



TESI DOCTORAL

**LA VIA JAK/STAT COM A MEDIADORA
DE RESPOSTES A L'ESTRÈS OXIDATIU,
LA INFLAMACIÓ I LA IMMUNITAT
INNATA EN ASTRÒCITS**

ROSER GORINA MENDIZ

DECEMBRE 2007

ABREVIATURES

ABREVIATURES

AA	Àcid Araquidònic
ADN	Àcid deoxiribonucleic
AMPA	Àcid α -amino-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
APC	Cèl·lula presentadora d'antígens
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
BHE	Barrera hematoencefàlica
BSA	Albúmina de sèrum boví
cDNA	ADN complementari
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DCF	2',7'-diclorofluoresceïna
DCFH-DA	Diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna
DHE	Dihidroetidi
DMSO	Dimetilsulfòxid
dsRNA	ARN de doble hèlix
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
eIF2-α	Factor eucariòtic d'iniciació 2 α
FADD	Domini de mort associat a Fas
FBS	Sèrum boví fetal
FSC	Fluid sanguini cerebral
GFAP	Proteïna glial acídica fibril·lar
GSH	Glutatió
GSHPx	Glutatió peroxidasa
GSHR	Glutatió reductasa
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazina-N'- [2-àcid etanosulfònic])
HSP	Proteïna de shock tèrmic
LDH	Lactat deshidrogenasa
IFN	Interferó
IL	Interleuquina
IKK	I κ B kinasa
IRAK	Quinasa associada al receptor d'IL-1
IRF	Factor de resposta a interferó
LPS	Lipopolisacàrid bacterià
MCP-1	Proteïna quimioattractant de monòcits 1
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
MIP-1	Proteïna inflammatòria de macròfags 1

MMPs	Metal·loproteinases
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	3, (4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazoli bromidi
MyD88	Gen de resposta primaria a la diferenciació mieloide 88
NFκB	Factor nuclear Kappa-B
NO	Òxid nítric
NOS	Òxid Nítric Sintasa induïble
NOX	NADPH oxidasa
NAC	N-acetil-L-cisteïna
NMDA	N-metil-D-aspartat
OACM	Oclusió de l'artèria cerebral mitja
PAMP	Patró molecular associat a patògens
PARP	Poli-ADP Ribosa Polimerasa
PG	Propilgallat
PKR	Proteïna quinasa R
PIAS	Proteïnes inhibidores de STATs activades
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PRR	Receptor de reconeixement de patògens
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SDS	Sodi dodecil sulfat
SNC	Sistema Nerviós Central
SOCS	Supressor de la senyalització per citoquines
siRNA	Petit ARN d'interferència
SOD	Superòxid dismutasa
ssRNA	ARN de cadena simple
SSTH	Solució salina tamponada amb HEPES
STAT	Transductor de senyal i activador de la transcripció
TAK	Quinasa activada per TGF-β
TBK	<i>TRAF family member-associated NFκB (TANK)-binding kinase 1</i>
TGF-β	Factor de creixement transformant β
TIR	Receptor Toll/interleuquina-1
TIRAP	Proteïna associada a TIR
TLR	Receptor <i>Toll like</i>
TNF-α	Factor de necrosi tissular α
Tollip	<i>Toll interacting protein</i>
TRAF	Factor associate al receptor de <i>TNF</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN</i>
TRAM	Molècula adaptadora relacionada amb <i>TRIF</i>
VCAM-1	Molècula d'adhesió cel·lular-1
XD/XO	Xantina deshidrogenasa / Xantina oxidasa

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	3
1. VIA DE SENYALITZACIÓ JAK/STAT	3
1.1. Janus quinases (JAKs)	3
1.2. Transductors del senyal i activadors de la transcripció (STATs)	5
1.2.1. Efectes biològics de les proteïnes STATs	6
1.3. Activació de la via JAK/STAT	9
1.3.1. Translocació nuclear de les STATs	11
1.3.2. Activació transcripcional de les STATs	12
1.4. Regulació negativa de les STATs	13
1.5. Modificacions postranscripcionals de les STATs	15
2. RELLEVÀNCIA DE LA VIA JAK/STAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL	17
2.1. La isquèmia cerebral	17
2.1.1. La penombra isquèmica	17
2.1.2. Cascada isquèmica citotòxica	18
2.1.3. Dany per reperfusió	19
2.1.4. Paper de la via JAK/STAT en la isquèmia cerebral	20
2.1.4.1. La via JAK/STAT en el sistema nerviós central	20
2.1.4.2. Activació de la via JAK/STAT en la isquèmia cerebral ...	20
2.1.4.3. Paper de Stat1 i Stat3	21
2.2. Producció d'estrès oxidatiu en la isquèmia/reperfusió. L'estrès oxidatiu com a activador de la via JAK/STAT	23
2.2.1. Espècies reactives d'oxigen (ROS)	23
2.2.1.1. Química dels ROS	23
2.2.2. Efecte dels ROS en les macromolècules.....	25
2.2.3. Mecanismes de defensa antioxidants	26
2.2.4. Mecanismes de generació de ROS en la isquèmia/reperfusió	27
2.2.4.1. Producció de ROS a la cadena de transport electrònic...	28
2.2.4.2. Generació de ROS per sistemes enzimàtics prooxidants	29
2.2.4.3. ROS generats per cèl·lules infiltrades	33
2.2.5. Vies de senyalització activades per ROS	33
2.2.5.1. Vies redox activades en la isquèmia	34
2.2.6. Activació de la via JAK/STAT per l'estrès oxidatiu	36
2.3. Resposta inflamatòria a la isquèmia. Activació de JAK/STAT	37
2.3.1. Inflamació en el sistema nerviós central	37
2.3.2. El procés inflamatori en la isquèmia	37
2.3.2.1. Activació microglial	38
2.3.2.2. Migració leucocitària	39
2.3.3. Mediadors inflamatoris en la isquèmia	39
2.3.3.1. Molècules d'adhesió cel·lular	39
2.3.3.2. Citoquines	41

2.3.3.3. Quimioquines	44
2.4. Activació de la immunitat innata en la isquèmia cerebral. Inducció de la via JAK/STAT pel sistema immune innat	45
2.4.1. La resposta immunitària en el SNC	45
2.4.2. <i>Toll-like receptors</i> (TLRs)	46
2.4.2.1. Activació de NFκB en la senyalització dels TLRs	48
2.4.2.2. Inducció d'IFN de classe I per l'estimulació dels TLRs .	50
2.4.3. Activació del sistema immune en la isquèmia/reperfusió	53
3. ACTIVACIÓ DELS ASTRÒCITS EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL	54
3.1 Paper de l'astroglia en el sistema nerviós central	54
3.2. Efectes de l'astroglia en la supervivència neuronal durant la isquèmia / reperfusió	56
3.3. Resposta dels astròcits a la isquèmia/reperfusió	57
3.4. Els astròcits i l'estrès oxidatiu	58
3.5. Els astròcits en la inflamació i la immunitat	59
OBJECTIUS	63
MÈTODES	67
1. CULTIUS CEL·LULARS	69
1.1. Cultiu de glia mixta de rata	69
1.2. Cultiu de glia mixta de ratolí	69
1.3. Cultiu pur d'astròcits	70
1.4. Cultiu de microglia	71
1.5. Línies cel·lulars	71
1.5.1. Línia cel·lular NIH3T3	71
1.5.2. Descongelació de línies cel·lulars	72
1.5.3. Subcultiu de línies cel·lulars	72
1.5.4. Congelació de línies cel·lulars	72
2. MÈTODES DE MESURA DE LA VIABILITAT CEL·LULAR	73
2.1. Assaig d'exclusió del colorant Blau Tripà	73
2.2. Iodur de propidi	73
2.3. Assaig de l'activitat lactat deshidrogenasa	74
2.4. Assaig MTT	75
2.5. Assaig de l'activitat caspasa-3	76
3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ I FOSFORILACIÓ DE PROTEÏNES	78
3.1. Extracció de proteïnes totals	78
3.2. Determinació de la concentració de proteïna	78
3.3. Western-Blot	79
3.4. Immunofluorescència	83
3.5. ELISA	84

4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA	85
4.1. Extracció d'ARN	85
4.2. Quantificació d'ARN	86
4.3. Retrotranscripció	86
4.4. PCR en temps real.....	87
4.4.1. Taqman	87
5. MÈTODES DE DETERMINACIÓ D'ESTRÈS OXIDATIU	88
5.1.Determinació dels nivells intracel·lulars d'hidroperòxids mitjançant diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna	88
5.2.Determinació dels nivells intracel·lulars de superòxids mitjançant dihidroetidi	89
5.3. Mesura de la peroxidació lipídica: TBARS	90
5.4. Mesura de l'oxidació de proteïnes mitjançant la tècnica Oxiblot	91
6. SILENCIAMENT GÈNIC: ARN D'INTERFERÈNCIA	92
RESULTATS	95
RESUM DELS RESULTATS	97
Article nº 1: AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway	101
Article nº 2: Exposure of Glia to Pro-Oxidant Revealed Selective Stat1 Activation by H₂O₂ and Jak2-Independent Antioxidant Features of the Jak2 Inhibitor AG490	117
Article nº 3: Astrocytes are very sensitive to develop innate immune responses to short interfering RNA	131
Article nº 4: Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia	167
DISCUSSIÓ GENERAL	173
CONCLUSIONS	189
BIBLIOGRAFIA	193