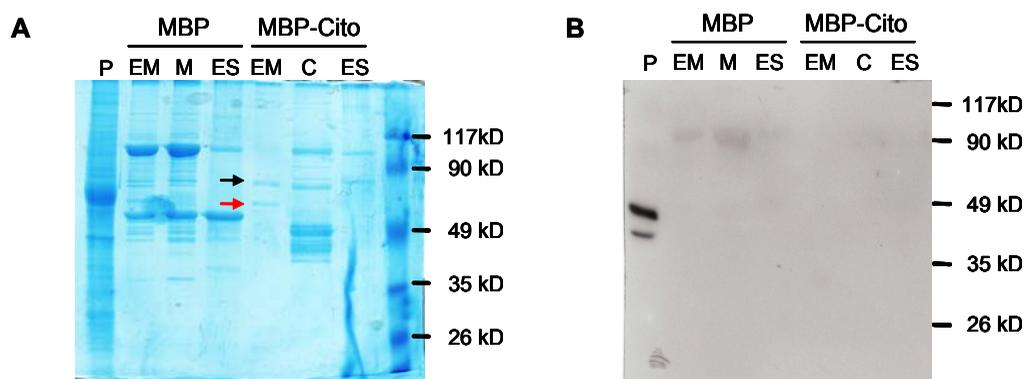


Figura V.40.- Unión de proteínas a la cola citosólica del RAGE. **A-** Tinción con azul comassie. P: extracto de pulmón. EM: fracción eluída con maltosa. ES: fracción eluída con SDS. M y C: Proteínas purificadas (MBP y MBP-Cito respectivamente). La flecha negra indica la proteína MBP-Cito y la flecha roja la posible proteína que se une a la cola citosólica. **B-** *Western-blot* con anticuerpos frente a ERKs.

V.6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE AGEs DE RATA

En esta Tesis Doctoral también hemos abordado el estudio de la regulación de la expresión génica del RAGE de rata. La sobre-expresión del receptor de AGEs es un mecanismo de amplificación de la respuesta al acúmulo de AGEs en el síndrome

diabético tardío y por tanto, hemos tratado de estudiar la respuesta de diferentes estímulos presentes en la diabetes sobre la expresión génica del receptor en rata: elevadas concentraciones de AGEs, hiperglicemia o estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

Uno de los mecanismos de control de la expresión que hemos estudiado es la regulación de la actividad promotora del gen de rata. Para ello hemos usado un sistema de genes reporteros basado en la luciferasa. El segundo mecanismo analizado ha sido la regulación mediada por el extremo 3' no traducido del mRNA del RAGE de rata. En este caso, como sistema reportero hemos seleccionado la GFP. Como se indica más adelante, los estudios de la región 3' no traducida se han extrapolado al gen humano (apartado V.7.2).

V.6.1.- Estudio de la actividad promotora del RAGE de rata

Hemos estudiado la regulación de la expresión del RAGE de rata mediada por su promotor. Para ello hemos utilizado un sistema de genes reporteros basado en la luciferasa. A partir de una genoteca genómica de rata, se obtuvieron fagos que contenían la secuencia completa del RAGE de rata. Estos clones fueron subclonados en pUC18 y se realizó un estudio preliminar de la actividad promotora a partir de la región proximal del promotor (1.4 kbases) (Caballero, 2004) en células NRK-52F. En esta Tesis Doctoral hemos retomado el estudio de la actividad promotora, aunque en este caso se ha optado por estudiar una región más extensa del promotor (2635 bases).

En primer lugar hemos clonado la secuencia del promotor del RAGE de rata. Para ello, a partir de la secuencia completa del gen de rata se ha clonado la región correspondiente al promotor en pBlueScript KS- (Stratagene) y posteriormente lo

hemos subclonado en el vector pGL3-basic, de forma que la región promotora del RAGE junto con la región 5' no traducida del gen controla la expresión de un gen de luciferasa de luciérnaga. Un esquema de la secuencia de la región clonada y de esta construcción se muestra en la figura V.41.

A

GGATCCGGAGACATGTTTTCTGGGGATGCCCGGGCTCAATGGAGATTCTACCCTGCTTCCCAGGTGAGAAGGCCACCTCTTTCTTCTTCT
 TTTTCATTGCTGCGTGCATGATGGGGAGGTGGGTATATGTGCGCGATGTCGCTGCACACATAGTATGTGACAGGGGGCATGTGGCAATGTC
 ACTGCACATGGCGATATGTGCGGTTCAGTTCCTCCATCTTTACGTGGTTCAGGGATCAAGCTCAGGTACACAGGCTTTACTTGCACAAAC
 ACCTTTATCCAGGAGCTGCACCAACTGGCCCCATCCCCGCCCCACCCCAACACACAAGGCCCTTCTAAGGCTTCTGTCTGTCATG
 CTTTTCTTTGCGCTGCAAGTGGAATCTCTCCGACTCGATGGGTCAGCGAGCTATGGGGATAACATCGGGGGAGGCCAGATATATA
 GTCCTCGAGAAATGCGGTGAGTGAAGGGCTTAGTGCTCCAGCTTTTGGCTTACCAGGGCAGGAGTGTCCCGCAGCCCCC
 CACCCCTACATTTGGAGTTCATCTGACTCTCATTCTTACCAGCCAAATGGTGCTGGCAGGAGGCTGTGACCCCGTCTCTCGTGA
 CATCCCCGACAGAGGGACCAGGAAGTGTCACTCTGACACTTCAACTGACCTTGCCCCCAAGGTACAGGTTGGGGCTCCCACCAG
 GCAACTCTTGGAGGACTCTGGGCACCTAGAGACTAACCCACAGAAAGCAGGCGGATTGGGGTTGTGCCCTCCCCAACTAG
 TTF-1
 ACACTCGGTGCTGGGGTGCTGACTACATGGCAGGAGAGTGGGTGCTCTCCGTTCTTTTCTCCCTCCACGAAAAACAGATACTTATT
 TCTCAGATATCTCTTAAATCTACAACGTAATGCAATGTGTTGGCTTGGCTCCCCACTTCTATTCCCCCCACTGTATATA
 TCTGAAATCTGAAGAGCTCAGCCCTGCCGACCCAGAGATGCCAAAAATGGGACTCTTGGACAGAGGCGCTGGGACGACCCCCCTCC
 CRE SRF
 CCATGCATCCCCACCTTCTGCCCTCCAGACGGCTTTATTACCTCATACGCAGCTCATCTTAAACCAATAGAATCGCTCGGTGGACAAGA
 GTGCTGACTCAGATATCTACCTCGGAGGACTTCTGCTACTTTAGAGAATTGTTGACCAGGTTTTGAAGTTGGACTTTTTTTTTTTTTT
 NF-KB
 TTAGAAAAGAAACCCTGAACTGTATTTTTTTTGTGTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTGTGGTAGTGGTGATTAATTTTTTAATAG
 TTTGAAGAAGTAGGGTTGGGGTGTTGTATGTTGTTGTGTTGTTGTTGTTTTAAAATAAACATGCTGATTATTTTTGTTTACCCTCGA
 GAAGTAAGCGCCAAAGGGCTAGTAAGAGAACAGACAGCGCTGGTGGCTATTGCTCCAGGCTACCAGTGGGGAGGTGATTGTTG
 CGGACACCCTGCTCAGCTGGACACTTAGTGTCTTCTAGCTTGTGACGAAATCCCTGCTGTATCTGATGTTGATCAGCATGCAG
 CTGTAGCTCCTGCTCCCCCACACCTCCCAAGTAACTTTGGCAAGGCTGGACTGAACTCAGTATTTTTGAAAAAGTCAAAAAGCT
 PPAR α /RXR
 TTCGGTTTTGTTTTAAAAGTTGTCAGAGTGGAAGATCGATCAGGAAGGGAGTCTTGCCAAATACGCTAAATACGGCTGGGTG
 NF1
 CTTCTACGTGCTCCGCCAGTTTCCAGAAATAAGTCTTTCTATTTCAGTCTTAATCTCATGCCAAATCAAGGGGTTGGGAGAGGA
 GGGAGGTGCATGAAAGCCAGGTATGAGGAAGATTAAAGTGTCTCATCTCAGCCCGGAACCTTCTATCTGACCTTCAGACATCCTCAG
 GATCTTCCAGACCTGTACAGTGGAAACCCTCCATCAGTGGCCAGCGGGCCTGGGAGTGTGAGAGGCGGTGGGAGGGTGCC
 SP1
 AGGGCAGTTTCTCTCCTCACTTGTAACTTGTAGATTCAAAAAAAGAAATGGCAGTTTTAAATAAAGAGATTTCTTTTCCCTGGG
 NF1
 TTTAGTTGAGATTTTTTTTCAAAAACAAAACAAAACAAAAAACCCATATCCCAAAGAATTATTACAAGGCTCCAAGTGCCTCAGG
 NF1
 CCAGTCCCCTACAAAGATTCACTCAGAAAGACAACAGACCAGGCTGACCATGTGCCTAATAACCCGCCAGGTCAAGATAGAGCAC
 NF-KB SRF
 TGGTGCAGCTGGTGGACTCATGACCTCGTGGCTGAAGAAATGAGATTTTTTATTGTTGTAAGAACTTACCCTAGGAGAGGTTGTG
 TCCGAAAGACTGCCAGTGTCTCAGGTGGGTGAGATTGCTTCTAGTACTGAAGGACTCTGTGCCAGAAGCACAAATTCCTGCCATTCT
 SREBP
 CTGATGGGACAAGATGCAAGTGGGGCAGGGTAGAGGGTGCAAGCCCCACCTAGGGCAGTAGCCACAGTAGGAGTGGGGCAGACAGAA
 CCAGGAGCTGGGAAGGAAGCACATG

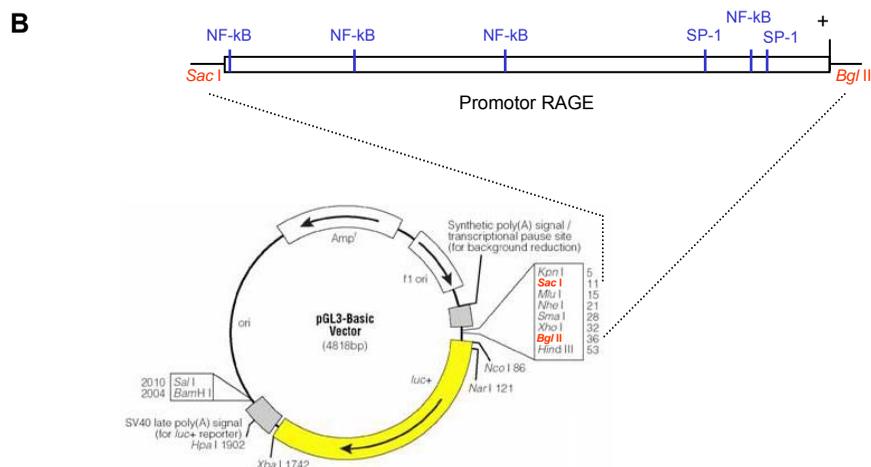


Figura V.41.- Construcción utilizada para el análisis de la actividad promotora del gen del receptor de productos avanzados de glicación de rata. **A-** Secuencia de la región promotora del receptor de productos avanzados de glicación de rata clonada. En azul se muestra la secuencia correspondiente al extremo 5' no traducido del gen. En rojo se indica el codón de inicio de la traducción. Subrayados se muestran posibles motivos de unión a factores de transcripción obtenidos a partir de una predicción realizada utilizando el programa Mathinspector. En amarillo se indican dos regiones de fuerte estructura secundaria. **B-** Esquema de la construcción.

En primer lugar hemos determinado los niveles de transcripción basales y en respuesta a la adición de productos avanzados de glicación de nuestra construcción en células Neuro-2A. Como control positivo hemos utilizado el plásmido pGL3-Control, que contiene el promotor de SV40 y como control negativo el plásmido pGL3-Basic, que carece de región promotora. Para normalizar la eficiencia de transfección se ha utilizado el vector pRL-TK, siguiendo el protocolo descrito en el apartado IV.4.1.12 de materiales y métodos.

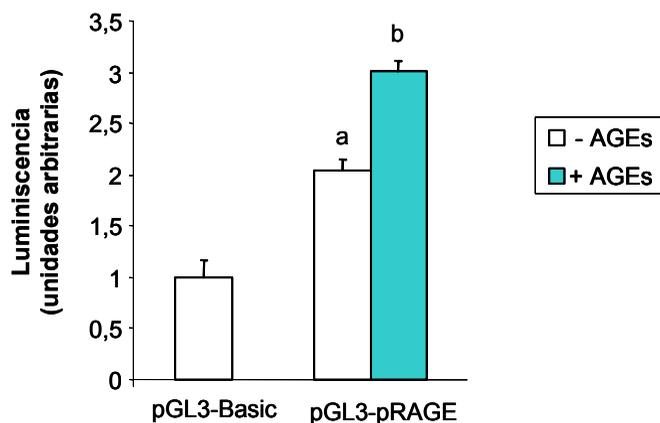


Figura V.42.- Niveles de expresión de luciferasa de los distintos plásmidos utilizados. El nivel de expresión del plásmido pGL3-Control es 40 veces superior al pGL3-Basic (datos no mostrados). Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ con respecto al pGL3-Basic; b: $p < 0,01$ con respecto a las mismas células sin AGEs ($n=5$).

Como se observa en la figura V.42 nuestra construcción tiene unos niveles de transcripción superiores al plásmido pGL3-basic, y además es funcional, ya que responde a la adición de productos avanzados de glicación. No obstante, en comparación con un promotor fuerte como el contenido en el vector pGL3-Control, los valores basales de transcripción son, aunque significativos, pequeños.

Hemos transfectado nuestra construcción en distintas líneas celulares que expresan RAGE de forma endógena, y hemos medido el nivel basal de transcripción que varía de unas líneas celulares a otras (figura V.43). Creemos que esto puede indicar que la regulación del receptor es distinta dependiendo del tipo celular y de la función que en ellas el RAGE ejerce en respuesta a los niveles de AGEs circulantes.

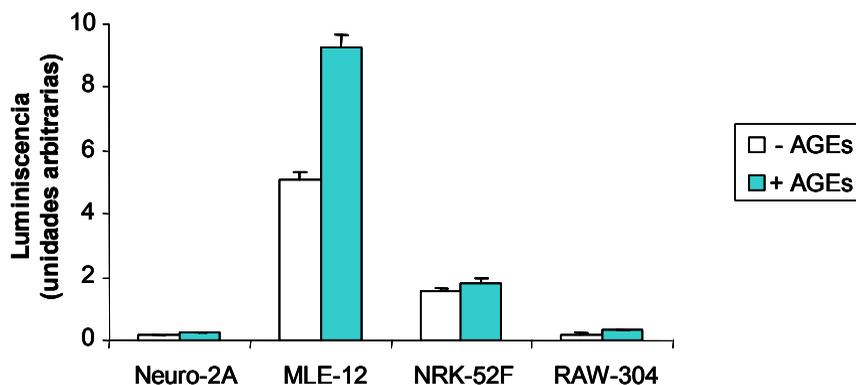


Figura V.43.- Niveles de transcripción del promotor del receptor de AGEs de rata en distintas líneas celulares. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=6).

A continuación hemos estudiado la regulación de la expresión del RAGE de rata mediada por su promotor en respuesta a distintos efectores: AGE-BSA (100 μ g/mL de medio de cultivo), insulina (100 nM), H₂O₂ (1 μ M), glucosa (50 mM), lipopolisacárido (5 μ g/mL de medio de cultivo) y tungstato sódico (100 μ M). Para estos experimentos se han utilizado las líneas celulares Neuro 2A y MLE-12.

Como puede observarse en la figura V.44, casi todas las moléculas ensayadas tienen un efecto positivo en la expresión de la luciferasa, y además el efecto parece ser tejido-específico, ya que los resultados difieren en las dos líneas celulares ensayadas. Como cabría esperar, los AGEs que son el ligando natural del receptor, producen un incremento significativo en la expresión del receptor en las dos líneas celulares. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno, un generador de radicales libres, sólo tiene un efecto significativo en células neuronales.

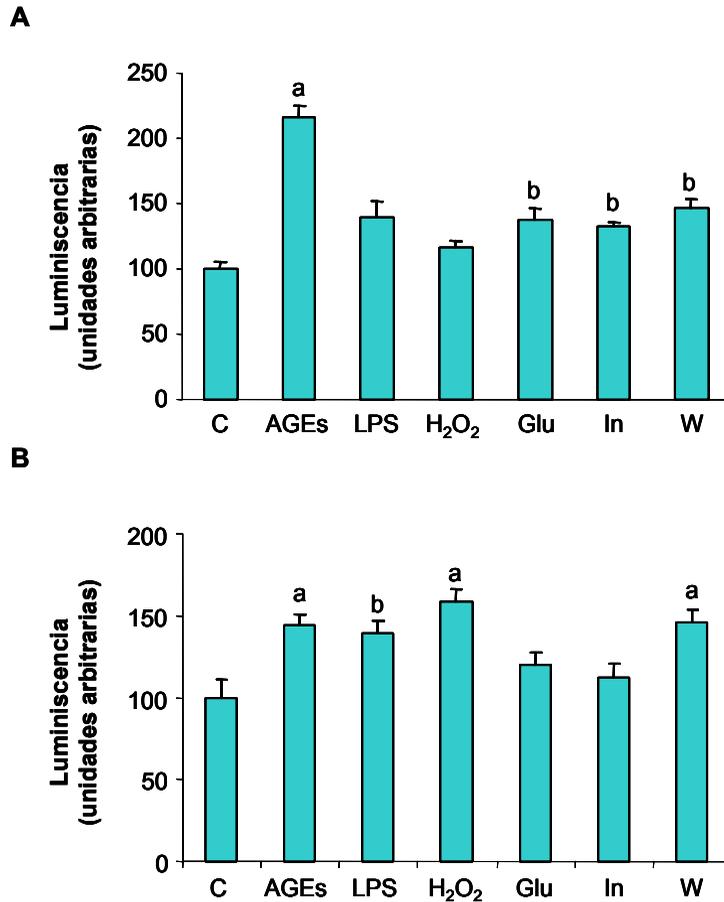


Figura V.44.- Niveles de expresión de luciferasa mediados por el promotor del RAGE de rata en respuesta a distintos efectores. Los resultados se han expresado como porcentaje de variación con respecto al control, al que se le ha dado un valor de 100. **A-** Células MLE-12. a: $p < 0,01$ y b: $p < 0,04$ con respecto al control. **B-** Células Neuro-2A. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,03$ y b: $p < 0,05$ con respecto al control ($n=5$).

Esta secuencia ARE tiene una fuerte influencia en la expresión del gen, ya que en células transfectadas con la construcción pGFP+ARE los niveles de GFP y de mRNA de la GFP son muy inferiores a los de la construcción pGFP Δ ARE (Figura V.46 A). Estos resultados parecen indicar que esta secuencia ARE tiene un efecto directo sobre la estabilidad del mRNA del receptor de AGEs, para confirmarlo se ha inhibido la síntesis de RNA con Actinomicina D. Células CHO-k1 transfectadas con las construcciones pGFP Δ ARE o pGFP+ARE se han incubado con Actinomicina D (1 μ g/ml de medio de cultivo) durante diferentes tiempos, y se ha determinado la cantidad de mRNA de GFP mediante *Northern-blot* en las diferentes muestras.

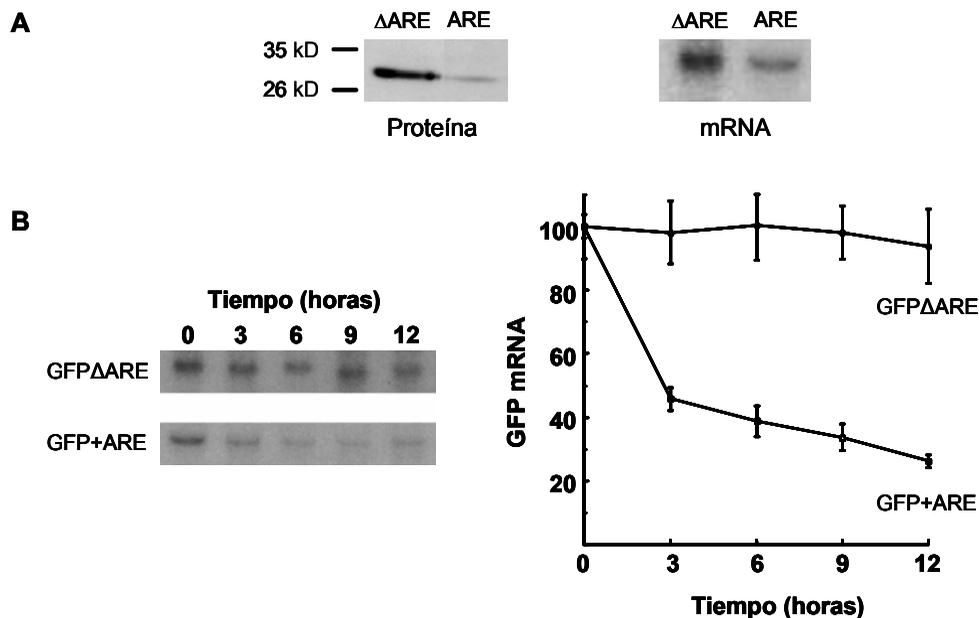


Figura V.46.- Influencia de la región 3' no traducida del gen del RAGE de rata en la expresión génica. **A-** Expresión de GFP determinado por *Western-blot* y de mRNA de la GFP determinado por *Northern-blot* en células CHO-k1 transfectadas con la construcción pGFP Δ ARE o pGFP+ARE. **B-** Estabilidad del mRNA de la GFP fusionada a la región 3' no traducida del RAGE. *Northern-blot* y cuantificación relativa de las bandas del *Northern-blot*. La cantidad de mRNA de GFP se ha normalizado con la cantidad de β -actina, detectada con una sonda específica.

Como se observa en la figura V.46 B, existen diferencias importantes en la vida media de los mRNA que contienen o no las secuencias ARE. La cantidad de mRNA de la construcción pGFP+ARE disminuye más de la mitad a las tres horas de incubación con actinomicina D y a las 12 horas prácticamente ha desaparecido. Por el contrario, la cantidad de mRNA de la construcción pGFP Δ ARE presenta variaciones muy pequeñas en este período de tiempo.

Hemos estudiado la influencia de diferentes moléculas efectoras en la regulación de la estabilidad del mRNA del receptor en cultivos celulares. Para ello, células NRK transfectadas con la construcción pGFP+ARE se incubaron durante 18 horas con las siguientes moléculas: AGE-BSA (100 μ g/mL de medio de cultivo), insulina (100 nM), H₂O₂ (1 μ M), glucosa (50 mM) y tungstato sódico (100 μ M) en medio de cultivo sin suero. El nivel de expresión de la GFP en cada una de las situaciones ensayadas se ha determinado por *Western-blot* utilizando un anticuerpo monoclonal frente a GFP (Figura V.47).

Los AGEs, los niveles elevados de glucosa y el peróxido de hidrógeno producen un aumento de la expresión de la GFP. Además el tungstato sódico, un antidiabético, también aumenta la expresión, efecto que posiblemente tenga lugar a través de la interacción con la secuencia ARE de la región 3' no traducida del gen del RAGE, ya que no se observan cambios en la expresión de GFP en células transfectadas la construcción pGFP Δ ARE (datos no mostrados).

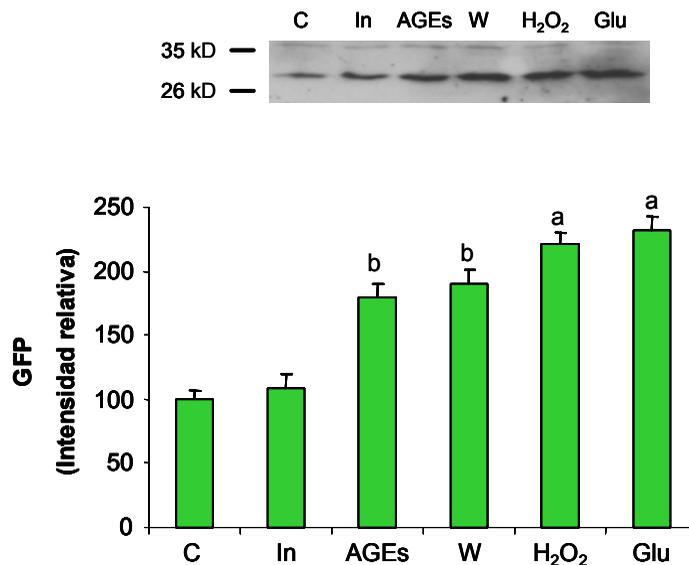


Figura V.47.- Influencia de diferentes compuestos en la regulación de la estabilidad del mRNA de la GFP. Se muestra un Western-blot y la cuantificación de las bandas del Western-blot. C: Control, In: Insulina, AGEs: AGE-BSA, W: Tungstato sódico, H₂O₂: peróxido de hidrógeno. Glu: Glucosa. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ y b: $p < 0,02$ con respecto al control (n=4).

Para confirmar estos resultados, hemos cuantificado la intensidad de fluorescencia de las células en cada una de estas condiciones mediante citometría de flujo. Para ello se han usado parámetros ya descritos para la cuantificación de la proteína fluorescente verde en células transfectadas (Lange *et al.*, 2006). En primer lugar utilizamos sólo células control, transfectadas con las construcciones pGFP Δ ARE o pGFP+ARE y sin ningún efector, para determinar si esta técnica nos permitía detectar diferencias entre las dos isoformas. El análisis se ha realizado únicamente con las células transfectadas, descartando las células no transfectadas.

Como se observa en la figura V.48 la construcción que contiene la secuencia ARE, presenta menor intensidad de fluorescencia, aunque las diferencias entre las

dos construcciones son inferiores a las observadas por *Northern-blot* o *Western-blot* (Figura V.46), esta técnica nos permite detectar variaciones de intensidad de fluorescencia entre las dos isoformas.

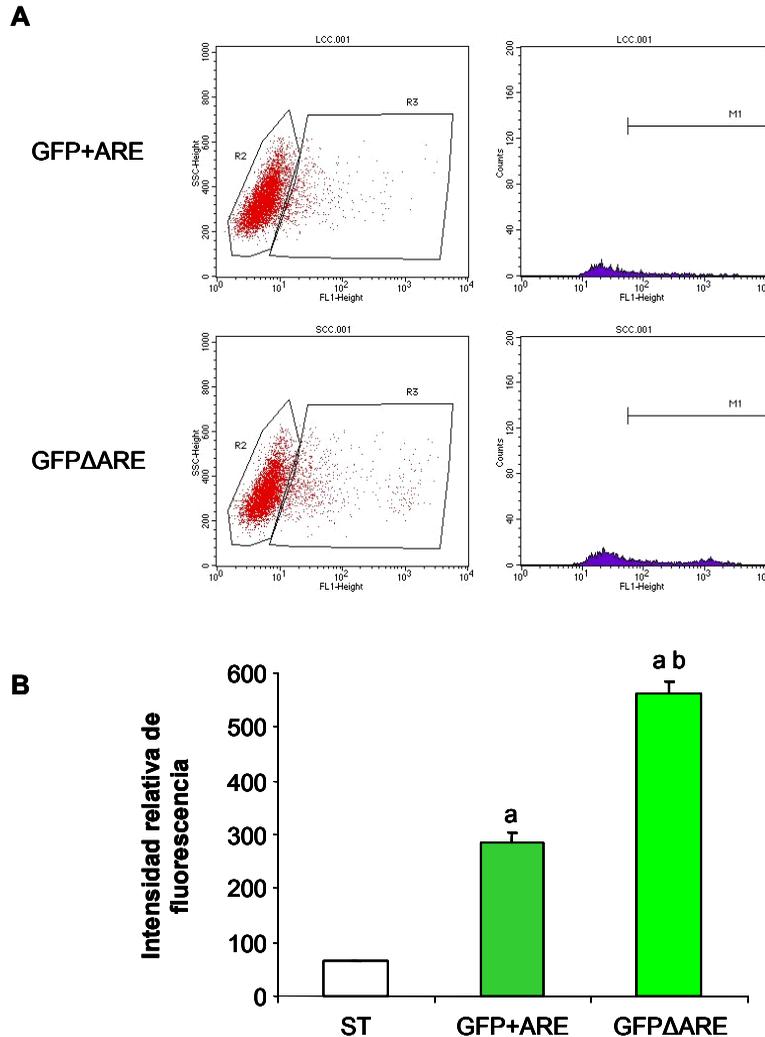


Figura V.48.- Análisis mediante citometría de flujo de las isoformas de la región 3' no traducida del RAGE de rata. **A-** Citograma e histograma obtenido en las dos isoformas, analizando únicamente la población positiva. **B-** Intensidad de fluorescencia de las dos isoformas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ con respecto a las células sin transfectar, b: $p < 0,01$ con respecto a la construcción pGFP+ARE (n=6).

A continuación, hemos medido la intensidad de fluorescencia de células transfectadas con la isoforma GFP+ARE tratadas durante 18 horas con los mismos efectores medidos por *Western-blot*.

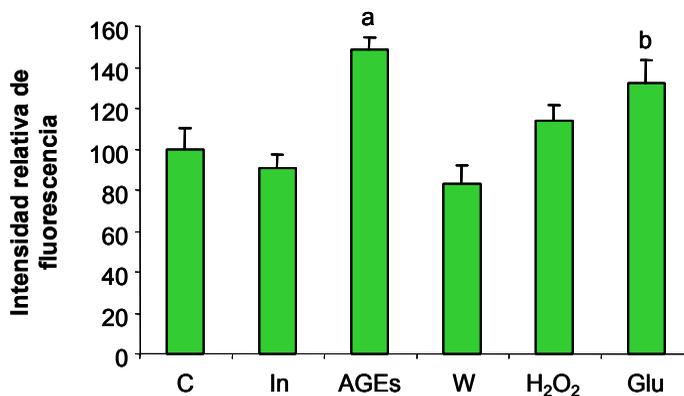


Figura V.49.- Análisis mediante citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia de la isoforma GFP+ARE en respuesta a distintos efectores. C: Control, In: Insulina, AGEs: AGE-BSA, W: Tungstato sódico, H₂O₂: peróxido de hidrógeno. Glu: Glucosa. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ y b: $p < 0,03$ con respecto a las células control (n=4).

Del análisis de citometría observamos unos resultados parecidos a los obtenidos en el *Western-blot*, aunque con alguna diferencia. Se aumenta la GFP (medida como intensidad de fluorescencia) de forma significativa en respuesta a la adición de AGEs y glucosa al medio de cultivo.

Puesto que el resultado más relevante es el incremento de la estabilidad del mRNA del receptor de AGEs de rata en presencia de elevadas concentraciones de AGEs, hemos querido confirmar estos resultados obtenidos mediante *Western-blot* y citometría de flujo realizando un *Northern-blot*. Hemos analizado el efecto de la

incubación con AGEs en la cantidad de mRNA de células transfectadas con los plásmidos pGFP Δ ARE o pGFP+ARE (Figura V.50).

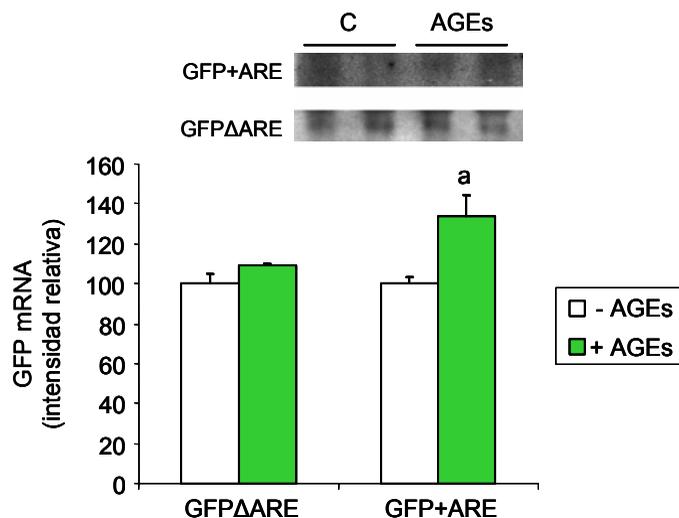


Figura V.50.- Efecto de los AGEs sobre la cantidad de mRNA del receptor de AGEs de rata. Células NRK-52F se han transfectado con las construcciones pGFP Δ ARE o pGFP+ARE y han sido incubadas en presencia o ausencia de AGEs. La cantidad de mRNA correspondiente a cada isoforma ha sido cuantificado mediante *Northern blot*. Se muestra la intensidad relativa de las bandas del *Northern-blot*. La cantidad de mRNA de GFP se ha normalizado con la intensidad de la banda 18 S del RNA. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,05$ con respecto al control (n=4).

Como puede observarse en la figura V.50, mientras que los AGEs no tienen ningún efecto sobre la estabilidad del mRNA transcrito a partir del plásmido pGFP Δ ARE, la adición de AGEs al medio de cultivo produce un incremento significativo de la cantidad de mRNA sintetizado a partir del plásmido pGFP+ARE. Este resultado resalta la importancia de esta secuencia ARE en el control de la expresión génica del RAGE de rata.

V.7.- NUEVAS VARIANTES DEL mRNA DEL RECEPTOR DE AGEs HUMANO

V.7.1.- Análisis de las isoformas generadas por *splicing* alternativo en la región codificante del mRNA del RAGE humano

En primer lugar hemos analizado si en el receptor de AGEs humano existe la isoforma generada por *splicing* alternativo que hemos descrito en rata. Para este experimento se partió de RNA total de dos líneas celulares humanas: ECV-304 y U-937, se diseñó una reacción de PCR con oligonucleótidos que nos permitieron amplificar la región del receptor comprendida entre los exones 6 y 10, de forma que se puede estudiar si existe una isoforma que carece del exón 9 análoga a la descrita para el receptor de rata. Los productos de PCR obtenidos se identificaron por *Southern-blot*.

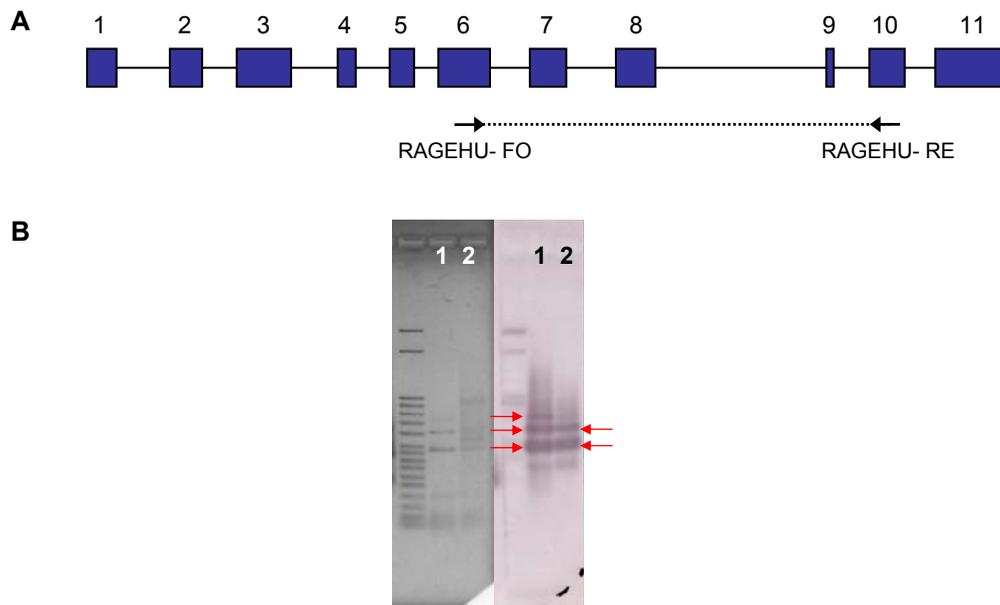


Figura V.51.- Análisis de la existencia de *splicings* alternativos en el gen del RAGE humano. **A**-Localización de los oligonucleótidos utilizados. **B**- Separación electroforética (izquierda) y Southern-blot (derecha) de las bandas amplificadas por PCR. 1: U-937. 2: ECV-304. Las flechas indican las bandas detectadas.

En la línea celular ECV-304 (células endoteliales) se detectan dos bandas: una de 480 bp correspondiente al RAGE completo y otra de 622 bp correspondiente a una isoforma del receptor anteriormente descrita, que contiene el intrón 6 y que origina una isoforma soluble del receptor. En la línea celular U-937 (monocitos), se detectan tres bandas, las dos detectadas en células endoteliales y otra banda de aproximadamente 750 bp que no se corresponde con ninguna isoforma anteriormente descrita. En ninguna de las dos líneas celulares utilizadas se detecta la isoforma del receptor que carece del exón 9 descrita en rata, ya que esta isoforma debería de dar una banda de 453 bp.

La banda de 750 bp detectada en U-937 fue eluída del gel de agarosa y clonada en el vector pST1-Blue (Novagen) para su secuenciación. La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia del gen del RAGE humano y comprobamos que esta banda detectada en U-937 se corresponde con una nueva isoforma soluble del receptor, que resulta del mantenimiento de la secuencia del intrón 6 entre los exones 6 y 7 y de la secuencia del intrón 9 entre los exones 9 y 10. La introducción de la secuencia del intrón 6 genera un codón de stop que hace que la proteína codificada pierda parte del dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citosólico del receptor.

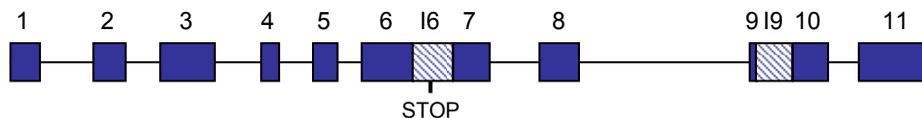


Figura V.52.- Esquema de la nueva isoforma del mRNA del RAGE humano.

Por tanto, nuestros resultados muestran que no existe la isoforma carente del exón 9 en humanos. El análisis de la región comprendida entre el exón 6 y 10 nos ha permitido detectar una nueva isoforma soluble que tiene un patrón de expresión

específico de líneas de monocitos y que no está presente en líneas celulares endoteliales.

V.7.2.- Influencia de la región 3'-no traducida del mRNA del RAGE humano en la regulación de la expresión génica

Como se ha indicado anteriormente, la región 3' no traducida del receptor de productos avanzados de glicación de rata tiene una gran relevancia en la estabilidad del mRNA y por tanto en el control de la expresión. Por ello, nos planteamos estudiar esta región en el receptor de productos avanzados de glicación humano.

En primer lugar hemos estudiado la secuencia correspondiente al extremo 3' del gen humano. Del análisis de la secuencia se deduce la posible existencia de varias señales de poliadenilación, así como secuencias ricas en timina que aunque no se corresponden con secuencias ARE consenso si pueden tener efecto en la estabilidad del mRNA del RAGE humano (Figura V.53).

```
TGAggggccacagacagatcccatccatcagctccctttctttttccctgaactgttctggcctcaga
ccaactctctcctgtataaatctctctcctgtataaccccaccttgccaagcttctcttacaaccagagcc
cccccaatgatgattaaacacctgacacatcttgctcttggtgtgtctgtgtgtgtatgagacacaacc
taccctataacccttgagggcctgaaggaaaggactcaccctataacttaccatactataccaaaca
tctactcaagttggggagaagatgcttctgtcgggggtggggcgaaacttggaagagatcccatcaatat
atcaccttttttattgaatttgtattaaaggaggtagtgagggggcggaagcacttaagagtcagaatc
catattagactctggggagtgaaaattaaattaaatcagtaagatggggagtgggggaagagtcagaggg
aactttgccacctttgaagatcaaatcaagaaatcagggaaagcaaagacttaggagaggagaaagacat
tctctcaatccatcctccttcccagggcagagaataaacaactgtactgagtgagcctctgagcagaag
gctctcccattatgacacagacttactcctcctcccaggccttctggacaatgtccagggtggcctt
agccaacagaaatagaggggtcaaggggtccaggagtacggaagggtcagcaggaccctcaatactgat
tcttctctggctggaggtgggcaggaagcagacatagctcaatactgagcagcaaaaaaagaagaagat
ggcgagaaacaggaagaggggaatcctgccagctggaggctgggtgaccctgtcccagatccacacctgtgg
gagagaggaaagctgtggaagcatatgctcctaggtctggagggggcctgaggggattcacagggtccct
gatgggagctgagtgactcttacctgtaccccggggaaaggctcatgggcattgaagacggtgg
```

Figura V.53.- Secuencia de la región 3' no traducida del mRNA del receptor de AGEs humano: En mayúsculas se muestra el codón de STOP de la traducción, en rojo y subrayado se muestran las posibles secuencias de poliadenilación detectadas. En amarillo se muestran secuencias ricas en timina.

humana ECV-304 se observa que esta región tiene una fuerte influencia en la expresión del gen ya que hay una importante disminución de la intensidad de fluorescencia, mientras que este efecto no se observa en la línea celular de hamster CHO-k1 (Figura V.55).

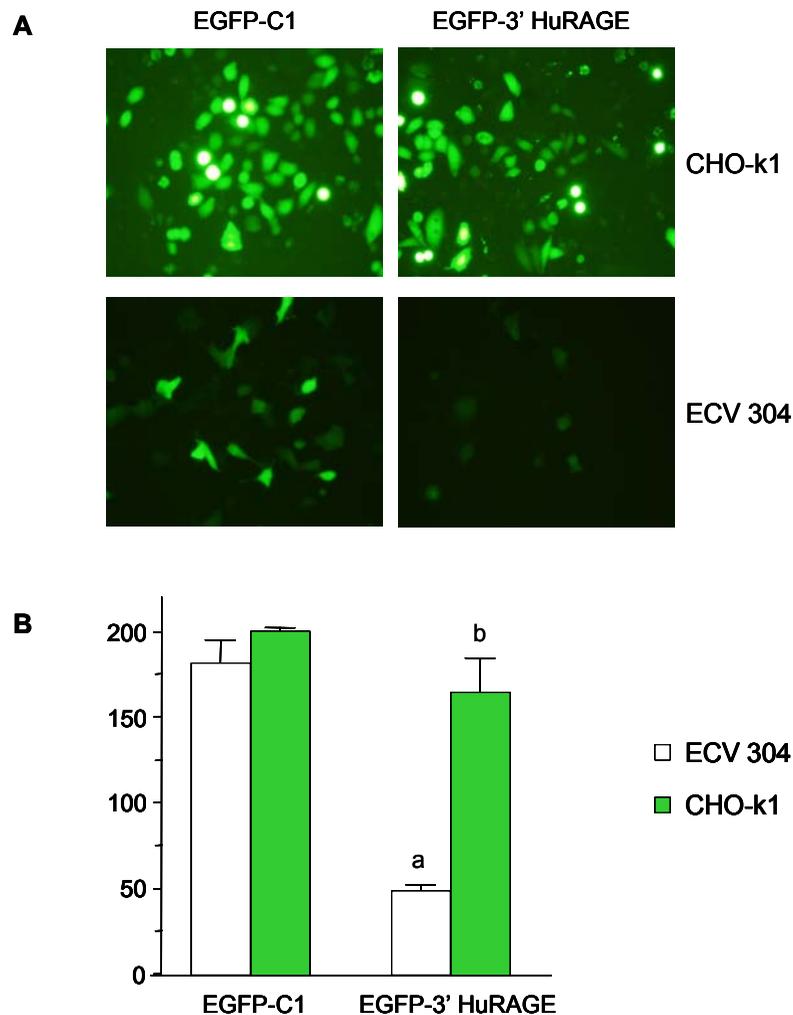


Figura V.55.- Influencia de la región 3'-UTR del RAGE humano en la expresión génica. **A-** Microscopía de fluorescencia de células CHO-k1 y ECV 304 transfectadas con el vector pEGFP-C1 y pEGFP-3'HuRAGE. **B-** Intensidad de fluorescencia de las células. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,001$ con respecto a las mismas células transfectadas con el plásmido pEGFP-C1 y b: $p < 0,001$ con respecto a células ECV transfectadas con el plásmido pEGFP-3' HuRAGE (n=5).

Estos resultados parecen indicar que la región 3' no traducida del mRNA del receptor de productos avanzados de glicación en humanos, igual que la de rata, tiene un papel relevante en la regulación de la expresión génica. Este papel es dependiente de la secuencia presente en esta región y es especie específico, ya que sólo se pone de manifiesto en experimentos realizados con líneas celulares humanas.

El mecanismo por el que se produce este efecto en rata, es un uso diferencial de señales de poliadenilación de forma que la presencia de una secuencia ARE en uno de los transcritos generados tiene un fuerte efecto negativo sobre la expresión del gen (Caballero *et al.*, 2004). En el extremo 3' no traducido del mRNA del RAGE humano también existen varias señales de poliadenilación consenso (Figura V.53), por ello nos planteamos estudiar si en el receptor humano existía el mismo mecanismo de regulación que en rata.

En primer lugar hemos estudiado si estas señales de poliadenilación son funcionales y para ello hemos utilizado la técnica de RACE. Hemos partido de RNA total de células CHO-k1 y ECV-304 transfectadas con la construcción pEGFP-3' HuRAGE. El RNA se ha retrotranscrito utilizando un oligonucleótido dT y se han realizado dos reacciones de PCR anidadas para amplificar los productos obtenidos. Para la primera reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido dT y el oligonucleótido GFP-C que hibrida en el extremo carboxilo de la proteína verde fluorescente, de esta forma sólo se amplifican los transcritos codificados por la construcción pEGFP-3' HuRAGE. Para la segunda reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido RAGEHU-FF, que hibrida al principio de la región 3' no traducida del RAGE humano (en el codón de STOP) y el oligonucleótido Not I.

En la figura V.56 se muestran los productos de PCR obtenidos. En las dos líneas celulares estudiadas se amplifican varias bandas. Para identificar las

secuencias específicas hemos utilizado la técnica de *Southern-blot*, utilizando como sonda un fragmento de DNA del RAGE correspondiente al extremo 3' no traducido marcado con digoxigenina-dUTP. Como puede observarse, mediante *Southern-blot* sólo se detecta una banda, que se ha aislado y clonado en el vector pST1-Blue para su secuenciación. El análisis de la secuencia nos indica que sólo es funcional la primera señal de poliadenilación.

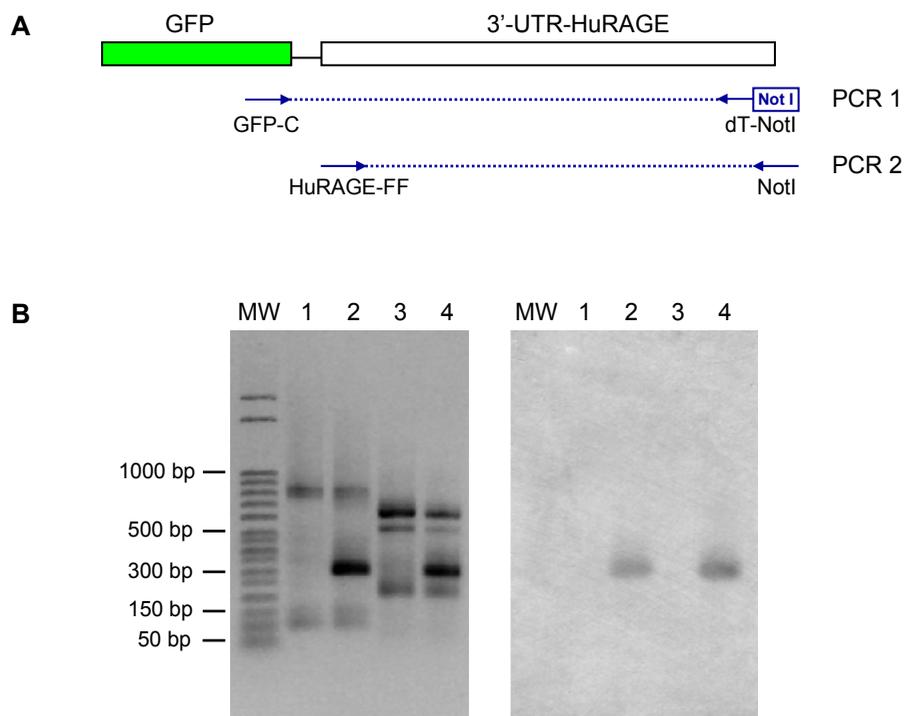


Figura V.56.- Análisis mediante 3' RACE del uso de señales de poliadenilación en el extremo 3' del mRNA del receptor de AGEs humano. **A-** Esquema de la posición de hibridación de los oligonucleótidos utilizados. **B-** *Southern-blot*. Gel transferido (izquierda). Película (derecha). 1: ECV-304, 2: ECV-304 transfectadas con pEGFP-3'HuRAGE, 3: CHO-k1, 4: CHO-k1 transfectadas con pEGFP-3'HuRAGE.

Aunque no exista un uso diferencial de señales de poliadenilación como ocurre en el gen del RAGE de rata, en esta región deben existir secuencias que de alguna manera regulen la expresión del RAGE, ya que en células transfectadas con la construcción pEGFP-3' HuRAGE hay una importante disminución de la intensidad de fluorescencia en comparación con células transfectadas con el vector pEGFP-C1.

Hemos analizado la secuencia de esta región con el fin de identificar la región responsable del efecto. Así, hemos identificado dos regiones ricas en timina y citosina que pueden condicionar la estabilidad del mRNA (Figura V.57).

```
TGAGGGGCCACAGACAGATCCCATCCATCAGCTCCCTTTTCTTTTCCCTTGAACTGTT
CTGGCCTCAGACCAACTCTCTCCTGTATAATCTCTCCTGTATATAACCCACCTTGCCAA
GCTTTCTTCTACAACCAGAGCCCCCACAATGATGATTAAACACCTGACACATCTTGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura V.57.- Secuencia de la región 3' no traducida del mRNA del receptor de AGEs humano: En negrita se muestra el codón de STOP de la traducción, subrayado se muestra la señal de poliadenilación y en rojo se muestran las secuencias que pueden intervenir en la regulación de la expresión

Para estudiar la influencia de las dos regiones identificadas sobre la expresión, se han hecho construcciones similares a pEGFP-3' HuRAGE pero en las que se han deleccionado estas regiones y se han transfectado en células ECV-304. Como control hemos utilizado células transfectadas con la construcción pEGFP-3' HuRAGE.

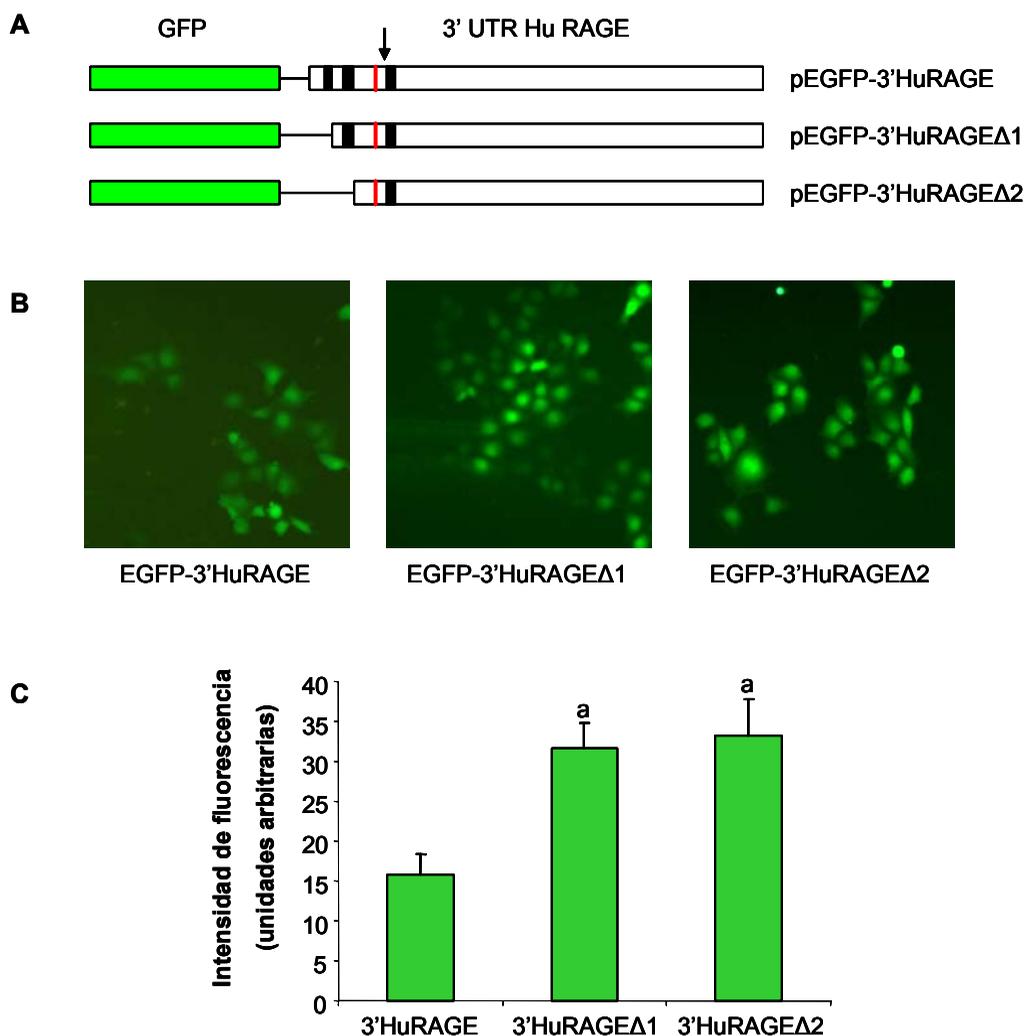


Figura V.58.- **A-** Esquema de las construcciones utilizadas del extremo 3'UTR del RAGE humano: En verde se muestra la región codificante de la proteína fluorescente verde, en blanco la región 3' no traducida del RAGE humano, en rojo la señal de poliadenilación y en negro las posibles secuencias responsables. La flecha indica la posición de la cola de poli A. **B-** Microscopía de fluorescencia de células ECV 304 transfectadas con las distintas construcciones. **C-** Medida de la intensidad de fluorescencia de las células. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,01$ con respecto a las células transfectadas con el plásmido pEGFP-3' HuRAGE (n=5).

Como se observa en la figura V.58, la delección de las regiones identificadas produce una recuperación de la intensidad de fluorescencia alcanzando niveles muy similares a los del vector pEGFP-C1. Por tanto, el efecto de la región 3' no traducida sobre la expresión del RAGE, es dependiente de la secuencia presente en esta región. Probablemente la secuencia responsable de este efecto es CCCTTTTCTTTTTCCCT ya que sólo con la primera delección es suficiente para recuperar una intensidad de fluorescencia similar a la de las células transfectadas con el plásmido control pEGFP-C1.

Al igual que en la región 3' no traducida de rata, hemos estudiado la influencia de diferentes moléculas en la estabilidad del mRNA del receptor en cultivos celulares. Para ello, células transfectadas con la construcción pEGFP-3' HuRAGE se han incubado durante 18 horas con AGE-BSA, insulina, tungstato sódico, glucosa y H₂O₂. A partir de estos cultivos se ha obtenido RNA total y la cantidad de mRNA de la GFP en cada una de las condiciones estudiadas se ha cuantificado por *Northern-blot*, utilizando como sonda el cDNA de la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde marcado con ³²P.

Como se observa en la figura V.59 la adición de AGEs a estas células produce un aumento significativo de la expresión de la GFP, la adición de glucosa y peróxido de hidrógeno, también producen un aumento, pero éste no es significativo.

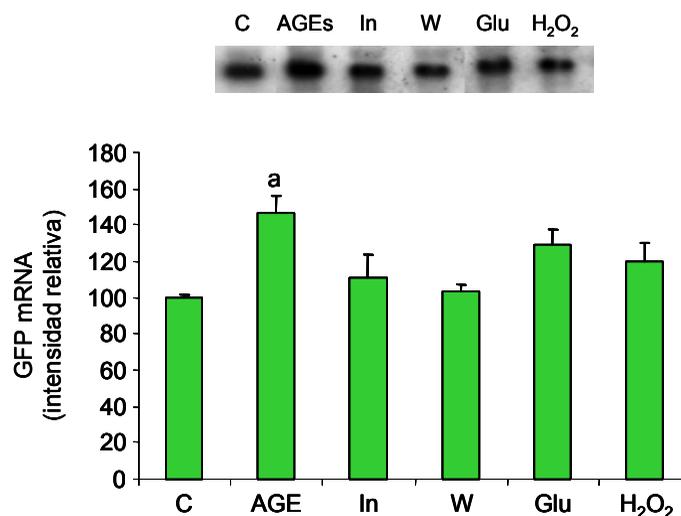


Figura V.59.- Influencia de diferentes compuestos en la regulación de la estabilidad del mRNA del receptor de AGEs humano. Cuantificación relativa de las bandas del Northern-blot. La cantidad de mRNA de GFP se ha normalizado con la intensidad de la banda 18 S del RNA. C: Control, AGEs: AGE-BSA, In: Insulina, W: Tungstato sódico, Glu: Glucosa, H₂O₂: peróxido de hidrógeno. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,05$ con respecto al control (n=4).

V.8.- PAPEL DEL RAGE EN LA MODULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN CÉLULAS MUSCULARES

La hiperglucemia crónica promueve la resistencia a insulina, pero los mecanismos moleculares por los que se produce este efecto no se conocen totalmente. Se ha descrito que los productos tempranos de glicación disminuyen la entrada de glucosa en la célula mediada por insulina (Miele *et al.*, 2003).

Nuestra hipótesis es que el RAGE podría estar implicado a través de la unión a productos avanzados de glicación, es decir a productos tardíos más que a productos tempranos. En tejido muscular de rata se expresa el receptor de AGEs. En

situaciones patológicas como la diabetes, el tejido muscular tiene un papel relevante en la hiperglucemia debido a una menor retirada de la glucosa circulante, y por tanto hemos realizado unos experimentos preliminares para determinar si los productos avanzados de glicación, al igual que los productos tempranos de glicación, inducen resistencia a insulina en células musculares.

En primer lugar, hemos analizado distintas albúminas glicadas, una con un alto contenido en productos avanzados de glicación y otra con sólo productos tempranos de glicación. La albúmina rica en productos tardíos se ha obtenido en nuestro laboratorio mediante incubación prolongada con glucosa-6P y la albúmina rica en productos tempranos es de origen comercial (Sigma). El grado de glicación avanzado presente en ambas albúminas se ha determinado mediante anticuerpos anti RNasa-AGEs obtenidos en nuestro laboratorio y que sólo reconocen los productos avanzados de glicación. Los resultados se muestran en la figura V.60.

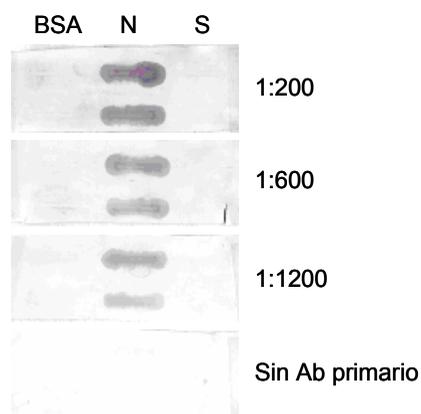


Figura V.60.- Caracterización de productos tempranos y tardíos de glicación. Se aplicaron 1µg/pocillo de cada una de las albúminas en una membrana de nitrocelulosa y se identificaron utilizando distintas diluciones de un anticuerpo frente a RNasa-AGEs. BSA: albúmina bovina, N: BSA-AGEs obtenidos en nuestro laboratorio, S: albúmina glicada comercial.

Una vez caracterizadas las distintas albuminas glicadas, hemos ensayado el efecto de la incubación con productos avanzados de glicación (BSA-AGEs obtenidos en nuestro laboratorio) en la entrada de glucosa inducida por insulina en la línea celular de músculo de rata L6.

La incubación con AGEs disminuye la entrada de glucosa en la célula inducida por la adición de insulina, sin embargo, el efecto más significativo es la disminución en el transporte basal de glucosa. Este efecto se ha confirmado en una la línea celular de adipocitos 3T3 (figura V.61).

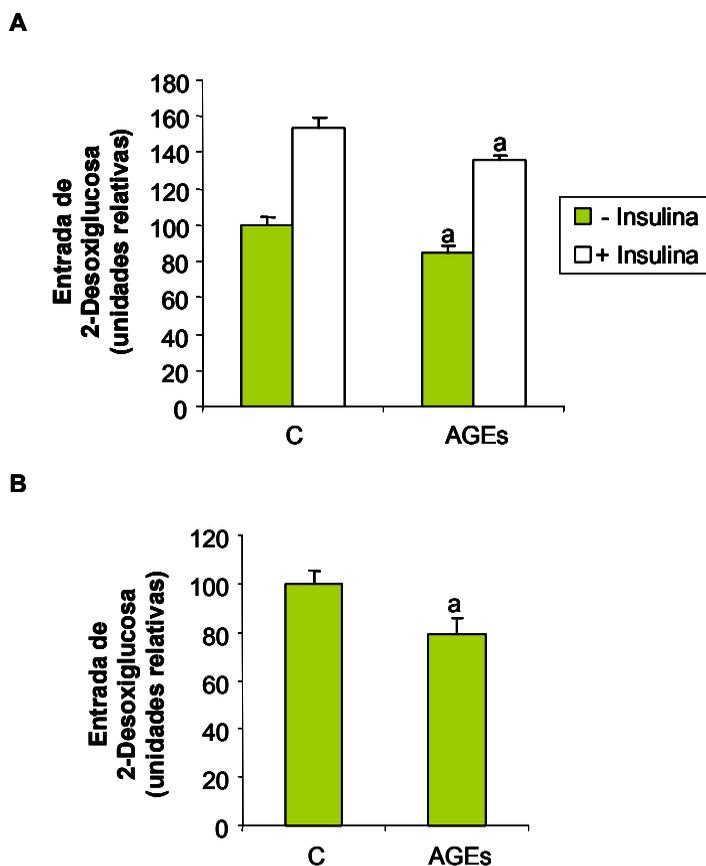


Figura V.61.- Efecto sobre la entrada de glucosa de los AGEs. A- Células L6. **B-** Células 3T3. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,05$ con respecto a las mismas células sin AGEs ($n=6$).

Es la primera vez que se demuestra el efecto de productos avanzados de glicación sobre el desencadenamiento de resistencia periférica a la acción de la insulina en músculo y por tanto este hecho resalta el papel que el receptor de AGEs debe tener en esta situación.

Para determinar la vía por la que los AGEs producen este efecto, se han preincubado las células con inhibidores de distintas vías de señalización del RAGE: PD 98059 que inhibe la fosforilación de ERK 1/2, GW 9662 que inhibe la activación de PPAR γ , y Wortmanina que inhibe la activación de la fosfatidil inositol 3 kinasa, durante 30 minutos antes de añadir AGEs y se ha medido el transporte de glucosa.

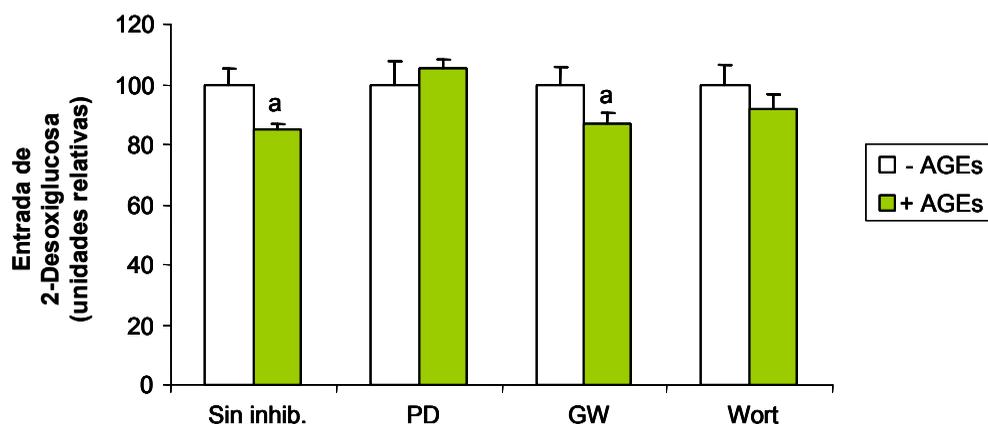


Figura V.62.- Mecanismo de inhibición de la entrada de glucosa mediado AGEs. Los resultados se expresan como media \pm SEM. a: $p < 0,05$ con respecto a las mismas células sin AGEs ($n=4$).

Como puede observarse en la figura V.62 cuando se inhibe la activación de las ERKs, el transporte de glucosa tras la adición de AGEs alcanza niveles iguales a los de las células control. Posiblemente la vía de señalización de MAP-quinasas y el propio RAGE estén implicados en la inhibición del transporte de glucosa por los AGEs, mientras que es independiente de la vía de señalización mediada por PPAR- γ .

VI.- DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

Una de las principales causas de las complicaciones a largo plazo de la diabetes es la glicación irreversible no enzimática de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, debido a la hiperglicemia crónica, y que da lugar a la formación de productos avanzados de glicación (AGEs). Esta glicación no enzimática se inicia por la condensación espontánea de azúcares reductores como la glucosa con los grupos aminos libres de los residuos de lisina o arginina de las proteínas, para formar una base de Schiff. Tras la unión del azúcar a la proteína se produce una cascada de reacciones de deshidratación, condensación, fragmentación y oxidación que hacen que las proteínas glicadas se transformen de manera irreversible en productos avanzados de glicación (AGEs) (Kikuchi *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 2003). La unión de AGEs al receptor de productos avanzados de glicación (RAGE), desencadena una serie de respuestas intracelulares que pueden formar parte de la patogénesis de las complicaciones de la diabetes.

El receptor de productos avanzados de glicación pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas de superficie celular. Este receptor se localiza en la membrana plasmática de células endoteliales y macrófagos y se caracteriza por tener un gran repertorio de ligandos entre los que se incluyen los productos avanzados de glicación, fibras amiloides, anfoterina y miembros de la familia de las S100/calgranulinas, lo que hace que esté implicado en una gran variedad de procesos fisiopatológicos, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, tumorigénesis, desórdenes inflamatorios y patologías asociadas con la diabetes como la aterosclerosis (Schmidt *et al.*, 2001).

Este receptor posee un dominio extracelular que incluye tres regiones similares a las inmunoglobulinas, una región de tipo variable que se cree es

responsable de la unión de ligandos y dos regiones de tipo constante que se ha supuesto que estabilizan la unión de ligandos al dominio extracelular variable, un dominio transmembrana y un dominio citosólico de 43 aminoácidos altamente cargado, que es esencial para la activación celular dependiente de RAGE (Neeper *et al.*, 1992; Renard *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2000). La unión de AGEs al receptor produce su activación lo que desencadena una serie de respuestas intracelulares mediadas principalmente por la generación de especies reactivas de oxígeno y que consisten fundamentalmente en la liberación de citoquinas y factores de proliferación como TNF α o IL-1 (Schlueter *et al.*, 2003).

Al inicio de esta Tesis Doctoral y en estudios realizados por el grupo de investigación, se había descrito que el receptor de productos avanzados de glicación de rata presentaba un alto grado de variabilidad. Así, en nuestro grupo se había descrito la existencia de dos isoformas que difieren en un exón correspondiente al dominio extracelular, próximo al dominio transmembrana. Estas dos isoformas se diferencian solamente en nueve aminoácidos, cuatro de ellos ácidos por lo que probablemente le confirieran al receptor una diferente afinidad y/o especificidad por los ligandos (Girón *et al.*, 1998). Además, experimentos preliminares apuntaban la posibilidad de la existencia de dos inicios de la transcripción del gen que pudieran dar lugar a proteínas diferentes con quizás una localización subcelular de las proteínas distinta (Caballero, 2004).

Sin embargo, aunque se especulaba con el posible comportamiento de estas isoformas, realmente no se conocía la funcionalidad de ellas y si podrían ser importantes como mecanismos de regulación de la transducción de señales mediada por el receptor. Hay que señalar que el estudio de las propiedades del receptor de AGEs es desde el punto de vista experimental difícil. En el momento de iniciar esta

Tesis Doctoral se carecía de anticuerpos específicos y sensibles frente al RAGE que permitieran fácilmente estudiar su expresión y localización subcelular y ya que se trata de un receptor de membrana que se caracteriza por mediar la producción de señales proliferativas en la célula era difícil, sino imposible, encontrar alguna actividad enzimática asociada específicamente con la estimulación de la cascada de señalización mediada por el RAGE y que permitiese la monitorización de la funcionalidad del receptor o de sus diferentes isoformas con facilidad.

Por ello, se planteó como paso previo en esta Tesis Doctoral el desarrollo de sistemas que permitiesen un fácil estudio de la funcionalidad del receptor de AGEs y sus isoformas. Estos sistemas consistieron en la expresión recombinante del receptor de rata con el objeto de obtener anticuerpos y por otra parte, el desarrollo de un sistema de expresión eucariota del receptor que nos permitiese una fácil detección del mismo y el estudio de su capacidad de mediar respuestas intracelulares.

Los anticuerpos específicos y sensibles frente al receptor de productos avanzados de glicación son herramientas imprescindibles para monitorizar su expresión. Por ello, en primer lugar intentamos la expresión heteróloga del RAGE de rata en bacterias. Todos los intentos que realizamos para expresar el receptor completo fueron infructuosos, probablemente debido a la toxicidad de la proteína completa en las bacterias hospedadoras. Por ello y como método alternativo, seleccionamos un sistema de expresión en bacterias de los diferentes dominios de nuestro receptor. Para la expresión heteróloga de estos dominios hemos fusionado las distintas regiones del RAGE que queríamos expresar con el extremo carboxilo de la proteína de unión a maltosa (MBP), una proteína muy soluble y de gran tamaño, estrategia que facilita la expresión y posterior purificación. Hemos expresado por una parte el dominio intracelular y el dominio transmembrana del receptor (que

hemos llamado MBP-Cito) y por otra la región variable del dominio extracelular del receptor V1, responsable de la unión de ligandos (esta construcción la hemos llamado MBP-V1). Probablemente la expresión de estos dominios se ha visto facilitada por la presencia de la proteína de unión a maltosa que tiene una notable capacidad para favorecer la solubilidad y el plegamiento de las proteínas fusionadas a ella. Esta capacidad es muy superior a la de otras proteínas de fusión como la Glutathion transferasa (Marston, 1986).

Para la obtención de anticuerpos policlonales en conejos seleccionamos la proteína de fusión MBP-Cito. Los anticuerpos obtenidos frente a la proteína de fusión fueron clarificados de los anticuerpos que reconocían al dominio de la MBP y se mostraron adecuados y específicos para la identificación del receptor de AGEs de rata mediante *Western blot*. En el caso de la proteína de fusión MBP-V1 decidimos además de obtener anticuerpos frente a ella, determinar su capacidad de unir AGEs. En numerosas revisiones sobre el receptor de AGEs se menciona que la capacidad de unir ligandos reside en la región variable V1 del receptor. No obstante, no existen suficientes pruebas experimentales que confirmen esta hipótesis. De hecho, la mayoría de experimentos en los que se ha estudiado la capacidad de unión a ligandos del RAGE *in vitro* se ha empleado todo el dominio extracelular del receptor que incluye dos dominios de inmunoglobulinas adicionales (Valencia *et al.*, 2004). Así mismo, en los experimentos clásicos en los que se ha bloqueado la interacción de los AGEs con el receptor en animales de experimentación o cultivos celulares se ha empleado todo el dominio extracelular (que ha sido denominado RAGE soluble) (Wautier *et al.*, 1996).

Nuestros resultados de *pull-down* utilizando la proteína de fusión MBP-V1 demuestran que el dominio variable del receptor es suficiente para el reconocimiento

de AGEs. Así, los AGEs marcados con rodamina se unen específicamente a nuestra proteína de fusión, no son desplazados por albúmina no glicada y pueden ser desplazados específicamente al incubar con AGEs no marcados. Este resultado indica, por tanto, que es suficiente este dominio para la unión de AGEs y que puede ser usado ventajosamente frente al denominado RAGE soluble (que usualmente es expresado en sistemas recombinantes más complejos basados en baculovirus (Wautier *et al.*, 1996; Valencia *et al.*, 2004)) en experimentos de bloqueo de AGEs circulantes. Además, el hecho de que la presencia de la proteína de fusión MBP no interfiera en la capacidad de unir AGEs del dominio V1 permite el uso de nuestra proteína de fusión inmovilizada en una matriz de agarosa-maltosa lo que facilita los estudios de unión a ligandos. Planeamos usar este sistema para realizar mutagénesis dirigida y establecer dentro del dominio V1 qué aminoácidos están directamente implicados en la unión a AGEs. Un buen candidato para estos estudios sería la mutación Gly82Ser, que ha sido estudiada en cultivos celulares y parece conferir una mayor afinidad por S100/calgranulinas (Hofmann *et al.*, 2002).

Como ya hemos indicado, en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se había descrito que el receptor de productos avanzados de glicación de rata presentaba un alto grado de variabilidad. Sin embargo, no se conocía la distribución subcelular y funcionalidad de las distintas isoformas del receptor y si éstas podían ser importantes como mecanismos de regulación de la transducción de señales mediada por el receptor. Además, existía un escaso conocimiento del tráfico intracelular del receptor e incluso se desconocía si era necesaria la internalización del mismo para la producción de respuestas intracelulares.

Por ello, un paso previo para el estudio de estas isoformas, ha sido el desarrollo de un sistema de expresión eucariota del receptor que nos permitiese una

fácil detección. Por todo esto, decidimos hacer construcciones en las que la región codificante del RAGE se fusionó con un epítipo fácilmente detectable como la proteína verde fluorescente (GFP), que permite visualizar el receptor mediante microscopía de fluorescencia y confocal.

Aunque frecuentemente las proteínas de fusión con la GFP mantienen la localización y actividad de la proteína original, era importante comprobar si la proteína RAGE-GFP mantiene las propiedades nativas del receptor de rata. Por tanto, el primer objetivo que nos marcamos fue establecer la validez de este sistema para el estudio del receptor de AGEs de rata. Nuestros resultados muestran que la expresión eucariota de una proteína de fusión entre el receptor de AGEs y la proteína fluorescente verde es un sistema idóneo para monitorizar la expresión y funcionalidad del receptor en cultivos celulares eucariotas ya que:

1. La proteína RAGE-GFP muestra en células eucariotas una localización coherente con la esperada para un receptor de membrana. Así, tiene una distribución mayoritaria en la membrana plasmática y una localización menor en el retículo endoplásmico. Esta localización es compatible con la que previamente detectamos con el receptor de AGEs fusionado a un epítipo *c-myc* utilizando técnicas de inmunocitoquímica (Caballero, 2004). Un aspecto destacado de la localización de la proteína RAGE-GFP es que su sobreexpresión en la membrana plasmática conduce a la formación de numerosas evaginaciones de la membrana en las que se localiza el receptor de AGEs (Figura V.13). Aunque este comportamiento se ha atribuido en algunos casos al uso de lípidos catiónicos en transfecciones transitorias de plásmidos que codifican para proteínas de membrana (Cornea *et al.*, 1999), no es nuestro caso ya que estas evaginaciones se mantienen en células transfectadas de

manera estable tras numerosos pases de cultivo. Nosotros pensamos que la aparición de evaginaciones es una respuesta frente a la sobre-expresión del receptor de manera que se produce un aumento de la superficie celular para acomodar al mismo. Otro aspecto destacado de la localización en la membrana plasmática del receptor fusionado a la proteína fluorescente verde es, en el caso de neuritas, su localización preferente en las prolongaciones celulares que se producen en la diferenciación celular del cultivo (Figura V.13).

2. La expresión eucariota de la proteína de fusión RAGE-GFP no produce toxicidad celular. Es posible mantener cultivos estables de células transfectadas sin aparente pérdida de la población transfectada. El análisis de los núcleos de las células transfectadas mediante tinción con DAPI no muestra ningún indicio de que la sobre-expresión del receptor produzca fenómenos apoptóticos en los tipos celulares estudiados (Figura V.14).
3. La proteína de fusión RAGE-GFP retiene la capacidad de unir ligandos tal y como hemos monitorizado mediante microscopía confocal (Figura V.15). Para ello hemos seleccionado ligandos, AGE-BSA, que hemos marcado con fluoróforos que permiten su fácil detección: rodamina y Texas Red. Hemos utilizado láseres de excitación específicos para la GFP y la rodamina o Texas-red que han sido empleados secuencialmente y con ventanas de emisión que no se solapaban para los distintos fluoróforos. Experimentos utilizando células marcadas sólo con el RAGE-GFP, rodamina o Texas-red nos permitieron comprobar la especificidad de las señales de emisión detectadas. De hecho, la elección de Texas Red como un fluoróforo alternativo para el marcaje de los AGEs-BSA se debió a que sus ventanas de excitación y emisión

se encuentran aún más desplazadas con respecto a las de la GFP que las de la rodamina y por tanto, nos da una garantía adicional de que no existen solapamientos de las señales. Teniendo en cuenta estas precauciones, nuestros resultados muestran que se produce una co-localización de las señales provenientes de la GFP y de la rodamina o Texas-red que son indicativas de una unión específica entre los AGEs y su receptor. Estas señales co-localizan a lo largo de la membrana plasmática e incluso pueden ser detectadas mediante FRET (excitando a la longitud de onda de la GFP y observando la emisión del Texas Red por transferencia de energía de resonancia, datos no mostrados).

4. La proteína de fusión RAGE-GFP transfectada en células eucariotas mantiene la capacidad de activar cascadas de señalización tras la unión a ligandos. Esta capacidad de mediar respuestas la hemos medido como activación de cascadas de señalización *corriente abajo* del receptor de AGEs. De las diferentes cascadas de señalización implicadas, hemos seleccionado la mediada por MAP-quinasas ya que ha sido directamente implicada en el proceso de señalización mediado por el receptor (Lander *et al.*, 1997). Como indicador de la activación de esta ruta de señalización hemos seleccionado el incremento en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la incubación con AGEs. La fosforilación de ERK 1/2 está claramente establecida como dependiente de la presencia de AGEs en células que expresan su receptor (Goldin *et al.*, 2006) e incluso se ha postulado una interacción directa entre el RAGE y ERKs que conduciría a su estabilización y fosforilación por miembros de la familia de las MAP-quinasas (Ishihara *et al.*, 2003). Nuestros resultados en células Neuro-2A muestran que en respuesta a la incubación con AGEs las células transfectadas con la construcción que expresa la

proteína de fusión RAGE-GFP incrementa significativamente los niveles de fosforilación de ERK 1/2, mientras que los AGEs tienen un efecto muy inferior en las células sin transfectar (ya que expresan de forma endógena un nivel bajo del receptor). Así, mientras que los niveles basales de fosforilación de ERK 1/2 en células transfectadas son similares a las de las células controles, la adición de AGEs produce un incremento aproximado de un 100% en la relación ERKs fosforiladas / ERKs totales en las células que sobreexpresan la proteína RAGE-GFP (Figura V.17). Este incremento en la fosforilación de ERKs mediado por el receptor de AGEs es dependiente del tiempo y produce una máxima activación en 15 minutos que se mantiene al menos durante una hora (Figura V.18). Por tanto, parece adecuado concluir que la proteína de fusión retiene la capacidad de mediar respuestas intracelulares. Para confirmar aún más este resultado decidimos estudiar un proceso que sucede en las etapas finales de la vía de señalización mediada por el RAGE, la activación del factor de transcripción NF- κ B y su translocación al núcleo (Huttunen *et al.*, 1999; Bierhaus *et al.*, 2001; Bierhaus *et al.*, 2005b). Para medir este fenómeno hemos utilizado la técnica de retardo en geles (EMSA) utilizando para ello la secuencia consenso de unión a este factor de transcripción. EL EMSA se ha realizado en células CHO-k1 transfectadas con el vector que expresa la proteína RAGE-GFP. Las células CHO-k1 no expresan de forma endógena el receptor de AGEs y por tanto, la respuesta a AGEs detectada se deberá exclusivamente al RAGE generado por nuestra construcción. En estas células se observa que la transfección con el vector que expresa la proteína RAGE-GFP conduce a un incremento de la capacidad de unión al DNA en los extractos nucleares. Este incremento que se observa en células transfectadas en ausencia de ligandos, es aún mayor cuando las células se incuban con AGEs-BSA (Figura V.19). Por tanto, los

resultados observados en la fosforilación de ERKs y en la activación de NF- κ B por la proteína RAGE-GFP, indican que es la proteína RAGE-GFP retiene la capacidad de translucir señales intracelulares.

Por tanto, cabe concluir que desde el punto de vista de localización subcelular, unión de ligandos y capacidad de desencadenar señales intracelulares, la construcción que expresa la fusión entre el RAGE de rata y la GFP es una herramienta válida para el estudio del receptor de productos avanzados de glicación y sus distintas isoformas.

Hasta ahora se desconocía el tráfico intracelular del receptor y si era necesaria su internalización para la producción de respuestas intracelulares. Dentro de la familia de receptores capaces de reconocer AGEs se han identificado varios miembros como AGE-R3 o galectina-3 que es capaz de translocarse desde el citoplasma a la superficie celular cuando la célula es expuesta a AGEs. La expresión en la superficie de AGE-R3 aumenta con la unión y endocitosis de AGEs por macrófagos (Vlassara *et al.*, 1995; Vlassara, 2001). Así mismo, se han identificado como receptores para AGEs algunos miembros de la familia de los receptores *scavenger* de macrófagos (Miyazaki *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2003) de clase A: I (Araki *et al.*, 1995) y II (Suzuki *et al.*, 1997) y de clase B: CD36 (Ohgami *et al.*, 2001 a) y SR-BI (Ohgami *et al.*, 2001 b); LOX-1 (Jono *et al.*, 2002); FEEL-1 y FEEL-2 (Tamura *et al.*, 2003). Estos receptores dan lugar, tras un proceso de internalización una vez unidos a sus ligandos, a cambios celulares, como la formación de células espumosas en lesiones ateromatosas. Por tanto, es posible que en el proceso de señalización celular mediado por el RAGE tuviese lugar una etapa de internalización.

La proteína de fusión con la GFP nos ha facilitado la visualización del receptor tras la unión a sus ligandos en cultivos celulares, y nos ha permitido

describir por primera vez la internalización del receptor tras la unión a sus ligandos. La internalización puede ser detectada mediante microscopía confocal utilizando ligandos marcados con rodamina o Texas Red. Así, mientras que gran parte de la fluorescencia debida a la GFP y a los ligandos colocaliza en la membrana plasmática de las células como ya hemos descrito, una parte considerable de la fluorescencia puede ser detectada tanto para los ligandos como para el receptor en el interior celular. Experimentos en los que células Neuro 2A transfectadas con la construcción que expresa la proteína RAGE-GFP se han incubado en presencia de AGEs sin marcar (Figura V.21) parecen soportar la idea de una internalización del receptor, ya que la fluorescencia asociada con la membrana plasmática en ausencia de AGEs, puede observarse distribuida de una manera difusa en el interior celular tras la adición de ligandos. Por tanto, parece que el receptor de AGEs, como otros miembros de esta familia de receptores, es capaz de internalizarse tras su unión a ligandos. La pregunta que este proceso de internalización plantea es hasta qué punto la propia internalización es relevante para el desencadenamiento de respuestas intracelulares, ya que de ellas se va a derivar en gran medida el desarrollo del síndrome diabético tardío en los pacientes diabéticos.

Para establecer la relevancia de este proceso de internalización en el desencadenamiento de respuestas intracelulares hemos utilizado un inhibidor específico de la internalización de receptores, la dansyl-cadaverina (Schütze *et al.*, 1999). En células Neuro-2A transfectadas con el plásmido pRAGE-GFP, la preincubación con dansyl-cadaverina anula completamente la fosforilación de ERKs inducida por AGEs (Figura V.22).

El promotor de AGEs de rata tiene cuatro secuencias consenso para el factor de transcripción NF- κ B (Caballero, 2004). De hecho, en el promotor humano se ha

establecido que la adición de AGEs, produce un incremento de la actividad promotora del propio receptor de AGEs (Li & Schmidt, 1997) en respuesta a la translocación de NF- κ B al núcleo celular. Nosotros hemos ensayado en células Neuro-2A transfectadas con un sistema reportero del promotor del RAGE de rata la respuesta a la incubación con AGEs en presencia y ausencia de dansyl-cadaverina. Nuestros resultados muestran (Figura V.23) que la adición de AGEs da lugar a un moderado aunque significativo incremento de la actividad promotora mediado por el receptor de AGEs endógeno de esta línea celular. Esta respuesta a la presencia de AGEs es totalmente anulada por la preincubación de las células con dansyl-cadaverina.

Por tanto, estos resultados parecen indicar que no sólo se produce una internalización del receptor tras la unión a ligandos, sino que esta internalización es un proceso clave para el desencadenamiento de respuestas intracelulares mediadas por el receptor de AGEs. Aún podemos realizar una prueba adicional de la relevancia de este proceso. Como veremos más adelante, hemos descubierto una isoforma del receptor de AGEs de rata que tiene una localización intracelular y la sobre-expresión de esta isoforma fusionada a la GFP conduce a una activación constitutiva de las ERKs. Por tanto, creemos que la sobre-expresión de la isoforma con localización intracelular mimetizaría al proceso de internalización y sería suficiente para estimular las cascadas de señalización celular dependientes del RAGE.

Se ha descrito que el dominio citosólico del receptor de AGEs es capaz de unir directamente a ERKs (Ishihara *et al.*, 2003). Este resultado en sí es sorprendente, y por eso algunos autores lo han puesto en duda ya que las ERKs 1/2 se encuentran en un nivel bajo de las cascadas de señalización mediada por MAP-quinasas y

parecería más lógica la interacción directa con algún miembro de la cascada de señalización que participase en las primeras etapas de la misma. No obstante, si el receptor de AGEs experimenta un proceso de internalización, la interacción directa con ERKs sería posible. Nosotros hemos tratado de repetir estos experimentos con nuestra proteína de fusión MBP-Cito. Para ello hemos realizado un *pull-down* utilizando fracciones citosólicas de pulmón de rata que se han incubado con nuestra proteína de fusión. Posteriormente, se han inmovilizado las proteínas en una resina de agarosa-amilosa y se han eluído específicamente con maltosa o tampón de carga de electroforesis. La presencia de ERKs en las fracciones eluídas se ha analizado mediante *Western-blot*. Nuestros resultados (Figura V.40) parecen indicar que no se produce la unión directa del dominio citosólico del receptor de AGEs a ERKs. Lo que sí obtenemos, de forma repetida, es la unión a este dominio de una proteína de un peso molecular aparente de 55-60 kD y que actualmente estamos tratando de identificar mediante técnicas de proteómica.

De cualquier manera, y aunque las proteínas con las que interacciona directamente el dominio citosólico del receptor están aún por determinar de manera definitiva, parece que la internalización del mismo es un requisito imprescindible para el desencadenamiento de las respuestas intracelulares. Creemos que se trata de un dato relevante ya que ofrece una nueva diana molecular para el diseño de agentes que prevengan las alteraciones a largo plazo de la diabetes: inhibidores específicos de la internalización del RAGE.

Otro aspecto que se ha abordado en esta Tesis Doctoral ha sido la determinación de la funcionalidad de una isoforma del receptor que carece del exón 9. Existen dos isoformas del RAGE de rata generadas por *splicing* alternativo que difieren en la presencia o ausencia del exón 9 que codifica para 9 aminoácidos del

dominio extracelular, estos aminoácidos se localizan en una región próxima al dominio transmembrana. (Girón *et al.*, 1998). Por tanto, aunque estas dos isoformas del RAGE se diferencian solamente en nueve aminoácidos, nos planteamos la posibilidad de que esta isoforma del receptor presentara una diferente afinidad y/o especificidad por los ligandos, una diferente distribución subcelular, alterase el proceso de transducción de señales al interior celular tras la adición de ligandos o finalmente tuviese un papel en el control post-transcripcional de la expresión del receptor. Ya que la estrategia de fusionar el RAGE a la proteína fluorescente verde se había mostrado adecuada para el estudio de la funcionalidad del receptor, decidimos seguir la misma estrategia en el caso de la isoforma carente del exón 9.

Los datos que hemos obtenido utilizando esta estrategia nos han demostrado que esta isoforma se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática, retiene la capacidad de unir ligandos, medida como capacidad de unir AGEs-BSA marcados con rodamina o Texas Red y es capaz de desencadenar de manera eficiente respuestas celulares tras la unión a ligandos. Por tanto, no existen diferencias significativas en los parámetros ensayados con respecto a la isoforma correspondiente al receptor de AGEs completo (aunque ciertamente queda por ensayar la capacidad de unión a ligandos del receptor diferentes de los AGEs). No obstante, cada uno de los resultados obtenidos con esta isoforma es una prueba adicional de que las proteínas de fusión son adecuadas para el estudio del receptor de AGEs ya que son capaces de localizarse específicamente en la membrana plasmática, unen eficientemente ligandos y desencadenan respuestas intracelulares. Asimismo, también prueban que la internalización del receptor es un requisito necesario para el desencadenamiento de repuestas intracelulares.

La única diferencia significativa que hemos encontrado entre la isoforma carente del exón 9 y el receptor de AGEs de rata completo ha sido que la expresión de la proteína de fusión que contiene la isoforma que carece del exón 9 tiene una expresión menor en la membrana plasmática. Puesto que ambas isoformas se expresan en nuestras construcciones desde el mismo promotor, esta diferencia parece indicar una regulación post-transcripcional de la expresión de la isoforma. Si consideramos que nuestros resultados parecen indicar que la diferencia en fluorescencia se produce en la membrana plasmática más que en la cantidad total de fluorescencia de las células (dato no mostrado), esto indicaría que en el exón 9 pudiesen localizarse señales secundarias de destino a la membrana plasmática cuya ausencia en la isoforma que se expresa menos en la membrana harían que parte de esta isoforma se localizase en el retículo en mayores niveles.

Puesto que esta isoforma se expresa menos en la membrana plasmática, la existencia de este *splicing* daría lugar a una disminución de expresión génica del receptor *funcional*. Este resultado no es tan sorprendente ya que en el caso del receptor humano de AGEs se ha descrito la existencia de varias isoformas generadas por *splicing* alternativo que aunque se expresan en las células humanas, dan lugar a isoformas no activas del receptor al carecer del dominio intracelular o bien extracelular (Schueter *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2003). Por tanto, en general cabría hipotetizar que el receptor de AGEs es capaz de regular su expresión génica mediante una serie de mecanismos que atenúan la generación de señales, ya sea por generar isoformas truncadas (caso del receptor humano) o bien por generar isoformas que tienen un menor nivel de expresión en la membrana plasmática (caso del receptor de rata).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Caballero, 2004), hemos descrito la posibilidad de uso de dos diferentes inicios de la transcripción del gen del RAGE mediante técnicas de extensión de cebadores. Estos resultados iniciales indicaban la posibilidad de que el uso del segundo inicio de la transcripción diese lugar a un transcrito que codificase para una proteína más pequeña que, manteniendo la misma pauta de lectura, careciese de la señal de exportación al retículo endoplásmico. Puesto que la técnica de extensión de cebadores origina en algunas ocasiones artefactos que conducen a proponer más inicios de la transcripción de los reales, en primer lugar decidimos confirmar el uso de los dos supuestos inicios de la transcripción para el RAGE de rata utilizando una técnica alternativa que complementase los resultados obtenidos en la extensión de cebadores. Hemos utilizado para ello la técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNA ends*).

Nuestros resultados parecen confirmar plenamente la existencia de esta isoforma ya que tanto experimentos de extensión de cebadores (figura V.33), experimentos de RACE (figuras V.34 y V.35), así como la detección de la proteína en el citosol de cerebro y pulmón de rata mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos obtenidos frente a MBP-Cito (figura V.36) corroboran la existencia de esta isoforma.

Hemos ensayado la funcionalidad de la isoforma utilizando la misma estrategia empleada anteriormente, la fusión a la GFP. La expresión de esta proteína de fusión en células Neuro 2A y CHO-k1 indica una localización de la misma en el citosol de la célula como cabría esperar. Esta localización debe compararse con la que presenta la GFP sola. La GFP, debido a la carencia de una señal de destino clara y la presencia de algunas secuencias secundarias de destino al núcleo celular se localiza

mayoritariamente difusa por toda la célula y en mayor concentración en el núcleo (Di Liegro *et al.*, 2000; Figura V.38). En el caso de la isoforma del receptor de AGEs que hemos llamado intracelular, se localiza dispersa por el citosol, con un aspecto parcialmente granuloso y sin concentrarse en el núcleo celular (Figura V.38).

Aparte de su localización subcelular, el aspecto más destacado de esta isoforma es la capacidad de desencadenar respuestas celulares de forma constitutiva. Hemos determinado la capacidad de incrementar la fosforilación de ERK 1/2 como indicador de la generación de respuestas intracelulares. Las células Neuro 2A transfectadas con esta isoforma, en ausencia de AGEs, tienen niveles de fosforilación de ERKs aproximadamente 2.5 veces superiores a las células controles sin transfectar. La adición de AGEs a estas células transfectadas produce un incremento adicional de la señalización medida como incremento en la fosforilación de ERKs. Por tanto, se trata de una isoforma funcional que, no sólo responde a la presencia de AGEs sino que mantiene niveles basales elevados de activación de la cascada de señalización. La función de esta isoforma en rata sería por tanto doble, posiblemente ser capaz de reconocer AGEs intracelulares formados durante el metabolismo celular en situaciones de hiperglicemia y por otra parte mantener niveles constitutivos de activación de la ruta de señalización. Quizás este último papel fuese más importante en períodos de desarrollo celular en los que se ha descrito que la expresión tisular del receptor es mayor y contribuye al crecimiento y diferenciación de tejidos como por ejemplo el cerebro (Hori *et al.*, 1995).

En humano se ha descrito una isoforma que pudiese ser parecida a la que aquí describimos para el receptor de rata (Yonekura *et al.*, 2003). En esta isoforma, mediante *splicing* alternativo del intrón 1 se produce una señal de parada de la traducción. Estos autores especulan con la posibilidad de que se emplee un ATG

alternativo presente en el exón 3 que daría una isoforma que careciendo del dominio V1 de unión a ligandos se expresase en las células. Esta isoforma debería por tanto tener una localización citosólica, aunque parece que estos autores describen una localización de la misma en la membrana plasmática. Esta isoforma, no sería por tanto totalmente equivalente a la de rata ya que se generaría mediante *splicing* alternativo y expresión bi-cistrónica, mientras que la de rata se genera mediante uso alternativo de inicios de la transcripción y mientras que la isoforma humana probablemente carece de la capacidad de unir ligandos, la isoforma de rata sí que mantiene casi la totalidad del dominio V1.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral hemos abordado el estudio de la regulación de la expresión del receptor de AGEs de rata. Hemos prestado atención a dos aspectos, la activación del promotor y la regulación de la estabilidad del mRNA del receptor como mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión génica.

El promotor del receptor de AGEs humano fue caracterizado por primera vez por Li & Schmidt en 1997. Estos autores describieron la presencia de tres sitios de unión a NF- κ B y dos sitios de unión a SP1. Estos autores midieron el incremento de la actividad promotora en respuesta a AGEs, mediada por el propio RAGE a través de un incremento en los niveles nucleares de NF- κ B. También ha sido caracterizado el incremento de la actividad promotora en respuesta a estradiol (Tanaka *et al.*, 2000) y a anfoterina en células de tejido nervioso a través de los sitios de unión SP1 (Li *et al.*, 1998). Pocos datos más se tienen sobre la regulación de la actividad promotora.

Nosotros hemos caracterizado el promotor de rata, aislado a partir de una genoteca genómica (Caballero, 2004). El análisis de la secuencia muestra la presencia de 4 sitios para NF- κ B y dos sitios SP1. Para el estudio de la actividad promotora

hemos utilizado un sistema de genes reporteros basado en la luciferasa. En primer lugar hemos medido los niveles basales de transcripción mediados por el promotor en diferentes tipos celulares y los hemos comparado con los de un promotor fuerte como es el de SV40 (pGL3-Control). Cabe señalar que el nivel de transcripción desde el promotor de rata es significativo pero muy inferior al de promotores fuertes como SV40. Hemos ensayado la transcripción basal desde el promotor en distintos tipos celulares, células de tejido nervioso Neuro 2A, células de endotelio pulmonar MLE-12, células renales NRK-52F y monocitos RAW-304.

Los resultados de expresión basal del promotor medidos en estos tipos celulares se corresponden bastante bien con la distribución conocida del receptor en los diferentes tejidos: es muy alta en pulmón donde se le atribuye un papel en la retirada de AGEs circulantes, mientras que es moderada en riñón, susceptible de experimentar el síndrome diabético tardío, e inferior en tejido nervioso y monocitos. Nuestros resultados muestran que en todas estas líneas celulares, la adición de AGEs produce un incremento de la actividad promotora corroborando los resultados de Li & Schmidt, 1997. No obstante, es de destacar los valores basales y en presencia de AGEs tan elevados de actividad promotora en pulmón. Probablemente, factores de transcripción tejido específicos en pulmón sean responsables de esta actividad promotora. En la actualidad nos encontramos analizando estos factores mediante el ensayo de deleciones seriadas del promotor en la línea celular MLE-12.

Hemos decidido estudiar el efecto de moléculas relacionadas con la diabetes sobre la actividad promotora del gen de rata. Para ello, hemos elegido dos tipos celulares, pulmón (células MLE-12) y tejido nervioso (células Neuro-2A) en las que ya hemos ensayado el efecto de los AGEs-BSA. Como hemos indicado, los AGEs inducen la sobre-expresión del gen del RAGE de rata, resultado ya mostrado para el

gen humano (Schmidt *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). También hemos medido el efecto de lipopolisacárido, que se ha descrito como capaz de estimular la actividad promotora en el gen humano (Li & Schmidt, 1997). También, hemos seleccionado el H₂O₂, un generador de radicales libres, puesto que se ha relacionado al estrés oxidativo en el desarrollo del síndrome diabético tardío (Baynes & Torpe, 1996) al favorecer la formación de productos avanzados de glicación (Reddy *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996) y producir la activación del factor nuclear NF-κB. También hemos ensayado el efecto de una hiperglicemia severa sobre la actividad del promotor de rata. Puesto que los AGEs se generan como consecuencia de una hiperglicemia sostenida, hemos querido conocer si una hiperglicemia, en ausencia de productos avanzados de glicación, es suficiente para inducir la sobre-expresión del receptor. Finalmente, hemos ensayado dos agentes hipoglicemiantes, la propia insulina y un compuesto con propiedades hipoglicemiantes, el tungstato sódico (Barberà *et al.*, 1994). El tungstato sódico es un compuesto que administrado por vía oral, conduce a una situación de normoglicemia en numerosos modelos experimentales de diabetes (Barberá *et al.*, 1994, 1997; Muñoz *et al.*, 2001, Girón *et al.*, 2003). Este compuesto ejerce su efecto hipoglicemiante utilizando vías de señalización celular a través de MAP-kinasas, en concreto ERK 1/2, independientes de las de la insulina (Domínguez *et al.*, 2003).

Nuestros resultados muestran que en células pulmonares el único estímulo capaz de incrementar de forma significativa y elevada la actividad promotora son los AGEs. Este resultado es coherente pues parece que en pulmón la única función del receptor es facilitar la retirada de AGEs circulantes y por tanto un incremento de la actividad promotora en respuesta a ellos es lógica. La incubación con concentraciones elevadas de glucosa (50 mM) ha tenido un pequeño efecto significativo sobre la expresión desde el promotor del receptor de AGEs de rata. Este

resultado nos confirma que la inducción de la expresión del receptor es debida fundamentalmente al incremento en los niveles de AGEs y que una hiperglicemia, transitoria, tiene si acaso un efecto moderado sobre la expresión génica del receptor. Permanece por dilucidar el mecanismo molecular de la elevada actividad promotora del gen en pulmón en condiciones basales.

En las células de tejido nervioso Neuro-2A, aunque los niveles basales son muy inferiores a las de las células de pulmón, la capacidad de respuesta a diferentes tipos de moléculas es más variada. Se producen incrementos significativos en el caso de los AGEs, lipopolisacárido, peróxido de hidrógeno y tungstato sódico. Es posible que AGEs y peróxido de hidrógeno usen una vía de señalización común mediada por la activación del factor NF- κ B (Baynes & Torpe, 1996), de forma que el efecto positivo sobre la transcripción del promotor del receptor, fuese inducido por la interacción de los AGEs con su propio receptor o bien por la producción de radicales libres intracelulares debida a la incubación con H₂O₂.

Los resultados de actividad luciferasa que hemos obtenido en presencia de insulina o de tungstato sódico son sorprendentes. En células MLE-12, insulina y tungstato producen una pequeña activación de la transcripción desde nuestra construcción. En la línea celular Neuro-2A, el incremento en la transcripción mediado por el tungstato es incluso superior. Si contemplamos que el principal mecanismo de acción del tungstato sódico es la activación de la vía de señalización de MAP-kinasas, incrementando directamente la fosforilación de ERKs (Domínguez *et al.*, 2003) y que el receptor de AGEs usa la misma vía de señalización, el resultado ya no es tan sorprendente. En el caso del efecto de la insulina sobre la transcripción del promotor probablemente haya que contemplarlo desde un punto de vista no relacionado con la diabetes. El receptor de AGEs ha sido implicado en otros procesos

celulares, fundamentalmente de tipo proliferativo. Así, el receptor está implicado en el crecimiento y diferenciación del tejido nervioso (Brett *et al.*, 1993) o en la angiogénesis en metástasis tumorales (Takada *et al.*, 2001; Huttunen *et al.*, 2002b; Kuniyasu *et al.*, 2002). Es posible, que en estas situaciones la insulina induzca la expresión del receptor y ha sido descrito que a través de la vía de señalización clásica de la insulina puede incrementarse la fosforilación de ERKs (Domínguez *et al.*, 2003).

Por tanto, el promotor del receptor de AGEs de rata tiene capacidad de respuesta a AGEs, H₂O₂ y compuestos insulinomiméticos. Esta capacidad de respuesta, aunque es necesario confirmarlo mediante experimentos de retardo en geles y *foot-printing*, parece estar mediada en gran medida en el promotor de rata por el sitio de unión al factor de transcripción NF-κB.

Ya habíamos descrito que el extremo 3' no traducido del mRNA del RAGE de rata tiene una influencia importante en la estabilidad del mismo y en el control de la expresión génica (Caballero *et al.*, 2004). Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral así lo confirman. La isoforma del mRNA del RAGE de rata generada por uso alternativo de señales de poliadenilación tiene una menor estabilidad que conduce a una vida media del RNA muy inferior a la que presenta la isoforma generada por el uso de la primera señal de poliadenilación y que no contiene una secuencia ARE funcional (Figura V.45).

Una vez establecida la importancia de la secuencia ARE en la estabilidad del mRNA, hemos estudiado la importancia de esta secuencia en respuesta a la adición de diferentes moléculas implicadas en la diabetes. Nuestros resultados indican que existe una modulación de la estabilidad del mRNA correspondiente a la isoforma del receptor de AGEs generada por el uso de la señal distal de poliadenilación en respuesta a AGEs, hiperglicemia y peróxido de hidrógeno. Estos agentes se

encuentran en concentraciones elevadas en la diabetes y su presencia en el medio de incubación probablemente conduce a una estabilización del mRNA y a un incremento de la expresión génica. Este resultado destaca la relevancia del extremo 3' no traducido del gen del mRNA del receptor de rata en el control de la expresión génica.

Obviamente, la pregunta que a continuación cabe plantearse es qué influencia tiene el extremo 3' no traducido del mRNA del receptor humano. Nuestros resultados muestran que aunque en el caso del gen humano existe una única secuencia funcional de poliadenilación, el transcrito generado contiene en su extremo 3' no traducido secuencias que conducen a una disminución de la expresión génica. Estas secuencias, que pueden ser mapeadas mediante deleciones seriadas, son ricas en timina. Probablemente se trate de secuencias ARE no canónicas y que tengan un efecto significativo sobre la expresión génica debido a una desestabilización del mRNA (Kruys *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002).

Experimentos preliminares realizados mediante *Northern- blot*, muestran que la incubación de células humanas transfectadas con la construcción que expresa la GFP fusionada al extremo 3' no traducido del gen humano muestran que la expresión génica controlada por esta región se encuentra regulada positivamente por la adición de AGEs al medio de cultivo (Figura V.59) y por tanto resalta la relevancia de este mecanismo de regulación de la expresión génica para el receptor de AGEs en humanos.

La hiperglicemia crónica promueve la resistencia periférica a la acción de la insulina, los mecanismos moleculares por los que se produce este efecto no se conocen totalmente. Así, se ha descrito que los productos tempranos de glicación disminuyen la entrada de glucosa en la célula mediada por insulina en músculo

esquelético por mecanismos que implican a la proteína quinasa C (Miele *et al.*, 2003). En adipocitos, los productos de glicación tempranos bloquean el transporte de glucosa a través de un estímulo mediado por especies reactivas de oxígeno (Unoki *et al.*, 2007). Nuestra hipótesis es que el RAGE podría estar implicado a través de la unión a productos avanzados de glicación, es decir a productos tardíos más que a productos tempranos.

En tejido muscular de rata se expresa el receptor de AGEs. En situaciones patológicas como la diabetes, el tejido muscular tiene un papel relevante en la hiperglicemia debido a una menor retirada de glucosa circulante, y por tanto hemos realizado unos experimentos preliminares para determinar si los productos avanzados de glicación, al igual que los productos tempranos de glicación, inducen resistencia a insulina en células musculares.

En primer lugar, hemos analizado distintas albúminas glicadas, una con un alto contenido en productos avanzados de glicación y otra con sólo productos tempranos de glicación. La incubación con AGEs tardíos disminuye la entrada de glucosa en la célula inducida por la adición de insulina, sin embargo, el efecto más significativo es la disminución en el transporte basal de glucosa. Otros autores habían indicado el efecto contrario para los productos tempranos, una mayor inhibición del transporte inducido por insulina y un menor efecto en el transporte basal de glucosa (Miele *et al.*, 2003). Por tanto, mientras que el efecto de productos tempranos de glicación sobre el transporte de glucosa ya se había establecido, es la primera vez que se demuestra el efecto de productos avanzados de glicación sobre el desencadenamiento de resistencia periférica a la acción de la insulina en músculo y por tanto este hecho resalta el papel que el receptor de AGEs debe tener en esta situación.

Para determinar la vía por la que los AGEs producen este efecto, se han preincubado las células con inhibidores de las distintas vías de señalización desencadenadas tras la unión AGEs-RAGE: PD 98059 que inhibe la fosforilación de ERK 1/2, GW 9662 que inhibe la activación de PPAR γ , y Wortmanina que inhibe la activación de la fosfatidil inositol 3 kinasa. Nuestros resultados muestran que el efecto debido a los AGEs tardíos se ejerce fundamentalmente a través de la ruta de ERKs, lo que implica claramente al receptor de AGEs como el mediador de esta respuesta frente a los productos generados tras una hiperglicemia sostenida.

Como conclusión, esta Tesis Doctoral pretendía establecer la relevancia de la variabilidad genética del receptor de AGEs en el control de la expresión génica del mismo y en el desencadenamiento de señales intracelulares que estuviesen implicadas en las patologías a largo plazo de la diabetes. Para ello, el análisis de la funcionalidad de las diferentes isoformas generadas por *splicing* alternativo y diferentes inicios de la transcripción, así como del papel del extremo 3' no traducido del mRNA tanto de rata como humano era importante. Creemos que el trabajo presentado en esta Tesis cumple al menos una parte considerable de los objetivos planteados. Obviamente, este trabajo abre múltiples interrogantes, por ejemplo si existe un uso diferencial de inicios de transcripción en el gen humano o el análisis de las diferentes isoformas y de las proteínas purificadas frente a otros ligandos distintos de los AGEs o incluso las bases moleculares del proceso de internalización y activación celular mediado por el receptor. Esperamos poder realizar determinaciones adicionales que en un futuro próximo nos permitan dilucidar estas cuestiones.

VII.- CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

- La expresión heteróloga en bacterias de los diferentes dominios del receptor de AGEs de rata produce niveles adecuados de proteína, soluble y fácilmente purificable. La proteína de fusión entre el dominio variable V1 del receptor y la proteína de unión a maltosa mantiene la capacidad de unir ligandos, AGEs, de una manera específica. Los anticuerpos obtenidos frente a estas proteínas recombinantes son herramientas útiles para la detección y cuantificación del receptor.

- La expresión eucariota de una proteína de fusión entre el receptor de AGEs y la proteína fluorescente verde GFP es un sistema idóneo para monitorizar la expresión y funcionalidad del receptor ya que:
 - Se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática y permite la detección de la proteína de fusión *in vivo* mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.
 - Retiene la capacidad de unir ligandos y permite monitorizar la misma utilizando ligandos marcados con fluoróforos.
 - Mantiene la capacidad de activar cascadas de señalización tras la unión a ligandos, medida como un incremento en la fosforilación de la ruta de MAP kinasas y un aumento en la unión a DNA del factor de transcripción NF- κ B.

- La unión de ligandos al receptor de AGEs de rata conduce a la internalización del mismo. El proceso de internalización es esencial para el desencadenamiento de respuestas celulares ya que inhibidores específicos de

la internalización como la dansyl cadaverina bloquean la fosforilación de ERK 1/2 mediada por los AGEs y la activación celular.

- Experimentos de extensión de cebadores y RACE demuestran la existencia de una isoforma del receptor, carente de la secuencia de exportación al retículo endoplásmico y de localización citosólica. Esta isoforma es capaz de producir una activación constitutiva de la ruta de señalización mediada por el RAGE.
- En el extremo 3' del gen del receptor de rata existen dos señales de poliadenilación. Una de las isoformas generada por una de estas señales contiene una secuencia rica en adeninas y uracilos, lo que produce la desestabilización del mRNA y la disminución de la expresión del receptor. La adición de AGEs, glucosa y peróxido de hidrógeno al medio de cultivo incrementan la expresión génica a partir de esta isoforma del mRNA.
- En el gen del receptor de AGEs humano existe una única secuencia funcional de poliadenilación. No obstante, el mRNA originado a partir de ella también contiene secuencias ricas en timinas capaces de disminuir la expresión génica en células humanas. La adición de AGEs a cultivos de células humanas transfectadas con construcciones en las que la GFP se ha fusionado a esta región 3' no traducida del gen humano, produce un incremento significativo de la expresión de esta proteína reportera.
- Los productos avanzados de glicación tienen un efecto directo sobre el transporte de glucosa en tejidos periféricos. Este efecto se ejerce a través de rutas de señalización mediadas por MAP-quinasas.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Agbulut O, Coirault C, Niederländer N, Huet A, Vicart P, Hagège A, Puceat M, Menasché P.** (2006) GFP expression in muscle cells impairs actin-myosin interactions: implications for cell therapy. *Nature Methods* 3: 331.
- Ahmed N.** (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67: 3-21.
- Ahmed N, Thornalley PJ.** (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 233-245.
- American Diabetes Association.** (2005) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28: S37-S42.
- Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zang M, Yang H, Tracey KJ.** (2000) High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 565-570.
- Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S.** (1995) Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *European Journal of Biochemistry* 230: 408-415.
- Barberà A, Rodríguez-Gil JE, Guinovart JJ.** (1994) Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 20047-20053.
- Barberà A, Fernández-Alvarez J, Truc A, Gomis R, Guinovart JJ.** (1997) Effects of tungstate in neonatally-streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia. *Diabetologia* 40: 143-149.

- Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, Ratto GM, Schmidt AM, De Caterina R.** (2005) At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25: 1401-1407.
- Baynes J, Thorpe S** (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9.
- Bhavsar PJ, Dellow KA, Yacoub MH, Brand NJ, Barton PJR.** (2000) Identification of cis-acting DNA Elements Required for Expression of the Human Cardiac Troponin I Gene Promoter. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 95–108.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.** (1998) AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research* 37: 586–600.
- Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP.** (2001). Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Diabetes* 50: 2792-2808.
- Bierhaus A, Humpert PM, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP.** (2005) Advanced Glycation End Product Receptor–Mediated Cellular Dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043: 676-680.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP.** (2005b) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine* 83: 876–886.

- Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern DM.** (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *American Journal of Pathology* 143: 1699-1712.
- Brownlee M.** (2000) Negative Consequences of Glycation. *Metabolism* 49 S1: 9-13.
- Brownlee M.** (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A.** (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 87: 432-438.
- Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM.** (2002) RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106: 2827-35.
- Bullock DW, Lamb DJ, Rider VC, Kima PE.** (1987) The rabbit progesterone receptor and uteroglobin gene expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 230: 79-97.
- Caballero JJ.** (2004) Análisis funcional del gen del receptor de productos avanzados de glicación de rata (RAGE). *Tesis Doctoral*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada.
- Caballero JJ, Girón MD, Vargas AM, Sevillano N, Suárez MD, Salto R.** (2004) AU-rich elements in the mRNA 3'-untranslated region of the rat receptor for advanced glycation end products and their relevance to mRNA stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 247 -255.

- Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC.** (1988) Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glucosylation. *Diabetes* 39: 807-814.
- Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B, Kohner EM** (1997) Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia* 40: 156-164
- Chomczynski P, Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156- 159.
- Cipollone F, Iezzi A, Fazio M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A.** (2003) The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* 108: 1070–1077.
- Clements RS Jr, Robison WG Jr, Cohen MP** (1998) Anti-glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice. *Journal of Diabetes and its Complications* 12: 28-33.
- Cornea A, Janovick JA, Lin X, Conn M.** (1999) Simultaneous and independent visualization of the gonadotropin-releasing hormone receptor and its ligand: evidence for independent processing and recycling in living cells. *Endocrinology* 140: 4272-4280.
- Deora AA, Win T, Vanhaesebroeck B, Lander HM.** (1998) A redox-triggered Ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 39-kinase to Ras by redox stress. *The Journal of Biological Chemistry.* 273: 29923–29928.

- Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM.** (2000) 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. *Biochemical Journal* 352:109-15.
- Ding Q, Keller JN.** (2005) Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neuroscience Letters* 373: 67-72.
- Ding Q, Keller JN.** (2005b) Evaluation of RAGE isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746: 18 – 27.
- Domínguez JE, Muñoz MC, Zafra D, Sánchez-Pérez I, Baqué S, Caron M, Mercurio C, Barberá A, Perona R, Gomis R, Guinovart JJ.** (2003) The anti-diabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 42785-42794.
- Donato R.** (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33: 637-668.
- Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY.** (1999) Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney International* 56: 1455-1467.
- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M.** (1994) Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 94: 110-117.
- Girón MD, Vargas AM, Suárez MD, Salto R.** (1998) Sequencing of two alternatively spliced mRNAs corresponding to the extracellular domain of the rat receptor for advanced glycosylation end products (RAGE). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251: 230–234.

- Girón MD, Caballero JJ, Vargas AM, Suárez MD, Guinovart JJ, Salto R. (2003)** Modulation of glucosa transporters in rat diaphragm by sodium tungstate. *FEBS letters* 542: 84-88.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. (2006)** Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114: 597-605.
- Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. (2001)** Blockade of receptor for advanced glycation end- products restores effective wound healing in diabetic mice. *American Journal of Pathology* 159: 513–525.
- Green H, Meuth M. (1974)** An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133.
- Guan C, Li P, Riggs PD, Inouye H. (1987)** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67: 21-30.
- Gugliucci A. (2000)** Glycation as the glucose link to diabetic complications. *The Journal of the American Osteopathic Association* 100: 621-634.
- Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. (1992)** Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 12404-12407.
- Hammes HP, Wellensiek B, Kloting I, Sickel E, Bretzel RG, Brownlee M (1998)** The relationship of glycaemic level to advanced glycation end products (AGE) accumulation and retinal pathology in the spontaneous diabetic hamster. *Diabetologia* 41: 165-170.
- Hanford LE, Enghild JJ, Valnickova Z, Petersen SV, Schaefer LM, Schaefer TM, Reinhart TA, Oury TD. (2004)** Purification and characterization of mouse

soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *The Journal of Biological Chemistry* 279: 50019-50024.

- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambhan N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM.** (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: the cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889-901.
- Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, Lalla E, Monteiro J, Stickland MH, Bucciarelli LG, Moser B, Moxley G, Itescu S, Grant PJ, Gregersen PK, Stern DM, Schmidt AM.** (2002) RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes and Immunity* 3: 123-135.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM.** (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 25752-25761.
- Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M.** (2003) Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 25: 283-292.
- Huang JS, Guh JY, Hung WC, Yang ML, Lai YH, Chen HC, Chuang LY.** (1999) Role of the Janus Kinase (JAK)/ signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells. *Biochemical Journal* 342: 231-238.
- Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY.** (2001) Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 81: 102-113.

- Hudson BI, Schmidt AM.** (2004) RAGE: A novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharmaceutical Research* 21: 1079-1086.
- Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ.** (1998) Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) gene: prevalence in type II diabetes mellitus and ethnic groups. *Diabetes* 47: 1155-1157.
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ.** (2001) Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50: 1505-1511.
- Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ, Futers TS.** (2001 b) Characterization of allelic and nucleotide variation between the RAGE gene on chromosome 6 and a homologous pseudogene sequence to its 5' regulatory region on chromosome 3: implications for polymorphic studies in diabetes. *Diabetes* 50: 2646-2651.
- Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, Lu Y, Lee L, Stern D, Naka Y, Ramasamy R, Yan SD, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM.** (2003) Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419: 80-88.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB.** (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes care* 29: 1420-1432.
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H.** (1999) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 19919-19924.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Rauvala H.** (2002) RAGE signalling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 38635-38646.

- Huttunen H, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H.** (2002b) Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Research* 62: 4805-4811.
- Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, Ueda S, Horiuchi S.** (1996) Carboxymethyllysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with AGEs of the Maillard reaction. *Biochemistry* 35: 8075-8083.
- Ishihara K, Tsutsumi K, Kawanw S, Nakajima M, Kasaoka T.** (2003) The receptor for advanced glycation end- products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Letters* 550: 107-113.
- Jono T, Miyazaki A, Nagai R, Sawamura T, Kitamura T, Horiuch S.** (2002) Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Letters* 511: 170-174.
- Kankova K, Vasku A, Hajek D, Zahejsky J, Vasku V.** (1999) Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22: 1745.
- Kankova K, Zahejsky J, Marova I, Muzik J, Kuhrova V, Blazkova M, Znojil V, Beranek M, Vacha J.** (2001) Polymorphisms in the RAGE gene influence susceptibility to diabetes-associatedmicrovascular dermatoses in NIDDM. *Journal of Diabetes and its Complications* 15: 185–192.
- Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita Z, Sasaki N, Tashiro K.** (2003) Glycation – a sweet tempter for neuronal death. *Brain Research Reviews* 41: 306-323.
- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Yan SD, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM.** (1999) N^ε- (Carboxymethyl) lysine

adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression.

The Journal of Biological Chemistry 274: 31740-31749.

- Kislinger T, Tanji N, Wendt T, Qu W, Lu Y, Ferran L, Taguchi A, Olson K, Bucciarelli L, Goova M, Hofmann M, Cataldegirmen G, D'Agati V, Pischetrieder M, Stern D, Schmidt AM.** (2001) RAGE mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in the vasculature of diabetic apolipoprotein E null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21: 905–910.
- Koya D, King GL.** (1998) Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complications. *Diabetes* 47: 859-866.
- Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y.** (2007) RAGE and Soluble RAGE: Potential Therapeutic Targets for Cardiovascular Diseases. *Molecular Medicine* 13: 625-635.
- Kruys V, Marinx O, Shaw G, Deschamps J, Huez G.** (1989) Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245: 852-5.
- Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, Ito R, Yokozaki H, Yasui W.** (2002) Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *The Journal of Pathology* 196: 163-170.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern D, Schmidt AM.** (2000) Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated alveolar bone loss in diabetic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 105: 1117-1124.

- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM.** (1997) Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21^{ras}-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 17810-17814.
- Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC.** (2006) Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World Journal of Gastroenterology* 12: 2394-2397.
- Lee AY, Chung SK, Chung SS** (1995) Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 2780-2784
- Lee KJ, Lu Y, Ginsberg MD, Ferran LJ, Stern DM, Schmidt AM.** (1997) A murine model of accelerated atherosclerosis in diabetic LDL Receptor deficient mice. *Circulation* 96 (suppl): I-175.
- Li J, Schmidt AM.** (1997) Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 16498-16506.
- Li J, Qu X, Schmidt AM.** (1998) Sp1-binding Elements in the Promoter of RAGE Are Essential for Amphotericin-mediated Gene Expression in Cultured Neuroblastoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 30870–30878.
- Li YM, Tan AX, Vlassara H** (1995) Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nature Medicine* 1: 1057-1061.
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H.** (1996) Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: Relationship of p60 to OST-48 and p90 to

80K-H membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 11047-11052.

Lindholm E, Bakhtadze E, Sjögren M, Cilio CM, Agardh E, Groop L, Agardh CD.

(2006) The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 49: 2745–2755.

Lue LF, Walker D, Brachova L, Rogers J, Shen Y, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD.

(2001) Involvement of RAGE-microglial interactions in Alzheimer's disease: in vivo and in vitro studies. *Experimental Neurology* 171: 29–45.

Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth

RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR, Cerami A, Vlassara H (1994) Reactive glycosylation end products in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 343: 1519-1522.

Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yan Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA,

Cerami A, Vlassara H (1991) Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 325: 836-842.

Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, Thompson A, Diener C, Schuler A, Huber G.

(1999) cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Molecular Brain Research* 71: 159–170.

March JC, Rao G, Bentley WE. (2003) Biotechnological applications of green

fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 303-315.

Marston FA. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in

Escherichia coli. *The Biochemical Journal* 15: 1-12.

- Mathaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU** (2000) Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine Reviews* 21: 585-618.
- Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E.** (2003) Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C α -mediated mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 47376-47387.
- Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S.** (2002) Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12: 258-262.
- Muñoz MC, Barberà A, Domínguez J, Fernández-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ.** (2001) Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 50: 131-138.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wangll F, Pan YCE, Elliston K, Stern D, Shaw A.** (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 14998-15004.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y.** (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18: 6169.
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H.** (2001a) CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *The journal of biological chemistry* 276: 3195-3202.
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H.** (2001b) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol

transport is inhibited by advanced glycation end products. *The journal of biological chemistry* 276: 13348–13355.

Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J. (1970) Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 65: 129-136.

Park IH, Yeon SI, Youn JH, Choi JE, Sasaki N, Choi IH, Shin JS. (2004) Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Immunology* 40: 1203–1211.

Park L, Raman K, Lee K, Lu Y, Ferran L, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by soluble receptor for AGE (sRAGE). *Nature Medicine* 4: 1025–1031.

Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, Rauvala H. (1993) Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMGI-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 19726-19736.

Peppas M, Vlassara H. (2005) Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview. *Hormones* 4:28-37.

Petersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant P, Groop PH. (2003) The functional –374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 52: 891–894.

Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving HH, Cambien F. (2001) Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50: 1214-1218.

- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A.** (1958) Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of Experimental Medicine* 108: 945-956.
- Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Lenti L, Sale P, Gradini R, Liu FT, Di Mario U.** (2000) The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product–receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating Galectin-3 expression. *Diabetes* 49: 1249-1257.
- Rauvala H, Merenmies J, Pihlaskari R, Korkkolainen M, Huhtala ML, Panula P.** (1988) The adhesive and neurite-promoting molecule p30: analysis of the amino-terminal sequence and production of antipeptide antibodies that detect p30 at the surface of neuroblastoma cells and of brain neurons. *The Journal of Cell Biology* 107: 2293-2305.
- Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht K, Thorpe S, Baynes J.** (1995) Carboxymethyllysine is a dominant AGE antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 34: 10872-10878.
- Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Lundh E, Morser J, Zhao L, Schmidt AM, Scherrmann JM, Wautier JL.** (1997) Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Molecular Pharmacology* 52: 54-62.
- Roessel P, Brand AH.** (2002) Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nature Cell Biology* 4: E15-E20.
- Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, Andrassy M, Marso SP, Duda S, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth PP, Stern DM, Schmidt AM, Naka Y.** (2003) Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 959-972.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, Ebina Y, Makino H, Smedsrød B, Horiuchi S.** (1998) Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 8630-8637.
- Scaffidi P, Misteli T, Brianchi ME.** (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191–195.
- Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J.** (2003) Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—a result of regulated alternative splicing?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1630: 1-6.
- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, Wang F, Pan YC, Tsang TC, Stern D.** (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 14987-14992.
- Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D.** (1994) The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 9882-9888.
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern DM.** (1995) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 VCAM-1 in cultured human endothelial cells and in mice. A Potential Mechanism for the Accelerated Vasculopathy of Diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 96: 1395–1403.

- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D.** (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circulation Research* 84: 489-497.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern D.** (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498: 99-111.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern D.** (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation* 108: 949-955.
- Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M.** (1998). Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *The Journal of Clinical Investigation* 101: 1142-1147.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L.** (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146.
- Soulis T, Thallas V, Youssef1 S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME.** (1997) Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 40: 619-628.
- Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM.** (2002a) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Research Reviews* 1: 1-15.
- Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM.** (2002b) Receptor for advanced glycation end products: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 1615-1625.

- Stitt AW.** (2003) The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Experimental and Molecular Pathology* 75: 95-108
- Stitt AW, He C, Burke G, Li YM, Vlassara H.** (1997) The advanced glycation endproduct (AGE) receptor complex: characterization in micro and macrovascular endothelium. *Diabetes* 46: 53A
- Stitt AW, He C, Vlassara H.** (1999) Characterization of the advanced glycation endproduct receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256: 549-978.
- Schütze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M, Krönke M.** (1999) Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 Tumor Necrosis Factor receptor death domain signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10203-10212.
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto KI, Mita K, Takahashi EI, Ando A, Inoko H, Ikemura T.** (1994) Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23: 408-419.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, Van Berkel TJ, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T.** (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292-296.
- Taguchi A, Blood DC, DelToro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu J, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O,**

- Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM.** (2000) Blockade of RAGE/Amphoterin suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 405: 354-360.
- Takada M, Koizumi T, Toyama H, Suzuki Y, Kuroda Y.** (2001) Differential expression of RAGE in human pancreatic carcinoma cells. *Hepatology* 48: 1577-1578.
- Takahashi K, Sawasaki Y.** (1992) Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool. *In vitro cellular & developmental biology: journal of the Tissue Culture Association* 28: 380-382.
- Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T.** (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In vitro cellular & developmental biology: journal of the Tissue Culture Association* 26: 265-274.
- Tamura Y, Adachi H, Osuga JI, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Shimano H, Nagai R, Kimura S, Tsujimoto M, Ishibashi S.** (2003) FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 12613-12617.
- Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H.** (2000) The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 25781-25790.
- Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF.** (1988) Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Journal of Molecular Biology* 203: 495-505.
- Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD.** (2000) Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and

nondiabetic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 11: 1656–1666.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 329 : 977-986.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1997) Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 46:1829-1839.

Thornalley P. (1998) Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cellular and Molecular Biology* 44: 1013-1023.

Titus JA, Haugland R, Sharrow SO, Segal DM. (1982) Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *Journal of Immunological Methods* 50: 193-204.

Tortorella LL, Pilch PF. (2002) C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression. *American journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283: E514-524.

Tsien RY. (1998) The Green Fluorescent Protein. *Annual review of biochemistry* 67: 509-544.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-853.

Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. (2007) Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the

- generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 76: 236-244.
- Urata Y, Yamaguchi M, Higashiyama Y, Ihara Y, Goto S, Kuwano M, Horiuchi S, Sumikawa K, Kondo T.** (2002) Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW 264.7 mouse macrophages. *Free radical biology & medicine* 32: 688-701.
- Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, Hughes TE.** (2004) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* 324: 68-78.
- Vlassara H.** (2001) The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 17: 436-443.
- Vlassara H, Palace MR.** (2002) Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine* 251: 87-101.
- Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A.** (1995) Identification of Galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-Receptor complex. *Molecular Medicine* 1: 634-646.
- Wautier JL, Guillausseau PJ.** (2001) Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab (Paris)* 27: 535-542.
- Wautier JL, Schmidt AM.** (2004) Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction. *Circulation Research* 95: 233-238.
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM.** (1996) Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble RAGE blocks hyperpermeability. *The Journal of Clinical Investigation* 97: 238-243.

- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern D, Schmidt AM, Wautier JL.** (2001) Activation of NADPH oxidase by AGEs links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *The American Journal of Physiology* 280: E685–E694.
- Wendt TM, Bucciarelli LG, Lu Y, Qu W, Fan L, Tsai M.** (2000) Accelerated atherosclerosis and vascular inflammation develop in apo E null mice with type 2 diabetes. *Circulation* 102 (suppl): II-231.
- Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM.** (2003 a) Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 14: 1383–1395.
- Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM.** (2003 b) RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *The American Journal of Pathology* 162: 1123–1137.
- Wikenheiser KA, Vorbroker DK, Rice WR, Clark JC, Bachurski CJ, Oie HK, Whitsett JA.** (1993) Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 11029-11033.
- Xu D, Kyriakis JM.** (2003) Phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent activation of renal mesangial cell Ki-Ras and ERK by advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 39349–39355.
- Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H** (1998) Advanced glycation end products inhibit prostacyclin production and induce

plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41: 1435-1441

- Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H.** (2001) Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *The Journal of Clinical Investigation* 108: 261–268.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D.** (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 9889-9897.
- Yan SD, Chen X, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern DM, Schmidt AM.** (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382: 685–691.
- Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern DM, Kindy M.** (2000) Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature Medicine* 6: 643–651.
- Yan SF, Ramasamy R, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Hudson BI, Stern DM, Lalla E, Yan SD, Rong LL, Naka Y, Schmidt AM.** (2004) RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications?. *Diabetes and vascular disease research* 1: 10-20.
- Yang BZ, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran, Vlassara H.** (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: Relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *The Journal of Experimental Medicine* 174: 515-524.

- Yang SS, Chan C, Thompson EB.** (1976) Rescue of a rat tropic rat hepatoma virus pseudotype Kirsten sarcoma virus by co-cultivation of hepatoma tissue culture cells with K-NRK cells. *Journal of General Virology* 31: 239-243.
- Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L.** (2001) Requirement for p38 and p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinases in RAGE-Mediated Nuclear Factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50: 1495-1504.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H.** (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochemical Journal* 370: 1097-1109.
- Zamenhof PJ, Villarejo M.** (1972) Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo. *Journal of Bacteriology* 110: 171-178.
- Zhang T, Kruys V, Huez G, Gueydan C.** (2002) AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of *trans*-activating factors. *Biochemical Society Transactions* 30: 952-958.
- Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Larson MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ.** (2003) Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation* 107: 2238-2243.
- Zimmer M.** (2002) Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behaviour. *Chemical reviews* 102: 759-781.