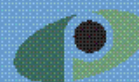


P. Pelegrín

La interleuquina-1 β (IL-1 β) en la dorada y en otros espáridos



UNIVERSIDAD DE MURCIA



Plan de Ciencia y Tecnología
Región de Murcia
2003-2006

ÍNDICE.....	3
ABREVIATURAS.....	9
LISTADO DE ESPECIES.....	15
RESUMEN.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	27
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	31
I. Introducción al sistema inmunitario.....	33
1. Generalidades.....	33
2. Sistema inmunitario de teleósteos.....	34
2.1. Órganos del sistema inmunitario de peces teleósteos.....	35
2.2. Sistema inmunitario innato.....	35
2.3. Sistema inmunitario adaptativo.....	37
3. Receptores del sistema inmunitario innato.....	39
3.1. Receptores solubles.....	39
3.2. Receptores intracelulares.....	39
3.3. Receptores de la superficie celular.....	39
3.3.1. TLR2.....	41
3.3.2. TLR4.....	41
3.3.3. TLR5.....	41
3.3.4. TLR9.....	42
II. Citoquinas.....	43
1. Introducción.....	43
2. Propiedades de las citoquinas.....	44
3. Funciones y clasificación de las citoquinas.....	44
3.1. Citoquinas que median la inmunidad natural.....	44
3.1.1. Interferon (IFN) tipo I.....	45
3.1.2. Factor de necrosis tumoral (TNF α).....	45
3.1.3. IL-1.....	46
3.1.4. Quimioquinas.....	47
3.2. Citoquinas que regulan la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria.....	47

3.2.1. IL-2.....	47
3.3. Citoquinas que regulan las células efectoras naturales.....	48
3.3.1. IFN γ	48
3.3.2. Factor transformador del crecimiento- β (TGF β).....	50
3.4 Citoquinas que estimulan la hematopoyesis.....	50
III. Interleuquina-1b	52
1. La familia de la interleuquina-1	52
2. La IL-1 β de los vertebrados.....	53
3. Procesamiento y mecanismo de secreción de la IL-1 β	56
4. Expresión y regulación de la IL-1 β	59
5. Receptores de la IL-1.....	60
CAPÍTULO I	
Clonación del gen de la interleuquina-1b de dorada	61
Material y métodos	63
1. Animales.....	63
2. Obtención de muestras.....	63
2.1. Riñón cefálico.....	63
2.2. Bazo	64
2.3. Exudado peritoneal.....	64
2.4. Hígado, branquia y cerebro.....	64
2.5. Sangre.....	64
2.6. Obtención de monocapas de macrófagos.....	65
3. Aislamiento de DNA y RNA.....	65
3.1. Homogenización.....	65
3.2. Separación de fases	65
3.3. Aislamiento de gDNA	65
3.4. Aislamiento de RNA.....	66
4. Producción de cDNA.....	66
5. Reacciones de amplificación (PCR)	66
6. Obtención de un fragmento del cDNA de la IL-1 β	67
7. RACE ("Rapid Amplification of cDNA ENDS")	68
8. Obtención del gen completo de la IL-1 β	69
9. Clonación de productos de PCR	69
10. Obtención de células competentes.....	69
11. Transformación de células competentes.....	70
12. Aislamiento de DNA plasmídico.....	70
13. Análisis de secuencias.....	70
14. Cultivo de <i>Vibrio anguillarum</i>	70
15. Obtención de gDNA de <i>Vibrio anguillarum</i>	71
16. Producción de sobrenadantes conteniendo citoquinas.....	71

17. Estudios de expresión.....	72
17.1. In vivo.....	72
17.2. In vitro.....	72
18. Clonación de la IL-1 β de otros espáridos.....	73
Resultados.....	74
1. Clonación de la IL-1 β de dorada.....	74
1.1. Clonación del extremo 3'.....	74
1.2. Clonación del extremo 5'.....	75
1.3. Clonación del gen completo de la IL-1 β	76
2. Análisis de la secuencia de la IL-1 β de dorada.....	77
3. Secuencia de la IL-1 β de otros espáridos.....	78
4. Homología con las IL-1 β s de otras especies.....	81
5. Expresión de la IL-1 β de dorada.....	83
5.1. Expresión in vivo.....	83
5.2. Expresión in vitro.....	84
CAPÍTULO II	
Obtención de un anticuerpo contra la interleuquina-1b de dorada.....	87
Material y métodos.....	89
1. Clonación del ORF DE LA IL-1 β de dorada.....	89
2. Construcción de un vector de expresión de la IL-1 β	90
3. Expresión de la IL-1 β recombinante en <i>Escherichia coli</i>	91
4. Purificación de la IL-1 β recombinante.....	91
5. Electroforesis de proteínas.....	92
6. Transferencia de proteínas y "Western blot".....	93
7. Producción de anticuerpos policlonales.....	94
Resultados.....	96
1. Clonación del ORF de la IL-1 β de dorada en pBluescript SK+.....	96
2. Construcción de un vector de expresión de la IL-1 β de dorada.....	97
3. Condiciones de expresión óptimas.....	98
4. Purificación de la IL-1 β	99
5. Obtención de un anticuerpo policlonal contra la IL-1 β de dorada.....	100
CAPÍTULO III	
Producción y mecanismo de secreción de la interleuquina-1b de dorada.....	103
Material y métodos.....	105
1. Cultivos primarios.....	105
1.1. Aislamiento de leucocitos de dorada.....	105
1.2. Aislamiento de macrófagos de ratón.....	105

2. Líneas celulares.....	105
2.1. SAF-1.....	105
2.2. J774.....	106
3. Tratamientos celulares.....	106
3.1. Ensayos de producción de IL-1 β	106
3.2. Ensayo de liberación de IL-1 β	106
4. Infecciones experimentales.....	106
5. Procesamiento de muestras.....	107
5.1. Extractos celulares.....	107
5.2. Sobrenadantes.....	107
5.3. Aislamiento de microvesículas.....	107
6. Digestión de VaDNA.....	107
7. Ensayo con anexina V.....	108
8. Procesamiento in vitro de la IL-1 β recombinante de dorada.....	108
Resultados.....	110
1. La IL-1 β de dorada se acumula intracelularmente en los leucocitos activados.....	110
2. Producción de la IL-1 β en el transcurso de una infección.....	111
3. El ATP extracelular no induce la liberación de la IL-1 β en leucocitos de dorada.....	112
4. El ATP extracelular no induce la exposición de fosfatidilserina en leuco- citos de dorada.....	113
5. El ATP extracelular promueve el procesamiento y la secreción de la IL-1 β en las células SAF-1.....	115
6. Procesamiento in vitro de la IL-1 β recombinante de dorada.....	117
DISCUSIÓN.....	119
1. Clonación de la IL-1 β de dorada.....	122
2. La secuencia de la IL-1 β de dorada.....	122
3. Clonación de la IL-1 β de otros espáridos.....	124
4. Expresión de la IL-1 β de dorada.....	124
5. Producción de un anticuerpo policlonal contra la IL-1 β de dorada.....	126
6. La IL-1 β de dorada se acumula intracelularmente en los leucocitos activados.....	126
7. El ATP extracelular no induce la liberación de la IL-1 β en leucocitos de dorada.....	127
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135

RESUMEN EN INGLÉS	157
Summary	159
Introduction	159
Materials and methods	161
1. Animals	162
2. Production of cDNA	162
3. Cloning and sequencing	162
4. Expression studies	163
5. Cloning of gilthead seabream IL-1 β into expression vector	163
6. Overexpression and purification of sbIL-1 β	164
7. Polyclonal anti-sbIL-1 β antibody	164
8. Cell culture and treatments	164
9. Western blot analysis	165
10. Annexin V binding	165
11. Protein determination	165
Results	166
1. Seabream IL-1 β cloning and sequencing	167
2. Seabream IL-1 β expression	167
3. sbIL-1 β is intracellularly accumulated by activated leukocytes	167
4. Extracellular ATP does not promote the release of sbIL-1 β by leukocytes	168
5. Extracellular ATP fails to induce PS flip in seabream leukocytes	169
6. Extracellular ATP promotes the secretion of a 22 kDa sbIL-1 β form by SAF-1 cells	169
Discussion	170
1. Seabream IL-1 β sequence	171
2. Seabream IL-1 β expression	171
3. Seabream IL-1 β production	172
4. Seabream IL-1 β secretion	172
5. Conclusion	174

Abreviaturas

α -6xHis	Anticuerpo anti-6xHis
λ DNA/ <i>Hind</i> III	Genoma del fago λ digerido con <i>Hind</i> III
α -sblL-1 β	Anticuerpo anti-IL-1 β de dorada
3ZD	Anticuerpo anti-IL-1 β humana y de ratón
6xHis	Epitopo de 6 histidinas
AEBSF	4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluorido hidrocloreídrico
APC	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPe	ATP extracelular
BR	Branquia
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
ConA	Concanavalina A
CpG	Motivos desoxicitidilato-fosfato-desoxiguanilato
CRP	Proteína C reactiva
CSF	Factor estimulador de colonias
CTL	Células T citotóxicas
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidina) butano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Exudado peritoneal
F	Oligonucleótido directo
FCA	Adyuvante completo de Freund
FIA	Adyuvante incompleto de Freund
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Fluorescencia verde
FL2	Fluorescencia roja
FSC	"Forward scatter"
gDNA	DNA genómico
HBSS	Tampón Hank's
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRP	Peroxidasa de rábano
hrTNF α	TNF α recombinante humano
ICa	Ionóforo de calcio A23187
ICE	Enzima convertidora de IL-1 β o caspasa 1

IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-1R	Receptor de la interleuquina-1
IL-1RI	Receptor tipo I de la interleuquina-1
IL-1RII	Receptor tipo II de la interleuquina-1
iNOS	Sintetasa de NO inducible
IP	Ioduro de propidio
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
JNK	Quinasa N-terminal de Jun
L-15	Medio de cultivo Leibovitz's
LAK	Células agresoras activadas por linfoquinas
LB	Medio Luria-Bertani
LBP	Proteína plasmática de unión a LPS
I-MAF	MAF producido por linfocitos
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
LTA	Ácido lipoteicoico
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAF	Factor activador de macrófagos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MBL	Lectina de unión a manosa
MCP-1	Proteína quimiotáctica del monocito-1
MDP	Muramildipéptido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MLR	Reacciones linfocitarias mixtas
m-MAF	MAF producido por macrófagos
MMR	Receptor de manosa de los macrófagos
mRNA	RNA mensajero
MSR	Receptor basurero de los macrófagos
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
NK	Células agresoras naturales
NOD	Proteínas con un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
nt	Nucleótidos
OAS	2',5'-oligoadenilato sintetasa
ORF	Marco abierto de lectura
PAMP	Patrón molecular asociado a los patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
pl	Punto isoelectrico

PKR	Quinasa de proteínas R
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
Poli(A)	Poliadenina
ProIL-1 β	Precursor de la IL-1 β
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PS	Fosfatidilserina
PTG	Protegrina
R	Oligonucleótido reverso
RACE	Amplificación rápida de los extremos del cDNA
ralL-1	Antagonista del receptor de la IL-1
RC	Riñón cefálico
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RNI	Intermediarios de nitrógeno reactivos
ROI	Intermediarios de oxígeno reactivos
RT	Retrotranscripción
SAP	Proteína amiloide del suero
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
sPLA2	Forma soluble de la fosfolipasa A2
sRPMI	Medio RPMI-1640 + 0'35% NaCl
TCA	Ácido tricloroacético
TCM (2x)	20mM TrisHCl, 20 mM CaCl ₂ , 20 mM MgCl ₂ , pH=7'5
TCR	Receptor de las células T
TdT	Enzima transferasa de deoxinucleótidos terminal
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF	Factor transformante del crecimiento
Th	Linfocitos T cooperadores
TIR	Dominio Toll/IL-1R
TLR	Receptores semejantes a Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-R1	Receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral
TSB-1	Caldo de triptona de soja + 1% NaCl
UTR	Secuencia no traducida
UV	Ultravioleta
VaDNA	DNA genómico de <i>Vibrio anguillarum</i>
VHS	Virus de la septicemia hemorrágica
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YVAD-CHO	Inhibidor específico de la caspasa 1

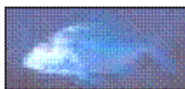
Listado de especies



Anguila (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758)



Carpa común (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)



Dentón (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758)



Dorada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)



Esturión siberiano (*Acipenser baerii* Brandt, 1869)



Lamprea de río (*Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758)



Lubina (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758)



Pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822)



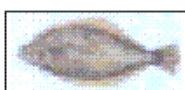
Pez gato norafricano (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822)



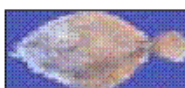
Pez rojo (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758)



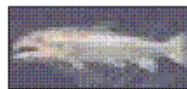
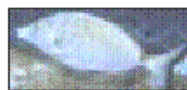
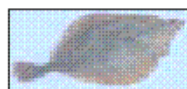
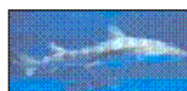
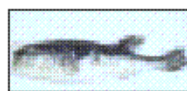
Pintarroja (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758)



Platija japonesa (*Paralichthys olivaceus* Temminck y Schlegel, 1846)



Rodaballo (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)

Salmón (*Salmo salar* Linnaeus, 1758)Sargo (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777)Solla (*Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758)Tollo rayado (*Triakis scyllium* Müller y Henle, 1839)Torafugu (*Fugu rubripes* Temminck y Schlegel, 1850)Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Resumen

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la caracterización de la interleuquina-1 β (IL-1 β) de dorada (*Sparus aurata* L.). Nuestro trabajo se ha elaborado en tres etapas.

En una primera etapa se abordó la clonación del gen de la IL-1 β de dorada mediante una aproximación por clonación homóloga utilizando RT-PCR. El cDNA de la IL-1 β de dorada contiene 1.271 nucleótidos (nt) que incluyen un marco de lectura abierta de 762 nt, un extremo 5' no traducido (UTR) de 102 nt y un extremo 3' UTR de 407 nt. El gen está compuesto por 5 exones y 4 intrones. La secuencia posee un alto grado de homología a nivel de aminoácidos con otras IL-1 β de peces (del 38% al 96%), encontrándose la mayor homología con las secuencias de sargo (*Diplodus puntazzo*) y de dentón (*Dentex dentex*), especies de la misma familia que la dorada y cuyas IL-1 β s también han sido parcialmente obtenidas en el presente trabajo. El transcrito de la IL-1 β se acumula en diferentes órganos linfomieloides en peces infectados experimentalmente con la bacteria *Vibrio anguillarum*, así como en leucocitos y macrófagos estimulados *in vitro* con derivados bacterianos (LPS y DNA) y linfoquinas.

En la segunda etapa del estudio, la IL-1 β de dorada se expresó en *Escherichia coli* como una proteína de fusión a 6xHis y se purificó mediante cromatografía de afinidad a una resina de cobalto. La IL-1 β purificada se utilizó como inmunógeno para obtener un anticuerpo policlonal específico.

La última etapa del presente trabajo se centró en el estudio de la producción y el mecanismo de liberación de la IL-1 β de dorada utilizando el anticuerpo obtenido. Tanto el LPS y el DNA bacteriano como las linfoquinas fueron capaces de inducir la acumulación intracelular de un polipéptido de unos 30 kDa que represente el precursor de la IL-1 β (proIL-1 β). La adición de ATP no produjo el procesamiento ni la liberación de la IL-1 β en las células de riñón cefálico. Sin embargo, la adición de ATP a los fibroblastos de la línea celular de dorada SAF-1 produce la liberación de microvesículas conteniendo una forma de la IL-1 β de unos 22 kDa. La adición de un inhibidor específico de la caspasa 1 previene el procesamiento post-traducciona l de la IL-1 β , resultando en la liberación de la proIL-1 β tras la adición de ATP.

Introducción

Los estudios de inmunología comparada en peces están despertando un interés científico básico creciente, debido a la posición filogenética de este grupo de vertebrados. Los peces son el primer grupo animal que muestra las respuestas inmunitarias innata (inespecífica) y adaptativa (específica) bien estructuradas como tales. Esta distinción entre vertebrados e invertebrados parece representar la mayor dicotomía en los sistemas de defensa de los animales (Van Muiswinkel, 1995). Además, la existencia de un patrón común para el sistema inmunitario de todos los vertebrados no excluye la existencia de diferencias claras tanto entre ejemplares de una misma especie como entre las diferentes especies pertenecientes a este grupo de animales. Quizás la más importante sea el gran desarrollo y preponderancia de los mecanismos de defensa innatos de peces, en contraste con la potente y bien desarrollada respuesta adaptativa de vertebrados superiores (Anderson, 1992).

Por otra parte, el desarrollo considerable de la acuicultura en las últimas décadas, como alternativa al uso de unos recursos pesqueros castigados por la sobreexplotación y por la contaminación, ha despertado un interés añadido al conocimiento de los mecanismos de defensa de los peces (Anderson, 1992). La práctica de la piscicultura supone el cultivo de un gran número de ejemplares en espacios limitados y una manipulación más o menos periódica (transporte, clasificación, etc.), que desencadenan situaciones de estrés en los animales. Todas estas condiciones favorecen el desarrollo de enfermedades infecciosas, que son las responsables de cuantiosas pérdidas económicas. Por ello, el conocimiento del sistema inmunitario de los peces en general, y de las especies objeto de cultivo en particular, se ha convertido en objetivo prioritario de estudio.

En este contexto, el grupo de investigación del que formo parte tiene una larga trayectoria trabajando en el estudio del sistema inmunitario innato de especies mediterráneas de peces, tales como la dorada (*Sparus aurata* L.) y la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.), de gran interés comercial tanto para la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia como para la Unión Europea. En concreto, las investigaciones de nuestro grupo se han centrado en el estudio de las respuestas del sistema inmunitario innato y en el empleo de inmunoestimulantes que permitan prevenir las enfermedades en estas especies. Además, en los últimos años los estudios se han ampliado a la caracterización molecular de las citoquinas, por ser las principales moléculas que coordinan las respuestas inmunitarias innata y adquirida.

En este marco se engloba el objeto de la presente Tesis Doctoral, en la que se aborda el estudio de uno de los principales mediadores de la inflamación y de la respuesta inmunitaria, la interleuquina-1 β (IL-1 β) en la dorada y en otros espáridos. Se ha llevado a cabo la caracterización molecular de esta citoquina y la producción de anticuerpos específicos contra ella, permitiéndonos abordar el estudio de su relevancia en el sistema inmunitario de los peces y abriendo una nueva línea de trabajo para el futuro próximo.

Objetivos

El presente trabajo se propone los siguientes objetivos concretos:

- Clonar y caracterizar el gen de la *IL-1 β* de dorada y de otros espáridos.
- Estudiar las relaciones filogenéticas de la *IL-1 β* de dorada con las *IL-1 β* s de otros vertebrados.
- Obtener la *IL-1 β* recombinante de dorada y producir anticuerpos específicos contra ella.
- Estudiar la expresión de la *IL-1 β* de dorada *in vitro* e *in vivo*.
- Estudiar el procesamiento post-trasduccional y el mecanismo de secreción de la *IL-1 β* de dorada.

Revisión bibliográfica

I. Introducción al sistema inmunitario

1. Generalidades

La **inmunidad** es una reacción frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos (virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares) y las macromoléculas (proteínas y polisacáridos), sin implicar la consecuencia patológica de tal reacción (Abbas y col., 1995). El sistema inmunitario está formado por las células y las moléculas que son responsables de la inmunidad, y la respuesta coordinada y colectiva de éstas frente a sustancias extrañas constituye la respuesta inmunitaria. Debido a la gran diversidad de agentes infecciosos, se requieren una gran variedad de respuestas inmunitarias para poder combatir cada tipo de infección (Male y Roitt, 1996).

La respuesta inmunitaria se inicia con el reconocimiento del patógeno o del material extraño, para terminar desarrollando un mecanismo capaz de eliminarlo (Male y Roitt, 1996). La respuesta inmunitaria se puede dividir en dos ramas: innata (natural o inespecífica) y adaptativa (adquirida o específica). La diferencia fundamental entre ambas es que la adaptativa es altamente específica para un patógeno en particular y es más efectiva con cada encuentro sucesivo con el mismo patógeno. Por tanto, podemos decir que las dos características claves de la respuesta inmunitaria adaptativa son la especificidad y la memoria (Male y Roitt, 1996).

Dentro de la respuesta innata se incluyen las barreras físicas, las células fagocíticas y los eosinófilos, las células agresoras naturales (NK) y varias moléculas de la sangre (complemento y proteínas de la fase aguda) (Abbas y col., 1995; Male y Roitt, 1996). Estos componentes actúan como una primera barrera de defensa frente a la infección hasta que se desencadena la respuesta específica.

La respuesta adaptativa engloba a los linfocitos y a sus productos de secreción, los anticuerpos, y aparece exclusivamente en los vertebrados (Abbas y col., 1995). Los linfocitos son capaces de reconocer específicamente los patógenos individuales tanto si están dentro de las células del huésped como si se encuentran en los fluidos o en la sangre (Male y Roitt, 1996). Existen dos categorías principales de linfocitos: los linfocitos T (células T) y los linfocitos B (células B). Las células B se encargan de reconocer y de combatir los patógenos extracelulares y sus productos a través de sus secreciones, los anticuerpos, los cuales tienen la propiedad de unirse a una molécula diana, denominada antígeno. Las células T por su parte poseen un gran número de actividades. Los linfocitos T cooperadores (Th) intervienen regulando el desarrollo y la producción de anticuerpos por parte de las células B o bien interactúan con las células fagocíticas ayudándolas a destruir los patógenos que han fagocitado. Otro tipo de linfocitos T, las células T citotóxicas (CTL), reconocen y destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales.

Las respuestas innata y adaptativa actúan de forma integrada y coordinada. En la práctica existe una interacción considerable entre los linfocitos y los fagocitos (Male y Roitt, 1996). Por ejemplo, algunos fagocitos ingieren y degradan los antígenos y los presentan a los linfocitos T en superficie unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en

una forma adecuada para que estos puedan reconocerlos. A este proceso se le denomina presentación de antígeno. En respuesta, los linfocitos secretan factores solubles (citoquinas), los cuales activan a los fagocitos para poder destruir a los patógenos que han fagocitado. En otro tipo de interacciones los fagocitos utilizan los anticuerpos producidos por las células B para poder reconocer y fagocitar más fácilmente a los patógenos. La consecuencia de todas estas interacciones es que la mayoría de las respuestas inmunitarias frente a los organismos patógenos constan de una gran variedad de componentes innatos y adaptativos. En las primeras fases de la infección, la respuesta innata predomina, pero posteriormente los linfocitos empiezan a generar la respuesta adaptativa.

2. Sistema inmunitario de teleósteos

El sistema inmunitario de los teleósteos muestra características similares al de aves y mamíferos, presentando respuestas celulares y humorales que poseen las características de ser específicas y de tener memoria (Van Muiswinkel, 1995). Por lo tanto, los teleósteos tienen las dos ramas del sistema inmunitario bien diferenciadas. La respuesta innata consta de barreras físicas (epitelios y mucosas), de efectores celulares (fagocitos y células citotóxicas no específicas) y de factores humorales (complemento y otras proteínas de la fase aguda). La respuesta adaptativa, por su parte, engloba a un componente celular (linfocitos) y a otro humoral (anticuerpos).

A pesar de las semejanzas entre el sistema inmunitario de teleósteos y el de otros vertebrados, también existen diferencias claras. La más importante es que los peces dependen en mayor grado de los mecanismos de defensa innatos que los mamíferos (Fig. 1). Esto es especialmente cierto en condiciones ambientales de baja temperatura (los peces son animales poiquilotermos), ya que la respuesta inmunitaria adaptativa es dependiente de la temperatura (Cuchens y Clem, 1977; Avtalion, 1981; Abruzzini y col., 1982; Miller y Clem, 1984; Clem y col., 1984; Clem y col., 1991).



Figura 1. Importancia relativa del sistema inmunitario innato y adaptativo en la defensa del animal frente a la infección. Adaptado de Anderson (1992).

2.1. Órganos del sistema inmunitario de peces teleósteos

Hasta el momento, todos los órganos y tejidos del sistema inmunitario de las especies de teleósteos estudiadas presentan un carácter mixto, no habiéndose encontrado órganos exclusivamente linfoides por lo que se hace referencia a órganos y tejidos linfomieloides. No obstante, por semejanza con el patrón de vertebrados, se los ha clasificado como en mamíferos, en órganos primarios y secundarios (Zapata y col, 1996).

Órganos primarios

Los peces carecen de médula ósea, siendo el riñón su órgano hematopoyético por excelencia. Este órgano consta de dos partes, la anterior o cefálica, con función hematopoyética fundamentalmente, y la posterior, que tiene función excretora básicamente. Las células hematopoyéticas aparecen agrupadas entre las del estroma reticular del órgano. El equivalente al otro órgano primario de mamíferos, el timo, está representado por masas de tejido linfomieloide que aparecen junto a las branquias. Está formado fundamentalmente por linfocitos y su función primordial parece ser la de generar linfocitos T.

Órganos secundarios

En peces no existen nódulos linfoides, el órgano linfoide secundario más importante es el bazo. Aunque presenta pocos linfocitos, tras la administración de un antígeno éstos aumentan en número considerablemente. Algunos estudios funcionales parecen indicar la presencia de linfocitos T y B en este órgano. El MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) representa acumulaciones de linfocitos, principalmente sin encapsular, cuya función no ha sido completamente estudiada. Se ha visto que son capaces de atrapar antígenos y liberar inmunoglobulinas (Ig) tipo M (IgM).

2.2. Sistema inmunitario innato

Barreras físicas y químicas

La primera línea de defensa frente a la invasión por microorganismos la constituyen las escamas, la piel y su secreción, el mucus. La función mas importante del mucus es prevenir la unión de bacterias, hongos o parásitos a las superficies epiteliales (Van Muiswinkel, 1995) y la de digerir a los microorganismos que quedan atrapados entre los complejos de mucopolisacáridos que lo forman gracias a la actuación de una batería de enzimas líticos entre los que destacan la lisozima, aunque también posee otras moléculas como la proteína C reactiva o Ig que se encargan de ampliar sus funciones (Alexander e Ingram, 1992).

Efectores celulares

Una gran variedad de tipos de leucocitos están involucrados en la defensa innata celular de los peces. Entre ellos se incluyen a los fagocitos (monocitos/macrófagos y granulocitos) y a las células citotóxicas no específicas (Secombes, 1996). De éstas, las más importantes para la inmunidad innata son los fagocitos, los cuales se encargan de eliminar virus, bacterias y parásitos. En este contexto los monocitos/macrófagos son las células con

mayor capacidad fagocítica en peces tanto *in vitro* como *in vivo* (Rowley y col., 1988; Secombes y Fletcher, 1992) y no sólo desempeñan un papel en los sistemas de defensa innatos, sino que también pueden ser el primer paso para la activación y regulación de la respuesta inmunitaria específica (Clem y col., 1985; Clem y col., 1991; Vallejo y col., 1992). La capacidad fagocítica de los granulocitos en peces no está del todo especificada, existiendo pocos datos referidos a unas cuantas especies y contradictorios al respecto, debido a que existe una gran heterogeneidad morfofuncional interespecífica (Rowley y col., 1988; Suzuki e Iida, 1992; López-Ruiz y col., 1992; Meseguer y col., 1994). El trombocito es otro de los tipos celulares de peces cuya acción fagocítica no está del todo establecida, ya que algunos de los autores que han descrito la presencia de material foráneo en el citoplasma de estas células consideran que se encuentra en el sistema de canales de conexión superficial y por lo tanto en contacto directo con el medio externo que rodea a la célula (Daimon y Uchida, 1985); mientras que otros consideran que se trata de verdadera fagocitosis (Meseguer y col., 2002).

El proceso de fagocitosis que llevan a cabo los leucocitos de peces muestra las mismas etapas que el que llevan a cabo los fagocitos de mamíferos, caracterizándose ultraestructuralmente un primer contacto entre partícula a fagocitar y fagocito, el desarrollo de pseudópodos por parte del fagocito para englobar a la partícula a fagocitar, la formación de vesículas de endocitosis, la posterior formación de fagolisosomas y, por último, la digestión intracelular del material fagocitado (Esteban y Meseguer, 1994). El último paso de la fagocitosis lleva asociados dos mecanismos responsables de la muerte de los microorganismos fagocitados. Éstos son (1) la producción de intermediarios de oxígeno reactivos (ROI) con un incremento rápido y brusco en la tasa de consumo de oxígeno que se conoce como explosión o estallido respiratorio y que es independiente de la respiración mitocondrial; y (2) la producción de óxido nítrico (NO) y otros intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI). El primer paso en la explosión respiratoria está catalizado por la NADPH oxidasa, la cual produce la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido (O_2^-) que dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (Abbas y col., 1995). Otros tipos de ROI son el radical hidroxilo o el oxígeno singlete que se forman tras la interacción del O_2^- con el H_2O_2 . Todos estos productos son producidos por los fagocitos de peces (Nash y col., 1987; Chung y Secombes, 1988; Secombes y col., 1988; Plytycz y col., 1989). También existen evidencias de una actividad NADPH oxidasa en los fagocitos de peces (Secombes y Fletcher, 1992) y que los ROI producidos durante la explosión respiratoria en estos fagocitos tienen actividad bactericida (Sharp y Secombes, 1993; Skarmeta y col., 1995).

Las especies reactivas del nitrógeno (RNI), como NO, se generan cuando los macrófagos son activados por citoquinas, lipopolisacárido (LPS) o parásitos (Nathan, 1992). El NO es sintetizado a partir de la oxidación de una arginina por la acción de la forma inducible de la sintetasa de NO (iNOS) (Iyengar y col., 1987; Hibbs y col., 1987). Tanto el NO como otra serie de RNI desempeñan un papel central en los mecanismos de defensa celular contra virus, bacterias, protozoos, helmintos y tumores (Nathan y Hibbs, 1991). Existen evidencias de que los macrófagos de peces son capaces de producir NO *in vitro* cuando son activados apropiadamente (Neumann y col., 1995; Wang y col., 1995;

Mulero y Meseguer, 1998) y este parece ser tóxico para las bacterias patógenas de peces *Aeromonas salmonicida* y *Renibacterium salmoninarum* (Campos-Pérez y col., 1996) y también parece que contribuye de forma significativa en la actividad bactericida de los macrófagos del pez gato norafricano (*Clarias gariepinus*) (Yin y col., 1997). Finalmente también se ha clonado el cDNA de la iNOS mediante RT-PCR (retrotranscriptasa-reacción en cadena de la polimerasa) de macrófagos activados con LPS procedentes de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Hardie y col., 1994a; Laing y col., 1999a) y una secuencia parcial de este gen en pez rojo (*Carassius auratus*) (Laing y col., 1996). Recientemente también ha sido clonado el gen completo de la iNOS de trucha arcoiris (Wang y col., 2001a).

Por último se ha caracterizado una población heterogénea de células citotóxicas no específicas en peces que parece ser funcionalmente equivalente a las células NK de mamíferos, ya que tienen capacidad para lisar células tumorales de mamíferos y determinados protozoos parásitos de peces, pudiendo ser algunos de estos tipos celulares precursor filogenético de las células NK de mamíferos (Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Meseguer y col., 1999).

Factores humorales

Hay una gran diversidad de sustancias que actúan en la defensa innata de los peces (Alexander e Ingram, 1992). Éstas se pueden clasificar funcionalmente en: (1) inhibidores del crecimiento bacteriano, como la transferrina, antiproteasas y ceruloplasmina; (2) inhibidores de la replicación viral, como el interferón; (3) inhibidores de toxinas bacterianas; (4) lisinas, como la lisozima o la quitinasa; (5) aglutininas y precipitinas, como las lectinas y la proteína C reactiva; y por último (6) los componentes del complemento que desempeñan una gran cantidad de funciones, entre las que destaca la actividad quimiotáctica para leucocitos (Lamas y Ellis, 1994), la opsonización (Sakai, 1984a), la inactivación de determinadas toxinas (Von Eschen y Rudbach, 1974; Ellis y col., 1981; Sakai, 1984b), actividad bactericida (Sakai, 1983), citotoxicidad (Sakai, 1992) e inactivación viral (Sakai, 1992).

2.3. Sistema inmunitario adaptativo

Los anticuerpos son los principales mediadores de la respuesta inmunitaria adaptativa, junto con sus células productoras, los linfocitos. Estudios *in vitro* han demostrado que los peces poseen dos poblaciones de linfocitos que son equivalentes a las células B y T de los mamíferos. Estos estudios conjugan el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra los determinantes antigénicos de la superficie de los linfocitos y ensayos inmunológicos funcionales. Los mAbs contra la IgM del suero de los teleósteos son capaces de reaccionar con sólo una de las poblaciones de linfocitos (Lobb y Clem, 1982; Deluca y col., 1983; Secombes y col., 1983; Navarro y col., 1993) sugiriendo que las Ig de superficie pueden ser un marcador para células semejantes a las B y permitiendo la separación de las dos poblaciones de linfocitos de teleósteos: Ig⁺ e Ig⁻. Con estas dos poblaciones se han realizado posteriores estudios funcionales, que revelan que los linfocitos Ig⁺ e Ig⁻ de los peces tienen las características funcionales de los linfocitos B y T de mamíferos, respectivamente (Deluca y col., 1983; Sizemore y col., 1984; Miller y col., 1986; Graham y Secombes, 1990a; Marsden y col., 1995). Recientemente se ha confirmado la existencia de linfocitos T en peces

teleósteos al secuenciarse los genes que cifran el receptor de las células T (TCR) (Haire y col., 2000; Wang y col., 2001b; Wernmenstam y Pilstrom, 2001; Nam y col., 2003) y las proteínas CD3 (Alabyev y col., 2000) y CD8 (Hansen y Strassburger, 2000).

El sistema inmunitario adaptativo de teleósteos, al igual que el de mamíferos, presenta memoria (Van Muiswinkel, 1995). Así, tras un primer contacto con el antígeno, se produce un menor título de anticuerpos específicos en el suero que el que se produce en un posterior contacto con el mismo antígeno (respuesta secundaria). Los niveles de estas respuestas son dependientes de la temperatura. Sin embargo, en la respuesta secundaria no se observa ningún cambio en la afinidad de las Igs por el antígeno. (Harrell y col., 1975; Arkoosh y Kaattari, 1991). La forma más común de Ig en el suero de los teleósteos es una forma tetramérica que normalmente es denominada IgM por su alto peso molecular y por su estructura polimérica, aunque presenta una baja homología de secuencias (24%) con las cadenas μ de la IgM de mamíferos (Kaattari y Piganelli, 1996). Esta Ig posee varias funciones, incluyendo la activación de la cascada del complemento que termina lisando al patógeno invasor y la unión a los antígenos de la superficie de las células invasoras o de células infectadas por virus, señalando así la diana para la posterior actuación de las células citotóxicas y fagocíticas.

Como ya hemos comentado, la iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa está controlada por los macrófagos que funcionan como células presentadoras de antígenos (APC), degradando y presentando los antígenos junto con las proteínas del MHC a los linfocitos para que estos puedan reconocerlos (Clem y col., 1985; Vallejo y col., 1992). Por su parte, los linfocitos pueden producir citoquinas que activan a los macrófagos tras ser estimulados con un antígeno (Graham y Secombes, 1988), observándose, por tanto, una coordinación y un control mutuo entre las dos respuestas inmunitarias, la innata y la adaptativa.

Propiedad	Sistema Inmunitario Innato	Sistema Inmunitario Adaptativo
Receptores	Fijos en el genoma No se precisa reordenación génica	Cifradas por segmentos de genes Se necesita reorganización génica
Distribución	No clonal, todas las células de un mismo tipo son idénticas	Clonal, las células de un mismo tipo son distintas
Reconocimiento	Patrones moleculares conservados (LPS, mananos, glucanos, etc.)	Detalles de la estructura molecular (proteínas, péptidos y carbohidratos)
Distinción entre la propia y no propia	Perfecta: seleccionada por la evaluación	Imperfecta: seleccionada en células somáticas individuales
Tiempo de acción	Activación de los efectores inmediata	Activación de los efectores retrasada
Respuesta	Moléculas co-estimuladoras Citoquinas (IL-1 β , TNF α , IL-6) Quimioquinas (IL-8)	Expansión clonal a energía IL-2 Citoquinas efectores (IL-4, IFN γ)

Tabla 1. Inmunidad innata y adaptativa. Adaptado de Janeway y Medzhitov (2002).

3. Receptores del sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato es un mecanismo universal y ancestral para la defensa del hospedador frente a infecciones que es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) (Janeway y Medzhitov, 2002). Actualmente, se tiende a disminuir las diferencias entre los sistemas inmunitario innato y adaptativo (Tabla 1), ya que el sistema inmunitario innato es también muy específico.

El sistema inmunitario innato utiliza un amplio espectro de receptores que reconocen a los PAMPs y que han sido denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores pueden estar presentes en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o pueden estar solubles en la sangre o en los fluidos tisulares (Medzhitov y Janeway, 1997). Las principales funciones de estos receptores incluyen la opsonización, la activación de las cascadas del complemento y la coagulación, la fagocitosis, la activación de vías de señales proinflamatorias y la inducción de la apoptosis (Medzhitov y Janeway, 1997).

3.1. Receptores solubles

Entre estos receptores se encuentran la lectina de unión a manosa (MBL), la proteína C-reactiva (CRP) y la proteína amiloide del suero (SAP). Son moléculas que reconocen PAMPs y se producen en el hígado durante la fase aguda de una infección (Gewurz y col., 1982; Schwalbe y col., 1992; Fraser y col., 1998). La CRP y la SAP pueden actuar opsonizando patógenos ya que reconocen la fosforilcolina de la superficie bacteriana (Gewurz y col., 1982; Schwalbe y col., 1992) y también pueden activar la ruta clásica del complemento (Agrawal y col., 2001). La MBL se une específicamente a residuos terminales de manosa, que abundan en la superficie de muchos microorganismos, y también puede iniciar la ruta de la lectina del complemento (Fraser y col., 1998).

3.2. Receptores intracelulares

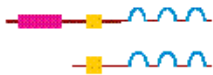
Muchos PRRs se encuentran en el interior de la célula donde se encargan de detectar patógenos intracelulares (virus y algunas bacterias) e inducir respuestas que bloquean su replicación. La quinasa de proteínas R (PKR) se activa al unirse al RNA de doble cadena vírico y bloquea la síntesis de proteínas en la célula (Clemens y Elia, 1997), induce la expresión de genes antivirales como el interferón de tipo I y promueve la apoptosis en las células infectadas (Williams, 1999). Otros tipos de proteínas antivirales son la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) (Kumar y Carmichael, 1998) y la familia de proteínas que poseen un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (Inohara y col., 1999).

3.3. Receptores de la superficie celular

Una gran variedad de receptores presentes en la superficie de los macrófagos funcionan como PRRs, entre ellos están los encargados de fagocitar a los microorganismos.

Un PRR de este tipo es el receptor de manosa de los macrófagos (MMR) que interacciona con una gran variedad de bacterias y hongos (Fraser y col., 1998). Otro es el receptor basurero de los macrófagos ("Macrophage Scavenger Receptor", MSR) que posee una especificidad para una amplia variedad de ligandos polianiónicos, entre los que se incluyen el RNA de doble cadena, el LPS y el ácido lipoteicoico (LTA) (Pearson, 1996). El MSR protege contra los choques endotóxicos y posee un importante papel en la defensa del huesped (Suzuki y col., 1997; Thomas y col., 2000).

Una familia de PRRs recientemente descubierta son los receptores semejantes a las proteínas Toll de *Drosophila melanogaster* ("Toll-Like Receptors", TLRs). Estos receptores se diferencian entre ellos en su especificidad por los ligandos, en sus patrones de expresión y en los genes que terminan induciendo. Los TLRs poseen un dominio intracelular homólogo al receptor de la IL-1, denominado dominio Toll/IL-1R (TIR), y ambos pertenecen a la superfamilia de receptores IL-1/TLR (Tabla 2) (O'Neill, 2000). Miembros de esta familia han sido descritos en insectos y plantas, por lo tanto, las vías de transducción de la señal desencadenadas por el dominio TIR, que terminan con la activación del factor κ B nuclear (NF- κ B), son una maquinaria ancestral de señales intracelulares común a todos los eucariotas (O'Neill y Greene, 1998).

Nombre		Ligando	Dominios
IL-1R	IL-1RI IL-1RII	IL-1	
TLRs		PAMPs	

 Dominio de membrana
 Dominio TIR (Toll/IL-1R)
 Dominio Ig
 Repeticiones ricas en leucina (LRRs)

Tabla 2. Receptores de la familia IL-1/TLR de los vertebrados.

Aunque los TLRs son un grupo de receptores muy importante para la respuesta inmunitaria innata, actualmente sólo se conoce la existencia de estos receptores en mamíferos y en aves. Así, se han clonado dos receptores de esta familia en pollo, que presentan una alta homología entre ellos y con el TLR2 de mamíferos. Uno de los TLR de pollo es capaz de reconocer las lipoproteínas y el LPS de los microorganismos, que son dos de los principales PAMPs. Este TLR cubriría por sí solo la función que en mamíferos tiene el TLR2 y el TLR4 (Fukui y col., 2001). En mamíferos, se han identificado un total de diez TLRs tanto en humanos como en ratones (Janeway y Medzhitov, 2002).

En peces existen diferentes estudios funcionales que demuestran la activación del sistema inmunitario a través del reconocimiento de distintos PAMPs que en mamíferos son reconocidos por los TLRs. Podríamos destacar el LPS (Bird y col., 2002a) y los motivos deoxitidilato-fosfato-deoxiguanilato (CpG) del DNA bacteriano (Jørgensen y col., 2001; Oumouna y col., 2002). Recientemente, al secuenciarse el genoma completo del

pez japonés torafugu (*Fugu rubripes*) se han encontrado 10 genes homólogos a los TLRs de mamíferos: los TLR2, 3, 5, 5s, 7, 8 y 9, un TLR (denominado TLR1) que comparte homología con los TLR1, 6 y 10 de humanos y dos TLRs específicos de este pez (el TLR21 y el TLR22) (Oshiumi y col., 2003). Curiosamente no se ha encontrado ninguno con homología al TLR4 de mamíferos, así que la función de este receptor podría estar cubierta por otro TLR que, como en el caso del pollo, reconocería distintos PAMPs. No obstante se precisan estudios funcionales que caractericen los tipos de ligandos que reconocen los TLRs de peces.

A continuación pasamos a describir los TLRs de mamíferos mejor caracterizados.

3.3.1. TLR2

Este receptor es capaz de reconocer una gran cantidad de sustancias y está considerado como el PRR que más ligandos reconoce. Entre sus ligandos se incluyen peptidoglicanos (Schwandner y col., 1999; Takeuchi y col., 1999), lipoproteínas bacterianas (Aliprantis y col., 1999; Brightbill y col., 1999; Takeuchi y col., 2000), un factor fenólico soluble de *Staphylococcus epidermidis* (Hajjar y col., 2001), el LPS de *Prophyromonas gingivitis* (Hirschfeld y col., 2001) y de *Leptospira interrogans* (el cual presenta una estructura diferente al LPS del resto de las bacterias Gram-negativas) (Werts y col., 2001), el glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi* (Campos y col., 2001) y el zimosano, un extracto de paredes de las levaduras (Underhill y col., 1999). El TLR2 reconoce estas sustancias al formar un heterodímero con el TLR1 o el TLR6 (Ozinsky y col., 2000; Takeuchi y col., 2001), y la formación de estos heterodímeros es la responsable de aumentar el repertorio de especificidad por los ligandos.

3.3.2. TLR4

Fue el primer TLR identificado en mamíferos, ya que una forma activa constitutiva de este receptor induce la expresión de citoquinas inflamatorias (Medzhitov y col., 1997). Este receptor está implicado en el reconocimiento del principal componente de las bacterias Gram-negativas, el LPS (Poltorak y col., 1998; Hoshino y col., 1999; Oureshi y col., 1999). Sin embargo, el TLR4 no es el único receptor encargado del reconocimiento del LPS, necesita proteínas accesorias como la proteína plasmática de unión a LPS (LBP; Ulevitch y Tobias, 1995), el receptor CD14 (Haziot y col., 1996; Moore y col., 2000) y la proteína MD-2 (Shimazu y col., 1999). Por lo tanto, parece que es un complejo formado por TLR4/MD-2/CD14 el responsable de unirse directamente al LPS (Lien y col., 2000; Poltorak y col., 2000; da Silva Corriera y col., 2001). El TLR4 también está implicado en el reconocimiento del LTA (Takeuchi y col., 1999), la proteína de choque térmico hsp60 (Vabulas y col., 2001) y la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial (Kurt-Jones y col., 2000).

3.3.3. TLR5

El TLR5 reconoce a la flagelina, subunidad que forma el flagelo bacteriano (Hayashi y col., 2001). A diferencia del resto de PAMPs, la flagelina es una proteína y no contiene

ningún elemento distinto a los componentes propios del hospedador. Sin embargo, el TLR5 reconoce las regiones amino y carboxilo terminales de la molécula, las cuales están altamente conservadas entre las bacterias y forman el corazón hidrofóbico de la proteína. Así que el TLR5 evolucionó reconociendo este patrón estructural conservado entre las proteínas de las bacterias (Janeway y Medzhitov, 2002).

3.3.4. TLR9

Los efectos inmunoestimuladores del DNA bacteriano se conocían desde hace tiempo (Krieg y col., 1995; Krieg, 2000) y ahora se sabe que el TLR9 es el encargado de reconocer los motivos CpG presentes en el DNA bacteriano (Hemmi y col., 2000). Uno de los enigmas de este PAMP es su accesibilidad hasta el receptor, ya que el DNA está encerrado dentro de las bacterias y rara vez estaría expuesto en la superficie bacteriana. Algunos estudios han demostrado que el TLR9 reconoce al CpG-DNA intracelularmente, en endosomas o lisosomas, donde las bacterias fagocitadas se lisan y sus componentes intracelulares quedan libres (Krieg y col., 1995; Hacker y col., 1998; Ahmad-Nejad y col., 2002). Por lo tanto, algunos TLRs ejercen su función dentro de la célula y no en la superficie celular.

II. Citoquinas

1. Introducción

Las citoquinas son proteínas (generalmente glucoproteínas) de peso molecular relativamente bajo (raramente más de 8-25 kDa) que regulan todos los procesos biológicos importantes, incluyendo el crecimiento celular, la activación celular, la inflamación, la inmunidad, la reparación tisular, la fibrosis y la morfogénesis. Son consideradas como una "familia" de proteínas, teniendo en cuenta un punto de vista funcional más que estructural, ya que estas proteínas no están todas relacionadas químicamente (Feldmann, 1996). Sin embargo, existen pares de citoquinas que muestran gran homología entre sí, (alrededor de un 30%), como, por ejemplo, la interleuquina-1 α (IL-1 α) y la IL-1 β , o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el TNF β . Además, también existen subfamilias con una gran homología estructural (alrededor del 80%), como por ejemplo la subfamilia del interferón α (IFN α), con alrededor de 20 miembros.

Las citoquinas median en gran parte las fases efectoras tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (Abbas y col., 1995). En la inmunidad innata, las citoquinas efectoras son producidas en su mayor parte por los fagocitos mononucleares, y por ello se las denomina a menudo monoquinas. Las monoquinas son producidas por los fagocitos mononucleares directamente en respuesta a microorganismos, y también como respuesta a las células T estimuladas por antígenos, es decir, como parte de la inmunidad específica. Ahora bien, la mayor parte de las citoquinas de la inmunidad específica son producidas por linfocitos T activados, y a estas moléculas se las denomina linfoquinas. Las linfoquinas tienen una doble función: unas son las encargadas de regular la proliferación y diferenciación de varias poblaciones linfocitarias, y otras actúan principalmente en la activación y regulación de las células inflamatorias (fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos). Tanto los linfocitos como los fagocitos mononucleares producen otras citoquinas que se conocen con el nombre de factores estimuladores de colonias (CSF), que estimulan la proliferación y diferenciación de leucocitos inmaduros en la médula ósea. Por último, algunas citoquinas son quimiotácticas para tipos celulares específicos y se conocen con el nombre de quimioquinas.

A pesar de la gran importancia de las citoquinas en la regulación y coordinación de todas las fases efectoras de la respuesta inmunitaria, se ha prestado escasa atención a la filogenia de la producción de citoquinas en los vertebrados en comparación con la filogenia de otros aspectos del sistema inmunitario, en especial de las inmunoglobulinas y del rechazo de trasplantes. Pero en los últimos años un gran número de citoquinas han sido clonadas y secuenciadas en distintas especies de peces y se empieza a entender su evolución y su función en el sistema inmunitario de estos vertebrados (revisado por Bird y col., 2002a).

2. Propiedades de las citoquinas

Aunque las citoquinas son un grupo diverso de proteínas, comparten varias propiedades (Abbas y col., 1995):

- 1) Las citoquinas son producidas durante las fases efectoras de la inmunidad innata y específica, y regulan las respuestas inflamatoria e inmunitaria.
- 2) La secreción de citoquinas es breve y autolimitada. En general, las citoquinas no se almacenan como moléculas preformadas, su síntesis se inicia por una nueva transcripción genética, y los RNA mensajeros (mRNA) que las cifran suelen ser inestables.
- 3) Una citoquina particular puede ser producida por muchos tipos celulares.
- 4) Una citoquina particular puede actuar sobre diferentes tipos celulares.
- 5) Las citoquinas tienen a menudo múltiples efectos sobre la misma célula diana, efectos que pueden ocurrir simultáneamente o no.
- 6) Diferentes citoquinas pueden presentar acciones similares.
- 7) Las citoquinas a menudo influyen en la síntesis y en la acción de otras citoquinas.
- 8) Las citoquinas, como otras hormonas polipeptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos y de elevada afinidad (10^{-10} - 10^{-12} M) presentes en la superficie de la célula diana. La acción puede ser autocrina, paracrina o endocrina.
- 9) La expresión de los receptores de citoquinas está regulada por señales específicas (otra citoquina o incluso la misma citoquina).
- 10) La mayor parte de las respuestas celulares a las citoquinas precisan tanto la síntesis de mRNA como de proteínas.

Para muchas células diana, las citoquinas actúan como factores de proliferación.

3. Funciones y clasificación de las citoquinas

Las citoquinas se pueden clasificar atendiendo a su función en: citoquinas que median la inmunidad innata, citoquinas que regulan a los linfocitos, citoquinas que regulan las células efectoras inespecíficas y citoquinas que regulan la hematopoyesis. A continuación vamos a referirnos únicamente a aquellas citoquinas que han sido estudiadas en peces.

3.1. Citoquinas que median la inmunidad natural

Las citoquinas que median la inmunidad natural son producidas por los fagocitos mononucleares en respuesta a los agentes infecciosos. Estas citoquinas protegen contra la infección viral, y aquellas que inician reacciones inflamatorias protegen contra infecciones producidas por bacterias.

3.1.1. Interferon (IFN) tipo I

Los IFNs tipo I comprenden dos grupos de proteínas serológicamente diferentes, pero con funciones similares. Al primer grupo se le denomina genéricamente IFN α y es una familia de 20 moléculas producidas fundamentalmente por los fagocitos mononucleares. El segundo grupo consta únicamente de un solo producto genético, el IFN β , que es producido mayoritariamente por los fibroblastos. Sus funciones biológicas principales son inhibir la replicación viral y la proliferación celular, activar las células agresoras naturales (NK) y modular las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Desde hace bastante tiempo es conocido que las líneas celulares epiteliales y fibroblásticas de peces pueden producir IFN en respuesta a infecciones *in vitro* por virus (Gravell y Malsberger, 1965; DeSena y Rio, 1975). En los sobrenadantes de estas células obtenidos 24-72 h tras la infección se detecta una actividad IFN capaz de reducir el efecto citopático provocado por virus en líneas celulares. Esta actividad es estable a pH ácido (pH=2), relativamente resistente a la temperatura, pero sensible a tripsina; características todas ellas del IFN tipo I. Además, la actividad IFN protege únicamente a la línea celular que lo produce, pero lo hace frente a cualquier tipo de virus.

Por otro lado, estudios *in vivo* también han demostrado la existencia de actividades IFN, con propiedades biológicas idénticas a las anteriormente citadas, en el suero de animales infectados natural o experimentalmente con virus (Dorson y col., 1975). El suero obtenido de animales infectados con virus es capaz de proteger *in vivo* a alevines de trucha arcoiris retados con el virus de la septicemia hemorrágica (VHS) (DeKinkelin y col., 1982).

Análisis físico-químicos de los IFN inducidos tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado grandes diferencias. El IFN del suero es una proteína de 26 kDa con un pI de 5'5 (Dorson y col., 1975). Sin embargo, el IFN producido *in vitro* por fibroblastos tiene un peso molecular de 94 kDa y un pI de 7'1 (DeSena y Rio, 1975).

Por otra parte, estudios de hibridación cruzada utilizando sondas de cDNA del IFN β humano han demostrado que secuencias de este gen están presentes en los peces óseos (Wilson y col., 1983; Tengelsen y col., 1991). Estudios similares utilizando sondas de IFN α no han obtenido éxito (Wilson y col., 1983). Muy recientemente, Altmann y col., (2003) han clonado un gen en el pez cebra (*Danio rerio*) que cifra un IFN con una homología del 34 al 67% con los distintos IFN de aves y mamíferos y que está filogenéticamente separado la misma distancia del IFN de aves y mamíferos, sugiriendo un antecesor común anterior a la divergencia de estos dos linajes. Estudios funcionales demuestran que el IFN del pez cebra es capaz de aumentar la resistencia frente a una infección viral, observándose un 36% de reducción en el número de calvas producidas en células transfectadas con este gen (Altmann y col., 2003).

3.1.2. Factor de necrosis tumoral (TNF α)

El TNF α es el principal mediador de las respuestas del huésped frente a las bacterias Gram-negativas, y puede actuar también frente a otros microorganismos infecciosos. La principal fuente celular de TNF es el fagocito mononuclear activado por LPS, aunque

otras células pueden secretar también esta proteína. Sus funciones principales son: inducir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, activar los fagocitos mononucleares (especialmente a los neutrófilos) e inducir la síntesis de citoquinas (IL-1, IL-6, TNF y quimioquinas). Cuando se secreta en cantidades elevadas entra en el torrente circulatorio y actúa de forma endocrina produciendo fiebre, síntesis de proteínas de la fase aguda y desórdenes metabólicos (caquexia).

Los primeros estudios sobre esta citoquina en peces se realizaron en trucha arcoiris, donde el TNF α recombinante humano (hrTNF α) actúa de forma sinérgica con MAF (factor activador de macrófagos) producido por linfocitos (I-MAF) (ver apartado 3.3.1.) en la elevación de la explosión respiratoria de los macrófagos (Hardie y col., 1994b; Jang y col., 1995a), aumenta la proliferación de los linfocitos inducida por mitógenos (Hardie y col., 1994b), y estimula la migración de los neutrófilos (Jang y col. 1995a). Todos estos efectos son inhibidos por anticuerpos dirigidos contra el receptor de 55 kDa del TNF humano (TNF-R1).

Por otro lado, el hrTNF α y el LPS tienen una acción sinérgica con el I-MAF induciendo la síntesis y secreción de un MAF por los macrófagos (m-MAF) (Jang y col., 1995b). El aumento de la explosión respiratoria de los macrófagos cuando se incuban con sobrenadantes conteniendo m-MAF, es parcialmente inhibido mediante preincubación de los macrófagos con anticuerpos dirigidos contra el TNF-R1 (Jang y col., 1995b).

Actualmente la secuencia del TNF α ha sido obtenida en la platija japonesa (*Parafichthys olivaceus*) (Hirono y col., 2000), en trucha arcoiris (Laing y col., 2001) y recientemente en dorada (*Sparus aurata*) (García-Castillo y col., 2002). El TNF α de estas especies posee alrededor del 30% de homología con los TNF α de mamíferos y de 50 a 60% entre ellos. Estudios sobre la expresión del mRNA de esta citoquina revelan un comportamiento diferente entre las distintas especies. Así, el tratamiento *in vitro* de leucocitos con LPS y/o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) produce un aumento en la acumulación del transcrito en la platija japonesa y en la trucha arcoiris (Hirono y col., 2000; Laing y col., 2001). Sin embargo, en dorada la expresión del transcrito es constitutiva en leucocitos y en macrófagos, así como en los distintos tejidos de peces infectados o no con *Vibrio anguillarum* (García-Castillo y col., 2002). Además, la estimulación de los macrófagos *in vitro* con LPS y MAF no produce un aumento de la expresión del TNF α . Estos resultados sugieren que el TNF α desempeñaría otra función en peces no relacionada con la respuesta inmunitaria. No obstante, se requieren estudios funcionales que establezcan el verdadero papel de esta importante citoquina.

3.1.3. IL-1

La IL-1 es un polipéptido derivado de los fagocitos mononucleares (y en menor medida de células endoteliales y epiteliales) que media la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata, al igual que el TNF. La IL-1 comparte algunos efectos biológicos con el TNF, pero tiene otras actividades biológicas: induce la proliferación, la expresión del receptor de IL-2 y la síntesis de citoquinas en las células T; activa la proliferación y diferenciación de las células B; y activa a los macrófagos y a las células NK. En el apartado III se detallan las características de esta molécula por ser el objeto de estudio del presente trabajo.

3.1.4. Quimioquinas

Las quimioquinas son un grupo de citoquinas de bajo peso molecular (8-10 kDa) que comparten estructuras y funciones homólogas. Estas moléculas son capaces de estimular el movimiento aleatorio de los leucocitos (quimioquinesis) y el movimiento dirigido (quimiotaxis). Existen dos subfamilias dependiendo de que las cisteínas del grupo amino terminal estén juntas (cis-cis) o separadas (cis-X-cis). La citoquina mejor caracterizada de la subfamilia cis-X-cis es la IL-8 y actúa predominantemente sobre los neutrófilos. Las citoquinas de la subfamilia cis-cis mejor caracterizadas son la proteína RANTES que actúa sobre las células T y los monocitos, y la proteína quimiotáctica del monocito-1 (MCP-1) que actúa sobre los monocitos.

La producción por los peces de citoquinas capaces de modular la migración de sus leucocitos ha sido demostrada en la carpa común (*Cyprinus carpio*). Los sobrenadantes conteniendo factores quimioatrayentes pueden generarse estimulando los leucocitos de esta especie con mitógenos de células T (PHA) o con antígenos específicos (Howell, 1987; Bridges y Manning, 1991). La naturaleza de los factores quimioatrayentes se desconoce, así como la de las células atraídas por ellos.

Recientemente se han secuenciado un gran número de quimioquinas en diferentes peces. En concreto dentro de la familia cis-X-cis, la IL-8 se ha clonado en trucha arcoiris (Laing y col., 2002; Sangrador-Vegas y col., 2002), en la platija japonesa (Lee y col., 2001) y en el tollo rayado (*Triakis scyllium*) (AB063299); la CK-1 en trucha arcoiris (Dixon y col., 1998); la LFCA-1 (similar a la IL-8) en lamprea de río (*Lampetra fluviatilis*) (Najakshin y col., 1999) y la scyba en pez cebra (Long y col., 2000). Por otra parte, miembros de la familia cis-cis han sido caracterizados en trucha arcoiris (AJ315149), en carpa común (Fujiki y col., 1999) y en pez cebra (AF201450). Por último, varios receptores de quimioquinas han sido clonados en carpa común (Fujiki y col., 1999) y en trucha arcoiris (Zhang y col., 2002). La identificación de estos genes permitirá dilucidar el papel de las quimioquinas en la respuesta inmunitaria de los peces, una vez que se disponga de las proteínas recombinantes y de anticuerpos específicos contra ellas.

3.2. Citoquinas que regulan la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria

Algunas citoquinas actúan básicamente regulando la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos. La mayor parte de estas citoquinas son producidas por las células T activadas, especialmente los linfocitos T CD4⁺ específicos para el antígeno.

3.2.1. IL-2

La IL-2 o TCGF (factor de crecimiento de las células T) es una glucoproteína producida por las células T (CD4⁺ y en menor cantidad por las CD8⁺) tras la activación por los antígenos. Sus funciones más importantes son las siguientes: estimular la proliferación de los linfocitos T de forma autocrina; estimular la proliferación y la capacidad lítica de las células NK, que se transforman en las células agresoras activadas por linfoquinas (LAK); y estimular la proliferación y la síntesis de anticuerpos por las células B humanas.

La estimulación de los leucocitos/linfocitos de peces con un mitógeno de células T ha sido la aproximación experimental más utilizada para generar sobrenadantes conteniendo actividad similar a IL-2. A causa de la importancia de la IL-2 en la proliferación de las células T, se ha usado normalmente un ensayo de proliferación de células blasto para comprobar la existencia de actividad IL-2. En la carpa común, los sobrenadantes de leucocitos estimulados con PHA o aloantígenos (MLR) inducen la proliferación de linfoblastos activados por PHA (Caspi y Avtalion, 1984; Grondel y Harmsen, 1984). Los leucocitos no estimulados por PHA son incapaces de proliferar en respuesta a estos sobrenadantes. Además, la adsorción de los sobrenadantes con células estimuladas reduce su actividad, aunque la adsorción con células sin estimular tiene poco efecto. Estos datos sugieren que los receptores de este factor de crecimiento se inducen tras la activación celular, de forma similar a lo que ocurre en mamíferos.

La IL-2 humana purificada no tiene efecto en los linfoblastos de carpa común (Grondel y Harmsen, 1984), pero sobrenadantes conteniendo IL-2 humana, de rata o de mono, estimulan la proliferación de estas células (Caspi y Avtalion, 1984). Si el efecto positivo de los sobrenadantes conteniendo IL-2 de mamífero sobre los linfoblastos de carpa se debe únicamente a la actividad de la IL-2 es incierto, especialmente por el hecho de que preparaciones más purificadas son normalmente menos activas.

A pesar de todos estos problemas en la identificación de la molécula responsable de la actividad IL-2 en peces, se ha clonado el gen de la IL-2 en la platija japonesa (Tamai y col., 1992). La secuencia de la proteína resultante de este gen presenta un 42% de homología con la IL-2 de mamíferos. Sin embargo, la mayor homología aparece en la secuencia "líder" de la proteína (precisamente una parte de ella se usó como un cebador para la reacción de PCR). En el resto de la molécula no existe prácticamente homología, con excepción de un pequeño segmento del comienzo y otro del final de la molécula. El producto de este gen, que ha sido expresado como una molécula recombinante en células COS-1, incrementa la proliferación de una línea celular derivada de células T de esta especie, pero no estimula la proliferación de varias líneas celulares derivadas de células B (Tamai y col., 1992).

3.3. Citoquinas que regulan las células efectoras naturales

Algunas citoquinas, producidas principalmente de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados por antígeno, actúan básicamente activando las funciones de las células inflamatorias naturales. Los estudios sobre este grupo de citoquinas en peces son escasos y se reducen a unas pocas citoquinas que incluyen una actividad MAF mediada por una molécula similar a IFN γ y una reactividad cruzada con TGF β de mamíferos. Del resto de las citoquinas de este grupo no se dispone de información.

3.3.1. IFN γ

El IFN γ , también llamado IFN tipo II, es una glucoproteína homodimérica formada por subunidades de 21 a 24 kDa. Estas subunidades difieren en su grado de glicosilación, pero son polipéptidos idénticos de 18 kDa codificados por el mismo gen. El IFN γ es producido por

los linfocitos $CD4^+ T_H0$ y T_H1 , y casi todas las células $T CD8^+$. La producción se inicia como consecuencia de la activación por el antígeno, y está aumentada por IL-2 e IL-12. El IFN γ también es producido por las células NK, que son la principal fuente de esta citoquina en los ratones que carecen de células T (Abbas y col., 1995; Farrar y Schreiber, 1993).

El IFN γ comparte muchas actividades con el IFN tipo I: induce un estado antiviral y es antiproliferativo. Ahora bien, el IFN γ se une a un receptor distinto del que utiliza el IFN tipo I y tiene varias funciones relacionadas con la inmunorregulación que lo diferencian del IFN tipo I (Abbas y col., 1995; Farrar y Schreiber, 1993; Feldmann, 1996). El efecto neto de las actividades del IFN γ es promover las reacciones inflamatorias mediadas por linfocitos T_H1 y por macrófagos, a la vez que suprime las reacciones mediadas por linfocitos T_H2 y por eosinófilos.

En peces, los leucocitos de riñón cefálico de trucha arcoiris tras ser estimulados con los mitógenos Con A y PMA, o con antígenos específicos, si los leucocitos son de animales inmunizados, segregan un factor soluble capaz de incrementar la adherencia, los niveles de fosfatasa ácida, la explosión respiratoria y la capacidad bactericida de los macrófagos (Secombes, 1987; Graham y Secombes, 1988; Marsden y col., 1994). Pero no todos los parámetros estudiados aumentan en los macrófagos activados con este factor soluble. La actividad 5'-nucleotidasa disminuye considerablemente al igual que ocurre en los macrófagos activados de mamíferos (Hepkema y Secombes, 1994). Por lo tanto, este factor soluble es una citoquina con actividad MAF.

Diferentes estudios sugieren que esta citoquina es un producto de las células T (negativas para inmunoglobulinas de superficie, Ig). En primer lugar, es segregada cuando los leucocitos son estimulados con un mitógeno de células T (Con A) (Graham y Secombes, 1988). En segundo lugar, su secreción en respuesta a antígenos específicos puede ser aumentada por inmunización de los ejemplares (Marsden y col., 1994), indicando la presencia de células memoria. En tercer lugar, la producción de MAF se reduce o inhibe completamente a bajas temperaturas (Hardie y col., 1994c), como otras respuestas de las células T de peces (Clem y col., 1991). Por último, experimentos de recolección en placa ("panning") utilizando un anticuerpo monoclonal contra Ig de trucha han demostrado que únicamente los linfocitos Ig $^+$ pueden producir MAF, aunque requieren la presencia de células accesorias (que no segregan MAF) (Graham y Secombes, 1990a).

La actividad MAF puede ser parcialmente purificada por cromatografía HPLC de exclusión por tamaños apareciendo en dos picos de proteínas con masa molecular de 19 y 32 kDa (Graham y Secombes, 1990b). La actividad MAF coincide en estas fracciones con actividad antiviral que protege a las células epiteliales RTH de trucha arcoiris contra el efecto citopático del virus IPN. Además, las dos actividades predominan en el pico de 19 kDa y desaparecen a pH ácido (pH 2) y a temperatura elevada (60°C), al igual que ocurre con el IFN γ . Todos estos datos sugieren que la actividad MAF presente en los sobrenadantes de leucocitos de trucha estimulados con mitógenos se debe a la presencia de una linfocina similar a IFN γ . Se requieren otros estudios a nivel molecular para poder desvelar si ambas actividades se deben a una sola molécula.

Por otro lado, se ha demostrado que los leucocitos de riñón cefálico de pez rojo estimulados con Con A y PMA producen un MAF capaz de inducir de forma sinérgica con el

LPS la producción de RNI en macrófagos diana (Neumann y col., 1995). Más recientemente y en esta línea de trabajo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que los leucocitos aislados del riñón cefálico de dorada y estimulados con los mitógenos ConA y PMA liberan una sustancia soluble con actividad MAF, capaz de aumentar las principales funciones de los fagocitos diana, incluyendo la migración, fagocitosis, producción de ROI y actividad bactericida (Mulero y Meseguer, 1998). Además este MAF es capaz de inducir la producción de RNI por parte de los macrófagos cuando se usa conjuntamente con LPS. Por último, los resultados de este estudio también demuestran que esta citoquina actúa sobre los dos tipos de células fagocíticas presentes en el riñón cefálico de dorada, macrófagos y granulocitos eosinófilos.

3.3.2. Factor transformador del crecimiento- β (TGF β)

El TGF β es una familia de moléculas relacionadas, cifradas por genes diferentes, a los que se les denomina TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β 4 y TGF β 5. Las células del sistema inmunitario sintetizan preferentemente TGF β 1. El TGF β 1 es una proteína producida tanto por las células T activadas por antígeno como por los fagocitos mononucleares activados por LPS. Su función inmunitaria principal es inhibir la proliferación de células T y la activación de los macrófagos.

La adición *in vitro* de TGF β 1 natural bovino a los macrófagos de trucha arcoiris puede aumentar o inhibir la explosión respiratoria de estas células (Jang y col., 1994). La incubación de los macrófagos con TGF β 1 produce un aumento de su explosión respiratoria cuando se usan concentraciones relativamente bajas (0'05-0'2 ng/ml). Sin embargo, cuando se realiza una pre-incubación, co-incubación o post-incubación de los macrófagos con TGF β 1 y potentes activadores de estas células (MAF o hrTNF β), el TGF β 1 suprime la capacidad de estos activadores para aumentar la explosión respiratoria. Estos efectos supresivos aparecen a dosis elevadas (1 ng/ml). Ambos efectos desaparecen cuando los macrófagos son preincubados con anticuerpos policlonales anti-TGF β 1, lo que confirma la especificidad del efecto de esta citoquina (Jang y col., 1994).

En los últimos años se han secuenciado en trucha arcoiris (Hardie y col., 1998; Laing y col., 1999b; AJ318935) y en solla (*Pleuronectes platessa*) (Laing y col., 2000) tres genes que corresponden a esta familia (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3). Además, el TGF β 1 y el TGF β 3 también se han secuenciado en anguila (*Anguilla anguilla*) (Laing y col., 1999b), el TGF β 3 en esturión siberiano (*Acipenser baeri*) (Laing y col., 1999b) y el TGF β 1 en dorada (AF510084).

3.4. Citoquinas que estimulan la hematopoyesis

Algunas citoquinas tienen potentes efectos estimuladores sobre la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea. De este modo, las reacciones inmunitarias que consumen leucocitos también estimulan la producción de nuevos leucocitos. Este grupo de citoquinas se conoce con el nombre de factores estimuladores de colonias (CSF).

Los estudios sobre este grupo de citoquinas en peces son muy escasos. Por un lado, se ha detectado una reactividad cruzada con suero anti-IL-3 de mamífero (Ahne, 1993, 1994) y por otro, se ha comprobado la existencia de factores con actividad similar a los CSFs en el suero de ejemplares de trucha arcoiris tratados con LPS o MDP (Kodama y col, 1994). La naturaleza de estos factores permanece desconocida.

III. Interleuquina-1 β

1. La familia de la interleuquina-1

La interleuquina-1 (IL-1) es una familia de citoquinas que se compone de cuatro miembros principales: la IL-1 α , la IL-1 β , el antagonista del receptor de la IL-1 (ral-1) y la IL-18. Recientemente la familia se ha ampliado con un grupo de moléculas que poseen una clara homología con las de este grupo (Dinarello, 1997; Dinarello, 1999; Mulero y col., 1999; Busfield y col., 2000; Smith y col., 2000; Lin y col., 2001; Pan y col., 2001). La IL-1 es uno de los principales mediadores de la inflamación y normalmente inicia y/o incrementa la expresión de una amplia variedad de genes implicados en este proceso, principalmente otras citoquinas. También interviene en la respuesta frente a invasiones microbianas y en la reparación de daños tisulares. Experimentos *in vitro* e *in vivo*, demuestran que la IL-1 α y la IL-1 β tienen efectos biológicos similares, pero no idénticos (Oppenheim y col., 1986; Dinarello, 1991; Dinarello, 1994; Dinarello, 1996; Dinarello, 1997) y ambas formas comparten el mismo receptor en las células diana. Sin embargo, una reciente investigación revela que las funciones endógenas de la IL-1 α y la IL-1 β son diferentes, la IL-1 β , pero no la IL-1 α , es un potente activador de la respuesta inmunitaria adaptativa (Nakae y col., 2001). La IL-1 α y la IL-1 β se producen por muchos tipos celulares (Oppenheim y col., 1986) entre los que se incluyen los neutrófilos, las células NK, los linfocitos B, los linfocitos T y células del sistema nervioso central, pero las principales células productoras son los monocitos y los macrófagos (Lepe-Zuniga y Gery, 1984; Dinarello y col., 1986; Dinarello, 1988; Arend y col., 1989).

Los miembros de la familia de la IL-1 pertenecen a la superfamilia de proteínas conocida como trébol- β (" β -trefoil"), debido a que sus proteínas maduras poseen 12 láminas β en su estructura secundaria, las cuales se pliegan formando una estructura con forma de trébol (Fig. 2) (Murzin y col., 1992; Nicola, 1994). La IL-1 α , la IL-1 β y el ral-1 contienen la firma de la familia de la IL-1: la secuencia consenso [FCI]-x-S-[ASLV]-x₂-P-x₂-[FYLV]-[LI]-[SCAI]-T-x₂-[LIVM] conservada en el extremo carboxilo (Hofmann y col., 1999).



Figura 2. Estructura tridimensional de la IL-1 β humana donde se puede observar la estructura trébol- β que forman las 12 láminas β (Murzin y col., 1995).

Por otro lado, todas las secuencias de *IL-1 β* s clonadas hasta la fecha presentan numerosas copias en el 3' UTR del motivo de inestabilidad del mRNA AUUUA, el cuál es típico de los genes que cifran mediadores de la inflamación (Caput y col., 1986).

Debido a la importancia de la *IL-1* en la respuesta inmunitaria de mamíferos y las evidencias existentes que sugerían su actividad biológica en el sistema inmunitario de otros vertebrados, en los últimos años los trabajos se han centrado en caracterizar los genes de la *IL-1* en aves, anfibios y peces. Actualmente la secuencia de la *IL-1 β* se conoce en varias especies de aves, anfibios y peces (Tabla 3) y la mayoría se ha obtenido mediante clonación homóloga. La secuencia de la *IL-18* ha sido recientemente clonada en pollo (Schneider y col., 2000) y es la única especie de vertebrado no mamífero donde se conoce esta citocina. Sin embargo, ninguna secuencia para la *IL-1 α* o el *rIL-1* se conoce en otros vertebrados que no sean mamíferos.

2. La *IL-1 β* de los vertebrados

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las *IL-1 β* s de todos los vertebrados muestran la mayor homología en las regiones que forman la estructura secundaria de la proteína, sugiriendo la presencia de 12 láminas β en el producto de estos genes y la presencia de patrones de plegamiento similares, por lo tanto, pertenecerían a la familia trébol- β (Nicola, 1994; Bird y col., 2002a).

La estructura secundaria de las proteínas es la que dirige el plegamiento y la que establece la estructura terciaria de las proteínas. La estructura terciaria es muy importante en la *IL-1 β* , ya que le permite unirse al receptor. Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que los aminoácidos Arg⁴, Leu⁶, Phe⁴⁶, Ile⁹⁶, Lys⁹³, Lys¹⁰³ y Glu¹⁰⁸ de la *IL-1 β* madura humana son esenciales para su unión con el receptor tipo I de la *IL-1* (Labriola-Tompkins y col., 1991). En la estructura tridimensional, estos aminoácidos forman un grupo localizado en una región concreta de la molécula de la *IL-1 β* , y se conservan entre las secuencias de mamíferos, pero no entre las moléculas de vertebrados no mamíferos conocidas hasta la fecha (Bird y col., 2002a).

La firma de la *IL-1* está conservada en las *IL-1 β* de mamíferos, aves y anfibios, pero aparece parcialmente conservada entre las *IL-1 β* s de peces. Por lo tanto, Bird y col. (2002a) proponen la siguiente firma teniendo en cuenta todas las secuencias de *IL-1 β* s: [FCL]-x-S-[ASLV]-x₂-[PSRI]-x₂-[FYLV]-[LV]-[SCAT]-T-x₂-[LIVMK]. Aunque las secuencias de las *IL-1 β* s compartan la firma de la familia *IL-1* y posiblemente muestren la presencia de láminas β , la homología de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos entre las moléculas de vertebrados son bastante bajas y varía enormemente dentro de las especies de peces (Bird y col., 2002a). Esto es debido a la gran diversidad filogenética de este grupo de animales. En la tabla 4 se puede observar la taxonomía de las especies de peces donde se conoce la secuencia de la *IL-1 β* y los órdenes a los que pertenecen están evolutivamente muy separados (Fig. 3).

En algunas especies de peces se han encontrado múltiples copias del gen de la *IL-1 β* , como por ejemplo en trucha, carpa o pez rojo (Tabla 3). Esto no es de extrañar ya que

Organismo	Gen	Nº de EMBL	Referencia
<i>Homo sapiens</i> (Humano)	M	M15330	Nishida y col., 1987
	C	M15840	Bensi y col., 1987
<i>Cercopithecus torquatus</i> (Mangabey de bairns rojo)	M	U19837	Villinger y col., 1995
<i>Macaca fascicularis</i> (Macaca cangrejera)	M	D83353	Tatsuka y col., 1995
<i>Macaca mulatta</i> (Macaca rhesus)	M	U19845	Villinger y col., 1995
<i>Macaca nemestrina</i> (Macaca cola de oarbo)	M	U19853	Villinger y col., 1995
<i>Mus musculus</i> (Ratón)	M	M15131	Gray y col., 1985
	C	X04964	Telford y col., 1988
<i>Rattus norvegicus</i> (Rata casera)	M	M98820	
<i>Sigmodon hispidus</i> (Rata de monta)	M	AF421387	
<i>Equus caballus</i> (Cabella)	M	D42147	Kato y col., 1995
<i>Bos taurus</i> (Vaca)	M	M35589	Laang y col., 1988
<i>Canis lupus</i> (Cibra)	M	U20500	
<i>Ovis aries</i> (Oveja)	M	X54798	Fiskerstrand y Sargen, 1990
<i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	M	M86725	Huetter y col., 1993
	C	X74558	Vandenbroeck y col., 1993
<i>Capra hircus</i> (Cabra)	M	D83351	
<i>Felis domesticus</i> (Gato)	M	M92080	
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coneja)	M	D21835	Mari y col., 1988
<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín nariz de botella)	M	AB028218	Inoue y col., 1999
<i>Trichosurus vulpecula</i> (Zarigüeya australiana)	M	AF071539	Wedlack y col., 1999
<i>Omithorhynchus anatinus</i> (Ornitornina)	C	AJ239048	Bird y col., 2002a
<i>Mesocricetus auratus</i> (Hamster dorado)	SPM	AB028497	
<i>Canis familiaris</i> (Perra)	SPM	Z70047	
<i>Gallus gallus</i> (Polla)	M	Y15008	Weining y col., 1998
	C	AJ245728	
<i>Xenopus laevis</i> (Rana de uñas africanas)	M	AJ010497	Zau y col., 2000a
	C	AJ314758	Bird y col., 2002a
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)	M	AJ289472	Scapigliati y col., 2001
	C	AJ311925	
<i>Scophthalmus maximus</i> (Rodaballo)	M	AJ295838	
<i>Paralichthys olivaceus</i> (Pistija japonesa)	M	AB070835	
<i>Platichthys platessa</i> (Salla)	SPM	AJ010640	Bird y col., 2002a
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris) IL-1 β 1	M	AJ223954	Zau y col., 1999a
	C	AJ004821	Zau y col., 1999b
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris) IL-1 β 2	M	AJ245925	Plaguetzuelas y col., 2000
	C	AJ245925	Plaguetzuelas y col., 2000
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpas común) IL-1 β 1	M	AB010701	Fujiki y col., 2000
	C	AJ245835	Engelsma y col., 2001
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpas común) IL-1 β 2-1	M	AJ401030	
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpas común) IL-1 β 2-2	M	AJ401031	
<i>Carassius auratus</i> (Pez rojo) IL-1 β 1	M	AJ249138	Bird y col., 2002a
	C	AJ419848	Bird y col., 2002a
<i>Carassius auratus</i> (Pez rojo) IL-1 β 2	M	AJ249137	Bird y col., 2002a
	C	AJ419849	Bird y col., 2002a
<i>Danio rerio</i> (Pez cebra)	SPM	AB30758	
<i>Scyllorhynchus canicula</i> (Pintarroja)	M	AJ251201	Bird y col., 2002b
	C	AJ295947	Bird y col., 2002b

Tabla 3. Secuencias de las IL-1 β s conocidas. C: gen completo; M: mRNA; SPM: secuencia parcial del mRNA.

estas especies poseen un ancestro tetraploide y es bastante frecuente que tengan varias copias de ciertos genes (Bird y col., 2002a). Sin embargo, todavía se desconoce los posibles papeles que podrían desempeñar estos genes en la respuesta inmunitaria del pez.

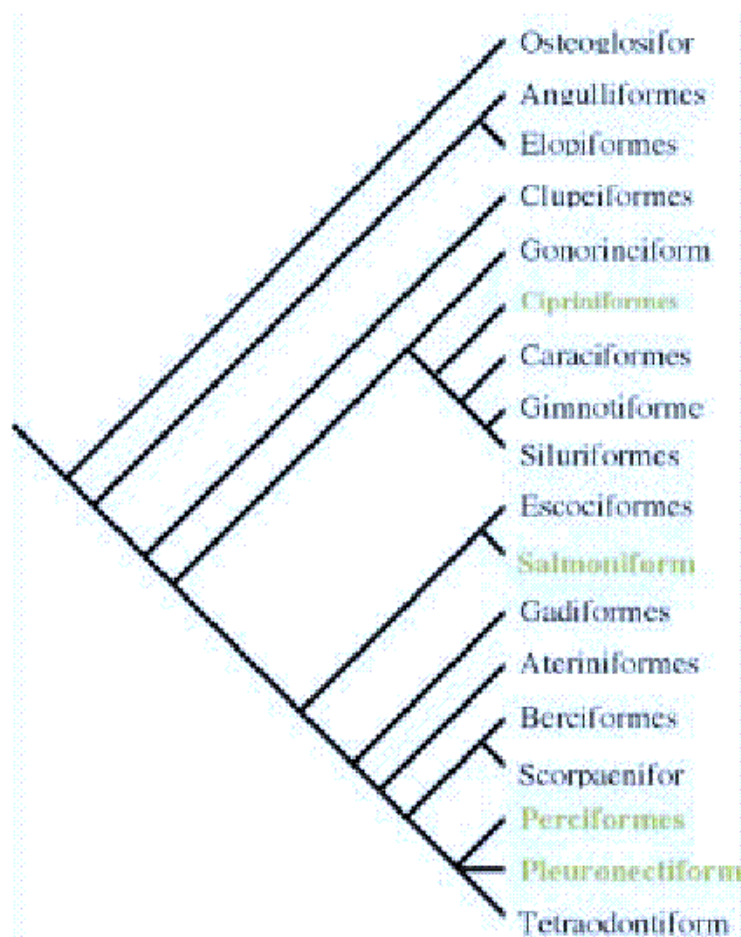


Figura 3. Cladograma mostrando la filogenia de los órdenes dentro de los teleosteos, adaptado de Trapani (2001). Los nombres en verde indican los órdenes con especies donde se ha clonado la IL-1 β .

Entre los mamíferos también se han identificado dos IL-1 β en cerdo que poseen entre ellas un 86% de identidad en aminoácidos (Vandenbroeck y col., 1994).

En mamíferos, existen cierta cantidad de polimorfismos para los miembros de la IL-1, se han descrito dos alelos para la IL-1 β (Di Giovine y col., 1992), el rIL-1 (Clay y col., 1996) y varios para la IL-1 α (Bailly y col., 1993). Estos polimorfismos pueden tener importancia clínica, un alelo específico de la IL-1 α está asociado con una poliartritis juvenil (McDowell y col., 1995), un alelo de la IL-1 β está relacionado con erosiones severas de artritis (Di Giovine y col., 1994) o ciertos tipos de diabetes (Pociot y col., 1992), y un alelo del rIL-1 contribuye a la susceptibilidad a la sepsis (Fang y col., 1999). Un estudio reciente muestra que el genotipo para la IL-1 puede estar relacionado con la periodontitis adulta (McDevitt y col., 2000). Todavía queda por determinar si existen polimorfismos para la IL-1 β de vertebrados no mamíferos. Estos hallazgos podrían suponer una ventaja para determinadas especies de peces de interés en acuicultura, donde determinados genotipos podrían conferir ventajas frente a enfermedades o infecciones.

Clase	Orden	Familia	Especie	Nombre común
Condrictios	Cercaríniformes	Esciliorínidos	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Pintarroja
Osteictios	Perciformes	Espáridos	<i>Sparus aurata</i>	Dorada
			<i>Dentex dentex</i>	Dentón
			<i>Diplodus puntazzo</i>	Sargo
		Morónidos	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina
	Pleuronectiformes	Escottálmidos	<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo
		Paralictidos	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Platija japonesa
	Selmoniformes	Salmonidos	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris
	Cipriniformes	Ciprinidos	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común
			<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo

Tabla 4. Taxonomía de las clases Condrictios y Osteictios, mostrando las especies donde se ha clonado la IL-1 β . En negrita se señalan las especies empleadas en este trabajo.

3. Procesamiento y mecanismo de secreción de la IL-1 β

La mayoría de proteínas de secreción poseen un péptido señal o líder en su extremo amino formado por 13-30 aminoácidos hidrofóbicos. Esta señal conduce la síntesis de la proteína al retículo endoplasmático y la proteína sintetizada queda en la luz del retículo, donde normalmente se le elimina el péptido señal (Milstein y col., 1972; Blobel y Dobberstein, 1975a, b). El péptido señal también se puede encontrar hasta a 12 residuos de aminoácidos aguas arriba del extremo amino de la proteína, como en el caso de la ovoalbúmina, donde el péptido líder no se elimina de la proteína madura (Tabe y col., 1984). La translocación de las proteínas al retículo endoplasmático suele ocurrir de manera simultánea a su traducción. Sin embargo, en levaduras, los péptidos ya sintetizados se pueden translocar al interior del retículo endoplasmático con la intervención de otras proteínas como la proteína de choque térmico 70 (Chirico y col., 1988; Deshaies y col., 1988). Las proteínas de secreción pasan entonces al aparato de Golgi donde se glicosilan y finalmente se almacenan en vesículas de secreción, las cuales por exocitosis se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido al espacio extracelular (Palade, 1975).

La IL-1 β se sintetiza como un precursor inmaduro de 31 kDa denominado proIL-1 β , que se sintetiza en el citosol de la célula porque carece de un péptido líder (Auron y col., 1984; March y col., 1985). Estudios de inmunocitoquímica (Singer y col., 1988) y de fraccionamiento celular (Matsushima y col., 1986; Bakouche y col., 1987) han demostrado que la IL-1 β no se encuentra en el retículo endoplasmático ni en el aparato de Golgi. Además, las drogas que bloquean el tráfico de vesículas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi no bloquean la liberación de la IL-1 β (Rubartelli y col., 1990). Todos estos estudios demuestran que esta citoquina no sigue la ruta clásica de secreción retículo

endoplasmático-aparato de Golgi (Rubartelli y Sitia, 1997), pero por el momento se desconoce con detalle su mecanismo de liberación.

La proIL-1 β se procesa a su forma activa de 17 kDa por una proteasa de cisteínas denominada enzima convertidora de IL-1 β (ICE) o caspasa 1 (Cerretti y col., 1992; Thornberry y col., 1992; Tocci, 1997). El procesamiento de la IL-1 β por la caspasa 1 está ligado a su secreción, y podría ser secretada después de procesarse o se podría procesar e inmediatamente liberarse, debido a que la forma madura de 17 kDa no suele encontrarse asociada a la célula (Rubartelli y col., 1990). Algunos estudios indican que es la estructura de la IL-1 β madura la responsable de que esta molécula se libere, ya que mutaciones que alteran la conformación de la IL-1 β madura inhiben la salida de esta molécula en células P388D1 (Siders y Mizel, 1995).

El LPS bacteriano actúa como estímulo aumentando la cantidad de proIL-1 β asociada a la célula, pero la secreción de la citoquina en estas condiciones es muy baja y se necesita un segundo estímulo para inducir la secreción de la IL-1 β (Rubartelli y col., 1990). El tratamiento con adenosina 5'-trifosfato (ATP) aumenta la secreción de la IL-1 β (Hogquist y col., 1991a; Rubartelli y col., 1993; Perregaux y Gabel, 1994) que actuaría de forma autocrina, ya que los monocitos activados producen y secretan ATP (Ferrari y col., 1997a).

El ATP extracelular (ATPe) ejerce su acción uniéndose a los receptores purinérgicos P2X, presentes en los macrófagos (Hickman y col., 1994; Di Virgilio, 1995; Di Virgilio y col., 2001). El receptor P2X, es un canal iónico asociado a un ligando y su activación produce un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática para el K $^{+}$, siendo la salida de K $^{+}$ de la célula la responsable de desencadenar el procesamiento y la secreción de la IL-1 β (Bhakdi y col., 1990; Perregaux y Gabel, 1994; Walev y col., 1995; Ferrari y col., 1997b). Una exposición prolongada a ATPe induce apoptosis y activación de la caspasa 1 en monocitos, por lo tanto, un modelo sugiere que la IL-1 β se procesa y se libera una vez que la célula muere por apoptosis (Hogquist y col., 1991b). Otros autores proponen mecanismos activos para la liberación de la IL-1 β que no terminan con la muerte celular. Uno de ellos sugiere que la proIL-1 β se incorpora en gránulos de secreción mediante un transportador específico desconocido y el ATPe produce la exocitosis de estos gránulos y el procesamiento de la proIL-1 β (Andrei y col., 1999) (Fig. 4). Otro modelo propone que la proIL-1 β está libre en el citosol y el ATPe induce la estrangulación de microvesículas a partir de la membrana plasmática que contienen la IL-1 β madura (MacKenzie y col., 2001) (Fig. 4). Este último modelo sería también extensible a plaquetas, las cuales son capaces de liberar microvesículas conteniendo IL-1 β activa después de ser activadas (Lindemann y col., 2001). Recientemente se ha demostrado que los cambios celulares producidos por el ATPe son reversibles si el estímulo se retira a tiempo y la célula no entra en apoptosis (MacKenzie y col., 2001), lo que sugiere que la liberación de IL-1 β es un proceso activo no asociado a la muerte celular.

Existen otros estímulos diferentes al ATPe que producen el procesamiento y la liberación de la IL-1 β , pero todos ellos tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de la célula al K $^{+}$, como el ionóforo de K $^{+}$ nigericina, el estrés hipotónico y algunas toxinas bacterianas (Bhakdi y col., 1990; Perregaux y Gabel, 1994; Cheneval y col., 1998). Otros estímulos conocidos que producen la liberación de la IL-1 β son los que producen un

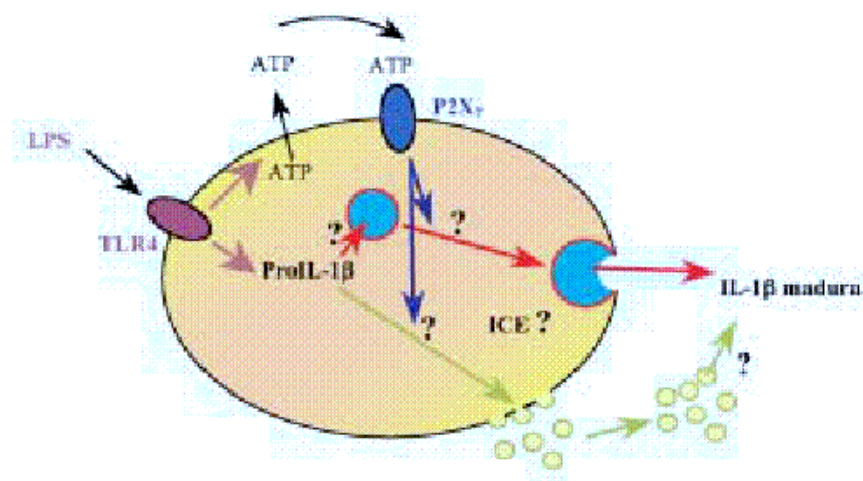


Figura 4. Modelo propuesto para la liberación de la IL-1 β mediada por los receptores purinérgicos P2X $_7$. En rojo se ilustra el modelo propuesto para la liberación por exocitosis y en verde por microvesículas.

aumento en la permeabilidad de la célula al Ca $^{2+}$, como los ionóforos de calcio y la interacción de las células productoras de IL-1 β con linfocitos T CD8 $^{+}$ activados (Rubartelli y col., 1990; Gardella y col., 2001). Por otra parte, la exposición de las células a condiciones estresantes, como un aumento de la temperatura de cultivo, inducen un aumento en la liberación de la IL-1 β , indicando que el control de la producción de citoquinas bioactivas se puede también producir en respuesta a daños tisulares (Rubartelli y col., 1990).

Recientemente se ha demostrado que determinados péptidos antimicrobianos producidos por los neutrófilos [protegrina (PTG)-1 y PTG-3] son capaces de promover el procesamiento postraduccional y la liberación de la IL-1 β por un mecanismo independiente del receptor P2X $_7$ (Perregaux y col., 2002). Por otro lado, se ha demostrado que los macrófagos activados producen una forma soluble de fosfolipasa A2 (sPLA2) que genera lisofosfatidilcolina, la cual se ha demostrado recientemente que es capaz de promover el procesamiento postraduccional y la liberación de la IL-1 β por exocitosis de vesículas de secreción, así como también la secreción de otras proteínas que carecen de péptido líder, como en el caso de la proteína nuclear HMGB1 (Gardella y col., 2002).

En este enigmático escenario sobre el mecanismo de liberación de la IL-1 β , debemos indicar la ausencia de un sitio conservado de reconocimiento y corte para la caspasa 1 en las secuencias de las IL-1 β s de aves, anfibios y peces clonadas hasta la fecha. Se han predicho sitios putativos para el procesamiento de estas moléculas basándose en alineamientos múltiples de las diferentes secuencias (Weining y col., 1998; Yin y Kwang, 2000; Hong y col., 2001; Peddie y col., 2001). Las moléculas recombinantes generadas poseen actividad biológica, pero se desconoce si el precursor en estas especies posee también actividad. Finalmente, nos gustaría indicar que no existen trabajos hasta la fecha que demuestren las señales implicadas en la producción de la IL-1 β ni el mecanismo por el cual ésta se procesa y se libera en animales no mamíferos.

4. Expresión y regulación de la IL-1 β

El papel de la IL-1 β en la respuesta inmunitaria se ha dilucidado en parte mediante estudios de expresión. En mamíferos, la IL-1 β se produce en respuesta a varios estímulos, entre los que se incluyen los derivados microbianos, como el LPS, otras citoquinas (TNF, IFN γ , CSF e IL-2), las interacciones con células T presentadoras de antígenos y por complejos inmunes (revisado por Stylianou y Saklatvala, 1998). Estudios similares demuestran que la IL-1 β de aves, anfibios y peces presenta patrones de expresión como los de mamíferos. En pollo, la síntesis del mensajero de la IL-1 β se induce rápidamente en monocitos tras 1 h de estimulación con LPS (Weining y col., 1998). La inyección de LPS a ejemplares de *Xenopus* aumenta los niveles de transcrito de la IL-1 β en varios tejidos, principalmente en riñón, hígado y bazo (Zou y col., 2000a). En peces, los estudios de expresión de esta citoquina se ciñen al estudio de la expresión del mRNA con RT-PCR o con "Northern blot", debido a la ausencia de anticuerpos específicos contra la IL-1 β de estos animales. En estos estudios se demuestra que el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con LPS es capaz de aumentar los niveles del transcrito de la IL-1 β en carpa, trucha, lubina y pintarroja (Zou y col., 1999a, b, 2000b; Engelsma y col., 2001; Scapigliati y col., 2001; Bird y col., 2002b). En trucha se han realizado extensos estudios sobre la expresión de la IL-1 β . Así, una dosis de 5 μ g/ml de LPS es la responsable de producir la máxima expresión del transcrito y éste se detecta 1 h después de la estimulación con LPS y alcanza un máximo a las 4 h. Por otra parte, la temperatura de cultivo posee un claro efecto sobre la acumulación del transcrito de la IL-1 β de trucha, ya que el aumento de la temperatura actúa como regulador positivo de la síntesis de IL-1 β (Zou y col., 2000b). Además, la línea celular de fagocitos mononucleares de trucha RTS-11, expresan el gen de la IL-1 β y sus niveles aumentan después de tratarlos con LPS (Brubacher y col., 2000).

La secuencia del promotor del gen de la IL-1 β se ha clonado recientemente en trucha arcoiris (Wang y col., 2002) y en pintarroja (AJ295947), permitiendo comparar sus elementos reguladores con los del promotor de la IL-1 β humana y de ratón. En peces se encuentran secuencias homólogas para los factores de transcripción positivos y negativos que regulan la expresión del gen. Una secuencia TATA está presente a 24-27 pb aguas arriba del sitio donde se empieza la transcripción. La secuencia para NF- κ B y la secuencia intensificadora también están presentes en peces. En mamíferos el NF- κ B es crucial como activador de la transcripción de la IL-1 β (Hiscott y col., 1993; Goto y col., 1999). La IL-1 β es un fuerte inductor de NF- κ B y por lo tanto su síntesis se autorregula de forma positiva. Esto se ha demostrado cuando los macrófagos de trucha tratados con IL-1 β recombinante de trucha produce un aumento del transcrito de la IL-1 β . Además, estudios preliminares confirman que la secuencia para el factor de transcripción NF- κ B en el promotor de la IL-1 β 1 de trucha es esencial para la expresión de este gen (Wang y col., 2002). Otros posibles elementos activadores de la transcripción de la IL-1 β de trucha y de pintarroja incluyen secuencias para AP1, SP1 y CEBP.

5. Receptores de la IL-1

La función de la IL-1 está mediada por sus receptores específicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores interleuquina-1/receptores parecidos a Toll (IL-1/TLR). Esta familia de receptores se encuentran en vertebrados, insectos y plantas, participando siempre en la defensa del hospedador y en la inflamación. Todos ellos comparten un dominio intracelular denominado Toll/IL-1R (TIR) compuesto por unos 200 aminoácidos y que está implicado en la traducción de la señal cuando se le une el ligando (Mitcham y col., 1996; O'Neill y Greene, 1998; Bowie y O'Neill, 2000) (Ver también apartado 1.3.3).

Existen dos tipos de receptores para la IL-1, ambos presentan en su secuencia un péptido señal, una región transmembrana y una región extracelular con tres dominios Ig, y difieren en su dominio intracelular (Tabla 2). El receptor de tipo I (IL-1RI) posee el dominio intracelular TIR y por lo tanto es el que media los efectos biológicos de la IL-1. Este receptor está presente en todos los tipos celulares, pero predomina en los linfocitos T y en los fibroblastos (Dower y col., 1985; Chin y col., 1987). El receptor tipo II de la IL-1 (IL-1RII) presenta un dominio intracelular de 29 aminoácidos que carece del dominio TIR y por lo tanto no trasmite la señal al interior celular. Este receptor actúa secuestrando a la IL-1 y atenuando el efecto biológico de esta citoquina (Colotta y col., 1993; Sims y col., 1993; Rauschmayr y col., 1997). El IL-1RII se expresa en neutrófilos, linfocitos B y monocitos (McMahan y col., 1991).

La unión de la IL-1 al receptor de tipo I inicia la transducción de la señal por medio de diferentes cascadas de señales, destacando la ruta del NF- κ B, la activación de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las quinasas de Jun (JNK). Todas las rutas terminan con la inducción de numerosos genes proinflamatorios e inmunitarios (Ridley y col., 1997; May y Ghosh, 1998; Ninomiya-Tsuji y col., 1999). El rIL-1 se une al receptor de tipo I y no induce la transducción de la señal, por lo tanto, bloquea la unión de la IL-1 β y actúa como ligando antagonista del IL-1RI (Eisenberg y col., 1990; Hannum y col., 1990).

Genes homólogos del IL-1RI se han secuenciado en pollo (Guida y col., 1992) y en salmón (*Salmo salar*) (Subramaniam y col., 2002). En pollo la funcionalidad de este receptor se ha demostrado cuando la actividad IL-1 se anula en presencia del receptor recombinante soluble y cuando la actividad de la IL-1 disminuye al utilizar un anticuerpo específico que bloquea el receptor. También se ha demostrado que este receptor transduce la señal en células diana para la IL-1 (Klasing y Peng, 2001). En salmón el gen del *IL-1RI* se expresa en una amplia variedad de tejidos y su transcrito se acumula en las células después de la inyección intraperitoneal de LPS (Subramaniam y col., 2002). En trucha arcoiris se ha identificado un gen homólogo para el IL-1RII, cuya expresión aumenta en leucocitos de riñón cefálico después de estimularlos con LPS y hrTNF α (Sangrador-Vegas y col., 2000).

Capítulo I

Clonación del gen de la interleuquina-1 β de dorada

Material y métodos

1. Animales

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han utilizado ejemplares de dorada (*Sparus aurata* L.), de un peso medio de 150 g, pez teleósteo marino hermafrodita de carácter protándrico, procedentes de las instalaciones de la empresa Culmarex S.A. (Águilas, Murcia). Los ejemplares fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 260 l conteniendo agua salada (flujo de 1.500 l/h), a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Los parámetros y la calidad del agua fueron controlados semanalmente y mantenidos constantes. El pH fue de 7'5-8'0, la concentración de amoníaco se mantuvo por debajo de 0'02 mg/ml y la de nitritos por debajo de 0'1 mg/ml. Los peces fueron alimentados 5 días a la semana con 15 g de pienso comercial (ProAqua, Tabla 5) por cada Kg de biomasa (1'5% del peso corporal). Los animales fueron adaptados a los acuarios durante un periodo de al menos 15 días previamente al estudio y antes de cada muestreo fueron sometidos a un ayuno de 24 h.

Composición	Ingredientes
Proteínas 47%	Derivados de pescado
Grasas 21%	Derivados oleaginosos
Caniza 11%	Derivados de animales terrestres
Celulosa 2%	Cereales
Aditivos 13%	Aceite de pescado
	Vitaminas (C y E)
	Minerales
	Antioxidantes sintéticos

Tabla 5. Composición e ingredientes de la dieta comercial utilizada en el presente estudio (datos cedidos por ProAqua Nutrition S.A., Palencia).

2. Obtención de muestras

Todas las muestras fueron obtenidas en esterilidad utilizando cabinas de flujo laminar.

2.1. Riñón cefálico

Para obtener el riñón cefálico se retiraron las vísceras de la cavidad abdominal quedando el riñón cefálico al descubierto. A continuación, dicho órgano fue separado de la columna vertebral y del resto de tejidos adyacentes y depositado en una placa de Petri con 12 ml de medio de cultivo sRPMI (medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) conteniendo 0'35% de NaCl para ajustar su osmolaridad a la del suero de la dorada (353'33 mosmoles/l), suplementado con un 5% de suero bovino fetal (SBF, Gibco) descomplementado con calor (56°C, 30 min), 10 unidades/ml de heparina (Sigma) y un 1% de penicilina

(100 unidades/ml) y estreptomicina (100 μ g/ml) (Biochrom). A continuación se obtuvieron suspensiones celulares disgregando los órganos con la ayuda de un tamiz de nylon de un diámetro de poro de 102 μ m. Tras lavar las células dos veces en sRPMI mediante centrifugación en una centrífuga HERAEUS MINIFUGE T (400xg, 10 min, 4°C), se estimó el número de células obtenidas mediante recuento en un hemocitómetro de Neubauer. La viabilidad se determinó por el método de exclusión del azul tripano y en todos los ensayos fue superior al 90%.

2.2. Bazo

El bazo fue extirpado, separado de la grasa adyacente, depositado en una placa de Petri con 12 ml de medio de cultivo sRPMI suplementado, cortado en varias piezas y lavado para eliminar la mayor cantidad posible de eritrocitos. Finalmente, se obtuvo una suspensión celular mediante el procedimiento que ha sido descrito para el riñón cefálico.

2.3. Exudado peritoneal

El exudado peritoneal se obtuvo inyectando 8 ml de medio sRPMI en la cavidad peritoneal de los animales. Tras un masaje abdominal de 3 min de duración, se practicó una pequeña incisión junto a la aleta lateral para recoger con la ayuda de una pipeta Pasteur el medio conteniendo las células del exudado peritoneal. Posteriormente las células se lavaron dos veces y se contaron como se detalló para el riñón cefálico.

2.4. Hígado, branquia y cerebro

El hígado, la branquia y el cerebro fueron extraídos y colocados en una placa Petri conteniendo 12 ml de sRPMI. Posteriormente, se obtuvieron fragmentos de cada uno de los órganos de aproximadamente 50-100 mg y se lavaron varias veces en medio de cultivo.

2.5. Sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción de la vena caudal con ayuda de jeringuillas de insulina previamente heparinizadas con una solución de heparina (10.000 unidades/ml). La sangre fue diluida inmediatamente en medio sRPMI suplementado (1:6) y depositada cuidadosamente sobre un gradiente discontinuo de Percoll al 50% con el fin de aislar los leucocitos (Mulero y Meseguer, 1998). A continuación, los tubos fueron centrifugados a 400xg durante 30 min a una temperatura de 4°C. Transcurrido este tiempo las células presentes en la interfase fueron recogidas con una pipeta Pasteur y lavadas dos veces con medio sRPMI suplementado y contadas como se detalló para el riñón cefálico.

2.6. Obtención de monocapas de macrófagos

Los macrófagos se purificaron a partir de suspensiones de leucocitos de riñón cefálico. Para ello, se sembraron 5×10^7 células en un total de 5 ml de sRPMI sin SBF en un frasco de cultivo de 25 cm². Tras ser incubadas durante 16 h a 25°C, las células no adheridas fueron eliminadas mediante varios lavados con tampón Hank's (HBSS, pH=7.4). A las células adheridas (macrófagos) se les adicionó 3 ml de medio sRPMI suplementado (Mulero y Meseguer, 1998).

3. Aislamiento de DNA y RNA

El DNA genómico (gDNA) de hígado y el RNA total de los tejidos indicados anteriormente fueron aislados a partir de muestras de 50-100 mg de tejido, de $1-5 \times 10^7$ células o de las monocapas de macrófagos utilizando "TRIzol Reagent" (Gibco) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.1. Homogenización

Las muestras fueron homogeneizadas en 1 ml de TRIzol frío con la ayuda de un homogeneizador (Sigma) o del émbolo de una jeringuilla de 5 ml, dependiendo de las características del tejido.

3.2. Separación de fases

Las muestras homogeneizadas en TRIzol fueron incubadas con 100 µl de cloroformo (Sigma) durante 15 min en hielo, y a continuación centrifugadas a 10.000xg durante 15 min a 4°C. De esta forma se obtuvo una fase superior acuosa que contenía el RNA, una interfase de color blanco y una fase inferior roja de fenol-cloroformo (orgánica) que contenían las proteínas y el gDNA.

3.3. Aislamiento de gDNA

La fase superior fue retirada y se añadió a la interfase y a la fase orgánica 0.3 ml de etanol puro (Merck). A continuación, las muestras fueron mezcladas por inversión y dejadas a temperatura ambiente de 2 a 3 min. El DNA fue lavado dos veces con 1 ml de citrato sódico 0.1 M en etanol al 10% y otras dos veces en 1.5 ml de etanol (2.000xg, 5 min, 4°C), secado al aire en una cabina de flujo laminar durante 5-15 min y resuspendido en agua estéril (10 min a 50°C y 1 noche a 4°C).

El DNA así obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm en una cubeta de cuarzo (Hellma). La concentración de DNA se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble cadena. También se obtuvo la

relación entre Abs_{260}/Abs_{280} , para determinar el grado de pureza de las muestras. Finalmente se comprobó la integridad del DNA mediante electroforesis en un gel de agarosa (Ecogen) al 1% conteniendo 0'5 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma) y visualización con luz UV.

3.4. Aislamiento de RNA

Para aislar el RNA, la fase superior fue transferida a un tubo de centrifuga de 1'5 ml libre de RNasa y se adicionó 0'5 ml de isopropanol frío. Tras 15 min de incubación en hielo, las muestras fueron centrifugadas (10.000xg, 15 min, 4°C), se retiró el sobrenadante y el RNA así precipitado se lavó dos veces con 1'5 ml de etanol frío al 75%. A continuación, el RNA se dejó secar al aire en una cabina de flujo laminar durante 5-10 min y finalmente se resuspendió en 50 o 100 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma).

El cálculo de la concentración y pureza del RNA se realizó como ha sido indicado para el gDNA, pero teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 μ g/ml de RNA.

4. Producción de cDNA

Siempre se trabajó en la cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones. La cantidad total de RNA a retrotranscribir (de 1 a 5 μ g) se trató con 1 unidad de DNasa I Amplification Grade (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente para digerir el gDNA contaminante. La enzima fue inactivada durante 10 min a 65°C en presencia de 1 μ l de EDTA (25 mM).

La retrotranscripción se realizó partiendo de 1 a 5 μ g de RNA total, al que se le añadió 1 μ l de Oligo-dT o de RaceT (50 μ M, Tabla 6), llevándose hasta un volumen final de 11 μ l con agua tratada con DEPC. Esta mezcla fue incubada a 65°C durante 5 min y enfriada en hielo durante 3 min. Posteriormente se añadieron 4 μ l de tampón 5x, 1 μ l de DTT (0'1 M), 2 μ l de dNTPs (10 mM, Gibco), 40 unidades (1 μ l) de inhibidor de RNasa (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen) y 15 unidades (1 μ l) de retrotranscriptasa (SuperScript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase, Invitrogen). La retrotranscripción se llevó a cabo a 42°C durante 50 min y posteriormente se inactivó la enzima tratando las muestras a 95°C durante 5 min y se ajustó el volumen a 100 μ l con agua tratada con DEPC.

5. Reacciones de amplificación (PCR)

Las reacciones de amplificación de DNA ("Reacción en Cadena de la Polimerasa" o PCR) se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Las PCRs se realizaron en un volumen total de 50 μ l que contenía: 3 μ l de DNA molde, 5 μ l de tampón 10x, 1 μ l de dNTPs (10 mM, Gibco), 2 μ l de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos (obtenidos de Invitrogen o de Amersham Biosciences) (Tabla 6) a una concentración de 10

μM , 2'5 μl de MgCl_2 (50 mM) y 1'25 unidades de Ecotaq DNA polimerasa (Ecogen). Las condiciones de amplificación fueron:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	45 seg	30 – 40
Hibridación	42 – 80°C	45 seg	
Extensión	72°C	0'5 – 1'5 min	
Extensión final	72°C	10 min	1
Conservación	4°C	Indefinido	

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Posición
Directo (F) 13	GGGAAAGAATCTRTACCTGTCTGTG	458-481
F13N	AAGGAAGCAACCTCTACC	457-474
F17	CCCACCCTGCAGCTGGAG	499-510
Reverso (R)	TGAGAGGTGCTGATGAAC	842-859
R4	GTGCTGATGAACCACT	842-855
F1	GCTTGCACTCTGGAGGCGGTGG	503-523
F2	GGGCTGAACAACAGCACTCTC	598-616
F3	ATGCCCAGGGGCTGGGC	49-55
F4	AAGGATCC ATGGAATCCGAGATGACATGC	1-21
F8	AAGGATCC AAATGGAATCCGAGATGACATGC	1-21
F7	GAGAACAACACTGACAGG	(-103)-(-88)
R1	GTCGCTGCCCGGGGTGATCC	544-564
R2	CAGTTGCTGAAGGGGAACAGAC	621-642
R3	AAGAATTC TTAACACTCTCCACCCTCC	743-762
R5	AAGGATCC TTAACACTCTCCACCCTCC	743-762
R8	GATTCACCTCATATTAG	1.111-1.127
R7	GGTCGCCATGTTCACTTC	385-402
β -Actina-F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	
β -Actina-R	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	
Oligo-dT	(T) ₁₈	
Race	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
RaceT	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₈	

Tabla 6. Cebadores utilizados en los diferentes experimentos de RT-PCR y PCR. En la columna de la derecha se indican las posiciones de la secuencia del cDNA de la *IL-1 β* de dorada que corresponden a los distintos oligonucleótidos. Los nucleótidos subrayados indican los sitios de restricción que contienen los oligonucleótidos utilizados para amplificar el DRF de la *IL-1 β* . En negrita, nucleótidos añadidos en el extremo 5' de los sitios de restricción para facilitar la digestión del fragmento amplificado. R: A/G, Y: C/T

6. Obtención de un fragmento del cDNA de la *IL-1 β*

Para obtener un fragmento inicial del gen de la *IL-1 β* de dorada se recurrió a la estrategia de clonación homóloga. Dicha estrategia consistió en amplificar un fragmento del cDNA de la *IL-1 β* utilizando oligonucleótidos (algunos de ellos degenerados) diseñados a

partir de las regiones más conservadas entre las distintas secuencias conocidas de las IL-1 β s de vertebrados. En concreto se utilizaron las parejas de oligonucleótidos F13/R, F13/R4, F13N/R, F13N/R4, F17/R y F17/R4 (Tabla 6) en una reacción de amplificación a partir de cDNA de células de riñón cefálico activadas *in vitro* con 10 μ g/ml de LPS de *E. coli* O111:B4 (Sigma) durante 4 h. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1.	95°C	durante 5 min	1 ciclo
	95°C	durante 45 seg	
2.	48°C	durante 45 seg	38 ciclos
	72°C	durante 45 seg	
3.	72°C	durante 10 min	1 ciclo

7. RACE ("Rapid Amplification of cDNA ENDS")

Se utilizó el sistema RACE para amplificar los extremos 3' y 5' del cDNA de la IL-1 β de dorada a partir de la secuencia interna obtenida con los oligonucleótidos degenerados.

Para amplificar el extremo 3' del cDNA de la IL-1 β de la dorada, el RNA fue retrotranscrito con el oligonucleótido RaceT que contenía una secuencia "ancla" (Tabla 6) utilizando las condiciones descritas en el apartado 4. El cDNA así obtenido fue utilizado como molde en una primera ronda de PCR con un oligonucleótido complementario a la secuencia ancla, denominado Race (Tabla 6) y el oligonucleótido degenerado F13 con el que se amplificó el fragmento interno de la IL-1 β de dorada. En esta PCR se utilizaron las mismas condiciones de amplificación que las descritas en el apartado 6. A continuación se realizó una segunda ronda utilizando como molde 3 μ l de la primera ronda de PCR y un oligonucleótido específico de la IL-1 β de dorada más cercano al extremo 3' del gen (F1 o F2, Tabla 6) junto al Race (PCR "semi-nested"). En esta segunda ronda de PCR la temperatura de unión de los oligonucleótidos fue de 60°C y el número de ciclos se disminuyó a 30.

Para amplificar el extremo 5' de la IL-1 β , al cDNA obtenido como se describe en el apartado 4 y purificado con el "QIAquick® PCR Purification kit" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, se le adicionó dATP (concentración final 0.2 mM), 10 μ l de tampón 5x y el volumen final se llevó hasta 49 μ l con agua destilada. La mezcla se incubó a 94°C durante 3 min, se enfrió rápidamente en hielo y se añadieron 15 unidades (1 μ l) de la enzima transferasa de deoxinucleótidos terminal (TdT, Invitrogen). Una vez finalizada la reacción (30 min, 37°C), la enzima se inactivó a 70°C durante 10 min.

Una vez confirmado que la cola de poli(A) había sido correctamente añadida al cDNA haciendo una PCR control con el oligo-dT y un cebador reverse de la β -actina (Tabla 6), se hizo una primera ronda de PCR utilizando las mismas condiciones de amplificación que las descritas en el apartado 6 con el oligonucleótido R4 como cebador reverse junto con el RaceT (Tabla 6) que actuó como cebador directo ("forward"). A continuación, se hizo una PCR "nested" con un oligonucleótido reverse específico de la IL-1 β más cercano al extremo 5' (R1 o R2) junto con el Race (Tabla 6), usando una temperatura de hibridación de 60°C y 30 ciclos.

8. Obtención del gen completo de la *IL-1 β*

Los intrones del gen de la *IL-1 β* se obtuvieron haciendo reacciones de amplificación a partir de gDNA con oligonucleótidos específicos (F4, F7, R3, R6 y R7, Tabla 6), cuyas mezclas de reacción estaban suplementadas con el 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para favorecer la relajación de las estructuras secundarias del gDNA. En estas reacciones la temperatura de unión de los cebadores fue de 55 a 60°C, el tiempo de extensión se aumentó hasta 3 min y el número de ciclos también se incrementó hasta 35.

9. Clonación de productos de PCR

Los productos amplificados por PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (0.8-1.5%) tal como se ha indicado anteriormente y purificados mediante el "QIAquick® PCR Purification kit". La concentración de los productos de interés se calculó comparándola con un marcador consistente en el genoma del fago λ digerido con la enzima *HindIII* (λ DNA/*HindIII*, Invitrogen), para a continuación clonarlos en el vector pGEM-T Easy (Promega) utilizando una relación inserto:vector de 3:1. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10-20 μ l conteniendo 3'5-8 μ l de inserto, 25 ng del citado vector, 5 o 10 μ l de tampón de reacción 2x y 5 unidades de T4 DNA ligasa (Promega). La mezcla se dejó a temperatura ambiente toda la noche o a 16°C durante 48 horas.

Cuando la pureza de los fragmentos amplificados no era adecuada, se realizaron ligaciones en gel utilizando agarosa de bajo punto de fusión (LM-SIEVE, Pronadisa). Para ello, los productos de interés fueron recortados y extraídos del gel tras ser visualizados con luz UV de onda larga (365 nm). La agarosa se fundió a 60-65°C y se llevó a cabo la reacción de ligación como se ha indicado anteriormente.

10. Obtención de células competentes

Para la obtención de células competentes se utilizaron bacterias de la estirpe de *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1983), cuyo genotipo es: supE44 Δ lac U 169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsd R17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1. Los cultivos fueron crecidos en medio Luria (10 g/l de triptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl, LB, Sigma) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2-0.4 a 650 nm. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 2.200xg durante 30 min a 4°C, resuspendidas en una solución de MgCl₂ 100 mM frío, centrifugadas de nuevo y resuspendidas en CaCl₂ 100 mM frío. Finalmente, fueron centrifugadas, resuspendidas en CaCl₂ 100mM y glicerol (85:15, v/v) y almacenadas a -80°C en alícuotas de 100 μ l hasta su uso.

11. Transformación de células competentes

Las células competentes de *E. coli* (DH5 α) fueron transformadas con el vector pGEM-T Easy donde previamente habían sido ligados los fragmentos de interés obtenidos por PCR. El método de transformación se realizó según el procedimiento descrito por Sambrook y Russell (2001). Cuando la ligación se realizó con agarosa, a la reacción de ligación se le añadió un volumen de TCM 2x (TrisHCl 20 mM, CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 20 mM, pH=7.5) frío antes de transformar.

Tras la transformación, las células fueron crecidas a 37°C durante una noche en LB sólido (LB conteniendo 15 g/l agar bacteriológico, Difco) con 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma) y 1'6 mg/placa de X-gal (Applichem). Varias colonias blancas obtenidas fueron crecidas en 5 ml de LB con 100 μ g/ml de ampicilina durante una noche a 37°C para posteriormente aislar el DNA plasmídico como se detalla a continuación.

12. Aislamiento de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se aisló utilizando el kit comercial "QIAprep Spin Plasmid kit" (Qia-gen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras obtener los plásmidos correspondientes, se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con EcoRI (MBI Fermentas). Los fragmentos de interés fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

13. Análisis de secuencias

La homología de las secuencias obtenidas con otras secuencias conocidas fue analizada usando el programa BLAST (Altschul y col., 1990) del servidor ExPASy Proteomics Tools (<http://www.expasy.ch/tools>). La comparación directa entre dos secuencias se realizó con el programa ALIGN y los alineamientos múltiples con el programa CLUSTALW (Thompson y col., 1994), ambos del servidor del Instituto Bioinformático Europeo (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>). También se construyó un árbol filogenético basado en los alineamientos de las secuencias de aminoácidos generados por el programa CLUSTALW. Por último, se determinó el grado de hidrofobicidad de la misma mediante el servidor ExPASy Proteomics Tools (Kyte y Doolittle, 1982).

14. Cultivo de *Vibrio anguillarum*

En el presente estudio se han utilizado dos cepas (R-82 y ATCC 19264) de la bacteria patógena de peces *Vibrio anguillarum* (Toranzo y Barja, 1990). La bacteria fue criada durante 16 h a 25°C en caldo de triptona de soja (17 g/l de peptona de caseína, 3 g/l

de peptona de soja, 5 g/l de NaCl, 2'5 g/l de K_2HPO_4 y 2'5 g/l de dextrosa, TSB, Pronadisa) suplementado con un 1% de NaCl con una agitación orbital de 250 rpm. Posteriormente se cuantificó el número de bacterias midiendo la absorbancia a 600 nm. Las bacterias fueron lavadas dos veces con tampón fosfato (PBS, pH=7'4) estéril y ajustada a 5×10^8 células/ml para las infecciones experimentales, o bien fue fijada con 4% de formaldehído, lavada varias veces en PBS estéril y ajustada a 10^8 bacterias/ml para ser utilizada como estímulo en los estudios de expresión *in vitro*.

15. Obtención de gDNA de *Vibrio anguillarum*

Cultivos de 0'5 l fueron procesados para la extracción del DNA genómico de esta bacteria (VaDNA). Las bacterias fueron lisadas en TrisHCl 0'5 M, pH=9'4, EDTA 125 mM, SDS al 5% y 0'5 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) durante 1 h a 37°C. Posteriormente el lisado se pasó 10 veces a través de una jeringuilla con una aguja de 22G y el gDNA se extrajo con un volumen de fenol (Sigma), seguido de medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo:isoamiloalcohol (24:1, Sigma) y dos extracciones con un volumen de cloroformo:isoamiloalcohol (24:1). Por último, el DNA se precipitó con acetato sódico 0'3 M (pH=5'5) y dos volúmenes de etanol al 100%, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en PBS. La concentración se calculó como ha sido indicado en el apartado 3.3 y se ajustó a 5 mg/ml.

16. Producción de sobrenadantes conteniendo citoquinas

La producción de sobrenadantes conteniendo citoquinas (MAF) se realizó siguiendo la metodología de Mulero y Meseguer (1998). Para ello, suspensiones de leucocitos de riñón cefálico fueron ajustadas a 5×10^6 leucocitos/ml en sRPMI y sembradas en frascos de cultivo de 25 cm². A continuación, las células fueron estimuladas con 10 µg/ml de concaivalina A (ConA, Sigma) y 5 ng/ml de forbol miristato acetato (PMA, Sigma) durante 3 h a 25°C. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado cuidadosamente, las monocapas de células adheridas lavadas 3 veces con medio de cultivo para eliminar cualquier resto de los mitógenos, y finalmente cultivadas durante 48 h en sRPMI conteniendo 10% de SBF. Transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes fueron recogidos, centrifugados (400xg, 10 min) y almacenados a -80°C.

Sobrenadantes de leucocitos no estimulados con los mitógenos y sobrenadantes de leucocitos estimulados con mitógenos pero recogidos inmediatamente después de lavar las células fueron utilizados como controles.

17. Estudios de expresión

La expresión del transcrito de la *IL-1 β* de dorada fue estudiado mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos específicos F3 y R2 (Tabla 6), utilizando las siguientes condiciones de amplificación:

1.	95°C	durante 5 min	1 ciclo
	95°C	durante 45 seg	
2.	48°C	durante 45 seg	38 ciclos
	72°C	durante 45 seg	
3.	72°C	durante 10 min	1 ciclo

17.1. *In vivo*

En los estudios de expresión *in vivo*, dos ejemplares de dorada fueron inyectados intraperitonealmente con 5×10^8 bacterias de la cepa no virulenta ATCC 19264 de *Vibrio anguillarum*. Trascurridas 16 h se obtuvo el cDNA de bazo, cerebro, exudado peritoneal, sangre, riñón cefálico, branquias e hígado, como se ha indicado en el apartado 3. Así mismo se utilizaron cDNAs de los mismos tejidos de peces sin infectar para ser utilizados como control de la expresión basal del gen. Amplificaciones del gen de la β -actina se utilizaron para comprobar que se partía de la misma cantidad de cDNA en las distintas reacciones de amplificación.

17.2. *In vitro*

En los estudios de expresión *in vitro*, 2×10^7 leucocitos de riñón cefálico fueron incubados durante distintos tiempos (0, 0'5, 1, 2 y 4 h) a 25°C en sRPMI en presencia de *V. anguillarum* R-82 fijados con formaldehído (10 bacterias por leucocito). Posteriormente las células fueron procesadas para la obtención de cDNA según se detalla en el apartado 3 que se utilizó en reacciones de amplificación para la *IL-1 β* y la β -actina siguiendo las condiciones descritas anteriormente, pero utilizando 20 ciclos de amplificación.

En otra serie de experimentos, los leucocitos de riñón cefálico de dorada (6×10^7 células) se cultivaron durante 4 h a 25°C en sRPMI suplementado en ausencia o presencia de 10 μ g/ml de LPS y/o 50 μ g/ml de VaDNA. Posteriormente se obtuvo el cDNA de estas células como se ha indicado en el apartado 3 y se utilizó en reacciones de amplificación para la *IL-1 β* o para la β -actina.

Por último, monocapas de macrófagos fueron cultivadas durante 4 h a 25°C en sRPMI suplementado con 10 μ g/ml de LPS y/o una dilución 1/20 de MAF. Posteriormente las células fueron lavadas cuatro veces con tampón HBSS y se procesaron para obtener cDNA que se utilizó en reacciones de amplificación para la *IL-1 β* o para la β -actina, siguiendo las condiciones descritas anteriormente y analizando alícuotas de 10 μ l a 10, 20 y 30 ciclos de amplificación en un gel de agarosa al 1%.

18. Clonación de la *IL-1 β* de otros espáridos

Ejemplares de sargo y dentón (Tabla 4) mantenidos en las instalaciones del Centro de Recursos Marinos (San Pedro del Pinatar, Murcia) fueron utilizados para obtener suspensiones de 6×10^7 leucocitos de riñón cefálico, del mismo modo que se describió para dorada en el apartado 2.1. Estas células se cultivaron durante 4 h a 25°C con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS y se procesaron para obtener cDNA que fue utilizado en reacciones de amplificación con los oligonucleótidos F4 y R2 (Tabla 6) según se ha descrito anteriormente. En este caso, se empleó una temperatura de hibridación de 48°C, un tiempo de extensión de 40 seg y 40 ciclos de amplificación. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados directamente con los oligonucleótidos F4 y R2.

Resultados

1. Clonación de la IL-1 β de dorada

El aislamiento del gen de la IL-1 β se inició con la obtención de un fragmento interno de 205 pares de bases (pb) (Fig. 5) amplificado a partir de cDNA de riñón cefálico estimulado con LPS, utilizando los oligonucleótidos F13 y R (Tabla 6) diseñados contra las regiones conservadas de las IL-1 β s de vertebrados. Este fragmento de 205 pb tenía un único marco abierto de lectura (ORF) que cifraba una proteína que presentaba una alta identidad y homología con las secuencias de las IL-1 β s de otros grupos de vertebrados y con las dos IL-1 β s conocidas de peces:

Especie	% Identidad	% Homología
Trucha	80	89
Carpa	33	51
Xenopus	41	58
Pollo	33	50
Ratón	40	49
Humana	44	53

A partir de esta secuencia se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos (F1, F2, R1 y R2, Tabla 6) que fueron utilizados para amplificar los extremos 3' y 5' del cDNA mediante la estrategia RACE.

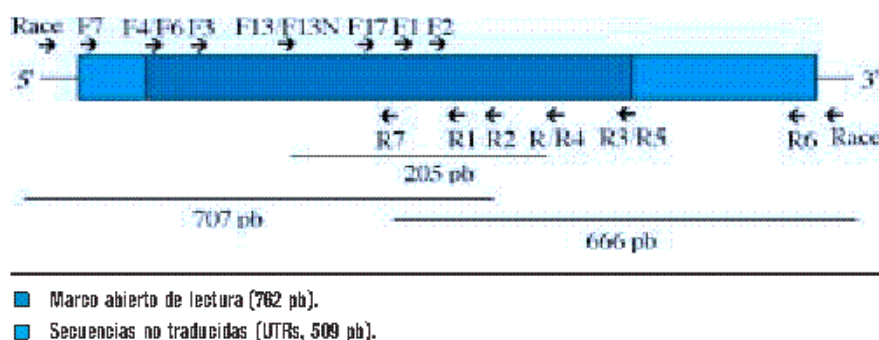


Figura 5. Posición de los oligonucleótidos (flechas) usados para amplificar el cDNA de la IL-1 β de dorada y los productos obtenidos.

1.1. Clonación del extremo 3'

El cDNA obtenido a partir de retrotranscripción con el oligonucleótido RaceT (Tabla 6) fue utilizado en una primera reacción de amplificación con los cebadores F13 y Race (Tabla 6), pero no se obtuvo amplificación visible bajo luz UV en un gel de agarosa teñido

con bromuro de etidio. No obstante esta reacción de PCR se sometió a una segunda ronda de amplificación utilizando los cebadores específicos de la *IL-1 β* de dorada F1 o F2 junto con el Race (Tabla 6 y Fig. 6A) obteniéndose un fragmento de 666 pb para F1/Race y de 571 pb en el caso de F2/Race (Fig. 6B), con una diferencia entre ambos de 95 pb, distancia existente entre las dos secuencias de la *IL-1 β* de dorada donde alinean los cebadores específicos utilizados.

Ambos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y secuenciados. La secuencia confirmó que dichos fragmentos correspondían a la *IL-1 β* de dorada y que contenían el final del ORF, así como el 3' UTR que finalizaba en una cola de poli(A).

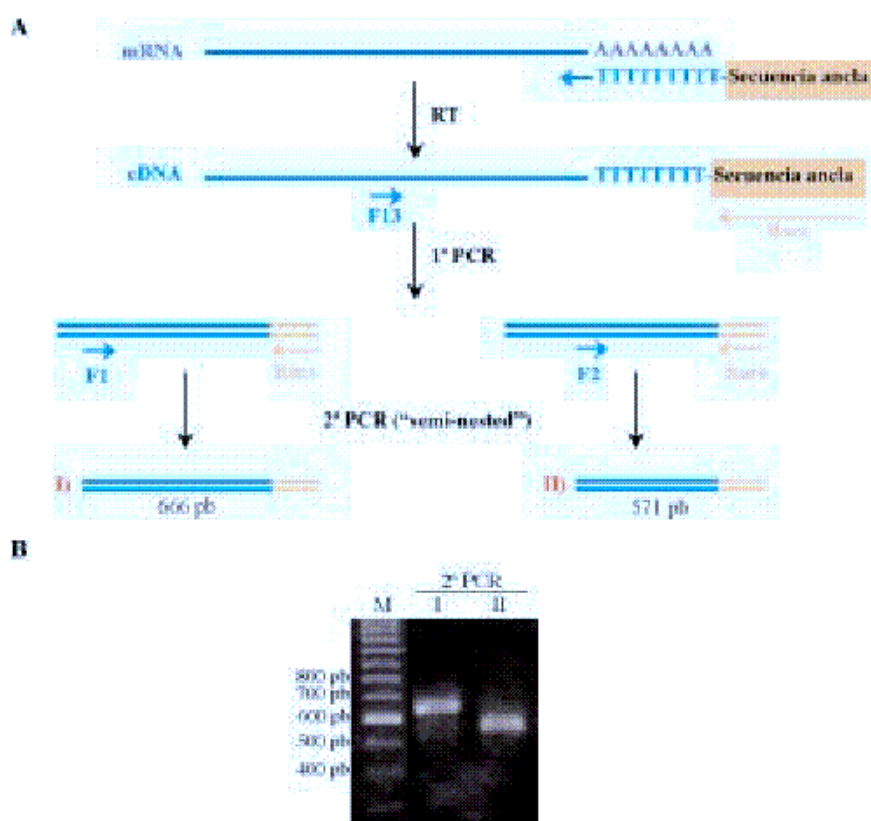


Figura 6. Experimentos de 3' RACE realizados para determinar el extremo 3' del cDNA de la *IL-1 β* (A) Se esquematiza el protocolo seguido y los productos de PCR obtenidos. (B) Visualización de los productos obtenidos en las dos reacciones de reamplificación del cDNA. M: marcador 100 pb DNA (Invitrogen).

1.2. Clonación del extremo 5'

Este extremo del gen fue obtenido utilizando como molde un cDNA al que se le había añadido una cola de poli(A) en su extremo 3'. Se realizó una PCR inicial con los cebadores R4 y RaceT (Tabla 6) y, al igual que en el caso anterior, no se observó amplificación. A continuación se realizaron reacciones de amplificación ("nested") a partir de

está utilizando los cebadores específicos R1 o R2 junto con el Race (Tabla 6). En estas reacciones se obtuvo un producto de 819 pb utilizando R2/Race o de 742 pb utilizando R1/Race (Fig. 7A). La diferencia entre ambos productos es de 77 pb y es la distancia existente en la secuencia de la *IL-1 β* de dorada entre las dos zonas donde alinean los cebadores específicos utilizados (Fig. 7B). Ambos fragmentos fueron clonados y secuenciados, obteniéndose la secuencia correspondiente al principio del ORF y el 5' UTR del cDNA de la *IL-1 β* de dorada.

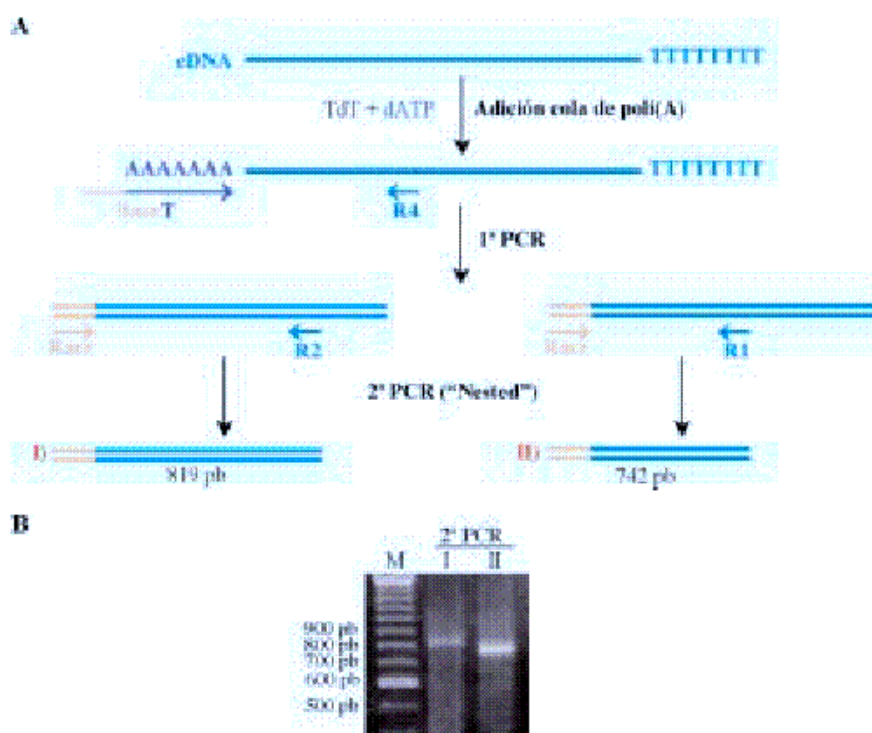


Figura 7. Experimentos de 5' RACE realizados para determinar el extremo 5' del cDNA de la *IL-1 β* . (A) Se esquematiza el protocolo seguido y los productos de PCR obtenidos. TdT: Transferasa de desoxinucleótidos terminal (B) Visualización de los productos obtenidos en las dos reacciones de reamplificación del cDNA. M: marcador 100 pb DNA.

1.3. Clonación del gen completo de la *IL-1 β*

Los intrones del gen de la *IL-1 β* de dorada fueron obtenidos mediante reacciones de amplificación utilizando gDNA y cebadores específicos (F4, F7, R3, R6 y R7, Tabla 6). Los productos obtenidos en las diferentes reacciones de amplificación se clonaron y secuenciaron, revelando que el gen de la *IL-1 β* está compuesto por cinco exones y cuatro intrones, uno de 406 pb presente en el 5' UTR y los otros tres situados en el ORF y con unos tamaños de 459, 679 y 149 pb, respectivamente (Fig. 8).

corte de la caspasa-1 o enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE). Esta caspasa corta el precursor de la IL-1 β de mamíferos en un residuo aspártico localizado entre las posiciones 113 y 117 para liberar la citoquina madura (Cerretti y col., 1992).

El análisis de la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β de dorada revela una similitud con el de otras secuencias de IL-1 β s (Fig. 11), ya que carece de un péptido señal hidrofóbico en el extremo amino que dirigiría la proteína al retículo endoplasmático.

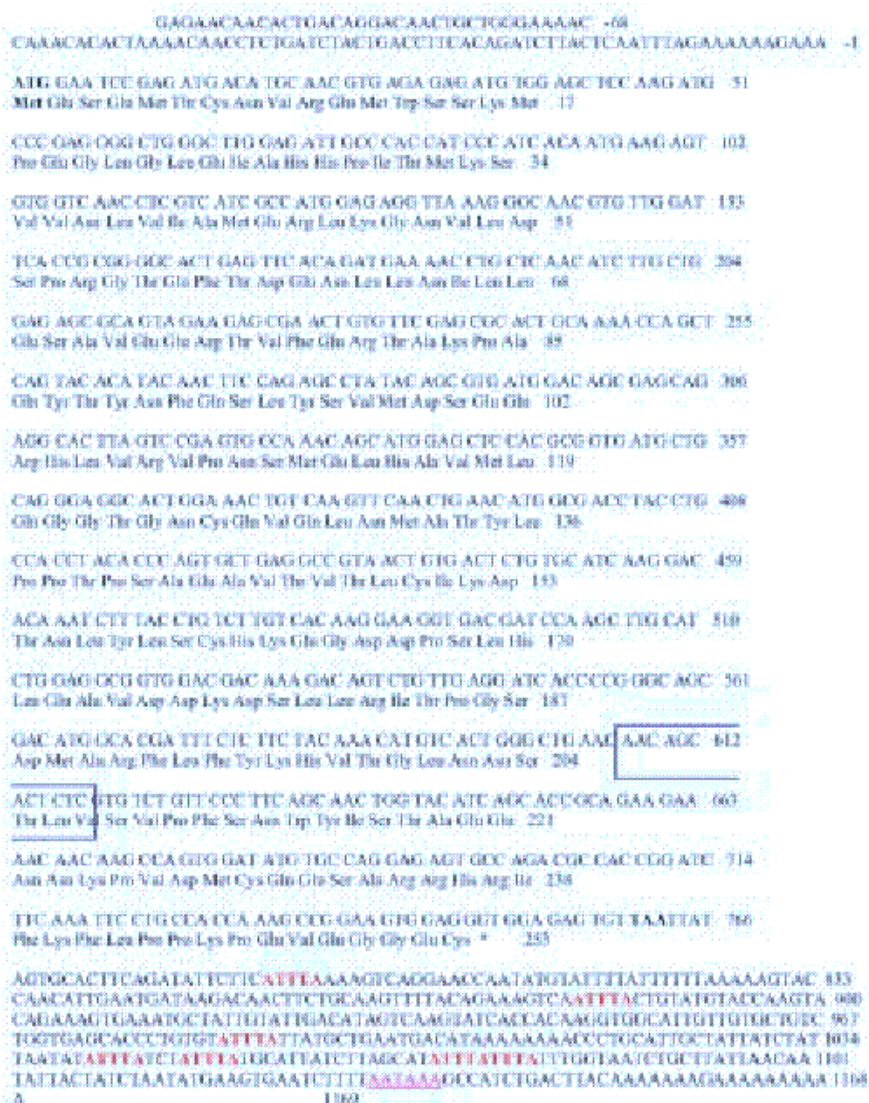


Figura 9. Secuencia completa del cDNA de la IL-1 β de dorada. En negrita está señalado el codón de inicio y el de fin de mensaje, subrayado en rosa se encuentra la señal de poliadenilación (AATAAA), en rojo se resaltan los motivos de inestabilidad del RNA (ATTTA) en el extremo 3' UTR y el recuadro azul indica los dos sitios potenciales de glicosilación.

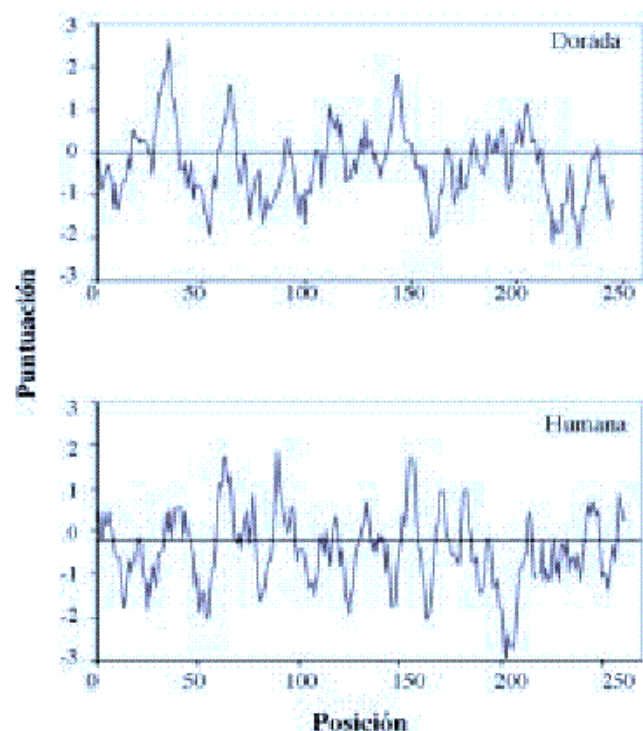


Figura 11. Gráficas de hidrofobicidad de la IL-1 β de dorada (arriba) y humana (abajo). Los valores positivos denotan los residuos hidrofóbicos y los valores negativos, los residuos hidrofílicos. La ausencia de una señal polipeptídica hidrofóbica en el extremo amino se observa en ambos casos.

```

Dorada: ATGGAAATCCCTAGATGACATGCAACCTTGAGAGAGATTTGGACCTCCAAAGATGCCCGAGGGG
60
Sargo: -----ATTTGGAGCCCTCAAGATGCTCCGAGGGG 27
Dentón: -----GCGAAATTGTGGAGGCCCAAGATGCCCAACCGG 33
      |||
Dorada: CTGGGCTTGGAGATTGGCCAGGATCCCAATGAAAGAGTGTGGTCAACCTGGTCAATC 129
Sargo: CTGGGCTTAGAGATTGCTCAACCATCCCTCACAATGAAGGCGTGGTCAACCTCAATC 87
Dentón: CTGGACTTGGAGATTACCCAGCATCCCTCACAATGAAGCGGTGGTAAACCTGATCATC 80
      |||
Dorada: GCCATGGAGAGGTTAAAGGGCAAGGTGTGGATTCAACCGCGGGCACTGAGTTACAGAT
189
Sargo: GGCATGGAGAGGTTAAAGAGCAAGGTGTGGAGTCAACCGCAGAGCACTGAGTTACAGAT
147
Dentón: GCCATGGAGAGGTTAAAGGGCAAGGTGTGGAGTCAACCGCGGGCACTGAGTTACAGAT
153
      |||
Dorada: GAAAACTGCTCAACATCTTCTGGAGAGCGCAGTGAAGAGCCGAACTGTGTTCCAGGCG
249
Sargo: GACAACCTGCTCAACATCTTCTGGAGAGCGCAGTAAAGAGCGGAAATGTGTTGGAGCGC
207
Dentón: GAAAACTGCTCAACATCTTCTGGAGAGCGCAGTAAAGAGCGGAACTGTGTTCCAGGCG
213
      |||
Dorada: ACTGC AAAACDAGCTCAATACACATACAACTTCAGAGGCTATACAGCGTGATGGACAGC
309
Sargo: ACTGC AAAACAGCTCAGTACACATACAACTTCAGAGGCTACACAGGTTGATGGACAGC
267
Dentón: ACTGCTACAACACTCAGTACAAATACAAGTTCAAAAACCTGTACAGCGTGATGGACAGC
273

```

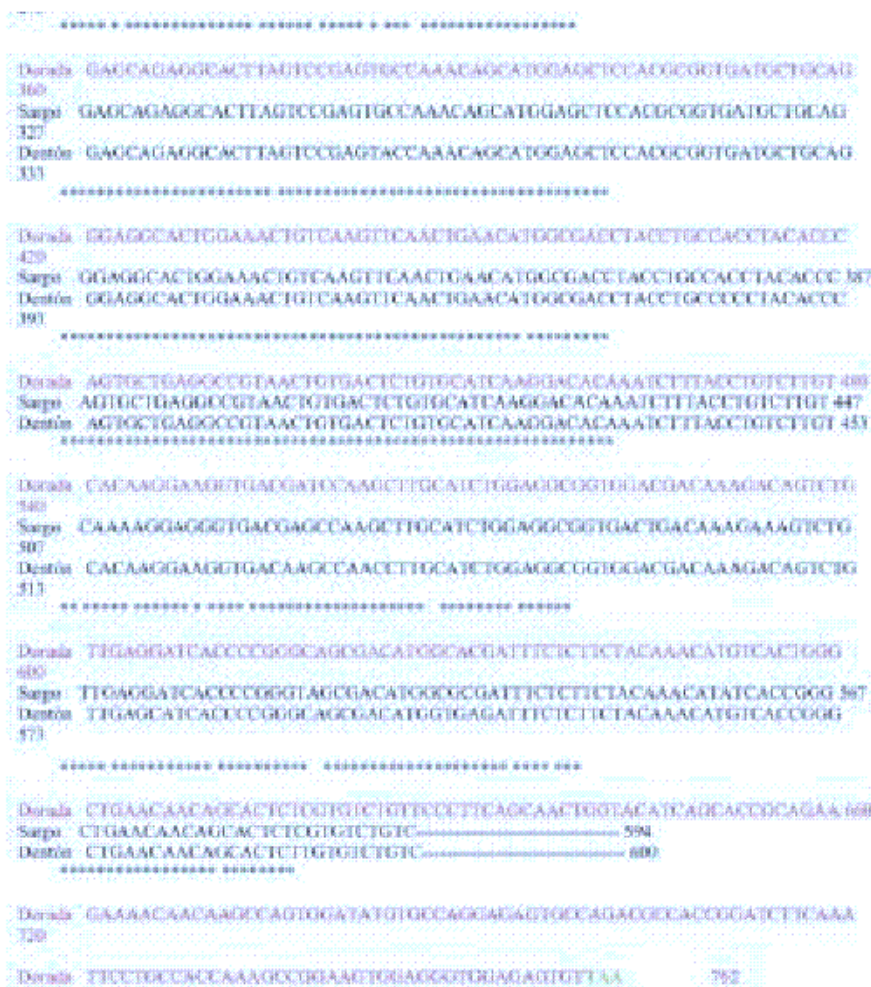


Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las *IL-1β* de dorada, sargo (AJ459238) y dentón (AJ459239). En verde están señalados el codón de inicio y el de fin de mensaje de la secuencia de dorada. Los nucleótidos idénticos se señalan con un asterisco.

parcial correspondiente al ORF casi completo de las *IL-1β* de estas especies. La comparación de las secuencias de nucleótidos con la de dorada (Fig. 12) revela una alta identidad en este fragmento. En concreto, presenta un 95% de identidad con la *IL-1β* de sargo y un 92% con la *IL-1β* de dentón. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre las *IL-1β* de espáridos revelan también un alto nivel de conservación (Fig. 13).

4. Homología con las *IL-1β* de otras especies

Cuando se compara la secuencia de la proteína de la *IL-1β* de dorada con las pertenecientes a otras especies, se observa que presenta una gran homología con las diferentes *IL-1β* de otros teleósteos (Tabla 4). En concreto, presenta la mayor homología con las



Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las IL-1 β de dorada, sargo y dentón. Los aminoácidos idénticos y similares se señalan con un asterisco y con uno o dos puntos, respectivamente. Los residuos en rojo indican las láminas β que forman la estructura secundaria de la proteína.

de otros miembros del orden de los perciformes: un 96% con la de sargo, un 93% con la de dentón y un 74% con la de lubina. Valores similares se encuentran con las IL-1 β s del orden de los pleuronectiformes, que incluyen a los peces planos como la platija japonesa y el rodaballo (Tabla 7). Sin embargo, la homología con la IL-1 β 1 de trucha, representante del orden salmoniformes, es tan solo del 67% y la identidad del 53%, aunque estos valores son mayores que los que presenta con los cipriniformes (53% de homología y 32% identidad con la IL-1 β 1 de carpa). Por último, la IL-1 β de dorada presenta la menor

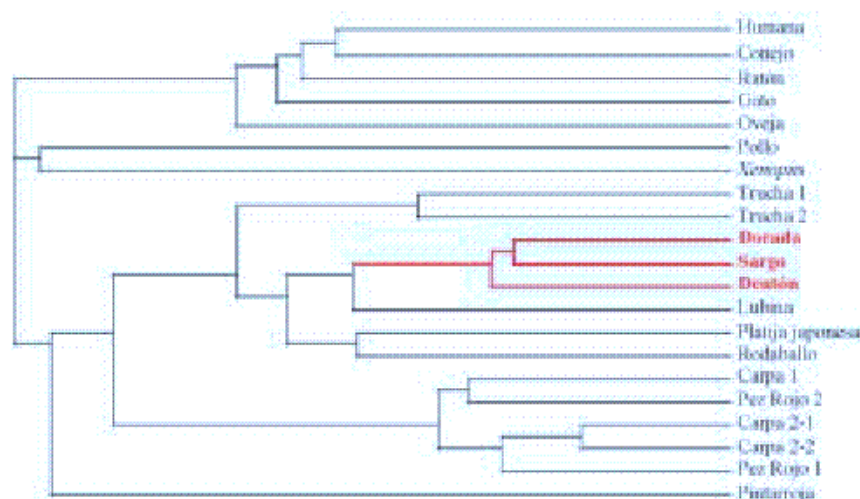


Figura 14. Árbol filogenético de las IL-1 β s conocidas obtenido con el programa CLUSTAL W, utilizando las secuencias de aminoácidos. En rojo se señalan las tres secuencias obtenidas en este estudio.

	Identidad (%)	Homología (%)
Humana	32	52
Ratón	30	50
Oveja	34	54
Pollo	32	51
Xenopus	32	50
Sargo	90	96
Dentón	88	93
Lubina	88	74
Rodaballo	58	72
Platija japonesa	50	68
Trucha 1	53	67
Trucha 2	47	62
Carpa 1	32	53
Carpa 2-1	29	44
Carpa 2-2	27	42
Pez rojo 1	27	42
Pez rojo 2	26	45
Pintarroja	23	38

Tabla 7. Homología de la proteína *IL-1 β* de dorada con otras *IL-1 β* s conocidas. En rojo se señalan las otras dos secuencias obtenidas en este estudio.

homología con la *IL-1 β* de pintarroja (38% de homología y un 23% de identidad) que pertenece a la clase de los condriktios.

Cuando se compara con las secuencias de *IL-1 β* s de aves y anfibios, la homología es parecida a la de mamíferos. Así, se aprecia un 51% de homología y un 32% de identidad con la proteína de pollo (*Gallus gallus*) y del anfibio *Xenopus laevis* (50% de homología y 32% de identidad); mientras que con la humana se observa un 52% de homología y un 32% de identidad. Estos resultados son confirmados por el árbol filogenético que se presenta en la figura 14, donde podemos apreciar que la *IL-1 β* de dorada aparece junto con las de peces teleósteos y separada de las de mamíferos, aves y anfibios.

5. Expresión de la *IL-1 β* de dorada

Para determinar la implicación de la *IL-1 β* en la respuesta inmunitaria de dorada, se estudió el patrón de expresión de este gen en distintas situaciones mediante ensayos de RT-PCR.

5.1. Expresión *in vivo*

El transcrito de la *IL-1 β* fue detectado en todos los tejidos examinados (bazo, cerebro, exudado peritoneal, sangre, riñón cefálico, branquia e hígado) de ejemplares de dorada infectados intraperitonealmente con la bacteria *V. anguillarum* (Fig. 15), aunque su expresión fue notablemente mayor en sangre y en exudado peritoneal, y menor en el cerebro. Sin embargo, el patrón de expresión cambia notablemente en peces sin infectar,

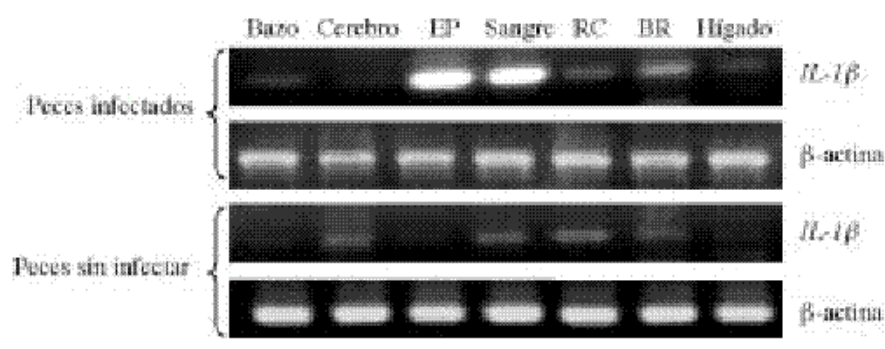


Figura 15. Expresión de la IL-1 β y de la β -actina en diferentes tejidos de peces infectados y no infectados con *V. anguillarum*. EP: exudado peritoneal, RC: riñón cefálico y BR: branquia.

observándose una menor expresión del gen en todos los tejidos (Fig. 15). La amplificación paralela de la β -actina revela una cantidad de cDNA de partida similar en todas las muestras.

5.2. Expresión *in vitro*

La expresión del transcrito de la IL-1 β también se estudió en leucocitos de riñón cefálico incubados *in vitro* durante distintos tiempos con una relación 1:10 (leucocito:bacteria) de *V. anguillarum* R-82 fijado en formaldehído. Los resultados obtenidos indican un aumento de la acumulación del transcrito a todos los tiempos ensayados (Fig. 16A). Por otro lado, la adición de LPS (10 μ g/ml) y de VaDNA (50 μ g/ml) también producía un aumento del transcrito de la IL-1 β , presentando además una acción sinérgica cuando se usan conjuntamente (Fig. 16B).

Por último, el transcrito de la IL-1 β se detectó en macrófagos purificados a 20 ciclos de amplificación, a pesar de permanecer ausente en leucocitos de riñón cefálico (tratados o no con LPS). El aumento del transcrito de la IL-1 β es particularmente evidente después de estimular los macrófagos con LPS y/o MAF (Fig. 16C).

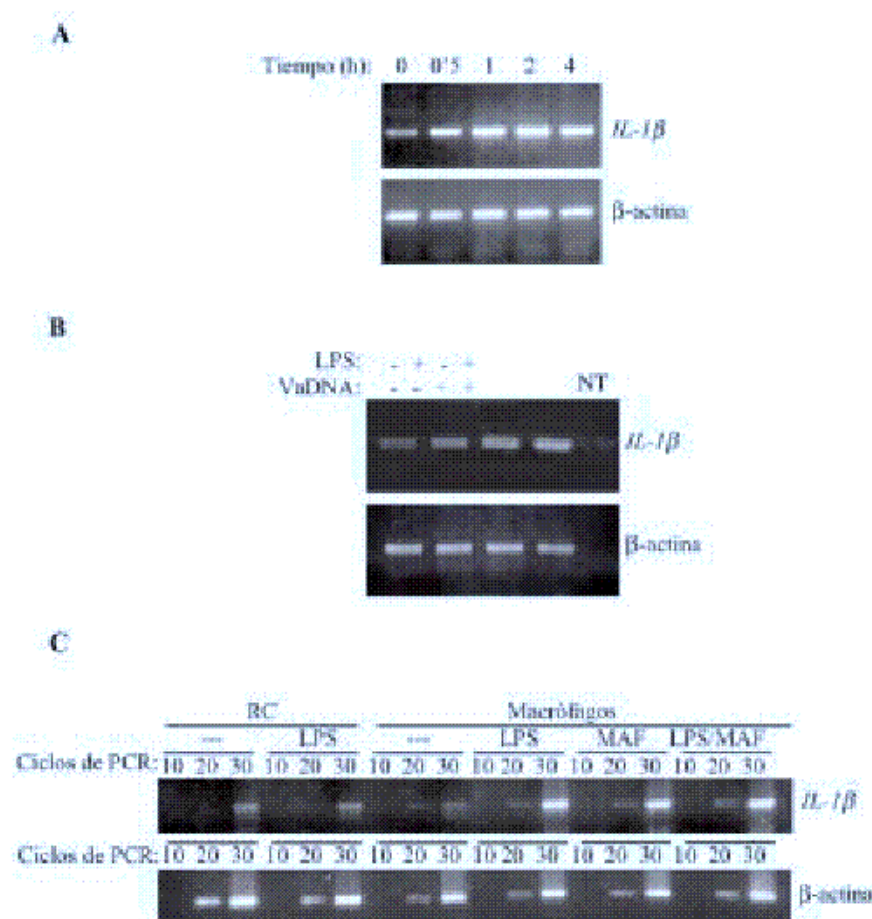


Figura 16. Expresión *in vitro* de la *IL-1 β* (utilizando los cebadores F3/R2) y de la β -actina. Las PCRs se realizaron con cDNA procedente de leucocitos de riñón cefálico estimulados a distintos tiempos con una relación 1:10 de *V. anguillarum* (A) o durante 4 h con 10 μ g/ml de LPS y/o 50 μ g/ml de VaDNA. NT: control sin cDNA (B). cDNA procedente de monocapas de macrófagos o de células de riñón cefálico (RC) sin estimular o estimulados durante 4 h con 10 μ g/ml de LPS y/o una dilución 1/20 de MAF fueron utilizados para amplificar la *IL-1 β* y la β -actina a 10, 20 y 30 ciclos (C). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Capítulo II

Obtención de un anticuerpo contra la interleuquina-1 β de dorada

Material y métodos

1. Clonación del ORF DE LA *IL-1 β* de dorada

En primer lugar, el ORF de la *IL-1 β* de dorada se clonó en el vector pBluescript SK+ (Stratagene), plásmido artificial de 2.964 pb derivado del pUC19 y que contiene los promotores reconocidos por las RNA polimerasas T3 y T7, el promotor del operón *lacZ*, un sitio múltiple de clonación dentro del gen que cifra la β -galactosidasa y un gen que confiere resistencia a ampicilina.

El ORF de la *IL-1 β* de dorada se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando los oligonucleótidos F6 y R5 (Tabla 6) que presentan en sus extremos 5' una secuencia de reconocimiento y corte para la enzima *Bam*HI (GGATCC). Para esta amplificación se utilizó 1 unidad de la enzima *Pfu* DNA Polimerasa (MBI Fermentas) junto con los siguientes componentes: 3 μ l de cDNA procedente de células de riñón cefálico de dorada estimuladas durante 4 h con 10 μ g/ml de LPS (ver material y métodos del capítulo I), 5 μ l de tampón 10x con MgSO_4 20 mM, 1 μ l de dNTPs (10 mM), 2 μ l de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 10 μ M y agua libre de DNasa y RNasa (Sigma) para ajustar la reacción a un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1.	95°C	durante 2 min	1 ciclo
	95°C	durante 45 seg	
2.	55°C	durante 45 seg	45 ciclos
	72°C	durante 2 min	
3.	72°C	durante 10 min	1 ciclo

El producto amplificado fue purificado mediante el kit comercial "QIAquick® PCR Purification kit" siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado y 1 μ g del vector pBluescript fue digerido con 10 unidades de la enzima de restricción *Bam*HI durante 2 h a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima (15 min, 80°C) y se purificaron los productos de la digestión con el kit "QIAquick® PCR Purification kit". La concentración y el tamaño de los productos digeridos se determinó comparándola con el marcador λ DNA/*Hind*III en un gel de agarosa al 1%. A continuación, fueron ligados usando una relación inserto:vector de 3'5:1 (42 ng de inserto y 50 ng de vector), junto con 6 μ l de tampón de reacción 5x y 1 unidad de ligasa de DNA T4 (New England BioLabs Inc.). La reacción de ligación se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente en un volumen final de 30 μ l. Células competentes de *E. coli* DH5 α (ver apartado 1.1 del material y métodos, capítulo I) fueron transformadas, sembradas en placas de LB-agar con ampicilina y X-gal, y crecidas a 37°C durante una noche. Varias colonias blancas fueron crecidas durante una noche a 37°C en 5 ml de LB con 100 μ g/ml de ampicilina para posteriormente aislar el DNA plasmídico utilizando el kit comercial "QIAprep Spin Plasmid kit". Tras obtener los plásmidos correspondientes, se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con

las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Los plásmidos que contenían las bandas de interés fueron secuenciados para comprobar que la secuencia no presentaba mutaciones y a uno de ellos se le asignó el nombre de pVP33.

2. Construcción de un vector de expresión de la *IL-1 β*

El plásmido pET-15b (Novagen) se utilizó como vector de expresión en células procariontes. Este plásmido tiene un tamaño de 5.708 pb, contiene el promotor T7, junto al operador del operón *lac*, que dirige la producción de proteínas de fusión unidas a seis residuos de histidinas (6xHis) en su extremo amino, el gen *lacI* que cifra el represor *lac* y como marcador un gen que confiere resistencia a ampicilina (Fig. 17). Un μ g de este vector fue digerido con 10 unidades de la enzima de restricción *Bam*HI, purificado con el kit comercial "QIAquick® PCR Purification kit" y utilizado en una reacción de ligación cuyo inserto fue el ORF de la *IL-1 β* extraído del plásmido pVP33 tras ser digerido con *Bam*HI y a continuación purificado en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LM-SIEVE, Pronadisa). La mezcla de ligación se compuso de 14 ng de inserto, 40 ng de pET-15b (relación 3:1), 10 μ l del tampón de reacción 5x, 1 unidad de ligasa de DNA T4 y hasta 50 μ l de agua estéril. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 16 horas. Como control de auto-ligación se realizó una reacción paralela en la que el inserto fue sustituido por agua.

Trascurrido este tiempo se le añadió un volumen de TCM 2x frío y con esta mezcla se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α (ver apartado 11 del material y

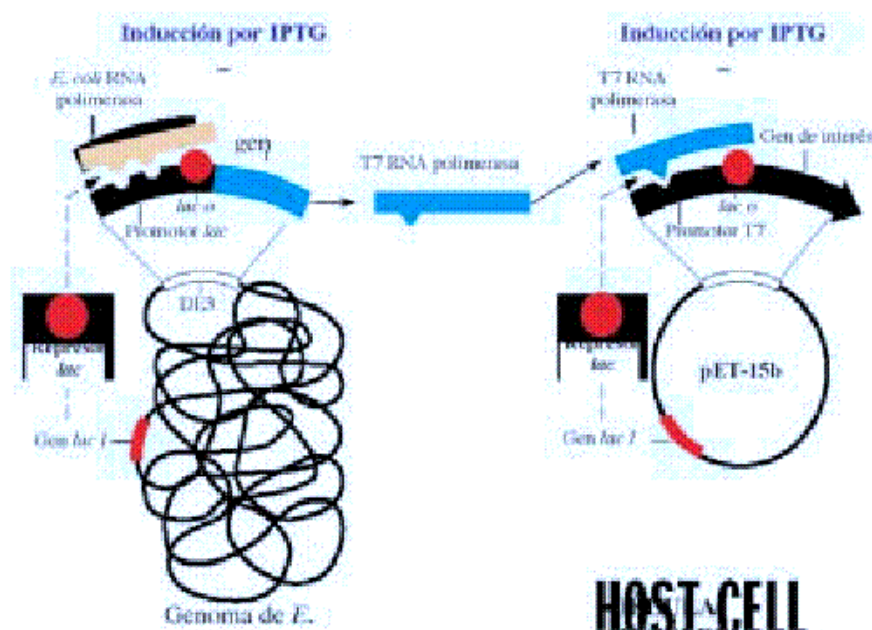


Figura 17. Control de los elementos en el sistema pET.

métodos, capítulo I) que fueron sembradas en placas de LB-agar con ampicilina y crecidas a 37°C durante una noche. Varias colonias se crecieron en 5 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina durante una noche a 37°C para posteriormente aislar el DNA plasmídico. Tras obtener los plásmidos correspondientes, se comprobó la presencia y la orientación del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente. Los vectores que contenían el inserto en la orientación adecuada fueron secuenciados y a uno de ellos se le asignó el nombre pVP40.

3. Expresión de la IL-1 β recombinante en *Escherichia coli*

Para expresar la IL-1 β fusionada a 6xHis (pVP40) se utilizó la estirpe de *Escherichia coli* BL21 lisogénica para el fago λ DE3, cuyo genotipo es: *hsdS gal* (λ clts857 *ind1* Sam7 *nin5* *LacUV5-T7* gene 1) (Studier y Moffatt, 1986). Esta estirpe carece de las proteasas lon y ompT, facilitando la estabilidad de las proteínas recombinantes durante el proceso de purificación (Grodberg y Dunn, 1988). La IL-1 β clonada en el vector pET-15b está bajo el control del promotor de T7, la polimerasa de T7 está determinada por el fago lisogénico λ DE3, que a su vez está controlado por el promotor *lacUV5*, que se induce por isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG) y se reprime por el represor *lacI*, el cuál está presente en condiciones normales en la célula huésped. Por lo tanto, la adición de IPTG induce la RNA polimerasa de T7 y la expresión del gen de interés (Fig. 17).

Bacterias competentes de *E. coli* BL21(DE3) obtenidas de la misma manera que para la estirpe DH5 α (según se detalla en el apartado 11 del material y métodos del capítulo I) se transformaron con 10 ng de vector pVP40 o con el vector pET-15b. Varias colonias procedentes de estas transformaciones se crecieron en 3 ml de medio de cultivo LB-ampicilina durante toda la noche. Medio ml de este cultivo se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga HERLME Z160M, las células se resuspendieron en 0'5 ml de LB fresco y se utilizaron como inóculo para un cultivo de 50 ml. Estos cultivos se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0'4–0'6 y entonces se indujeron con IPTG 1 mM (Applichem) a diferentes temperaturas (37°C y 25°C) y distintos tiempos de incubación (desde 15 min hasta 16 horas). Los cultivos se enfriaron inmediatamente y una alícuota de 2 ml se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm. Las bacterias se resuspendieron en 0'3 ml de tampón A (TrisHCl 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 4 mM, pH=7'5) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1/20, Sigma) y se sonicaron en un sonicador (LABROSONIC U, B. Braun) mediante 3 ciclos de 15 seg cada uno y a 3/4 de la máxima potencia. De este lisado se guardó una alícuota de 20 µl y el resto se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min para recoger 20 µl del sobrenadante. Ambas alícuotas se analizaron mediante "Western blot" para determinar la solubilidad de la proteína de fusión obtenida (Ver apartado 6).

4. Purificación de la IL-1 β recombinante

La purificación de la IL-1 β recombinante de dorada se realizó en condiciones desnaturalizantes a partir de cultivos de 50 o de 500 ml de *E. coli* BL21(DE3) que fueron inducidos durante 3 h a 37°C con IPTG 1 mM. Las bacterias fueron recuperadas mediante centrifugación (2.200xg, 30 min) y lisadas durante 1 h a temperatura ambiente con agitación en 2-3 ml de tampón de lisis desnaturalizante [TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH=7.8 (TrisHCl/NaCl) y guanidina-HCl 6 M]. A continuación, los lisados se centrifugaron a 10.000xg durante 10 min para retirar los restos celulares y a los sobrenadantes se les añadió 50-150 μ l de resina de cobalto ("TALON® Metal Affinity Resins", CLONTECH) equilibrada con tampón desnaturalizante. La resina se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con rotación para permitir la unión de la proteína de fusión al Co²⁺ de la resina (Fig. 18).

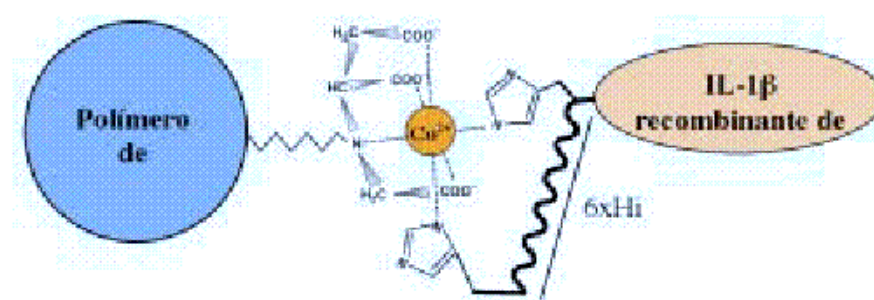


Figura 18. Diagrama de la unión de la polihistidina (6xHis) al Co²⁺. En esta unión se comparten los electrones del nitrógeno del anillo imidazol de las histidinas con los orbitales deficientes en electrones del metal.

A continuación, la resina fue lavada 5 veces con 1 ml de tampón de lavado [TrisHCl/NaCl, imidazol 5 mM (Sigma)] y la proteína recombinante se eluyó con 50 μ l de tampón TrisHCl/NaCl con imidazol 150 o 300 mM, el cual desplaza a las His de la unión con el Co²⁺. Después de eluir con imidazol se procedió a una elución con 50 μ l de una solución de EDTA 100 mM pH=8, el cual quela al Co²⁺ y lo desplaza de la resina de sefara, eluyendo todos los polipéptidos que quedaban unidos a la resina a través del Co²⁺. Alternativamente, se eluyó toda la proteína de fusión en 50 μ l de tampón de carga de electroforesis de proteínas durante 10 min a 95°C. La IL-1 β purificada de esta forma, se analizó y cuantificó en geles de acrilamida utilizando el marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) (apartado 5) y/o mediante el kit comercial BCA (Pierce) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas eluidas se conservaron a -80°C en alícuotas con glicerol al 50%.

5. Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas en función de su tamaño mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida utilizando el equipo Mini-PROTEAN 2 (BioRad) para

geles de 0'75 mm de grosor. En todos los casos se realizaron geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS (desnaturalizantes) según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando dos geles de poliacrilamida (concentrador al 4% y separador al 15%). La composición de estos geles fue:

	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida-bisacrilamida (37'5:1, Applichem)	0'325 ml	2'5 ml
Agua	1'525 ml	1'18 ml
SDS al 10%	0'025 ml	0'05 ml
TrisHCl 1'5M pH=8'8	-	1'25 ml
TrisHCl 0'5M pH=8'8	0'825 ml	-
Persulfato amónico (Sigma) al 10%	0'02 ml	0'02 ml
TEMED (Sigma)	0'004 ml	0'004 ml

Las muestras se prepararon en un volumen máximo de 20 ml y se les adicionó tampón de carga DTT-SDS 2x o 5x [1x: TrisHCl 40 mM, glicerol al 6'25%, ditiotretitol 32 mM (DTT, Gibco), SDS al 1'5%, azul de bromofenol al 0'025% (Sigma), pH=6'8]. Tras 10 min de incubación a 95°C, las muestras se cargaron en el gel mediante una microjeringuilla (Hamilton) y se sometieron a electroforesis a 200 V en tampón de recorrido (TrisHCl 0'05 M, glicina 0'192 M, SDS al 0'1%, pH = 8'3) hasta que el colorante indicador alcanzaba el borde inferior del gel. Se utilizó el marcador de tamaño molecular Bench-Mark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen) cuando los geles se transfirieron para realizar experimentos de "Western blot". Cuando los geles se tiñeron directamente con azul de Comassie o se procesaron para tinción negativa con imidazol se utilizó el marcador de tamaño molecular Bench-Mark™ Protein Ladder (Invitrogen).

Para la tinción de los geles con el azul de Comassie se aplicó una solución de azul de Comassie Brilliant al 0'05% (Sigma) en metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 1 h. Los geles se destiñeron mediante varios lavados sucesivos con una solución de metanol al 30% y de ácido acético al 10%, y se fijaron en una solución de ácido acético al 10%. Alternativamente, los geles se sometieron a tinción negativa empleando una solución de imidazol 0'2 M (Sigma) y del 0'1% de SDS durante 10 min, para a continuación ser revelados con ZnSO₄ 0'2 M (Ortiz y col., 1992).

6. Transferencia de proteínas y "Western blot"

La transferencia de proteínas o "blotting" supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para identificar y visualizar posteriormente una proteína específica empleando técnicas de inmunodetección llamadas "Western blot". En primer lugar, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0'45 mm de grosor (BioRad), mediante un sistema semi-seco y utilizando el equipo Semi-Dry Electroblothing Unit SV20-SDB (Sigma). El procedimiento se inició apilando sucesivamente sobre el electrodo

correspondiente al ánodo 3 papeles de cromatografía de 3 mm de espesor (Whatman) empapados en tampón de transferencia (TrisHCl 48 mM, glicina 38 mM, SDS 1'3 mM y metanol al 20%, pH=8'8), sobre éstos se puso la membrana, el gel, otros 3 papeles de cromatografía empapados en tampón de transferencia y finalmente el electrodo plano correspondiente al cátodo. La carga neta de las proteínas es negativa debida al SDS, así que migraron hacia el ánodo, que es donde se encuentra la membrana. Las transferencias se realizaron a 200 mA de intensidad durante 60 min.

Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante una noche a 4°C con leche desnatada al 5% en tampón lavador (TrisHCl 10 mM, NaCl 100 mM y Tween-20 al 0'01%, pH=7'5) para prevenir la unión no específica de los anticuerpos a la membrana. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en tampón de bloqueo con un anticuerpo primario destinado a localizar la proteína de interés (Tabla 8). Tras eliminar el exceso de anticuerpo con cuatro lavados en Tris/NaCl-Tween20, la membrana se incubó durante una hora en tampón de bloqueo con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y dirigido contra la Ig de la especie en la que se ha producido el anticuerpo primario (Tabla 8). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otros cuatro lavados en Tris/NaCl-Tween20. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave y constante.

Los complejos antígeno-anticuerpo se localizaron mediante quimioluminiscencia con el sistema ECL (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 19). Tras añadir la solución que contiene el sustrato para la peroxidasa, la membrana se expuso a una película Super RX (Fuji) durante períodos de tiempo que variaron entre 5 y 120 min, dependiendo de la intensidad de la señal.

Anticuerpo primario	Dilución	Procedencia	Anticuerpo secundario	Dilución	Procedencia
α -sbIL-1 β	1:1.000	Este trabajo	α -IgG de conejo-HRP	1:5.000	Sigma
α -sbIL-1 β purificado	1:100	Este trabajo	α -IgG de conejo-HRP	1:5.000	Sigma
α -cathepsins D humana	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	α -IgG de cabra-HRP	1:5.000	Sigma
3ZD	1:1.000	Biological Resources Branch, NCI	α -IgG de ratón-HRP	1:2.500	Sigma
α - β actina humana	1:10.000	Sigma	α -IgG de ratón-HRP	1:5.000	Sigma
α -BxHis	1:2.500	Sigma	α -IgG de ratón-HRP	1:2.500	Sigma

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos de "Western blot". (a: anti; a-sbIL-1 β : a-IL-1 β de dorada; 3ZD: a-IL-1 β humana/ratón).

Para comprobar la misma carga de proteínas en todas las calles, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron durante 30 seg con una solución de Ponceau S al 0'1 % (Sigma) y de ácido acético al 5%. Esta tinción no es permanente y puede desaparecer con posteriores lavados, siendo compatible con sucesivas detecciones con distintos anticuerpos.

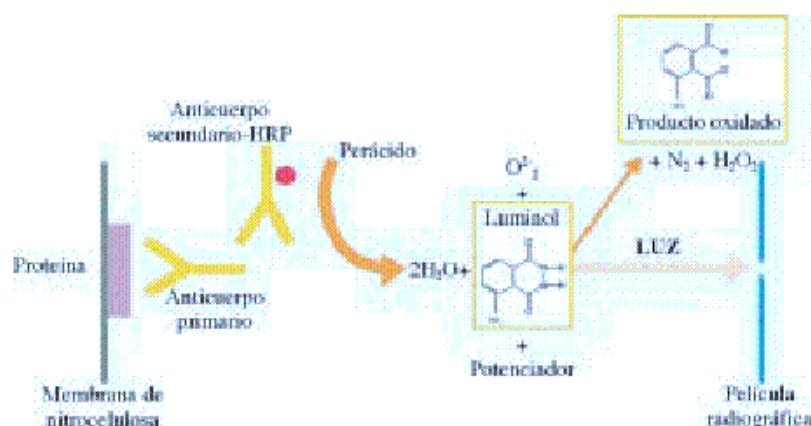


Figura 19. Método de detección mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL) empleada en los "Western blot".

7. Producción de anticuerpos policlonales

Para la producción de un anticuerpo policlonal se escogieron dos conejos neozelandeses que fueron inmunizados mediante inyección subcutánea con la IL-1b recombinante de dorada fusionada al epitopo 6xHis (6xHis-IL-1b). Esta proteína fue eluida de la resina de Co^{2+} mediante la adición de tampón de carga y sometida inmediatamente a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS. Tras la electroforesis los geles se sometieron a tinción negativa con imidazol y el fragmento de acrilamida que contenía la IL-1b se trituró en un mortero junto con 1 ml de tampón PBS estéril hasta disgregarlo totalmente. Antes de llevar a cabo la inmunización del conejo, el antígeno se emulsionó con 1 volumen de adyuvante completo de Freund (FCA, Sigma) para la inmunización primaria, o con 1 volumen de adyuvante incompleto de Freund (FIA, Sigma) para las inmunizaciones de recuerdo.

La obtención de los sueros preinmune e inmune durante el periodo de inmunización se realizó mediante la extracción de sangre de la oreja del conejo. A los 12 días después de la última inmunización, tras comprobar la presencia de anticuerpos anti-IL-1b, el animal fue anestesiado con éter etílico y se extrajo la sangre del corazón. Para la obtención de suero, la sangre se dejó coagular durante 16 h a $4^{\circ}C$ y se centrifugó durante 5 min a $10.000 \times g$ para retirar el coágulo, aislar el suero y congelarlo en alícuotas a $-20^{\circ}C$. La presencia de anticuerpos específicos se determinó mediante "Western blot" utilizando la IL-1b recombinante purificada.

Para algunos experimentos de "Western blot" los anticuerpos del suero del conejo fueron purificados mediante cromatografía de afinidad a la proteína A de *Staphylococcus aureus* utilizando el kit comercial "Protein A Antibody Purification kit" (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y almacenados en alícuotas a $-20^{\circ}C$ con glicerol al 50%.

Resultados

1. Clonación del ORF de la IL-1 β de dorada en pBluescript SK+

El ORF completo de la IL-1 β de dorada se amplificó a partir de cDNA obtenido de células de riñón cefálico activadas *in vitro* con LPS y utilizando los cebadores F6 y R5 (Tabla 6, Fig 5) que presentan ambos en su extremo 5' un sitio *Bam*HI (GGATCC). Este fragmento se digirió con *Bam*HI y se clonó en el vector pBluescript SK+ previamente digerido con *Bam*HI (Fig. 20). El plásmido obtenido, denominado pVP33, posee un tamaño de 3.738 pb y fue digerido con distintas restrictasas para comprobar la correcta inserción del fragmento clonado y secuenciado para comprobar que no presentaba mutaciones.

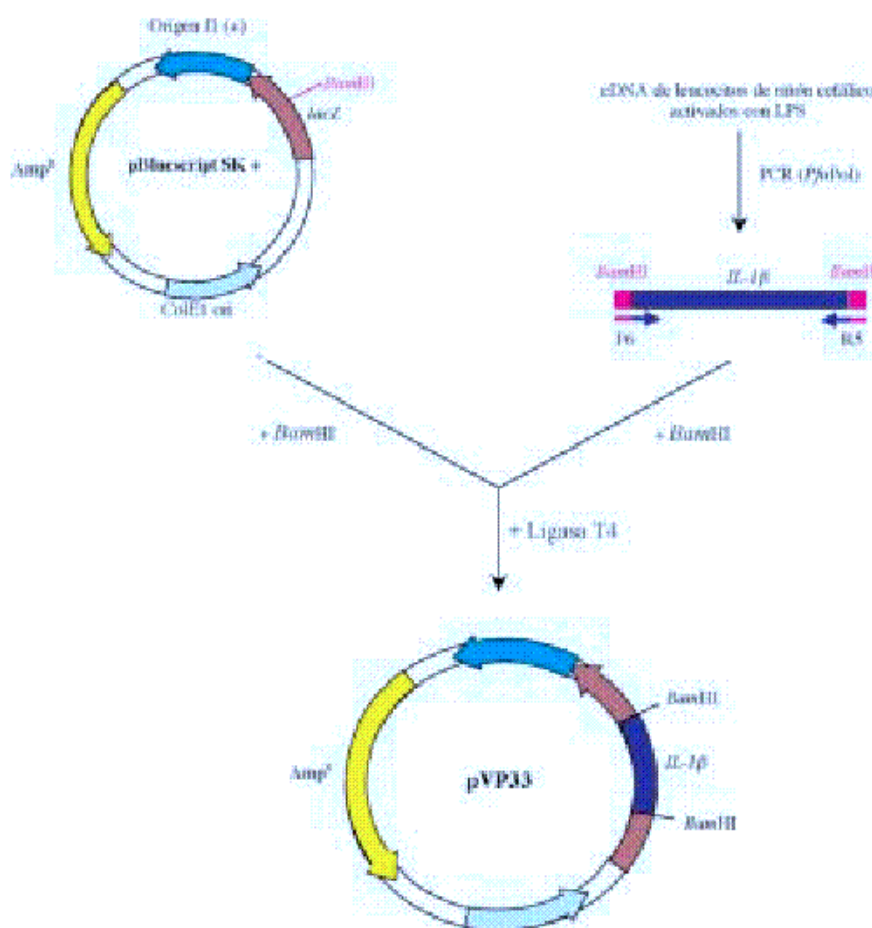


Figura 20. Construcción del vector pVP33.

2. Construcción de un vector de expresión de la IL-1 β de dorada

Para expresar la IL-1 β de dorada en *E. coli* se utilizó el vector de expresión pET-15b, que contiene un sitio de clonación *Bam*HI aguas abajo del promotor T7/lac. En este sitio se clonó el ORF de la IL-1 β de dorada extraído del plásmido pVP33 tras ser digerido con la enzima *Bam*HI (Fig. 21). El plásmido resultante, denominado pVP40, se digirió con distintas restrictasas para comprobar la correcta orientación del fragmento clonado y, a continuación, se secuenció para comprobar que el ORF de la IL-1 β se encontraba en fase con las 6xHis (Fig. 22). El plásmido obtenido permite expresar la IL-1 β fusionada con un epítopo de seis residuos de histidina (6xHis) en su extremo amino bajo el control del promotor T7/lac.

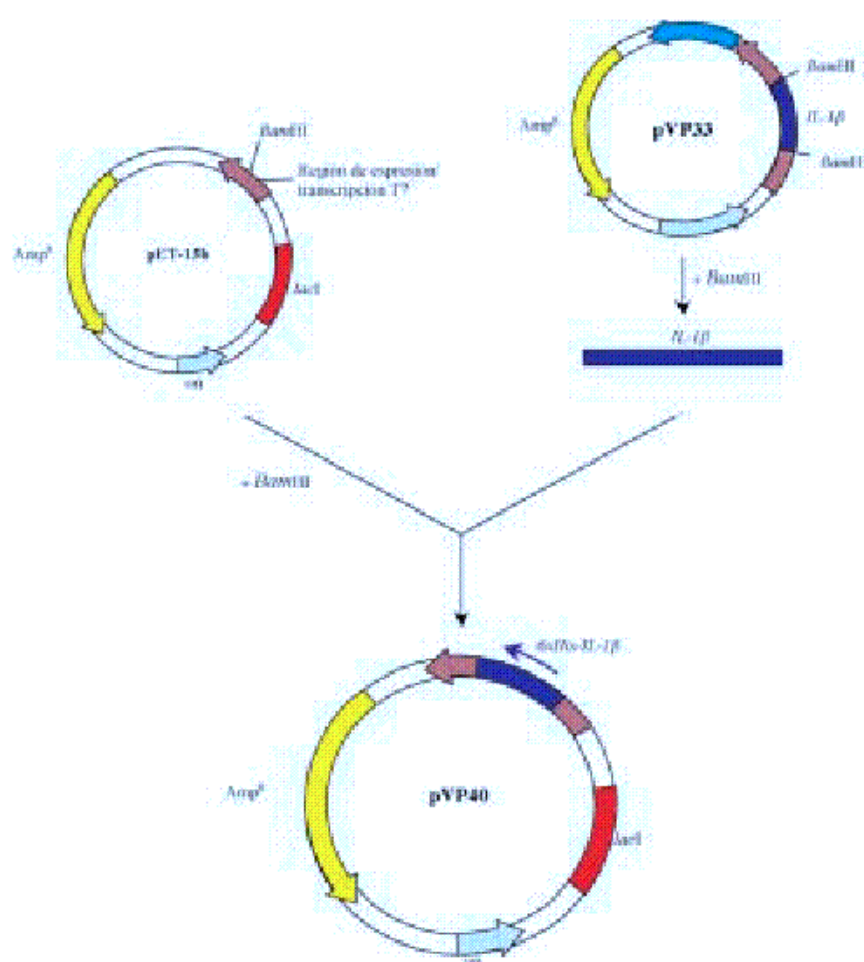


Figura 21. Construcción del vector pVP40.

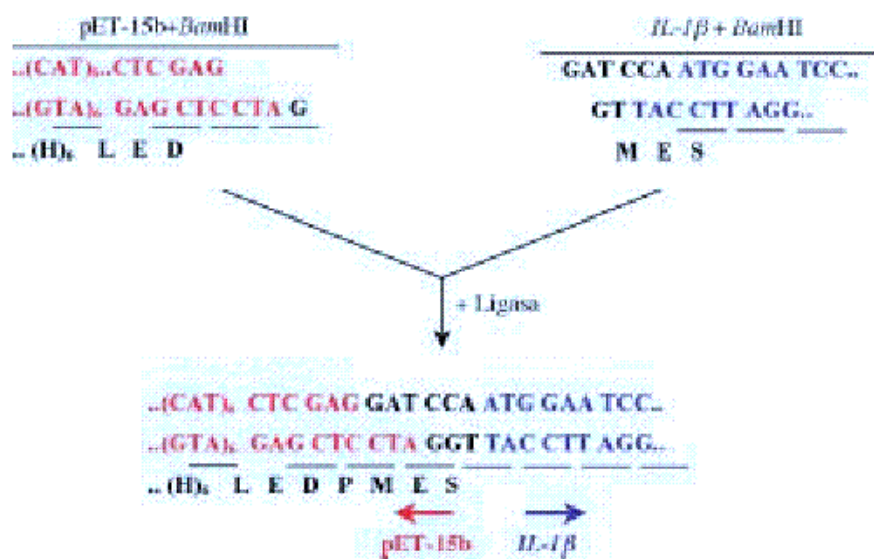


Figura 22. Secuencia de la región correspondiente a la fusión de la IL-1 β con la región de expresión del promotor T7lac en el plásmido pVP40. En azul se indica la secuencia de la IL-1 β en rojo; la región de iniciación de la traducción del pET-15b; y en negro, los nucleótidos añadidos como consecuencia de la estrategia de clonación seguida.

3. Condiciones de expresión óptimas

Para expresar la IL-1 β en *E. coli* se utilizó como célula huésped la estirpe BL21(DE3), que permite controlar la expresión de la proteína mediante inducción por IPTG de la polimerasa del fago T7, reduciendo los posibles efectos tóxicos provocados por la acumulación de la proteína sintetizada en *E. coli*.

Transformantes de la estirpe BL21(DE3) portadores del plásmido pVP40 o pET-15b se cultivaron hasta alcanzar una densidad óptica adecuada. Los cultivos se indujeron con IPTG 1 mM, ensayando diferentes condiciones de temperatura y distintos tiempos de incubación. Tras este periodo se realizó la extracción de proteínas, analizando las fracciones proteicas solubles e insolubles en geles de poliácridamida.

La tinción de los geles de poliácridamida con azul de Coomassie no reveló proteína alguna específica en los extractos de transformantes portadores del plásmido pVP40 (Fig. 23A) tras inducir la expresión de la proteína de fusión durante 3 h a 37°C. Sin embargo, experimentos de tipo "Western blot" utilizando anticuerpos monoclonales contra el epítopo 6xHis, revelaron la presencia de una proteína en los extractos de transformantes portadores del plásmido pVP40, del tamaño esperado para la 6xHis-IL-1 β de dorada (32 kDa, Fig. 23B). En todos los transformantes esta proteína se detectó en la fracción insoluble de los extractos.

La solubilidad de la IL-1 β recombinante se determinó ensayando diferentes condiciones de temperatura (37°C y 25°C) y distintos tiempos de incubación en presencia de IPTG (desde 15 min hasta 16 horas). En la figura 24A se puede observar que la producción de

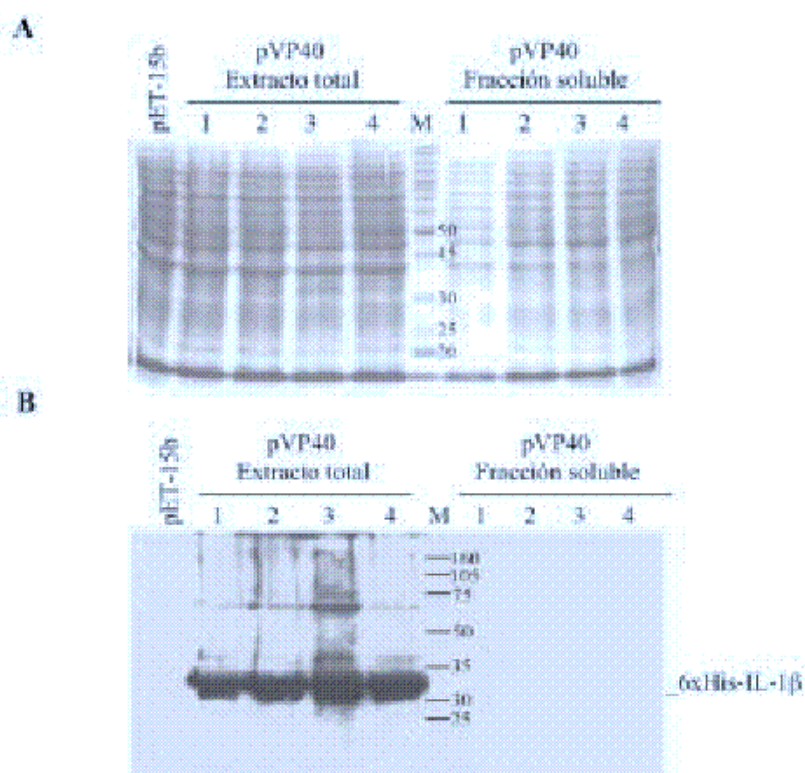


Figura 23. (A) Tinción con azul de Coomassie de las proteínas presentes en los extractos totales y las fracciones solubles obtenidas de la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. (B) Inmunodetección de la proteína 6xHis-IL-1 β con una dilución 1:2.500 del anticuerpo α -6xHis. En ambos casos los extractos corresponden a transformantes portadores del plásmido de expresión (pVP40) o del plásmido control (pET-15b). La expresión de la proteína se indujo durante 3 h a 37°C. En cada calle se cargaron 50 mg de proteínas totales. M: marcador de tamaños en kDa.

la IL-1 β se induce a tan sólo 15 min de incubación con IPTG, independientemente de la temperatura. Sin embargo la solubilidad de la proteína recombinante es mayor cuando se inducen los cultivos a 25°C y disminuye conforme se aumenta el tiempo de inducción (Fig. 24B), aunque siempre en cantidades muy bajas en comparación con la obtenida en forma insoluble. Dado que la proteína de fusión precipita rápidamente en todas las condiciones ensayadas, formando probablemente cuerpos de inclusión, y que las mayores cantidades obtenidas fueron a tiempos largos, en experimentos posteriores se utilizaron unas condiciones de inducción con IPTG de 3 h de incubación a 37°C.

4. Purificación de la IL-1 β

La IL-1 β producida en *E. coli* se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción insoluble de los extractos empleando una resina de Co²⁺

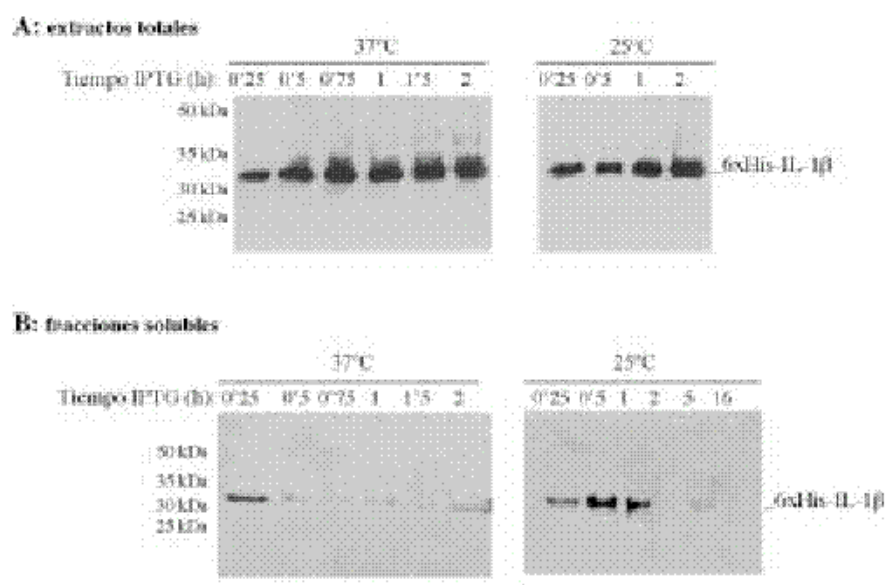


Figura 24. Immunodetección de la 6xHis-IL-1 β en extractos de *E. coli* con anticuerpos anti-6xHis. Los extractos corresponden a transformantes portadores del plásmido pVP40. La expresión de la proteína se indujo a la temperatura y tiempos señalados. (A) Extractos de lisados totales y (B) fracciones solubles. Las membranas fueron reveladas con una dilución 1:2.500 del anticuerpo α -6xHis.

y utilizando condiciones desnaturalizantes para solubilizar las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión. La cantidad de IL-1 β purificada a partir de cultivos de 500 ml osciló entre 300 y 600 μ g y apareció con un alto grado de pureza, ya que cargando 20 μ g de proteína purificada no aparecen bandas contaminantes cuando se tiñe con azul de Coomassie (Fig. 25A). Por otra parte, la proteína recombinante se eluyó probando distintas concentraciones de imidazol y EDTA, obteniéndose que la mayoría de la proteína se recupera con la primera elución de 150 mM de imidazol y va disminuyendo con las sucesivas eluciones, aunque siempre quedaba alguna proteína unida a la resina empleada (Fig. 25B).

5. Obtención de un anticuerpo policlonal contra la IL-1 β de dorada

Antes de proceder a la inmunización de los conejos para generar anticuerpos policlonales anti-IL-1 β , y para aumentar aún más la pureza del inmunógeno, la proteína purificada mediante cromatografía de afinidad se extrajo de un gel de poliacrilamida tras ser detectada con tinción negativa. Para cada inmunización se utilizaron de 0.15 a 0.3 mg de proteína que fue administrada al conejo mediante una inyección subcutánea. Se realizaron cinco inmunizaciones y tras la quinta inmunización, se sacrificó al animal, ya que una dilución 1:1.000 del suero procedente de uno de los conejos era capaz de detectar la 6xHis-IL-1 β purificada (Fig. 26A). Por otra parte, el suero inmune fue capaz de detectar una banda

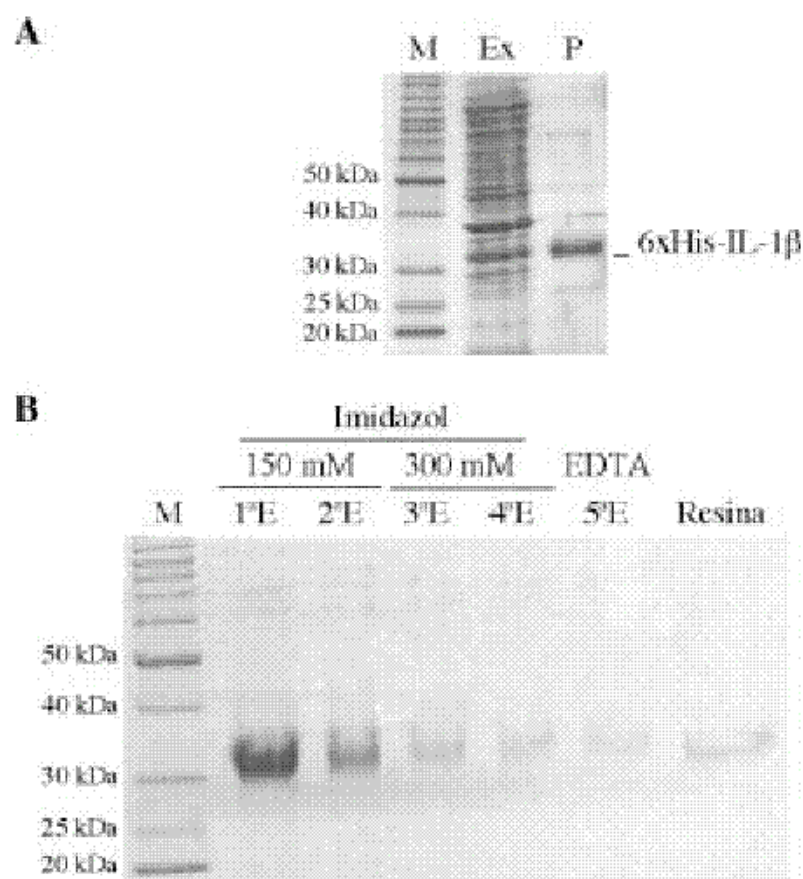


Figura 25. Purificación de la 6xHis-IL-1 β a partir de extractos de *E. coli* portadores del plásmido pVP40 procedentes de 500 ml de cultivo. (A) En las calles se cargó una dilución 1/100 del extracto y una dilución 1/10 de la proteína eluida de la resina de cobalto con 150 mM de imidazol. (B) En las calles se cargó una dilución 1/5 de las sucesivas eluciones con imidazol (1°E-4°E), EDTA (5°E), así como de la resina de Co²⁺. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. M: marcador de tamaños. Ex: extracto inicial. P: proteína purificada y eluida con 150 mM de imidazol.

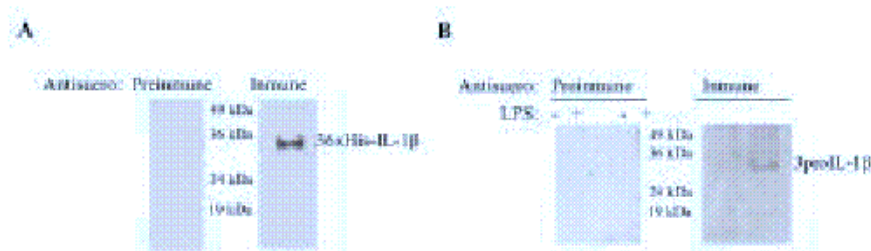


Figura 26. Immunodetección con el anticuerpo policlonal anti-IL-1 β de 50 ng de 6xHis-IL-1 β purificada (A). Immunodetección de una proteína de ~30 kDa en extractos procedentes de 5×10^6 leucocitos de riñón cefálico de dorada activados *in vitro* con 10 μ g/ml de LPS durante 16 h a 25°C (B). Se utilizó una dilución 1:1.000 de los sueros.

específica de unos 30 kDa en extractos de células de riñón cefálico estimuladas con LPS (Fig. 26B), que podría representar el precursor de la IL-1 β (proIL-1 β) de dorada. Como era de esperar el suero preinmune no detectaba la 6xHis-IL-1 β (Fig. 26A), ni reaccionaba con proteína alguna de los extractos de células de riñón cefálico activados o no con LPS (Fig. 26B).

Capítulo III

Producción y mecanismo de secreción de la interleuquina-1 β de dorada

Material y métodos

1. Cultivos primarios

1.1. Aislamiento de leucocitos de dorada

La mayor parte de los estudios del presente capítulo se han realizado con leucocitos de riñón cefálico ya que es el principal órgano hematopoyético de los teleósteos (Zapata y col., 1996) y, además, es el más utilizado para estudios de inmunología de peces. Sin embargo, en algunos experimentos se han empleado leucocitos procedentes de otros tejidos, en concreto de sangre o de exudado peritoneal. Los leucocitos se aislaron tal y como se detalla en el material y métodos del capítulo I.

1.2. Aislamiento de macrófagos de ratón

Ratones de la cepa BALB/c fueron inyectados intraperitonealmente con 3 ml de medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF y un 1% de penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). El medio conteniendo las células procedentes de cinco ratones fue recogido, y a continuación las células se lavaron, se contaron con un hemocitómetro de Neubauer, se sembraron en placas de 12 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo y se cultivaron durante 16 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, las células no adheridas fueron eliminadas mediante varios lavados con medio de cultivo con un 0.1% de SBF y a las células adheridas (macrófagos) se les adicionó 1 ml de medio RPMI suplementado con el 0.1% de SBF.

2. Líneas celulares

Las distintas líneas celulares empleadas en la presente Tesis Doctoral fueron adquiridas de la ECACC ("European Collection of Cell Cultures"). Las células fueron manipuladas bajo condiciones de esterilidad utilizando cabinas de flujo laminar y se emplearon medios que contenían un 1% de penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las células se dejaron crecer hasta que alcanzaron un 80% de confluencia, estado en el cual se utilizaron para hacer los distintos ensayos.

2.1. SAF-1

La línea celular SAF-1 procede de fibroblastos de dorada (Bejar y col., 1997), siendo la primera y única línea celular existente de esta especie. Las células SAF-1 fueron crecidas en medio de cultivo Leibovitz's L-15 (Gibco) suplementado con el 15% de SBF a 25°C en ausencia de CO₂. Las células fueron subcultivadas utilizando PBS conteniendo un 0.25% de tripsina (Gibco) y un 0.25% de EDTA durante 3-5 min a 25°C. La tripsina se

inactivó con un volumen de medio L-15 conteniendo un 15% de SBF y las células se recuperaron por centrifugación a 600xg durante 15 min.

2.2. J774

Los macrófagos de ratón de la línea celular J774 se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF a una temperatura de 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. Estas células se adhieren ligeramente a la superficie del frasco de cultivo, por lo que fueron recogidas utilizando un "rascador de células" (Nunc).

3. Tratamientos celulares

3.1. Ensayos de producción de IL-1 β

Leucocitos de riñón cefálico y de exudado peritoneal de dorada, aislados como se detalla en el apartado 2 del material y métodos del capítulo I, fueron cultivados durante 16 h a 25°C en medio sRPMI suplementado con un 5% de SBF en ausencia o presencia de *V. anguillarum* R-82 previamente fijadas con formaldehído (1 ó 10 bacterias/leucocito), 0'1-20 μ g/ml LPS, una dilución 1/20 de MAF, 50 unidades de factor de necrosis tumoral α recombinante humano (hrTNF α , Sigma), 25-250 μ g/ml de VaDNA y/o 50 μ g/ml de VaDNA digerido con DNasal. En otra serie de experimentos los leucocitos de riñón cefálico se incubaron a 25°C durante distintos tiempos con *V. anguillarum* R-82 (10 bacterias/leucocito) o con 10 μ g/ml de LPS.

Células SAF-1 en fase de crecimiento exponencial fueron cultivadas durante 16 h a 25°C en medio L-15 suplementado con un 15% de SBF en ausencia o presencia de 10 μ g/ml de LPS y/o 50 μ g/ml de VaDNA y 50 μ g/ml de VaDNA digerido con DNasal (ver apartado 6). Los macrófagos de ratón fueron estimulados durante 5 h con 100 ng/ml de LPS en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 0'1% de SBF.

3.2. Ensayo de liberación de IL-1 β

Las células, estimuladas como se ha indicado en el apartado anterior, fueron lavadas dos veces con medio de cultivo sin SBF, sembradas en medio de cultivo con un 0'1% SBF e incubadas a 25°C durante 0'5-3 h con ATP 5 mM (Sigma) (Andrei y col., 1999), con 10 μ g/ml del péptido antimicrobiano protegrina-1 (PTG-1, cedido por el Dr. C. A. Gabel) (Perregaux y col., 2002). En algunos casos se utilizó el inhibidor específico de la caspasa-1 YVAD-CHO (Calbiochem) que fue añadido a una concentración de 100 μ M, 1 h antes de adicionar el ATP (Laliberte y col., 1999).

4. Infecciones experimentales

Seis ejemplares de dorada fueron inyectados intraperitonealmente con 2×10^8 bacterias de la cepa virulenta R-82 de *Vibrio anguillarum*. Transcurridas 16 h de infección, se aislaron los leucocitos de riñón cefálico, sangre y exudado peritoneal como se detalló en el capítulo I y se procesaron como se explica a continuación.

5. Procesamiento de muestras

5.1. Extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de 5×10^6 células de riñón cefálico, 2.5×10^6 células de la línea SAF-1 y 5×10^6 macrófagos de ratón. Al finalizar los distintos tratamientos, las células fueron recogidas, lavadas rigurosamente con PBS estéril y lisadas durante 10 min a 95°C en tampón de carga de electroforesis de proteínas.

5.2. Sobrenadantes

Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de 25×10^6 células de riñón cefálico o de 10^6 células de la línea SAF-1 o de macrófagos de ratón. Se recogieron, se clarificaron centrifugándolos a $400 \times g$ durante 10 min a 4°C y las proteínas presentes en ellos fueron precipitadas incubándolas 30 min en hielo con un volumen de ácido tricloroacético (TCA, Sigma) al 20%, y centrifugándolas a $10.000 \times g$ durante 5 min. Las proteínas precipitadas se lavaron con 1 ml de etanoléter (1:1, v/v) y se resuspendieron calentándolas durante 10 min a 95°C en 15 μl de tampón de carga de electroforesis de proteínas conteniendo 2 μl de NaOH 2N.

5.3. Aislamiento de microvesículas

Las fracciones vesiculares se obtuvieron a partir de 25×10^6 células de riñón cefálico o de 10^6 células de la línea SAF-1 o de macrófagos de ratón. La fracción vesicular fue recuperada de los sobrenadantes clarificados mediante centrifugación a $100.000 \times g$ durante 90 min a 4°C empleando un rotor JA30.50 (Beckman Avanti J30I) en presencia de una dilución 1:100 de una mezcla de inhibidores de proteasas consistente en AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A (Sigma) (Lindemann y col., 2001). El sedimento se lisó en 10 μl de tampón de carga de electroforesis de proteínas calentándolo a 95°C durante 10 min. Por último, las proteínas de los sobrenadantes libres de microvesículas se precipitaron y se resuspendieron como se ha indicado anteriormente.

Todas las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 15%, se sometieron a electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron mediante inmunodetección empleando la técnica de "Western blot" (ver material y métodos del capítulo II).

6. Digestión de VaDNA

Un mg de VaDNA se trató durante 5 h a 37°C con 1000 unidades de DNaseI (Invitrogen) en 1 ml de tampón TrisHCl 0.1 M con MgCl₂ 5 mM, pH=8. Posteriormente la enzima se inactivó por calor (90°C, 10 min) y la digestión del DNA se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7. Ensayo con anexina V

Las células anexina V positivas se analizaron mediante citometría de flujo, empleando anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, 10⁶ células de riñón cefálico de dorada, SAF-1 o J774 fueron incubadas durante 30 min en 100 μ l de medio de cultivo conteniendo un 5% de SBF en presencia o ausencia de ATP 5 mM. Pasado este tiempo las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 100 μ l de tampón de unión 1x [N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) 10 mM (HEPES, Sigma) con NaCl 140 mM y CaCl₂ 2.5 mM, pH=7.4], y se incubaron en oscuridad durante 15 min con 5 μ l de anexina V-FITC y/o 5 μ l de una solución de 50 μ g/ml de ioduro de propidio (IP, Sigma) en PBS. Alternativamente, el marcaje se realizó en presencia de ATP. Para ello, transcurridos 15 min de incubación en medio de cultivo conteniendo un 5% de SBF y ATP 5 mM, se adicionó 12 μ l de tampón de unión 10x, 5 μ l de anexina V-FITC y/o 5 μ l de IP, y las células se incubaron en oscuridad durante otros 15 min. Al finalizar el marcaje, se adicionó 200 μ l de tampón de unión 1x frío.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson) con equipo estándar para la medición de "forward scatter" (FSC, tamaño celular), fluorescencia verde (FL1, FITC) y fluorescencia roja (FL2, IP). Las muestras fueron realizadas por duplicado y los datos se analizaron usando la opción estadística del "Lysis Software Package" (Becton Dickinson) obteniéndose el porcentaje de células en apoptosis (positivas para anexina V y por tanto células que emiten fluorescencia verde) presentes en la población de células examinada. También se determinó el porcentaje de células muertas (porcentaje de células que emiten fluorescencia roja).

8. Procesamiento *in vitro* de la IL-1 β recombinante de dorada

Para determinar si la caspasa 1 humana era capaz de procesar la IL-1 β de dorada, se utilizó un ensayo *in vitro* con 1000 unidades de caspasa 1 recombinante humana (cedida por la Dra. M. García-Calvo) junto con 4 μ g de IL-1 β recombinante de dorada (obtenida como se detalla en el apartado 4 del material y métodos del capítulo II) en tampón de reacción (HEPES 0.1 M con sacarosa al 10%, CHAPS al 0.1% y DTT 10mM, pH=7.5). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2h y como control se utilizó la IL-1 β recombinante en tampón de reacción con DTT pero sin caspasa 1 o bien con caspasa 1 pero sin DTT

en el tampón de reacción, ya que el DTT es el responsable de activar a la caspasa 1 (García-Calvo y col., 1999). Finalizada la reacción, a las diferentes muestras se les adicionó tampón de carga de electroforesis de proteínas y se calentaron a 95°C durante 10 min. Las muestras se analizaron mediante "Western blot" empleando el anticuerpo α -sblL-1 β (ver los apartados 5 y 6 del material y métodos del capítulo II).

Resultados

1. La IL-1 β de dorada se acumula intracelularmente en los leucocitos activados

Con el fin de dilucidar los estímulos que regulan la síntesis de la IL-1 β de dorada, los leucocitos fueron incubados *in vitro* con diferentes moléculas y la producción de la IL-1 β se analizó en los extractos celulares mediante "Western blot" empleando el suero anti-IL-1 β producido en este trabajo (α -sIL-1 β).

Inicialmente se comprobó si los leucocitos de dorada eran capaces de producir IL-1 β en respuesta a la bacteria patógena de peces *V. anguillarum* R-82 fijada con formaldehído. Leucocitos de exudado peritoneal o de riñón cefálico acumularon la proIL-1 β tras 16 h de incubación con esta bacteria (Fig. 27).



Figura 27 Inmunodetección de la IL-1 β en extractos procedentes de 5×10^6 células de riñón cefálico (RC) o de 2.5×10^6 células de exudado peritoneal (EP) estimuladas durante 16 h a 25°C con una relación 1:1 o 1:10 leucocito:bacteria. Las membranas se revelaron con una dilución 1:1000 de α -sIL-1 β .

Los derivados bacterianos, como el LPS y el VaDNA, también fueron capaces de estimular la acumulación intracelular de proIL-1 β en células de riñón cefálico, actuando de forma sinérgica cuando ambos estímulos se adicionaron simultáneamente (Fig. 28A). Este efecto sinérgico también ocurrió entre LPS y MAF y entre VaDNA y MAF, aunque la adición de las tres sustancias simultáneamente no produjo una mayor acumulación de IL-1 β (Fig. 28A). Por otro lado, el hrTNF α fue incapaz de inducir la acumulación de la IL-1 β en los leucocitos de riñón cefálico e incluso contrarrestó el efecto del LPS y del MAF (Fig. 28B).

Como era de esperar, la adición de DNA de salmón no estimuló la producción de IL-1 β (Fig. 28A) y, además, la acumulación de la pro-citoquina disminuyó considerablemente utilizando VaDNA digerido con DNaseI (Fig. 28C).

A continuación determinamos la cinética de la acumulación de la proIL-1 β en respuesta a *V. anguillarum* R-82 y a LPS. Los resultados obtenidos indican que la acumulación del precursor aumenta a partir de las 8 h de incubación con la bacteria (Fig. 29A). Sin embargo, el LPS era capaz de inducir la acumulación de la proIL-1 β a las 2 h de estimulación, alcanzaba un máximo a las 8 h y decaía hasta niveles basales a las 24 h tras la estimulación (Fig. 29B).

El efecto del LPS y del VaDNA sobre la producción y la acumulación de la proIL-1 β en células de riñón cefálico resultó ser dosis dependiente (Fig. 30). La máxima estimulación se obtuvo utilizando 10 μ g/ml de LPS (Fig. 30A) y 200 μ g/ml de VaDNA (Fig. 30B).

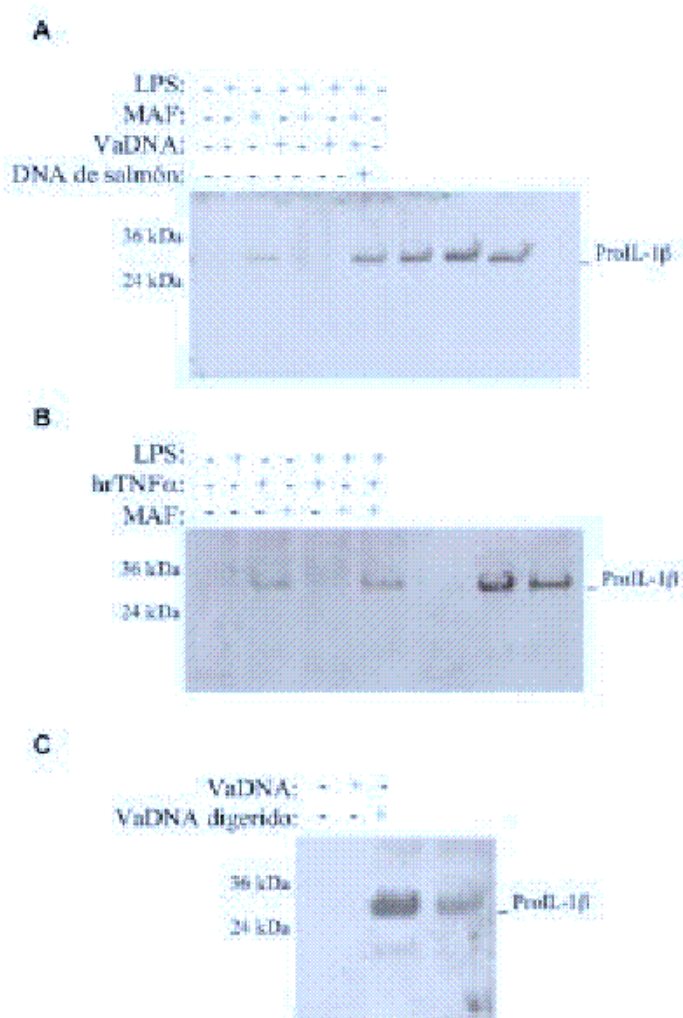


Figura 28. Inmunodetección de la IL-1 β en extractos procedentes de 5×10^6 células de riñón cefálico incubadas durante 16 h en ausencia o presencia de LPS (10 μ g/ml), MAF (dilución 1/20), VaDNA (50 mg/ml), DNA de salmón (50 μ g/ml), hrTNF α (50 unidades) y/o VaDNA digerido con DNaseI (50 μ g/ml). Las membranas se revelaron con una dilución 1:1.000 de α -sIL-1 β .

2. Producción de la IL-1 β en el transcurso de una infección

Con el fin de conocer la expresión de la IL-1 β en doradas infectadas, ejemplares de esta especie fueron inyectados intraperitonealmente con 10^8 bacterias de la cepa R-82 de *V. anguillarum*. Tras 16 h de infección, extractos de células de exudado peritoneal, de riñón cefálico y de leucocitos de sangre fueron analizados mediante "Western blot". Como se muestra en la figura 31, la proIL-1 β se acumula en los leucocitos de sangre e inesperadamente no se observa un aumento significativo en exudado peritoneal ni en riñón cefálico.

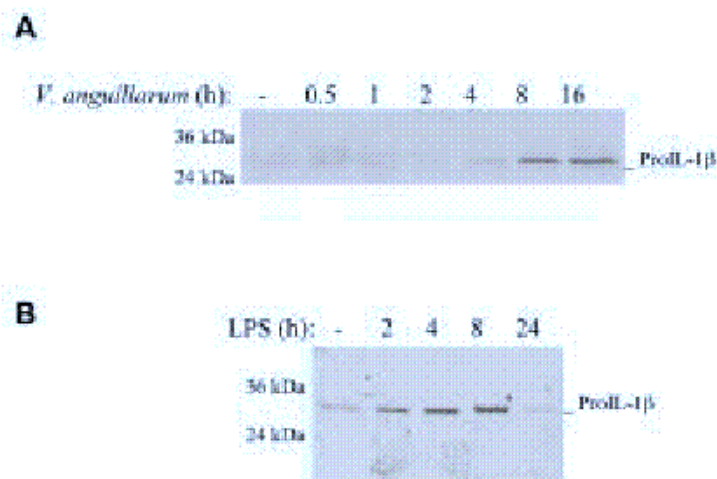


Figura 29. Cinética de la acumulación de la proIL-1 β en extractos de 5×10^6 células de riñón cefálico estimuladas durante 16 h con 10 bacterias por leucocito (A) o con 10 mg/ml de LPS (B). Las membranas se revelaron con una dilución 1:1.000 de α -shIL-1 β .

3. El ATP extracelular no induce la liberación de la IL-1 β en leucocitos de dorada

Para determinar si el ATP extracelular estaba implicado en el procesamiento post-trasduccional y la liberación de la IL-1 β de dorada, se utilizó un ensayo en dos etapas

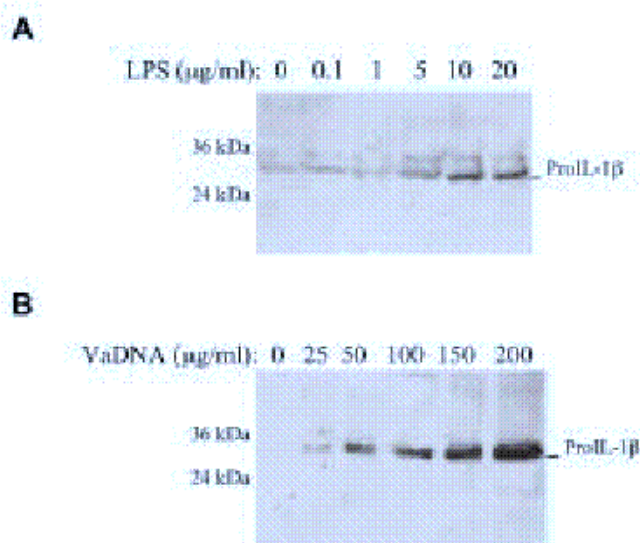


Figura 30. Acumulación de la proIL-1 β en extractos de 5×10^6 células de riñón cefálico estimulados con diferentes dosis de LPS durante 8 h (A) o con diferentes dosis de VaDNA durante 16 h (B). Las membranas se revelaron con una dilución 1:1.000 de α -shIL-1 β .

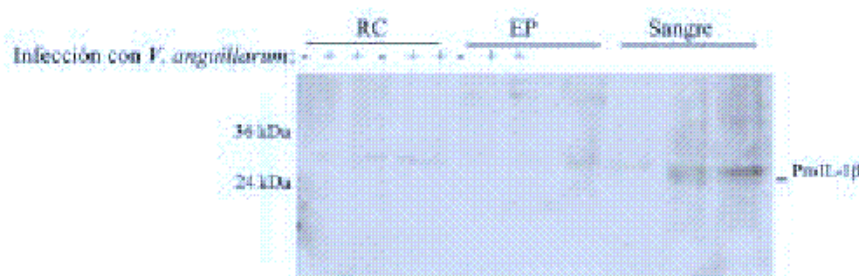


Figura 31. Infección experimental de ejemplares de dorada durante 16 h con 10^6 bacterias de *V. anguillarum* R-82. Se muestran los resultados obtenidos con dos peces infectados que son representativos de un total de seis. Los extractos proceden de 5×10^6 células de riñón cefálico (RC) y leucocitos de sangre, y de 2.5×10^6 células de exudado peritoneal (EP). La membrana se reveló con una dilución 1:1.000 de α -sIL-1 β .

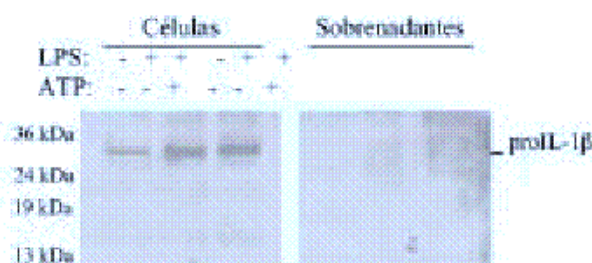
donde los leucocitos de riñón cefálico se trataron con LPS y/o VaDNA para inducir la síntesis y la acumulación de la prol-1 β y después se incubaron con ATP. Inesperadamente, la adición de ATP 5 mM durante 30 min no produjo una disminución de la IL-1 β asociada a la célula y, además, en los sobrenadantes no se detectó proteína alguna capaz de reaccionar con el α -sIL-1 β (Fig. 32A). Sin embargo, el tratamiento con ATP de macrófagos peritoneales de ratón previamente activados con LPS promovió la aparición de la forma madura de 17 kDa de la IL-1 β en los sobrenadantes celulares y paralelamente la desaparición de la prol-1 β en las células (Fig. 32B).

Para determinar si la IL-1 β de dorada se liberaba asociada a microvesículas, como ocurre en mamíferos (Lindemann y col., 2001; MacKenzie y col., 2001), leucocitos de riñón cefálico preactivados con LPS y VaDNA se incubaron durante 3 h a 25°C con ATP 5 mM en ausencia o presencia de un 5% SBF y a continuación se aisló la fracción vesicular mediante centrifugación. En ninguna de las condiciones utilizadas se detectó la IL-1 β en los sobrenadantes ni en las microvesículas (Figs. 33A y B). De manera similar, el tratamiento con el péptido antimicrobiano PTG-1 no provocó el procesamiento ni la liberación de una cantidad detectable de IL-1 β en microvesículas o en los sobrenadantes (Figs. 33A y B). Estos resultados se confirman examinando la cantidad de citoquina asociada a las células después de tratar con ATP o PTG-1 (Figs. 33A y B), la cual no varió de forma significativa con los distintos tratamientos.

4. El ATP extracelular no induce la exposición de fosfatidilserina en leucocitos de dorada

Los resultados anteriores nos llevaron a determinar si el ATP extracelular tenía algún efecto sobre la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática de células de riñón cefálico de dorada, hecho que está asociado a la liberación de la IL-1 β por los macrófagos humanos (MacKenzie y col., 2001). Para realizar este ensayo utilizamos anexina V conjugada con FITC, ya que esta proteína posee una alta afinidad por

A: Dorada



B: Ratón

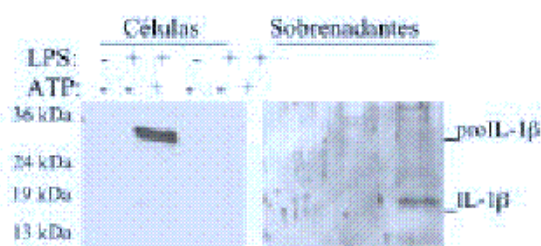


Figura 32. Leucocitos de riñón cefálico de dorada (A) y macrófagos peritoneales de ratón (B) preactivados con LPS y tratados con ATP 5 mM durante 30 min. Los extractos celulares proceden de 5×10^6 (A) o 5×10^6 (B) células, mientras que los sobrenadantes proceden de 2.5×10^5 (A) o 10^6 (B) células. Las membranas fueron reveladas con una dilución 1:1,000 de α -shIL-1 β (A) o con una dilución de 1:1,000 del anticuerpo monoclonal 3ZD anti-IL-1 β humana/ratón (B).

la PS y la exposición de ésta en la cara extracelular de la membrana plasmática es uno de los primeros procesos que sufren las células que van a entrar en apoptosis (Majno y Joris, 1995). El tratamiento durante 30 min con ATP 5 mM no aumentó el porcentaje de células de riñón cefálico positivas para anexina V; menos del 3% de las células sin tratar con ATP eran anexina V positivas y menos del 2% lo eran al ser tratadas con ATP (Tabla 9). Resultados similares se encontraron en fibroblastos de dorada de la línea celular SAF-1, donde la población de células anexina V no varió con el tratamiento de ATP y en ambos casos se mantuvo por debajo del 1% (Tabla 9). Sin embargo, los macrófagos de ratón de la línea J774 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para anexina V después de ser tratados con ATP, pasando del 6'9% al 17'4% (Tabla 9).

En otra serie de experimentos, la anexina V se adicionó mientras las células se incubaban con ATP, con el fin de prevenir la posible internalización de la PS tras retirar el ATP. Mientras que el porcentaje de células de riñón cefálico positivas para anexina V tampoco varió en estas condiciones, alrededor del 20% de células SAF-1 eran positivas para anexina V tras ser tratadas con ATP (Tabla 9).

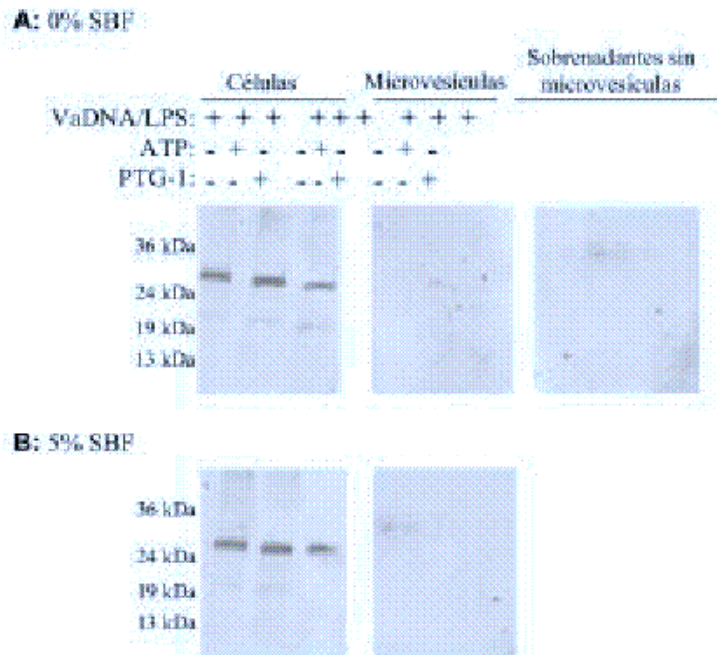


Figura 33. Extractos correspondientes a células de riñón cefálico preactivadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VaDNA durante 16 h a 25°C, y a continuación incubadas durante 3 h a 25°C con ATP 5 mM o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PTG-1 en ausencia (A) o presencia (B) de SBF. Los extractos celulares proceden de 5×10^6 células, mientras que las microvesículas y los sobrenadantes proceden de 25×10^6 células. Las membranas fueron reveladas con una dilución 1:100 de $\alpha\text{-sbIL-1}\beta$ purificado.

		Control	pre-ATP	ATP
Dorada	RC	2.6 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.1
	SAF-1	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	19.1 $\pm$ 3.9
Ratón	J774	8.9 $\pm$ 0.1	17.4 $\pm$ 3.0	ND

Tabla 9. Porcentajes de células positivas para anexina V después de ser incubadas durante 30 min en ausencia (control) o presencia de ATP 5 mM, lavadas y marcadas con anexina V-FITC (pre-ATP). Alternativamente, las células fueron marcadas con anexina V-FITC en presencia de ATP (tiempo total de incubación 30 min) (ATP). Los valores se presentan como la media $\pm$ el error estándar del porcentaje de células positivas para anexina V obtenidas de dos muestras independientes. RC: células de riñón cefálico. ND: no determinado.

5. El ATP extracelular promueve el procesamiento y la secreción de la EIL-1 β en las células SAF-1

Después de comprobar que las células SAF-1 eran capaces de responder a ATP, estudiamos la producción de IL-1 β en esta línea celular tras ser estimuladas con LPS y/o VaDNA. Estas células sólo fueron capaces de producir IL-1 β tras ser estimuladas durante

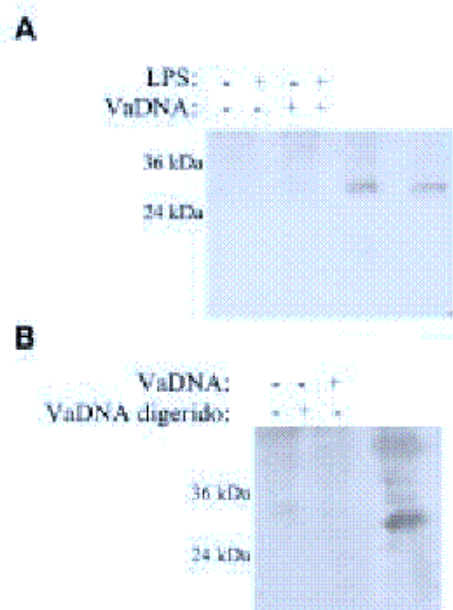


Figura 34. Extractos de 2.5×10^6 células SAF-1 incubadas durante 16 h a 25°C con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS y/o 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VaDNA (A), o con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VaDNA digerido con DNase (B). Las membranas fueron reveladas con una dilución 1:100 de α -shIL-1 β purificado.

16 h a 25°C con VaDNA (Fig. 34A). Inesperadamente, el LPS fue incapaz de inducir la producción de IL-1 β e incluso disminuyó los niveles de esta citoquina en las células tratadas con VaDNA. El efecto del VaDNA en la producción de la IL-1 β era específico, ya que desaparecía totalmente cuando éste era digerido con DNase (Fig. 34B).

A diferencia de lo ocurrido con los leucocitos de riñón cefálico, la adición de ATP a

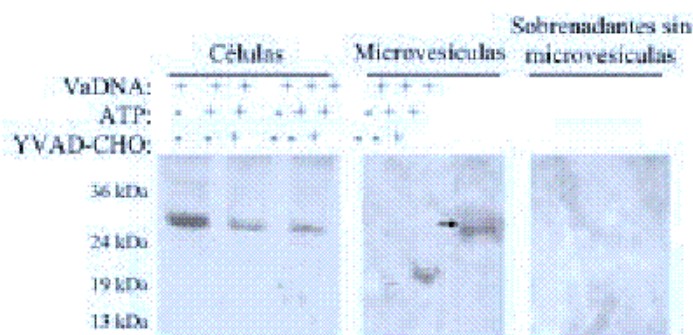


Figura 35. Células SAF-1 preactivadas con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VaDNA durante 16 h, incubadas a continuación durante 1 h en ausencia o presencia de YVAD-CHO 100 μM y tratadas con ATP 5 mM durante 30 min. Los extractos celulares corresponden a 2.5×10^6 células, y las microvesículas y los sobrenadantes proceden de 10^6 células. La flecha indica la posición de la proIL-1 β y la cabeza de flecha la posición de la posible IL-1 β madura. Las membranas fueron reveladas con una dilución 1:100 de α -shIL-1 β purificado.

células SAF-1 pretratadas con VaDNA resultó en una disminución de la procitoquina asociada a las células (Fig. 35) y en la aparición de una proteína de unos 22 kDa en la fracción de las microvesículas que podría representar a la IL-1 β madura. La fracción de las microvesículas muestra un patrón de marcadores particular, diferente al de los extractos celulares y los sobrenadantes, siendo negativas para catepsina D y β -actina cuando se analizaron con "Western blot" (dato no mostrado). Además, el tratamiento de las células con el inhibidor específico de la caspasa-1 YVAD-CHO antes de la adición del ATP, provocó la aparición de la proIL-1 β en la fracción de las microvesículas (Fig. 35). En ningún experimento se detectó la especie de 22 kDa en los sobrenadantes libres de microvesículas.

6. Procesamiento *in vitro* de la IL-1 β recombinante de dorada

Por último, pasamos a determinar si la caspasa 1 recombinante humana era capaz de procesar *in vitro* la IL-1 β recombinante de dorada. En la figura 36 se observa que tras tratar la IL-1 β de dorada con la caspasa 1 aparece una proteína de unos 22 kDa que no está presente cuando la reacción se lleva a cabo en ausencia de DTT. El DTT es esencial para la activación de la caspasa 1, ya que promueve la autocatálisis de la pro-caspasa 1 a caspasa 1 activa (García-Calvo y col., 1999).

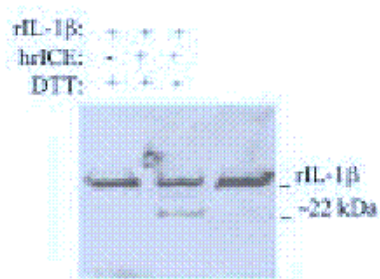


Figura 36. Procesamiento *in vitro* de la IL-1 β recombinante de dorada (rIL-1 β) por la caspasa recombinante humana (hrICE). La reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C con 4 μ g de rIL-1 β y 1000 unidades de hrICE en tampón de reacción con o sin DTT. La membrana fue revelada con una dilución 1:1.000 de α -sIL-1 β .

Discusión

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo importantes estudios sobre inmunología de peces. Dichos estudios han supuesto numerosos avances en el conocimiento de los órganos, tejidos, células, moléculas y mecanismos implicados en la defensa inmunitaria de este grupo de animales. Ese gran número de estudios ha estado propiciado por dos motivos principales. El primero de ellos, por un interés básico, ya que los peces son los primeros vertebrados que tienen una respuesta adaptativa bien estructurada y por tanto constituyen un grupo animal clave para conocer la evolución del sistema inmunitario. El segundo de los motivos es aplicado y es debido a la expansión de la acuicultura, a raíz de la necesidad de ir sustituyendo la pesca. El conocimiento del sistema inmunitario es una pieza clave para el desarrollo de esta actividad comercial, ya que es necesario conocer cómo combatir las enfermedades que pueden aparecer. Así, el estudio del sistema inmunitario de peces, en concreto el de la dorada, especie de gran importancia comercial y prioritaria para la Región de Murcia, para España y para la Unión Europea, es de vital importancia por los dos motivos anteriormente mencionados.

Los distintos componentes de la respuesta inmunitaria se controlan y se coordinan por las citoquinas, proteínas por lo general de bajo peso molecular y que además intervienen en todos los procesos biológicos importantes (Secombes y col., 1996). A pesar de la importancia de estas moléculas para el sistema inmunitario, la filogenia de las citoquinas ha recibido escasa atención comparada con otros aspectos del sistema inmunitario. Al igual que en mamíferos, la respuesta inmunitaria de los peces está coordinada por una amplia variedad de citoquinas. Desde hace muchos años se conocía la actividad biológica de las citoquinas en peces (Secombes y col., 1996) y en los últimos años se han clonado en peces diferentes citoquinas, entre las que se encuentra la IL-1 β , el TNF α , la IL-8, el TGF β y varias quimioquinas (revisado por Bird y col., 2002a). En concreto, la IL-1 β se ha clonado y caracterizado en un número considerable de especies (Tabla 3) debido a la gran importancia que tiene esta citoquina en la regulación del sistema inmunitario y al elevado grado de conservación que presenta entre las distintas especies. De esta manera se ha avanzado en el conocimiento de la filogenia de esta citoquina y en el papel que tiene en el sistema inmunitario de los vertebrados inferiores.

La IL-1 β es la principal citoquina que media la inflamación (Dinarello, 1996), aunque también está implicada en muchos otros procesos inmunitarios, como es la maduración y la proliferación de distintos tipos celulares (Dinarello, 1997). Debido a la importancia de esta citoquina el objetivo principal del presente trabajo se centró en la caracterización molecular y funcional de la IL-1 β de dorada (*Sparus aurata* L.), especie cuyo sistema inmunitario ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo de investigación. Los resultados de este estudio no sólo son interesantes desde un punto de vista básico, sino que permitirán producir moléculas recombinantes del sistema inmunitario de peces con el objeto de ser aplicados como inmunoestimulantes y/o adyuvantes de vacunas.

1. Clonación de la IL-1 β de dorada

La clonación de la IL-1 β de dorada se abordó mediante una aproximación homóloga utilizando RT-PCR. Su secuencia se dedujo al solapar tres productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos diseñados contra las regiones conservadas de la molécula y posteriormente empleando las técnicas 3' y 5' RACE. El extremo 5' del mRNA presenta 4 codones AUG en fase de lectura en los primeros 153 nt. Nosotros proponemos el primero como posible codón de inicio de la transcripción y, por tanto, un 5' UTR de 102 nt que sería similar al de otras especies de peces: 97 nt en trucha arcoiris, 53 nt en carpa, 80 nt en lubina y 54 nt en pintarroja (Zou y col., 1999a; Fujiki y col., 2000; Scapigliati y col., 2001; Bird y col., 2002b).

2. La secuencia de la IL-1 β de dorada

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β de dorada, deducida a partir del cDNA, muestra que se trata de una proteína en la que en dicha secuencia existe un alto grado de conservación si se compara con la de las IL-1 β s de otros peces. La IL-1 β de dorada muestra homología mayor con las IL-1 β s de las especies del mismo orden que con las de especies pertenecientes a órdenes evolutivamente más alejados (Fig. 14 y Tabla 4). En el árbol filogenético realizado con las secuencias de las IL-1 β s (Fig. 14), las especies aparecen ordenadas de la misma manera que en el cladograma consenso representativo de la evolución de los órdenes de teleósteos (Fig. 3).

La IL-1 β pertenece junto con la IL-1 α , el rIL-1 y la IL-18 a la familia de la IL-1 (Dinarello, 1997). Los miembros de esta familia se caracterizan por tener en su estructura secundaria 12 láminas β que le confiere a la proteína una estructura de trébol- β (Nicola, 1994). La mayor homología encontrada entre las secuencias de IL-1 β de vertebrados inferiores está en estas regiones de aminoácidos que formarían la estructura secundaria de 12 láminas β , sugiriendo que la IL-1 β de dorada, al igual que las del resto de vertebrados, se plegaría adoptando una forma de trébol- β y por lo tanto se clasificaría dentro de esta familia de proteínas. La firma consenso de la familia de la IL-1, deducida de las secuencias de mamíferos (Hofmann y col., 1999), no se ajusta totalmente a lo que se observa en las secuencias de peces, por lo que Bird y col. (2002a) han propuesto una nueva firma consenso que también se encuentra conservada en la secuencia de la IL-1 β de la dorada, así como en el resto de secuencias de peces. La IL-1 β de la dorada presenta esta firma en su extremo carboxilo (del aminoácido 206 al 229).

El precursor de la IL-1 β de dorada, al igual que el resto de proIL-1 β s, carece de un péptido señal que dirija su síntesis hacia el retículo endoplasmático, por lo tanto, su síntesis ocurriría en el citosol de la célula y su liberación no dependería de la vía clásica retículo endoplasmático-aparato de Golgi (Rubartelli y col., 1990). En mamíferos, la proIL-1 β se procesa por la caspasa 1 (ICE) en un Asp-X (donde X es normalmente un residuo hidrofóbico pequeño), para liberar el extremo carboxilo de la molécula y citoquina madura de 17 kDa. La IL-1 β madura se transporta al exterior celular mediante un mecanismo que

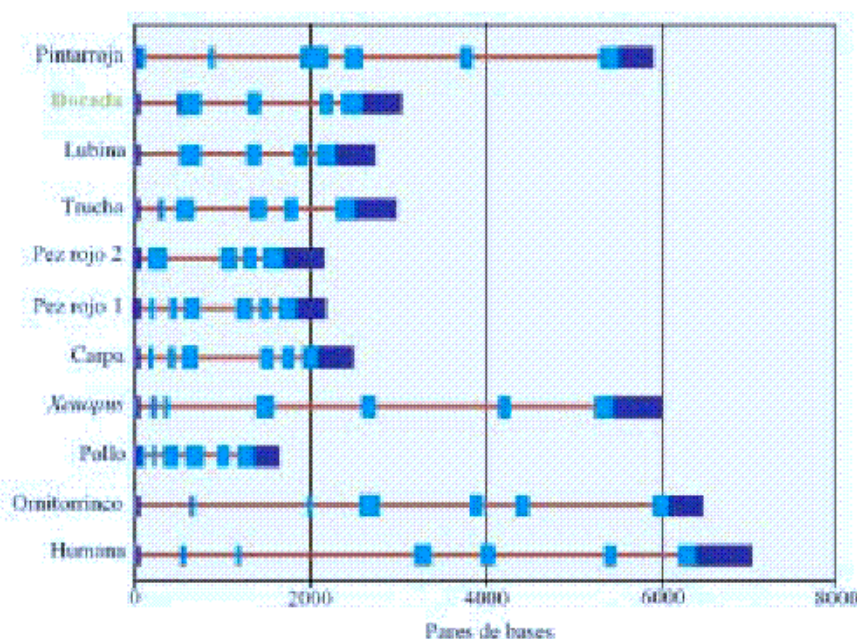


Figura 37. Organización del gen de la $IL-1\beta$ de diferentes vertebrados. Los intrones se representan con una línea y los exones con cajas azules. En azul claro se señalan las regiones correspondientes al marco de lectura abierta y en azul oscuro, las secuencias no traducidas. La especie objeto de este estudio se señala en verde.

actualmente no se conoce completamente (Laliberte y col., 1999). Sin embargo, la $IL-1\beta$ de dorada carece del sitio conservado de reconocimiento y corte por la caspasa 1, al igual que ocurre con las de aves, anfibios y otros peces (Bird y col., 2002a). Esto aumenta el desconocimiento sobre el procesamiento y la liberación de la $IL-1\beta$ de vertebrados no mamíferos.

El gen de la $IL-1\beta$ de dorada se compone de cuatro intrones y de cinco exones, organización que coincide con la del gen de la $IL-1\beta$ de la lubina, teleosteo que como la dorada pertenece al orden de los perciformes. Sin embargo, esa organización génica no coincide con la de las $IL-1\beta$ s de peces pertenecientes a otros órdenes. Así, la de trucha arcoiris y la de pintarroja presentan cinco intrones y seis exones, mientras que la de carpa, al igual que la de mamíferos, tiene seis intrones y siete exones. Por otro lado, los dos genes de la $IL-1\beta$ de pez rojo poseen distinta organización génica: la $IL-1\beta 1$ posee 6 intrones y 7 exones, mientras que la $IL-1\beta 2$ posee 4 intrones y 5 exones (Fig. 37). Debido a la gran variación en el número de intrones y a su emplazamiento en la estructura del gen, no es posible deducir un patrón de evolución claro para este gen.

La $IL-1\beta$ de dorada, en común con otros mRNA que cifran moléculas inflamatorias (Caput y col., 1986), posee en su extremo 3' UTR numerosas copias del motivo AUUUA, esto sugiere que el transcrito sería muy inestable y que su cantidad en la célula estaría muy regulada. Actualmente se están llevando a cabo estudios en nuestro laboratorio para determinar la estabilidad del mRNA de la $IL-1\beta$ de dorada, mediante el empleo de genes chivatos fusionados al 3' UTR de esta citoquina.

3. Clonación de la IL-1 β de otros espáridos

El presente trabajo también describe la clonación de una secuencia parcial de la IL-1 β en sargo (*Diplodus puntazzo*) y en dentón (*Dentex dentex*), especies que como la dorada pertenecen a la familia de los espáridos. Estas secuencias corresponden al ORF casi completo de las IL-1 β s de estas especies y poseen una alta identidad con la IL-1 β de dorada. El árbol filogenético de la familia espáridos diseñado tomando como criterio referente la secuencia de los RNA ribosómicos 16S (Day, 2002) (Fig. 38A) coincide con el obtenido si se toma como criterio referente la secuencia de las IL-1 β s (Fig. 38B).

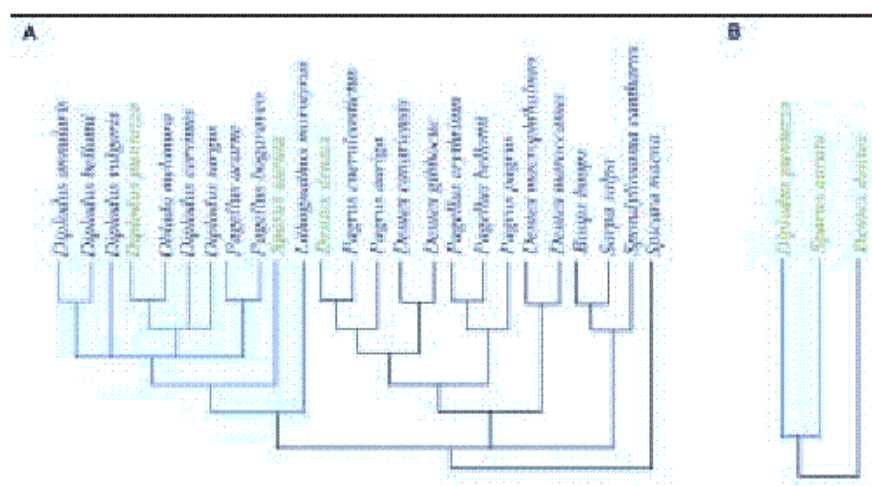


Figura 38. (A) Árbol filogenético consenso para las especies de la familia de los espáridos. (B) Árbol filogenético realizado tomando como criterio referente la secuencia de aminoácidos de las IL-1 β s. Obsérvese la correlación entre ambos. En verde se señalan las especies donde se ha secuenciado la IL-1 β .

4. Expresión de la IL-1 β de dorada

La implicación de la IL-1 β en la respuesta inmunitaria del pez es importante y su producción en los distintos tejidos dependerá de la virulencia del patógeno y de los tejidos diana colonizados. Para estudiar el patrón de expresión del gen frente a una infección, se analizó la acumulación de mRNA de la IL-1 β mediante ensayos de RT-PCR. En estos experimentos observamos que ejemplares de dorada infectados con *V. anguillarum* ATCC 19264 muestran una variedad en la expresión de la IL-1 β en los distintos tejidos examinados. La mayor expresión se encontró en células de exudado peritoneal y en leucocitos de sangre. Esto podría deberse a que se trata de una bacteria no virulenta que fue inyectada intraperitonealmente, por lo que posiblemente existe gran dificultad para que pueda colonizar los órganos del pez. Sin embargo, los mediadores de la inflamación producidos y liberados en la cavidad peritoneal en respuesta a la bacteria, podrían entrar en el torrente sanguíneo y activar a los leucocitos de sangre para producir IL-1 β . Un resultado importante fue que el transcrito de la IL-1 β también se detectó en algunos de los tejidos examinados de

peces sin infectar. Estos resultados contrastan con ensayos realizados en trucha arcoiris, donde no se detecta expresión basal para este gen (Zou y col., 1999a, 2000b). En mamíferos la regulación de la IL-1 β se lleva a cabo a nivel de la expresión del gen, de la síntesis de la proteína, del procesamiento postrasduccional y de la secreción de la citoquina madura, consiguiendo de esta manera reducir la respuesta de esta molécula durante la enfermedad (Dinarello, 1994). Aunque nuestros resultados indiquen una transcripción espontánea del gen de la IL-1 β de dorada, los estudios posteriores descartan la presencia de la proteína en células no activadas (ver apartado 6).

La bacteria *V. anguillarum* resultó también ser un potente inductor *in vitro* de la expresión de la IL-1 β en células de riñón cefálico, observándose un aumento en la acumulación del mRNA de la IL-1 β en las células tras 30 min de incubación. Estos resultados sugieren que el reconocimiento del patógeno y, probablemente, su fagocitosis son las señales utilizadas *in vivo* para la producción de esta citoquina.

En mamíferos la IL-1 β es producida principalmente por monocitos y por macrófagos (Dinarello, 1988). Sin embargo, no se conocen los tipos celulares que producen esta citoquina en peces. En el presente estudio, se demuestra que los macrófagos purificados de dorada acumulan en mayor cantidad el transcrito de la IL-1 β que las células totales de riñón cefálico, sugiriendo que en peces este tipo celular también es uno de los principales productores de esta citoquina.

Los estudios sobre la expresión de la IL-1 β en peces son muy escasos y todos ellos se basan en el estudio de la expresión del gen mediante RT-PCR o "Northern blot". Zou y col. (2000b) demuestran que la expresión *in vitro* de la IL-1 β en leucocitos de trucha arcoiris se regula de forma positiva con LPS y de forma negativa con cortisol. De forma similar, nuestros resultados indican que la expresión del transcrito de la IL-1 β en macrófagos de dorada se regula de forma positiva con LPS y/o MAF. Ésta es la primera evidencia que demuestra que las citoquinas producidas por linfocitos de peces activados son capaces de aumentar la expresión del transcrito de la IL-1 β , sugiriendo que estas linfocinas producidas durante el curso de una infección podrían regular la producción de esta molécula proinflamatoria *in vivo*.

Recientemente se ha demostrado que los motivos CpG presentes en el DNA bacteriano actúan como PAMP y activan al sistema inmunitario al ser reconocidos por el receptor TLR9 (Bauer y col., 2001). Estudios recientes demuestran que el sistema inmunitario de los peces también responde al DNA bacteriano. En concreto, éste es capaz de aumentar la cantidad del transcrito de la IL-1 β en macrófagos de trucha arcoiris (Jørgensen y col., 2001). De forma similar el DNA genómico de *V. anguillarum* fue capaz de inducir la acumulación del transcrito de la IL-1 β en células de riñón cefálico de dorada. Además, esta acumulación es significativamente mayor al emplear LPS junto con DNA. Este dato sugiere que, al igual que en mamíferos, ambas sustancias son reconocidas por distintos PRRs (ver apartado 6).

5. Producción de un anticuerpo policlonal contra la IL-1 β de dorada

Una de las limitaciones al estudio del papel de las citoquinas en la respuesta inmunitaria de los peces ha sido la carencia de anticuerpos específicos contra ellas. Por ello, nosotros nos propusimos obtener un anticuerpo específico contra la IL-1 β de dorada. En primer lugar la IL-1 β de dorada fue clonada en un vector de expresión que permitió producir la proteína recombinante fusionada a 6xHis en *E. coli*. La proteína de fusión se purificó empleando una resina de Co²⁺ y se utilizó como inmunógeno para producir un suero policlonal de conejo contra la 6xHis-IL-1 β . El anticuerpo fue capaz de detectar una proteína de unos 30 kDa en los extractos de leucocitos de riñón cefálico activados con LPS, pero no en los leucocitos control. El tamaño de esta proteína es similar al precursor de la IL-1 β estimado a partir de la secuencia del mRNA (29 kDa) sugiriendo que la proteína detectada corresponde a la proIL-1 β de dorada. Éste es el primer anticuerpo producido contra una citoquina de peces que ha sido empleado para estudiar los mecanismos de producción y de liberación de estas importantes moléculas.

6. La IL-1 β de dorada se acumula intracelularmente en los leucocitos activados

El anticuerpo nos permitió detectar mediante "Western blot" el aumento de la proIL-1 β en leucocitos de riñón cefálico tras ser incubados con distintos estímulos (*V. anguillarum*, LPS, VaDNA y/o MAF). Estos resultados coinciden con el aumento del mRNA observado en los experimentos de RT-PCR, sugiriendo que el mRNA termina traduciéndose para originar la proteína que se acumula intracelularmente como proIL-1 β . El efecto sinérgico que posee el LPS y el DNA bacteriano sobre la acumulación del mRNA de la IL-1 β en los leucocitos de riñón cefálico, se observa también en la acumulación de proIL-1 β , apoyando la hipótesis de que cada ligando transmite su señal a través de un PRR diferente. Esta hipótesis parece confirmarse con los resultados de los experimentos realizados con la línea celular SAF-1, donde el DNA bacteriano es capaz de activar la producción de proIL-1 β mientras que el LPS se muestra incapaz. En mamíferos, los TLRs representan una nueva familia de PRR que juega un papel importante en el reconocimiento del patógeno y en la iniciación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria (Janeway y Medzhitov, 2002). El TLR4 es el responsable de reconocer al LPS (Hoshino y col., 1999), mientras que el TLR9 reconoce los motivos CpG del DNA bacteriano (Hemmi y col., 2000). Los TLR de peces todavía no se han clonado ni caracterizado, pero un reciente estudio utilizando la secuencia del genoma completo del pez teleosteo torafugu predice que esta especie posee 10 genes homólogos a los TLR de mamíferos (Oshiumi y col., 2003). Sin embargo, se precisan estudios funcionales para dilucidar el papel de cada uno de estos TLR en la respuesta inmunitaria del pez, así como su especificidad de ligando. Nos parece interesante destacar que en esta especie no se ha encontrado un gen homólogo al TLR4 de mamíferos que es el responsable del reconocimiento del LPS. Oshiumi y col. (2003) proponen que este receptor se pierde en el linaje de los peces y que su función estaría cubierta por otro TLR, que según nuestros resultados debería ser distinto al que reconoce al DNA bacteriano (TLR9 en mamíferos).

El aumento de la proIL-1 β inducido por DNA bacteriano se reduce cuando se emplea el DNA bacteriano digerido con DNasaI, la reducción es importante en leucocitos de riñón cefálico y total en células SAF-1. Esto sugiere que es el DNA, y no endotoxinas bacterianas contaminantes, el que activa la producción de IL-1 β . Más interesante aún, la acumulación de proIL-1 β no se produce cuando se emplea DNA de salmón, indicando que la activación de los leucocitos es a través de motivos presentes en el DNA bacteriano.

En las infecciones de dorada con *V. anguillarum* R-82 se observa que la proIL-1 β se acumula en los leucocitos de sangre de los ejemplares retados con esta bacteria. Este resultado sugiere que la acumulación de transcrito de la *IL-1 β* detectada en los experimentos de RT-PCR en leucocitos de sangre de ejemplares infectados se traduce a proteína, y ésta se acumula en la célula como proIL-1 β . Sorprendentemente, la proIL-1 β no se detecta en células de exudado peritoneal, aunque la expresión del transcrito en estas células sea elevada. Esto puede ser debido a que la citoquina producida sea liberada al exterior de las células. Sin embargo, no hemos podido detectar la citoquina madura en los sobrenadantes de las células del exudado peritoneal de estos peces.

7. El ATP extracelular no induce la liberación de la IL-1 β en leucocitos de dorada

Recientes estudios en mamíferos han demostrado que el ATP extracelular (ATPe) actuando a través de los receptores purinérgicos P2X₇ promueve el procesamiento post-trasduccional y la liberación de la IL-1 β (Andrei y col., 1999; Laliberte y col., 1999; Solle y col., 2001). Sin embargo, la adición de ATPe a los leucocitos de riñón cefálico de dorada preactivados con LPS no promueve el procesamiento ni la liberación de la proIL-1 β . Como era de esperar, el tratamiento con ATPe de macrófagos peritoneales de ratón preactivados con LPS resultó en la detección de la forma madura de 17 kDa de la IL-1 β en los sobrenadantes y en la completa desaparición de la proIL-1 β asociada a las células. Sin embargo, este modelo es similar al que encontramos en células de la línea celular SAF-1, las cuales son capaces de liberar rápidamente una proteína de 22 kDa en respuesta a ATPe, junto a una disminución en la proIL-1 β asociada a las células. Estos resultados sugieren la presencia de un receptor homólogo al P2X₇ en las células SAF-1.

Recientes estudios demuestran que la IL-1 β liberada por los macrófagos y las plaquetas humanas está presente en la fracción particulada de los sobrenadantes celulares (Lindemann y col., 2001; MacKenzie y col., 2001). Esta fracción se compone de dos tipos de vesículas, los exosomas y las microvesículas (Heijnen y col., 1999). Los exosomas derivan de la exocitosis de cuerpos multivesiculares que proceden de endolisosomas, mientras que las microvesículas se generan por gemación a partir de la membrana plasmática y están asociadas a la exposición de fosfatidilserina (PS) (Heijnen y col., 1999). La translocación de la PS a la cara exterior de la membrana celular en células SAF-1 tratadas con ATPe sugiere que la IL-1 β de dorada podría estar contenida en microvesículas más que en exosomas. Estos resultados estarían de acuerdo con los estudios previos anteriormente citados que demuestran que la IL-1 β se libera en microvesículas (Lindemann y col., 2001; MacKenzie y col., 2001). Además, las fracciones vesiculares recuperadas de los sobrenadantes

de las células SAF-1 son negativas para cathepsina D y β -actina, confirmando que no son restos celulares.

El mecanismo involucrado en el procesamiento de la IL-1 β de peces también se planteó como uno de los objetivos de esta tesis, debido a que todas las secuencias de la IL-1 β de peces, anfibios y aves carecen de sitio conservado de reconocimiento de la ICE (Bird y col., 2002a). Nuestros resultados indican que el inhibidor específico de la ICE YVAD-CHO previene el procesamiento, pero no la liberación de la IL-1 β de dorada en células SAF-1 pretratadas con VaDNA y ATP, sugiriendo que la IL-1 β de peces, antes de ser liberada, necesita ser procesada por una proteasa similar a la ICE originando un polipéptido de unos 22 kDa. Estos resultados nos llevan a especular sobre un Asp conservado en todas las secuencias de vertebrados no mamíferos (Asp⁶⁰ en la secuencia de dorada, Fig. 10), ya que el procesamiento en esta posición produciría un péptido maduro de un peso molecular de unos 22 kDa. La presencia de enzimas con actividad ICE en este nivel de la filogenia no es sorprendente: existen dos secuencias con un alto nivel de homología con la ICE de mamíferos en el pez cebra (AF233434 y AF327410) y una en torafugu (SIN-FRUT00000075787). Sin embargo, hasta la fecha, los experimentos realizados en nuestro laboratorio para identificar la ICE de dorada, mediante clonación homóloga han resultado infructuosos. En cualquier caso, nuestros resultados parecen indicar que las células SAF-1 procesan la proIL-1 β mediante una enzima con actividad caspasa 1 y liberan una forma madura de 22 kDa de la IL-1 β de dorada en microvesículas tras ser tratadas con ATPe. Estos resultados se confirman con nuestro estudio *in vitro* que demuestra que la caspasa 1 humana es capaz de procesar la IL-1 β recombinante de dorada originando un producto de unos 22 kDa.

El motivo por el que las células de riñón cefálico no responden a ATPe no ha podido ser aclarado. Se necesitaría la clonación del receptor P2X₇ en peces. Una búsqueda sobre el genoma del torafugu revela la presencia de un posible transcrito (SIN-FRUT00000054475) que codificaría una proteína con un 46% de identidad y un 61% de homología con el receptor P2X₇ humano. Actualmente se están realizando en nuestro laboratorio estudios para identificar el receptor P2X₇ de dorada. Esto nos ayudaría a estudiar si dicho receptor se expresa en las células de riñón cefálico o en la línea celular SAF-1 y nos permitiría identificar las proteínas que podrían interaccionar con él. El receptor P2X₇ activo de mamíferos interacciona con numerosas proteínas para formar un complejo que promueve la reorganización del citoesqueleto (Kim y col., 2001; Wilson y col., 2002). Por ejemplo, las proteínas de membrana epiteliales (EMPs) interaccionan con el extremo carboxilo del receptor P2X₇, y cuando se sobreexpresa en células HEK293 son capaces de inducir la formación y estrangulación de vesículas a partir de la membrana plasmática, la exposición de PS y la muerte celular (Wilson y col., 2002). Estos descubrimientos sugieren que la interacción del receptor P2X₇ activo con las EMPs podría mediar algunas señales de la cascada de transducción de la señal. Por lo tanto, la incapacidad del ATPe para inducir la exposición de PS, la muerte celular, la producción de microvesículas y la liberación de la IL-1 β en las células del riñón cefálico de la dorada podría ser debido a la expresión y/o a la activación de cualquier otro de los componentes que forma este complejo con el receptor P2X₇.

Recientemente se ha demostrado que determinados péptidos antimicrobianos (las protegrinas, PTG), producidos por distintas células del sistema inmunitario durante el transcurso de una infección, pueden promover el procesamiento postransduccional y la liberación de la IL-1 β humana. Las PTG activan la ICE y el mecanismo de secreción de la IL-1 β por una vía independiente del receptor P2X₇ (Perregaux y col., 2002). Sin embargo, la adición de PTG-1 a las células de riñón cefálico de dorada, pretratadas con LPS y DNA bacteriano, no provocó una disminución significativa de la proIL-1 β asociada a las células ni la detección de proteína alguna en las microvesículas o en los sobrenadantes libres de microvesículas. Estos resultados sugieren que los leucocitos primarios de dorada son también incapaces de responder a otros estímulos responsables de la liberación de la IL-1 β en los mamíferos, pero que no actúan a través del receptor P2X₇.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. El cDNA de la *IL-1 β* de dorada se compone de 1.271 nt que incluyen un único ORF de 762 nt, un extremo 5' UTR de 102 nt y un extremo 3' UTR de 407 nt que contiene una posible señal de poliadenilación (AATAAA) situada 14 nt aguas arriba de la cola de poli(A) y siete posibles motivos de inestabilidad del RNA (ATTTA) característicos de los RNAs mensajeros de genes que cifran citoquinas inflamatorias.
2. El gen de la *IL-1 β* de dorada está compuesto por 5 exones y 4 intrones. Un primer intrón de 406 pb está presente en el 5' UTR y los otros tres están situados en el ORF y tienen unos tamaños de 459, 679 y 149 pb, respectivamente.
3. La proteína deducida del cDNA de la *IL-1 β* tendría 253 aminoácidos y un peso molecular estimado de 29 kDa. Dicha secuencia presenta la firma de la familia de la *IL-1* en su extremo carboxilo, y carece de un péptido señal hidrofóbico en el extremo amino así como del sitio de reconocimiento y corte de la caspasa-1.
4. La secuencia de aminoácidos de la *IL-1 β* de dorada deducida a partir de su cDNA posee una alta homología con otras *IL-1 β* s de peces (del 39% al 96%), especialmente entre los aminoácidos que formarían 12 láminas β implicadas en la estructura terciaria de la proteína. La homología es mayor con las *IL-1 β* s de especies del mismo orden y es menor con las especies pertenecientes a órdenes evolutivamente más alejados. El árbol filogenético realizado con las secuencias de las *IL-1 β* s coincide con el cladograma consenso que establece las relaciones filogenéticas de los diferentes órdenes de los peces teleósteos.
5. El transcrito de la *IL-1 β* de dorada se detecta mediante RT-PCR en células del exudado peritoneal, bazo, riñón cefálico, branquia, hígado y cerebro. La cantidad de transcrito se incrementa en células del exudado peritoneal y en leucocitos de sangre de peces infectados con *Vibrio anguillarum*. Por otro lado, la cantidad de transcrito de la *IL-1 β* en células de riñón cefálico de dorada aumenta tras el tratamiento *in vitro* con LPS, DNA bacteriano o *V. anguillarum*. Además, la acumulación del transcrito de la *IL-1 β* es mayor en macrófagos purificados que en células de riñón cefálico, y se induce tras el tratamiento *in vitro* con LPS y/o MAF.
6. El suero obtenido tras inmunizar conejos con la *IL-1 β* recombinante de dorada es capaz de detectar una proteína de unos 30 kDa presente únicamente en los extractos de células de riñón cefálico activados *in vitro* con LPS. Esta proteína representa el precursor de la *IL-1 β* (pro*IL-1 β*).
7. La pro*IL-1 β* se detecta asociada a las células de riñón cefálico de dorada tras

incubarlas *in vitro* con LPS, MAF y/o DNA bacteriano. Su cantidad aumenta de forma sinérgica cuando se estimulan las células con LPS y DNA bacteriano. Sin embargo, ni el ATP extracelular ni el péptido antimicrobiano PTG-1 inducen la liberación de la IL-1 β en células de riñón cefálico. Además, el ATP extracelular no es capaz de promover la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática.

8. La línea celular SAF-1 acumula proIL-1 β tras ser incubada *in vitro* con DNA bacteriano, pero el tratamiento con LPS no induce la producción de la proIL-1 β . El tratamiento con ATP induce la expresión de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de estas células.
9. La adición de ATP a las células SAF-1 activadas con DNA bacteriano induce la producción de microvesículas que contienen una proteína de unos 22 kDa que reacciona con el anticuerpo específico de la IL-1 β de dorada. Esta proteína podría representar la IL-1 β madura y se produce por un procesamiento post-trasduccional en el que interviene una enzima homóloga a la caspasa 1. Además, la caspasa 1 recombinante humana es capaz de procesar *in vitro* la IL-1 β recombinante de dorada.

Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1995) Citoquinas. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds) *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid, pp 267-292
- Abruzzini AF, Ingram LO, Clem LW (1982) Temperature-mediated processes in teleost immunity: Homeoviscous adaptation in teleost lymphocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 169:12-18
- Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, Volanakis JE (2001) Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* 166:3998-4004
- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968
- Ahne W (1993) Presence of interleukins (IL-1, IL-3, IL-6) and the tumor necrosis factor (TNF- α) in fish sera. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 13:106-107
- Ahne W (1994) Lectin (ConA) induced interleukin (IL-1 α , IL-2, IL-6) production *in vitro* by leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14:33-35
- Alabyev BY, Guselnikov SV, Najakshin AM, Mechetina LV, Taranin AV (2000) CD3epsilon homologues in the chondrosteian fish *Acipenser ruthenus*. *Immunogenetics* 51:1012-1020
- Alexander JB, Ingram GA (1992) Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Ann Rev Fish Dis* 2:249-279
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739
- Altmann SM, Mellon MT, Distel DL, Kim CH (2003) Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J Virol* 77:1992-2002
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Anderson DP (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Ann Rev Fish Dis* 2:281-307
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10:1463-1475
- Arend WP, Gordon DF, Wood WM, Janson RW, Joslin FG, Jameel S (1989) IL-1 beta production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels. *J Immunol* 143:118-126
- Arkoosh M, Kaattari S (1991) Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev Comp Immunol* 15:279-293
- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7907-7911
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Supplement 13, Wiley, New York.

- Avtalion RR (1981) Environmental control of the immune response in fish. Crit Rev Environ Control 11:163-187
- Bailly S, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW (1993) Genetic polymorphism of human interleukin-1 alpha. Eur J Immunol 23:1240-1245
- Bakouche O, Brown DC, Lachman LB (1987) Liposomes expressing IL 1 biological activity. J Immunol 138:4256-4262
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci USA 98:9237-9242
- Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC (1997) A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture 150:143-153
- Bensi G, Raugei G, Palla E, Carinci V, Tornese Buonomassa D, Melli M (1987) Human interleukin-1 beta gene. Gene 52:95-101
- Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Schmidt G (1990) Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. J Clin Invest 85:1746-1753
- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ (2002a) Evolution of interleukin-1beta. Cytokine Growth Factor Rev 13:483-502
- Bird S, Wang T, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2002b) The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1 beta in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). J Immunol 168:3329-3340
- Blobel G, Dobberstein B (1975a) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol 67:835-851
- Blobel G, Dobberstein B (1975b) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J Cell Biol 67:852-862
- Bowie A, O'Neill LA (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol 67:508-514
- Bridges AF, Manning MJ (1991) The effect of priming immersions in various human gamma globulin (HGG) vaccines on humoral and cell-mediate immune responses after intraperitoneal HGG challenge in the carp, *Cyprinus carpio* L. Fish Shellfish Immunol 1:119-129
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 285:732-736
- Brubacher JL, Secombes CJ, Zou J, Bols NC (2000) Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev Comp Immunol 24:565-574
- Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, Leiby KR, Holmgren LM, Gearing DP, Pan Y (2000) Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. Genomics 66:213-216

- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167:416-423
- Campos-Pérez JJ, Laing K, Ellis AE, Secombes CJ (1996) Detection of nitric oxide production by fish phagocytes. En: Barnes A, Davidson G, Hiney M, McIntosh D (eds) *Methodology in Fish Diseases Research*. MFDR Logo, Aberdeen, pp 25
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1670-1674
- Caspi RR, Avtalion RR (1984) Evidence for the existence of an IL-2-like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol* 8:51-60
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K, Black RA (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100
- Cheneval D, Ramage P, Kastelic T, Szelestenyi T, Niggli H, Hemmig R, Bachmann M, MacKenzie A (1998) Increased mature interleukin-1 beta (IL-1 beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1 beta-converting enzyme processing. *J Biol Chem* 273:17846-17851
- Chin J, Cameron PM, Rupp E, Schmidt JA (1987) Identification of a high-affinity receptor for native human interleukin 1 beta and interleukin 1 alpha on normal human lung fibroblasts. *J Exp Med* 165:70-86
- Chirico WJ, Waters MG, Blobel G (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332:805-810
- Chung S, Secombes CJ (1988) Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp Biochem Physiol* B89:539-544
- Clay FE, Tarlow JK, Cork MJ, Cox A, Nicklin MJ, Duff GW (1996) Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment. *Hum Genet* 97:723-726
- Clem LW, Faulmann E, Miller NW, Ellsaesser C, Lobb CJ, Cuchens MA (1984) Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 8:313-322
- Clem LW, Sizemore RC, Fellsaesser CF, Miller NW (1985) Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev Comp Immunol* 9:803-809
- Clem LW, Miller NW, Bly JE (1991) Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. En: Warr GW, Cohen N (eds) *Phylogenesis of Immune Functions*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 191-213
- Clemens MJ, Elia A (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17:503-524
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472-475

- Cuchens MA, Clem LW (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell Immunol* 34:219-230
- Da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276:21129-21135
- Daimon T, Uchida K (1985) Ultrastructural evidence of the existence of the surface connected canalicular system in the thrombocyte of the shark (*Triakis scyllia*). *J Anat* 141:193-200
- Day JJ (2002) Sparid phylogeny. *Biol J Linnean Soc* 76:269-301
- De Kinkelin P, Dorson M, Hattenberger-Baudouy AM (1982) Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. *Dev Comp Immunol (Supl. 2)*:167-174
- De Sena J, Rio GJ (1975) Partial purification and characterization of RTG-2 fish cell interferon. *Infect Immun* 11:815-822
- Deluca D, Wilson M, Warr GW (1983) Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur J Immunol* 13:546-551
- Deshais RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332:800-805
- Di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW (1992) Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet* 1:450
- Di Giovine FS, Crane A, Gough A, De Vries N, Van de Putte LBA, Emery P, Duff GW (1994) A genetic polymorphism in the IL-1 β gene is associated with joint erosions in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 6:545
- Di Virgilio F (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97:587-600
- Dinarello CA (1988) Biology of interleukin 1. *FASEB J* 2:108-115
- Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652
- Dinarello CA (1994) The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 5:517-531
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147
- Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:253-265
- Dinarello CA (1999) Interleukin-18. *Methods* 19:121-132
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladin MA Jr, O'Connor JV (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 163:1433-1450
- Dixon B, Shum B, Adams EJ, Magor KE, Hedrick RP, Muir DG, Parham P (1998) CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol Rev* 166:341-348
- Dorson M, Barde A, de Kinkelin P (1975) Egtved virus induced rainbow trout serum interferon: some physicochemical properties. *Ann Microbiol (Ins Pasteur)* 126:485-489
- Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S, Urdal DL (1985) Detec-

- tion and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* 162:501-515
- Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343:341-346
- Ellis AE, Hastings TS, Munro ALS (1981) The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *J Fish Dis* 4:41-51
- Engelsma MY, Stet RJ, Schipper H, Verburg-van Kemenade BM (2001) Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol* 25:195-203
- Esteban MA, Meseguer J (1994) Phagocytic defence mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. *Anat Rec* 240:589-597
- Evans DL, Jaso-Friedmann L (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effector of immunity in fish. *Ann Rev Fish Dis* 2:109-121
- Fang XM, Schroder S, Hoeft A, Stuber F (1999) Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 27:1330-1334
- Farrar MA, Schreiber RD (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11:571-611
- Feldmann M (1996) Cell cooperation in the antibody response. En: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds) *Immunology*. Mosby, Londres
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F (1997a) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185:579-582
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997b) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159:1451-1458
- Fiskerstrand C, Sargan D (1990) Nucleotide sequence of ovine interleukin-1 beta. *Nucleic Acids Res* 18:7165
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10:363-372
- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T (1999) Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetics* 49:909-914
- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T (2000) Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol* 10:229-242
- Fukui A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y, Toyoshima K, Seya T (2001) Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem* 276:47143-47149
- García-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW,

- Thornberry NA (1999) Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ* 6:362-369
- García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J (2002) Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 54:200-207
- Gardella S, Andrei C, Lotti LV, Poggi A, Torrissi MR, Zocchi MR, Rubartelli A (2001) CD8(+) T lymphocytes induce polarized exocytosis of secretory lysosomes by dendritic cells with release of interleukin-1 beta and cathepsin D. *Blood* 98:2152-2159
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrissi MR, Bianchi ME, Rubartelli A (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3:995-1001
- Gewurz H, Mold C, Siegel J, Fiedel B (1982) C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 27:345-372
- Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I (1999) Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1 beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 11:16-28
- Graham S, Secombes CJ (1988) The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology* 65:293-297
- Graham S, Secombes CJ (1990a) Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev Comp Immunol* 14:59-68
- Graham S, Secombes CJ (1990b) Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ? *J Fish Biol* 36:563-573
- Gravell M, Malsberger RG (1965) A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann NY Acad Sci* 126:555-565
- Gray PW, Glaister D, Chen E, Goeddel DV, Pennica D (1986) Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta. *J Immunol* 137:3644-3648
- Grodberg J, Dunn JJ (1988) *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170:1245-1253
- Grondel JL, Harmsen EGM (1984) Phylogeny of interleukins: growth factors produced by leucocytes of the cyprinid fish, *Cyprinus carpio* L. *Immunology* 52:477-482
- Guida S, Heguy A, Melli M (1992) The chicken IL-1 receptor: differential evolution of the cytoplasmic and extracellular domains. *Gene* 111:239-243
- Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17:6230-6240
- Haire RN, Rast JP, Litman RT, Litman GW (2000) Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics* 51:915-923
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166:15-19

- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343:336-340
- Hansen JD, Strassburger P (2000) Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alpha, in rainbow trout. *J Immunol* 164:3132-3139
- Hardie LJ, Grabowski PS, Ralston S, McGuigann F, Secombes CJ (1994a) Isolation of a partial coding sequence for nitric oxide synthase from rainbow trout macrophages. *Dev Comp Immunol* 18(Sup. 1):S88
- Hardie LJ, Chappell LH, Secombes CJ (1994b) Human tumor necrosis factor alpha influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet Immunol Immunopathol* 40:73-84
- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ (1994c) Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev Comp Immunol* 18:57-66
- Hardie LJ, Laing KJ, Daniels GD, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1998) Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine* 10:555-563
- Harrell L, Etlinger H, Hodgins H (1975) Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture* 6:211-219
- Hata J, Takeo J, Segawa C, Yamashita S (1997) A cDNA encoding fish fibroblast growth factor-2, which lacks alternative translation initiation. *J Biol Chem* 272:7285-7289
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103
- Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4:407-414
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94:3791-3799
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745
- Hepkema FW, Secombes CJ (1994) 5' Nucleotidase activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages: correlation with respiratory burst activity. *Fish Shellfish Immunol* 4:301-309
- Hibbs JBJ, Taintor RR, Vavrin Z (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235:473-476

- Hickman SE, el Khoury J, Greenberg S, Schieren I, Silverstein SC (1994) P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood* 84:2452-2456
- Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T (2000) Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Immunol* 165:4423-4427
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN (2001) Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69:1477-1482
- Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, Fenton M (1993) Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13:6231-6240
- Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* 27:215-219
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD (1991a) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8485-8489
- Hogquist KA, Unanue ER, Chaplin DD (1991b) Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147:2181-2186
- Hong S, Zou J, Crampe M, Peddie S, Scapigliati G, Bols N, Cunningham C, Secombes CJ (2001) The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 beta. *Vet Immunol Immunopathol* 81:1-14
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 162:3749-3752
- Howell CJ (1987) A chemokinetic factor in the carp *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol* 11:139-146
- Huether MJ, Lin G, Smith DM, Murtaugh MP, Molitor TW (1993) Cloning, sequencing and regulation of an mRNA encoding porcine interleukin-1 beta. *Gene* 129:285-289
- Hughes AL (1994) Evolution of the interleukin-1 gene family in mammals. *J Mol Evol* 39:6-12
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274:14560-14567
- Inoue Y, Itou T, Ueda K, Oike T, Sakai T (1999) Cloning and sequencing of a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-1alpha and -1beta complementary DNAs. *J Vet Med Sci* 61:1317-1321
- Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA (1987) Macrophages synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and the role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6369-6373
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216

- Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ (1994) Effects of transforming growth factor beta 1 on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity. *Dev Comp Immunol* 18:315-323
- Jang SI, Mulero V, Hardie LJ, Secombes CJ (1995a) Inhibition of rainbow trout phagocyte responsiveness to human tumor necrosis factor α (hTNF α) with monoclonal antibodies to the hTNF α 55 kDa receptor. *Fish Shellfish Immunol* 5:61-69
- Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ (1995b) Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *J Leukoc Biol* 57:943-947
- Jørgensen JB, Zou J, Johansen A, Secombes CJ (2001) Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 β and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish Shellfish Immunol* 11:673-682
- Kaattari SL, Piganelli JD (1996) The specific immune system: Humoral defense. En: Iwama G, Nakanishi T (eds) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, Inc., New York, pp 207-254
- Kato H, Ohashi T, Nakamura N, Nishimura Y, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A (1995) Molecular cloning of equine interleukin-1 α and β cDNAs. *Vet Immunol Immunopathol* 48:221-231
- Kiefer P, Mathieu M, Mason I, Dickson C (1996) Secretion and mitogenic activity of zebrafish FGF3 reveal intermediate properties relative to mouse and *Xenopus* homologues. *Oncogene* 12:1503-1511
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347-6358
- Klasing KC, Peng RK (2001) Soluble type-I interleukin-1 receptor blocks chicken IL-1 activity. *Dev Comp Immunol* 25:345-352
- Kodama H, Mukamoto M, Baba T, Mule DM (1994) Macrophage-colony stimulating activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *Modulators of Fish Immune Responses* 1:59-66
- Krieg AM (2000) The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12:35-43
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549
- Kumar M, Carmichael GG (1998) Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1415-1434
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- Labriola-Tompkins E, Chandran C, Kaffka KL, Biondi D, Graves BJ, Hatada M, Madison VS, Karas J, Kilian PL, Ju G (1991) Identification of the discontinuous binding site in

- human interleukin 1 beta for the type I interleukin 1 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 88:11182-11186
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Laing KJ, Grabowski PS, Belosevic M, Secombes CJ (1996) A partial sequence for nitric oxide synthase from goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. Immunol Cell Biol 74:374-379
- Laing KJ, Hardie L, Grabowski P, Secombes C (1999a) Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dev Comp Immunol 23:71-85
- Laing KJ, Pilstrom L, Cunningham C, Secombes CJ (1999b) TGF-beta3 exists in bony fish. Vet Immunol Immunopathol 72:45-53
- Laing KJ, Cunningham C, Secombes CJ (2000) Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA. Fish Shellfish Immunol 10:261-271
- Laing KJ, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2001) Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. Eur J Biochem 268:1315-1322
- Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2002) Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dev Comp Immunol 26:433-444
- Laliberte RE, Egger J, Gabel CA (1999) ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. J Biol Chem 274:36944-36951
- Lamas J, Ellis AE (1994) Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol 4:201-219
- Lee EY, Park HH, Kim YT, Choi TJ (2001) Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene 274:237-243
- Leong SR, Flagg GM, Lawman M, Gray PW (1988) The nucleotide sequence for the cDNA of bovine interleukin-1 beta. Nucleic Acids Res 16:9054
- Lepe-Zuniga JL, Gery I (1984) Production of intra- and extracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes. Clin Immunol Immunopathol 31:222-230
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J Clin Invest 105:497-504
- Lin H, Ho AS, Haley-Vicente D, Zhang J, Bernal-Fussell J, Pace AM, Hansen D, Schweighofer K, Mize NK, Ford JE (2001) Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. J Biol Chem 276:20597-20602
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. J Cell Biol 154:485-490
- Lobb CJ, Clem LW (1982) Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. Dev Comp Immunol 6:473-479

- Long Q, Quint E, Lin S, Ekker M (2000) The zebrafish *scyba* gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibulo-acoustic system during embryogenesis. *Mech Dev* 97:183-186
- López-Ruiz A, Esteban MA, Meseguer J (1992) Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) Light and electron microscopic studies. *Anat Rec* 234:161-171
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825-835
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15
- Male D, Roitt I (1996) Introduction to the immune system. En: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds) *Immunology*. Mosby, Londres, pp 1-12
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP, Cossman D (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human Interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315:641-648
- Marsden MJ, Cox D, Secombes CJ (1994) Antigen-induced release of macrophage activating factor from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 42:199-208
- Marsden MJ, Hamdani SH, Secombes CJ (1995) Proliferative responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, T and B cells to antigens of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol* 5:199-210
- Matsushima K, Taguchi M, Kovacs EJ, Young HA, Oppenheim JJ (1986) Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J Immunol* 136:2883-2891
- May MJ, Ghosh S (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19:80-88
- McDevitt MJ, Wang HY, Knobelmann C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS (2000) Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 71:156-163
- McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW (1995) A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 38:221-228
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, Copeland NG, Huebner K, Croce CM, Cannizzaro LA, Benjamin D, Dower SK, Spriggs MK, Sims JE (1991) A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 10:2821-2832
- Medzhitov R, Janeway CA Jr (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397
- Meseguer J, López-Ruiz A, Esteban MA (1994) Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry* 102:37-44

- Meseguer J, Esteban MA, Mulero V (1999) Natural Cytotoxic Response in Fish. A Review. En: Saksena D (ed) Ichthyology Recent Research Advances. Oxford & IBH Publishing, Nueva Delhi, pp 198-202
- Meseguer J, Esteban MA, Rodríguez A (2002) Are thrombocytes and platelets true phagocytes? Microsc Res Tech 57:491-497
- Miller NW, Clem LW (1984) Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. J Immunol 133:2356-2359
- Miller NW, Deuter A, Clem LW (1986) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish. Immunology 59:123-128
- Milstein C, Brownlee GG, Harrison TM, Mathews MB (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. Nature 239, 117-120
- Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP, Garka KE, Gerhart MJ, Slack JL, Gayle MA, Dower SK, Sims JE (1996) T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. J Biol Chem 271:5777-5783
- Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Annout MA, Golenbock DT, Freeman MW (2000) Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. J Immunol 165:4272-4280
- Mori S, Goto F, Goto K, Ohkawara S, Maeda S, Shimada K, Yoshinaga M (1988) Cloning and sequence analysis of a cDNA for lymphocyte proliferation potentiating factor of rabbit polymorphonuclear leukocytes: identification rabbit interleukin 1 beta. Biochem Biophys Res Commun 150:1237-1243
- Mulero JJ, Pace AM, Nelken ST, Loeb DB, Correa TR, Drmanac R, Ford JE (1999) IL1HY1: A novel interleukin-1 receptor antagonist gene. Biochem Biophys Res Commun 263:702-706
- Mulero V, Meseguer J (1998) Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol 8:143-156
- Murzin AG, Lesk AM, Chothia C (1992) β -Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. J Mol Biol 223:531-543
- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. J Mol Biol 247:536-540
- Najakshin AM, Mechetina LV, Alabyev BY, Taranin AV (1999) Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. Eur J Immunol 29:375-382
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y (2001) Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. Immunology 104:402-409
- Nam BH, Hirono I, Aoki T (2003) The Four TCR Genes of Teleost Fish: The cDNA and Genomic DNA Analysis of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-Chains. J Immunol 170:3081-3090

- Nash KA, Fletcher TC, Thomson AW (1987) Effect of opsonization on oxidative metabolism of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) neutrophils. *Comp Biochem Physiol* 86B:31-36
- Nathan C (1992) Nitric oxide a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064
- Nathan CF, Hibbs JBJ (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70
- Navarro V, Quesada J, Abad ME, Taverne N, Rombout JHWM (1993) Immuno(cyto)chemical characterization of monoclonal antibodies to gilthead seabream (*Sparus aurata*) immunoglobulin. *Fish Shellfish Immunol* 3:167-177
- Neumann NF, Fagan D, Belosevic M (1995) Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev Comp Immunol* 19:473-482
- Nicola NA (ed) (1994) Guidebook to cytokines and their receptors. Sanbrook and Tooze, Oxford.
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398:252-256
- Nishida T, Nishino N, Takano M, Kawai K, Bando K, Masui Y, Nakai S, Hirai Y (1987) cDNA cloning of IL-1 alpha and IL-1 beta from mRNA of U937 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 143:345-352
- O'Neill LA (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 44:RE1
- O'Neill LA, Greene C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63:650-657
- Oppenheim J, Kovacs E, Matsushima K, Durum S (1986) There is more than one interleukin-1. *Immunol Today* 7:45-56
- Ortiz ML, Calero M, Fernandez Patron C, Patron CF, Castellanos L, Mendez E (1992) Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett* 296:300-304
- Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, Matsumoto M, Ikeo K, Seya T (2003) Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* 54:791-800
- Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans DL (2002) Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs. *Dev Comp Immunol* 26:257-269
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Adrem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13766-13771

- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Herzog WJ, Vandlen R (2001) IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine* 13:1-7
- Pearson AM (1996) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:20-28
- Peddie S, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2001) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* 11:697-709
- Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269:15195-15203
- Perregaux DG, Bhavsar K, Contillo L, Shi J, Gabel CA (2002) Antimicrobial peptides initiate IL-1 β posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity. *J Immunol* 168:3024-3032
- Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2000) Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 51:1002-1011
- Plytycz B, Flory CM, Galvan I, Bayne CJ (1989) Leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev Comp Immunol* 13:217-224
- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion *in vitro*. *Eur J Clin Invest* 22:396-402
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088
- Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B (2000) Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2163-2167
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625
- Rauschmayr T, Groves RW, Kupper TS (1997) Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5814-5819
- Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J (1997) Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 158:3165-3173
- Rowley AF, Hunt TC, Page M, Mainwaring G (1988) Fish. En: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate blood cells. Cambridge University Press, Cambridge, pp 19-128

- Rubartelli A, Sitia R (1997) Secretion of mammalian proteins that lack a signal sequence. En: Kuchler K, Rubartelli A, Holland BI (eds) Unusual secretory pathways: From bacteria to man. Austin: R G Landes, pp 87-104
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. EMBO J 9:1503-1510
- Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Cozzolino F, Sitia R (1993) Post-translational regulation of interleukin 1 beta secretion. Cytokine 5:117-124
- Sakai DK (1983) Lytic and bactericidal properties of salmonid sera. J Fish Biol 23:457-466
- Sakai DK (1984a) Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. J Fish Dis 7:29-38
- Sakai DK (1984b) The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products. J Fish Dis 7:329-338
- Sakai DK (1992) Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. Ann Rev Fish Dis 2:223-247
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor
- Sangrador-Vegas A, Martin SA, O'Dea PG, Smith TJ (2000) Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. Eur J Biochem 267:7031-7037
- Sangrador-Vegas A, Lenington JB, Smith TJ (2002) Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization. Cytokine 17:66-70
- Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, Zou J, Pelegrín P, Falasca C, Prugnoli D, Secombes CJ (2001) Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. Fish Shellfish Immunol 11:711-726
- Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, Elvers S, Staeheli P, Kaspers B, Weining KC (2000) cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. J Interferon Cytokine Res 20:879-883
- Schwalbe RA, Dahlback B, Coe JE, Nelsestuen GL (1992) Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. Biochemistry 31:4907-4915
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem 274:17406-17409
- Secombes CJ (1987) Lymphokine-release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanavalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence. Dev Comp Immunol 11:513-520
- Secombes C (1996) The nonspecific immune system: cellular defenses. En: Iwama G, Nakanishi I (eds) The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press, Inc., New York, pp 63-103
- Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Ann Rev Fish Dis 2:53-71

- Secombes CJ, van Groningen JJM, Egberts E (1983) Separation of lymphocyte subpopulation in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. *Immunology* 48:165-175
- Secombes CJ, Chung S, Jeffries AH (1988) Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev Comp Immunol* 12:201-206
- Secombes CJ, Hardie LJ, Daniels G (1996) Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol* 6:291-304
- Sharp GJE, Secombes CJ (1993) The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 3:119-129
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782
- Siders WM, Mizel SB (1995) Interleukin-1 beta secretion. A possible multistep process that is regulated in a cell type-specific manner. *J Biol Chem* 270:16258-16264
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK (1993) Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6155-6159.
- Singer II, Scott S, Hall GL, Limjoco G, Chin J, Schmidt JA (1988) Interleukin 1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. *J Exp Med* 167:389-407
- Sizemore RC, Miller NW, Cuchens MA, Lobb CJ, Clem LW (1984) Phylogeny of lymphocytes heterogeneity: the cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J Immunol* 133:2920-2924
- Skarmeta MA, Bandin I, Santos Y, Toranzo AE (1995) *In vitro* killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Dis Aquat Org* 23:51-57
- Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE (2000) Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem* 275:1169-1175
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 276:125-132
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130
- Stylianou E, Saklatvala J (1998) Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1075-1079
- Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C (2002) Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev Comp Immunol* 26:415-431
- 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, Vanberkel TJC, 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
- Suzuki Y, Iida T (1992) Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann Rev Fish Dis* 2:149-160
- Tabé L, Krieg P, Strachan R, Jackson D, Wallis E, Colman A (1984) Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J Mol Biol* 180:645-666
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S (2000) Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164:554-557
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940
- Tamai T, Sato N, Kimura S, Shirahata S, Murakami H (1992) Cloning and expression of flat-fish interleukin 2 gene. En: Murakami H, Shirahata S, Tachibana H (eds) *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 509-514
- Telford JL, Macchia G, Massone A, Carinci V, Palla E, Melli M (1986) The murine interleukin 1 beta gene: structure and evolution. *Nucleic Acids Res* 14:9955-9963
- Tengelsen LA, Trobridge GD, Leong JC (1991) *Proc 2nd Int Symp on Viruses of Lower Vertebrates*, pp 27-42
- Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, El Khoury J (2000) Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* 191:147-156
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Tocci MJ (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774
- Tocci MJ (1997) Structure and function of interleukin-1 beta converting enzyme. *Vitam Horm* 53:27-63
- Toranzo AE, Barja JL (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain. *Dis Aquat Org* 9:73-82
- Totsuka K, Takakura H, Hashimoto O, Tatsumi M (1998) Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-1beta cDNA. *Int Arch Allergy Immunol* 116:40-48

- Trapani J (2001) Position of developing replacement teeth in teleosts. *Copeia* 1:35-51
- Ulevitch RJ, Tobias PS (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13:437-457
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276:31332-31339
- Vallejo AN, Miller NW, Clem LW (1992) Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Ann Rev Fish Dis* 2:73-89
- Van Muiswinkel WB (1995) The piscine immune system: innate and acquired immunity. En: Woo P (ed) *Fish diseases and disorders*. CAB International, Oxon, pp 729-750
- Vandenbroeck K, Fiten P, Beuken E, Martens E, Janssen A, Van Damme J, Opdenakker G, Billiau A (1993) Gene sequence, cDNA construction, expression in *Escherichia coli* and genetically approached purification of porcine interleukin-1 beta. *Eur J Biochem* 217:45-52
- Vandenbroeck K, Fiten P, Opdenakker G, Billiau A (1994) Two distinct interleukin-1 beta genes in the pig genome. *Immunogenetics* 40:82
- Villinger F, Brar SS, Mayne A, Chikkala N, Ansari AA (1995) Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. *J Immunol* 155:3946-3954
- Von Eschen KB, Rudbach JA (1974) Inactivation of endotoxin by serum: A phylogenetic study. *J Infect Dis* 129:21-27
- Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A, Bhakdi S (1995) Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J* 14:1607-1614
- Wang R, Neumann NF, Shen Q, Belosevic M (1995) Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish Shellfish Immunol* 5:329-346
- Wang T, Ward M, Grabowski P, Secombes CJ (2001a) Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem J* 358:747-755
- Wang K, Gan L, Kunisada T, Lee I, Yamagishi H, Hood L (2001b) Characterization of the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) T-cell receptor alpha locus reveals a unique genomic organization. *Immunogenetics* 53:31-42
- Wang T, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2002) Cloning and functional characterisation of the interleukin-1 beta 1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta* 1575:108-116
- Wedlock DN, Goh LP, Parlange NA, Buddle BM (1999) Molecular cloning and physiological effects of brushtail possum interleukin-1 beta. *Vet Immunol Immunopathol* 67:359-372
- Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P (1998) A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* 258:994-1000

- Wermerstam NE, Pilstrom L (2001) T-cell antigen receptors in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure, organisation and expression of TCR alpha and beta genes. *Dev Comp Immunol* 25:117-135
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2:346-352
- Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120
- Wilson V, Jeffreys AJ, Barrie PA, Boseley PG, Slocombe PM, Easton A, Burke DC (1983) A comparison of vertebrate interferon gene families detected by hybridization with human interferon DNA. *J Mol Biol* 166:457-475
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X₂ receptor C terminus. *J Biol Chem* 277:34017-34023
- Yin Z, Kwang J (2000) Carp interleukin-1 beta in the role of an immuno-adjuvant. *Fish Shellfish Immunol* 10:375-378
- Yin Z, Lam TJ, Sin YM (1997) Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol* 7:93-104
- Zapata AG, Chibá A, Varas A (1996) Cells and tissues of the immune system of fish. En: Iwama G, Nakanishi T (eds) *The fish immune system. Organism, pathogen and environment*. Academic Press, San Diego, EE.UU., pp 1-62
- Zhang H, Thorgaard GH, Ristow SS (2002) Molecular cloning and genomic structure of an interleukin-8 receptor-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 13:251-258
- Zou J, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1999a) Molecular cloning of interleukin 1 beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 11:552-560
- Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (1999b) The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Eur J Biochem* 259:901-908
- Zou J, Bird S, Minter R, Horton J, Cunningham C, Secombes CJ (2000a) Molecular cloning of the gene for interleukin-1 beta from *Xenopus laevis* and analysis of expression *in vivo* and *in vitro*. *Immunogenetics* 51:332-338
- Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, Cunningham C, Secombes CJ (2000b) Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev Comp Immunol* 24:575-582

Resumen en inglés

Summary

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) interleukin-1 β (IL-1 β) cDNA was isolated by RT-PCR using degenerate primers designed against vertebrate IL-1 β conserved motifs and subsequent rapid amplification of cDNA ends (RACE). The gene consist of a 102 bp 5' untranslated region (UTR), a single open reading frame of 762 bp which translates into a 253 amino acid molecule, and a 407 bp 3'UTR with a polyadenylation signal 14 nucleotides upstream of the poly(A)tail and seven cytokines RNA instability motifs (ATTTA). A high degree of amino acid identity was found between seabream IL-1 β sequence and other known IL-1 β s (from 38% to 96%). A phylogenetic tree reveals that the seabream IL-1 β sequence is most related to the IL-1 β s sequences of other sparids. The IL-1 β message was detected by RT-PCR in head-kidney, blood, spleen, liver, gill and peritoneal exudate of both non-infected and bacterially challenged fish. More importantly, IL-1 β was highly expressed by purified macrophage monolayers and was upregulated by lipopolysaccharide (LPS) and macrophage-activating factor (MAF) stimulation (as assayed by semi-quantitative RT-PCR experiments).

IL-1 β is a secretory cytokine lacking a signal peptide, wich does not follow the classical secretion pathway of endoplasmic reticulum to Golgi. Its post-translational processing by IL-1 β -converting enzyme (ICE) and subsequent release from activated macrophages requires ATP to act on P2X₇ receptors. No information is available on the production and release of fish IL-1 β , but the IL-1 β gene sequences reported to date lack a conserved ICE recognition site. We show for the first time that LPS/ MAF/bacterial DNA (VaDNA)-primed immune cells of fish accumulate intracellular IL-1 β as a ~30 kDa polypeptide (proIL-1 β). The combination of LPS and VaDNA was found to be synergistic, suggesting that each ligand is recognized by a different pattern recognition receptor (PRR). More importantly, the addition of extracellular ATP does not promote IL-1 β secretion by immune cells and fails to induce a phosphatidylserine (PS) flip. In contrast, fish SAF-1 fibroblasts shed microvesicles containing a 22 kDa IL-1 β form within 30 min of activation by ATP. Notably, the post-translational processing of IL-1 β by SAF-1 cells is inhibited by a specific ICE inhibitor.

Introduction

In fish, as in mammals, a wide array of cytokines coordinates the innate and adaptive immune response. Despite the plethora of biological activities described for cytokines in fish (reviewed by Secombes et al., 1996), only very few fish cytokine sequences have been reported so far. These sequences include interleukin-1 β (IL-1 β) (Zou et al., 1999a; Fujiki et al., 2000; Scapigliati et al., 2001; Bird et al., 2002b), transforming growth factor- β (Hardie et al., 1998), tumor necrosis factor- α (Hirono et al., 2000; Laing et al., 2001; García-Castillo et al., 2002), fibroblast growth factor (Kiefer et al., 1996; Hata et al., 1997) and several chemokines (Dixon et al., 1998; Fujiki et al., 1999; Najakshin et al., 1999).

IL-1 β , together with interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-18, is a member of the IL-1 gene family (Hughes, 1994), all of which have in common a β -trefoil structure composed of 12 β -sheets (Nicola, 1994). These molecules play a pivotal role in the inflammatory response as well as in the maturation and proliferation of many immunity cell types (Dinarello, 1997). Little is known about the regulation of IL-1 β expression in fish cells, although Zou et al. (2000b) have reported that IL-1 β gene expression is upregulated by lipopolysaccharide (LPS) in rainbow trout leukocytes.

The mechanism of mammal IL-1 β release remains enigmatic. Unlike most secreted proteins, it lacks a secretory signal sequence and does not follow the classical endoplasmic reticulum to Golgi route of secretion (Rubartelli et al., 1990). IL-1 β is mainly produced by activated macrophages as a 31 kDa biologically inactive precursor molecule (proIL-1 β) that is proteolytically cleaved to a 17 kDa active form by IL-1 β -converting enzyme (ICE, caspase-1) (Cerretti et al., 1992). Cleavage of IL-1 β is coupled to its secretion because processed IL-1 β can only be found extracellularly (Rubartelli et al., 1990). Although the levels of IL-1 β basal processing and release are quite low, they are strongly induced by the presence of extracellular ATP, which can be autocrinally generated by activated monocytes, and which interacts with P2X₇ purinergic receptors (Ferrari et al., 1997b). This has now been confirmed by results from mice lacking the P2X₇ receptors where macrophages primed with LPS are unable to process and to release IL-1 β in response to application of ATP (Solle et al., 2001).

The first non-mammalian sequences reported have even resulted in a more puzzling scenario, since fish, amphibian and bird *IL-1 β* genes cloned so far lack a conserved ICE recognition site (Weining et al., 1998; Zou et al., 1999a, 2000a; Fujiki et al., 2000; Scapigliati et al., 2001; Bird et al., 2002b). A great deal remain to be learnt about the phylogeny, biological activities and maturation of fish IL-1 β . Additional lower vertebrate sequences are needed to increase our knowledge of IL-1 β evolution. In addition, the production of recombinant molecules for bioactivity testing and production of specific antibodies to fish IL-1 β will help to understand the evolution of vertebrate IL-1 β , as well as to identify the mechanisms orchestrating its secretion in fish.

In this work, we report the cloning of the marine teleost fish (gilthead seabream, *Sparus aurata* L.) IL-1 β cDNA. The molecule shows the highest nucleotide and amino acid

identity with the IL-1 β s sequences of other sparids and this is further confirmed by the phylogenetic tree analysis. The IL-1 β transcript was found in several tissues from non-infected fish and both LPS and macrophage-activating factor (MAF) up-regulated its expression in macrophages. Such data offer a new insight into the regulation of IL-1 β expression in fish immunocompetent cells. Moreover, the production of a specific antiserum against the gilt-head seabream IL-1 β allows us to characterize the inflammatory stimuli that regulate in this species the production, processing and release of IL-1 β . To this end, we examined the extracellular signals involved in the secretion of this cytokine and, to our surprise, found that extracellular ATP failed to induce the secretion of IL-1 β by immune cells, whereas it promoted post-translational processing and release of IL-1 β within microvesicles in SAF-1 fibroblasts of the same species.

Materials and methods

1. Animals

Healthy specimens (150 g mean weight) of the hermaphroditic protandrus marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) obtained from Culmarex S.A. (Murcia, Spain), were kept in 260 l running seawater aquaria (flow rate 1500 l/h) at 20°C with a 12-h L/D cycle. Fish were fed with a commercial pellet diet (ProAqua, see Table 6) at a feeding rate of 1.5 g dry diet/kg biomass of fish/day.

2. Production of cDNA

The head-kidney was extracted by ventral incision and washed in 8 ml sRPMI medium (RPMI-1640 culture medium (Gibco) adjusted to gilthead seabream serum osmolarity (353.33 mOs) with 0.35% NaCl) supplemented with 5% heat-inactivated (56°C, 30 min) fetal calf serum (FCS) (Gibco), 10 units/ml heparin (Sigma), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Biochrom) (Mulero and Meseguer, 1998). Cell suspensions were obtained by forcing fragments of the organ through a 102 μ m nylon mesh and incubated with 1 ml of sRPMI containing 5% FCS and 10 μ g/ml of lipopolysaccharide (LPS, Sigma) for 4 hours at 25°C. The cells were then centrifuged at 400 $\times$ g and total RNA was extracted from the cell pellets with TRIzol Reagent (Gibco) following the manufacturer's instructions. The SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to synthesize first strand cDNA with oligo-dT₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen) from 5 μ g of total RNA at 42°C for 50 min.

3. Cloning and sequencing

The sequence of the seabream IL-1 β was obtained using homology cloning approach. For this, the cDNA obtained as described above was used in initial PCR with F13 and R primers (see Table 6) designed against conserved motifs of known IL-1 β sequences. Amplification was performed in 50 μ l reactions containing 5 μ l PCR reaction buffer (10 $\times$, Ecogen), 2 μ l forward and reverse primers (10 μ M each), 2 μ l dNTP mix (10 mM each, Gibco), 0.5 μ l EcoTaqDNA polymerase (1.25 units, Ecogen), 35.5 μ l DNase/RNase-free distilled water (Sigma) and 3 μ l cDNA template. The cycling reaction was performed in a MasterCycler Gradient (Eppendorf): one cycle of 95°C for 5 min, 30 cycles of 95°C for 45 sec, 48°C for 45 sec and 72°C for 1 min, followed by one further cycle of 72°C for 10 min. PCR products were separated in a 1% agarose (Pronadisa) gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide (Sigma) and visualised under UV light.

PCR products were purified with the QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega). Following transfection into competent

Escherichia coli DH-5 α cells, recombinants were identified through blue-white colour selection in ampicillin (Sigma) Luria Broth Base (Sigma) plates containing 40 mg/ml of X-Gal (Applichem). Plasmid DNA was isolated by the QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiaegen) and sequenced using a ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

Based on the partial seabream IL-1 β sequence obtained with the product of F13/R primers, several seabream specific primers (Table 6) were used to obtain the 3' and 5' ends of the gene by rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR. In 3'RACE-PCR, cDNA was retrotranscribed using an oligo-dT adaptor primer (RaceT, Table 6). PCR was carried out with the F13 and the Race primer and a second semi-nested PCR with seabream specific F1 or F2 primers and the Race primer. For 5'RACE-PCR, cDNA synthesized with an oligo-dT was treated with *E. coli* RNase H (Invitrogen) and then purified with the QIAquick[®] PCR Purification Kit. The first strand cDNA obtained was tailed with poly(A) at the 5' end using the Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT, Invitrogen). PCR was performed initially with the R primer and the oligo-dT adaptor (RaceT) primer and then semi-nested PCR with seabream specific R1 or R2 primers and the Race primer.

Generated sequences were analysed for similarity with other known sequences using the BLAST program (Altschul et al., 1990) within the ExPASy Proteomic Tools server. Direct comparison between two sequences was made using the ALIGN program, and the results were presented as percentage of identity and similarity. Multiple sequence alignment was generated using the CLUSTALW programme (Thompson et al., 1994), within the EBI Outstation. Finally, a phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequence alignments generated with CLUSTALW (Kyte and Doolittle, 1982).

4. Expression studies

The expression of IL-1 β transcript was studied *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* experiments, head kidney cells and purified macrophage monolayers (adherent cells after overnight incubation in serum-free medium) were incubated for 4h at 25°C in sRPMI alone or containing 10 μ g/ml LPS and/or a 1/20 dilution of MAF (Mulero and Meseguer, 1998). cDNA was synthesized from total RNA as described above and used as template for PCR reactions. PCR was performed using F3 and R2 seabream IL-1 β specific primers (Table 6): one cycle of 95°C for 5 min, 30 cycles each of 95°C for 45 sec, 55°C for 45 sec and 72°C for 1 min, followed by one cycle of 72°C for 10 min. Primers for β -actin were used as a positive control for RT-PCR because the gene is expressed constitutively in the tissues examined. Samples were collected from PCR reactions at 10, 20 and 30 cycles and then separated in a 1% agarose gel containing 0.5 μ g/ml of ethidium bromide and visualised under UV light.

For the *in vivo* experiments, RT-PCR was performed using F3 and R2 primers with cDNA from several tissues (spleen, brain, peritoneal exudate, blood, head kidney, gill and liver) isolated from fish 24 h after challenge with 5x10⁸ cells of a non-virulent strain (ATCC 19264) of the fish bacterial pathogen *Vibrio anguillarum* (Toranzo and Barja, 1990). cDNA from all the above tissues isolated from unstimulated fish were also used as a control to detect basal IL-1 β expression.

5. Cloning of gilthead seabream IL-1 β into expression vector

The coding region for the gilthead seabream IL-1 β (sblL-1 β) was obtained by polymerase chain reaction amplification with the primer F6 and R5 (see Table 6) and LPS-stimulated head-kidney cDNA, which was obtained using protocols described elsewhere, as template. The PCR-amplified product was purified and cloned into the *Bam*HI site of the pBluescript SK+ vector (Stratagene), and then subcloned into the *Bam*HI site of the pET15b vector (Novagen) for bacterial expression of the 6xHis-tagged protein.

6. Overexpression and purification of sblL-1 β

Escherichia coli BL21(DE3) cells freshly transformed with the pET15b-sblL-1 β construct were cultured overnight in LB-ampicillin medium. After dilution into fresh LB-ampicillin, the cultures were grown at 37°C to an A_{600} of 0.4-0.6 and induced with 1mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG, AppliChem) for 2 h at 37°C. Protein expression in whole cell extracts was checked by centrifuging 0.1 ml of induced culture (14,000 rpm in a Microfuge), and the cell pellet was lysed by boiling in SDS-loading buffer for analysis by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and Western blotting using an anti-polyhistidine monoclonal antibody (Sigma). To check the solubility of the expressed protein, the cell pellet (obtained as above) was suspended in buffer A (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 4 mM 2-mercaptoethanol, pH=7.5), sonicated and centrifuged, and the supernatant and pellet were separately analysed by Western blotting. Under these experimental conditions, recombinant His₆-tagged sblL-1 β was found to be mainly insoluble.

Pelleted cells from 0.5 l induced cultures were suspended in 3 ml of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6M guanidine-HCl, pH=7.8) and stirred for 3 h at room temperature. sblL-1 β protein from clarified supernatants was purified using TALON metal affinity resin and following the manufacturer's purification protocol (CLONTECH).

7. Polyclonal anti-sblL-1 β antibody

Anti-sblL-1 β rabbit polyclonal antibody was obtained using standard procedures (Ausubel et al., 1995). Immunization was performed with 6xHis-tagged sblL-1 β excised from SDS-PAGE gels reversibly stained with Zn-imidazole negative staining (Ortiz et al., 1992). The reactivity of the antiserum to sblL-1 β was checked by Western blotting (see above).

8. Cell culture and treatments

Seabream head-kidney leukocytes obtained as described above were stimulated overnight at 25°C with 0.1-20 μ g/ml LPS, a 1/20 dilution of macrophage-activating factor (MAF) (Mulero and Meseguer, 1998), 50 units of human recombinant tumour necrosis

factor alpha (hrTNF α , Sigma) (Jang et al., 1995a) and/or 25-200 μ g/ml genomic DNA from *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 cells (VaDNA) in sRPMI supplemented with 5% FCS (Gibco), unless otherwise indicated, and 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Biochrom). In some experiments, the cells were then washed twice with sRPMI and re-incubated 0.5-3 hr with 5 mM ATP (Sigma) or 10 μ g/ml PTG-1 (a gift from Dr. C. A. Gabel) in sRPMI supplemented with 0.1% FCS. Where indicated, cells were pretreated for 60 min with 100 μ M of the specific ICE inhibitor YVAD-CHO (Calbiochem) before ATP addition. At the end of the incubation, clarified supernatants were concentrated by precipitation with 20% trichloroacetic acid (TCA, Sigma), and the cells were extensively washed and lysed with boiling SDS-sample loading buffer. Alternatively, clarified supernatants were centrifuged at 100,000 g in a JA30.50 rotor (Beckman Avanti J30i) for 90 min at 4°C in the presence of protease inhibitors (Cocktail P8340, Sigma) to collect microvesicles (Lindemann et al., 2001).

The gilthead seabream fibroblast cell line SAF-1 (Bejar et al., 1997) was purchased from the ECACC (UK) and grown in Leibovitz's L-15 culture medium (Gibco) supplemented with 15% FCS and penicillin/streptomycin at 25°C. Murine J774 macrophages and peritoneal macrophages from BALB/c mice were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin at 37°C.

9. Western blot analysis

Cell extracts, concentrated supernatants and microvesicle fractions were analysed on a 15% SDS-PAGE and transferred for 50 min at 200 mA to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The blots were developed using a 1/1,000 dilution of polyclonal sblL-1 β antiserum or monoclonal 3ZD anti-mouse/human IL-1 β (Biological Resources Branch, NCI) antibody, and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Membranes were then stained with a 0.1% Ponceau solution (Sigma) and/or reprobed with a 1:10,000 dilution of a monoclonal anti- β -actin (A5441, Sigma) to confirm a similar protein loading in all lanes. In some cases membranes were also reprobed with a 1:100 dilution of a goat polyclonal antibody raised against a conserved epitope of cathepsin D from human origin (sc-6486, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

10. Annexin V binding

PS exposure on the extracellular leaflet of the membrane was determined by flow cytometry using a FITC-Annexin V kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Cells were also gated by propidium iodide (PI, Sigma), used in this case as a marker of non-viable, necrotic cells.

11. Protein determination

The protein concentrations of cell lysates, supernatants and microvesicle preparations were estimated by the BCA protein assay reagent (Pierce) using BSA as a standard.

Results

1. Seabream *IL-1 β* cloning and sequencing

Three overlapping products (Fig. 5), which contained the full-length seabream *IL-1 β* cDNA (Fig. 8), were obtained by RT-PCR. The gene consisted of 1271 nucleotides including a 759 bp single reading frame, a 102 bp 5' untranslated region (UTR) and a 410 bp 3' UTR, the last mentioned containing seven cytokine RNA instability motifs (ATTTA) typical of inflammatory cytokine genes, a poly(A)tail and a polyadenylation signal 14 nucleotides upstream of the poly(A)tail (Fig. 8). The translated open reading frame gave the predicted 253 amino acid seabream *IL-1 β* (sbIL-1 β) precursor peptide with a molecular weight of about 29 kDa and two potential N-glycosylation sites. Multiple alignments with others *IL-1 β* sequences (Fig. 10) revealed a high level of conservation within the 12 β -sheets that form the β -trefoil structure, characteristic of all members of the *IL-1* gene family (Nicola, 1994). However, similar to other non-mammalian molecules sequenced to date, the seabream *IL-1 β* precursor lacks the interleukin-1-converting enzyme (ICE or caspase 1) recognition site. This caspase cleaves the mammalian *IL-1 β* precursors in an aspartic acid located between position 113 and 117 to release the mature peptide (Cerretti et al., 1992).

When the homology of seabream *IL-1 β* full length precursor was compared with other known *IL-1 β* sequences, we found the highest amino acid identity and similarity with the *IL-1 β* sequences of other sparids (90% identity with sharpsnout seabream and 88% with common dentex and 96% and 93% similarity, respectively) (Table 7). This closer relationship was also apparent in the phylogenetic tree analysis (Fig. 14), since the seabream *IL-1 β* clustered together with the fish sequences, and distant from mammalian, amphibian and bird *IL-1 β* sequences. Finally, the amino acid sequence was used to obtain a hydrophobicity plot (Fig. 11), which revealed that seabream *IL-1 β* precursor, as do as all known *IL-1 β* molecules, lacks a hydrophobic signal peptide.

2. Seabream *IL-1 β* expression

RT-PCR was used for the detection of *IL-1 β* transcript in different gilthead seabream tissues after challenging fish with *V. anguillarum*. The *IL-1 β* transcript was detected in all the tissues examined (Fig. 15), although expression was clearly weakest in brain and strongest in blood and peritoneal exudate. Interestingly, we found a basal expression of the *IL-1 β* transcript in most of the tissues from non-injected fish. Finally, the *in vitro* studies revealed that the *IL-1 β* transcript was detected in purified head-kidney macrophages after only 20 PCR cycles, whereas it was absent from total head-kidney leukocytes. This was particularly evident after co-stimulation of macrophage samples with LPS and MAF, since a stronger expression was detected at both 20 and 30 PCR cycles (Fig. 16C). β -actin amplifications confirmed similar amounts of cDNA template in all the samples and that the reaction was not saturated at 10 or 20 cycles.

3. sbIL-1 β is intracellularly accumulated by activated leukocytes

A rabbit polyclonal antiserum was generated against purified recombinant 6xHis-tagged sbIL-1 β and used in Western blotting to detect the presence of IL-1 β immunoreactivity in lysates from activated seabream leukocytes (Fig. 26). The antiserum reacted strongly against 6xHis-tagged sbIL-1 β (Fig. 26A) and detected a ~30 kDa polypeptide in cell lysates from LPS-stimulated head-kidney cells, but not in those from resting cells (Fig. 26B). In contrast, pre-immune serum was unable to react with any protein from lysates prepared from either LPS-stimulated or resting head-kidney cells (Fig. 26B). The size of the polypeptide that reacted with the sbIL-1 β antiserum was similar to that expected for the deduced proIL-1 β from the *sbIL-1 β* cDNA sequence. The addition of lymphocyte-derived MAF alone or in combination with LPS also resulted in the production and intracellular accumulation of sbIL-1 β by head-kidney cells, whereas the addition of hrTNF α failed to induce the production of sbIL-1 β and even reversed the effects of LPS and MAF (Fig. 28). Interestingly, the combination of LPS and genomic DNA from the bacterium *Vibrio anguillarum* (VaDNA) was found to act synergistically (Fig. 28A). DNA from salmon testes failed to induce the production of sbIL-1 β by head-kidney cells (Fig. 28A), and DNase I-digested VaDNA was not as effective as the non-digested one (Fig. 28C).

We next examined the kinetics of proIL-1 β accumulation by seabream head-kidney leukocytes following LPS-stimulation (Fig. 29B). Cells incubated for 24 h in medium containing 5% FCS in the absence of LPS resulted in a weak production of proIL-1 β . Nevertheless, the amount of the precursor intracellularly accumulated increased significantly upon LPS addition, peaking at 8 h. The effect of LPS on proIL-1 β accumulation was found to be dose-dependent, with greater increases of proIL-1 β accumulation occurring when LPS dosage was increased to above 5 μ g/ml (Fig. 30A). Similarly, VaDNA also increased pro-IL1 β accumulation in a dose-dependent manner (Fig. 30B).

4. Extracellular ATP does not promote the release of sbIL-1 β by leukocytes

To determine whether extracellular ATP is capable of stimulating sbIL-1 β secretion, a staged assay was used. Cells were stimulated with LPS to initiate proIL-1 β synthesis and then treated with ATP. Unexpectedly, the addition of 5 mM ATP following LPS-priming of seabream head-kidney cells did not promote proIL-1 β post-translational processing and release (Fig. 32A). In sharp contrast, ATP treatment of mouse peritoneal macrophages led to the release of large amounts of the 17kDa IL-1 β mature form and the concomitant disappearance of the cell-associated 31 kDa procytokine species (Fig. 32B).

It has very recently been demonstrated that human monocytes release IL-1 β when microvesicles are shed from the plasma membrane following the addition of ATP (MacKenzie et al., 2001). We therefore examined whether a similar mechanism might operate in fish. LPS/VaDNA-activated head-kidney cell cultures treated with ATP for up to 3 hr in the absence or presence of 5% FCS (Fig. 33) released no significant amounts of sbIL-1 β within the microvesicles. Similarly, PTG-1, an antimicrobial peptide capable of initiating IL-1 β

post-translational processing and release (Perregaux et al., 2002), did not induce measurable quantities of sIL-1 β in microvesicles or in microvesicle-free fractions (Fig 33). These results were further confirmed by examining the cytokine that remained associated to the cells following ATP and PTG-1 treatments (Figs. 33A and B, left panel). We found the amount of the 30 kDa IL-1 β species to be consistently similar for the control, ATP- and PTG-1-treated cells.

5. Extracellular ATP fails to induce PS flip in seabream leukocytes

Annexin V is a high-affinity PS binding protein, which is widely used as a marker of cells destined for, or in the execution phase of, cell death by apoptosis because translocation of PS from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer (PS flip) is a general feature of such apoptotic cells (Majno and Joris, 1995). MacKenzie et al. (2001) have recently shown that human P2X₇ receptor activation with ATP for 2 min resulted in a reversible PS flip associated with the rapid shedding of microvesicles containing mature IL-1 β . We therefore applied FITC-conjugated annexin V to gilthead seabream head-kidney leukocytes that had been incubated for 30 min with ATP and then extensively washed. Unexpectedly, ATP addition (5 mM) did not induce a significant PS flip in head-kidney leukocytes: prior to agonist application, <3% of cells were annexin-positive, while <2% were annexin-positive after being treated for 30 min with ATP (Table 9). Similar results were obtained with the gilthead seabream fibroblast cell line SAF-1, where <1% of cells were annexin-positive both prior to and after ATP application (Table 9). In contrast, a significant increase in PS translocation (6.8% vs 17.4%) was found in murine J774 macrophages after being treated for 30 min with ATP and then washed and stained with FITC-conjugated annexin V (Table 9).

Since this PS flip following ATP application for up to 10 min is completely reversed in human HEK293 cells stably expressing the rat P2X₇ receptor (MacKenzie et al., 2001), we applied FITC-conjugated annexin V in the presence of ATP (15 min incubation with ATP alone followed by a second 15 min incubation after the addition of FITC-conjugated annexin V). While the head-kidney leukocytes were still resistant to ATP, about 20% of SAF-1 cells became annexin-positive under these experimental conditions. These results suggest the presence of a P2X₇ receptor homologue in SAF-1 cells, whose engagement would lead to a fully reversible PS flip within less than 30 min, although this is not the case with head-kidney leukocytes.

6. Extracellular ATP promotes the secretion of a 22 kDa sIL-1 β form by SAF-1 cells

The translocation of PS in SAF-1 cells after extracellular ATP addition, prompted us to examine whether this cell line was able to produce and release IL-1 β . VaDNA, but not LPS or digested VaDNA, stimulated the intracellular accumulation of a 30 kDa sIL-1 β form

(Fig. 34). The addition of ATP to primed cells resulted in a significant reduction of cell-associated sblL-1 β (Fig. 35, left panel) and the concomitant appearance of a 22 kDa polypeptide in the microvesicle fraction that reacted with the sblL-1 β antiserum (Fig. 35, middle panel) and which might, therefore, represent mature sblL-1 β . The microvesicle fractions showed a particular protein pattern that was completely different from those obtained for cell extracts and supernatants: microvesicle fractions were negative for cathepsin D and β -actin when analysed by Western blotting (data not shown). Importantly, the 30 kDa sblL-1 β species was detected in the microvesicle fraction when the cells were pre-treated with the specific ICE inhibitor YVAD-CHO (Fig. 35, middle panel). Finally, as in THP-1 monocytes (MacKenzie et al., 2001), sblL-1 β was never detected in the microvesicle-free supernatants (Fig. 35, right panel).

Discussion

1. Seabream *IL-1 β* sequence

In this study the full *IL-1 β* cDNA sequence from the marine fish gilthead seabream is reported. The molecule shows a high degree of homology with the known fish *IL-1 β* s, especially with the two *IL-1 β* genes cloned from other sparids (common dentex and sharpsnout seabream). Most notably, the phylogenetic tree shows a correlation with the cladogram of the teleosts. The amino acid regions that form the secondary structure of 12 β -sheets, a feature of the β -trefoil cytokine family (Nicola, 1994), were the areas that showed the highest homology. This feature confirms that this seabream molecule, like all other *IL-1 β* molecules, forms part of the β -trefoil family. In common with inflammatory molecules, the seabream sequence has numerous copies of the AUUUA motif in the 3' UTR, suggesting that this mRNA is very unstable and that its expression is tightly regulated.

As all *IL-1 β* s sequenced to date, the seabream *IL-1 β* precursor, lacks a specific hydrophobic signal peptide, suggesting that it is released by damaged cells or is secreted by a mechanism differing from that used for other secretory proteins (Rubartelli et al., 1990). Mammalian *IL-1 β* precursor is cleaved by caspase-1 (ICE) in the Asp-X bond (where X is normally a small hydrophobic residue) to yield a 17 kDa carboxyl terminus-derived mature polypeptide, which is then transported out of the cells, supporting the hypothesis that *IL-1 β* post-translational processing involves a commitment to cell death (Laliberte et al., 1999). However, as other non-mammalian *IL-1 β* sequences (Bird et al., 2002a), seabream *IL-1 β* lacks the caspase 1 recognition sequence. Therefore, the natural *IL-1 β* cleaving site and its releasing mechanism remain undefined in these animals.

2. Seabream *IL-1 β* expression

The role of *IL-1 β* in the fish immune response is critical and its production in different fish tissues depend on the virulence and target tissues of the pathogen. In fact, seabream specimens challenged by *V. anguillarum* show a remarkable variety of tissue-dependent expression changes, as assayed by RT-PCR. The strongest expression was found in peritoneal exudate and peripheral blood cells, which was to be expected since the bacterium was injected intraperitoneally and it is a non-virulent strain unable to leave the peritoneal cavity and colonise other fish organs. However, the inflammatory mediators released in the peritoneal cavity after bacterial injection might enter the blood stream, where they would activate peripheral blood leukocytes. An unexpected result was that the *IL-1 β* transcript was also found in some of the tissues examined from non-injected fish, in contrast with earlier findings in trout, where no basal expression of *IL-1 β* was found (Zou et al., 1999a). In mammals, not only *IL-1 β* gene expression is regulated but also, *IL-1 β* protein synthesis and secretion is regulated in order to reduce the response of this molecule during disease (Dinarello, 1994).

In mammals, IL-1 β is mainly produced by monocytes and macrophages. However, little is known about the cell types able to produce this molecule in fish. In this study, seabream macrophage monolayers showed a much stronger degree of IL-1 β expression than total head kidney cells, suggesting that they are a major source of IL-1 β in fish. Zou et al. (2000b) recently reported that trout IL-1 β expression is up-regulated *in vitro* by LPS stimulation but down-regulated by cortisol treatment. Similarly, IL-1 β expression by seabream macrophages is enhanced upon LPS and/or MAF stimulation. To the best of our knowledge, this is the first demonstration that cytokines produced by activated fish lymphocytes are able to up-regulate IL-1 β production by macrophages, suggesting that lymphokines produced during the course of an infection may regulate the production of this pro-inflammatory molecule *in vivo*.

3. Seabream IL-1 β production

Using a polyclonal antiserum developed against IL-1 β of the marine fish gilthead seabream, we have been able to investigate the production and release of fish IL-1 β . Firstly, we found that IL-1 β is synthesized, but not secreted, by head-kidney leukocytes after stimulation with LPS, bacterial genomic DNA and lymphocyte-derived MAF either alone or in combination. Importantly, LPS and bacterial DNA synergistically produced an increase of IL-1 β intracellular accumulation, suggesting that each ligand would signal through a different PRR. This observation is further supported by the fact that bacterial DNA was able to prime gilthead seabream SAF-1 cells for IL-1 β production, whilst LPS was not able to do so. In mammals, Toll-like receptors (TLRs) represent a newly family of PRR that play a major role in pathogen recognition and the initiation of inflammatory and immune responses (Janeway and Medzhitov, 2002). TLR4 is responsible for the recognition of LPS (Hoshino et al., 1999), while TLR9 recognizes the CpG motif found in microbial DNA (Hemmi et al., 2000). Fish TLRs have not been cloned or characterized to date, but a recent study has used the draft of the pufferfish *Fugu rubripes* genome project to predict that this teleost species contains ten *TLR* genes, and that eight of them are orthologues of human *TLR* genes (Oshiumi et al., 2003). Interestingly, the pufferfish has two *TLR* genes (*TLR21* and *TLR22*) that are unique to the fish, whereas it lacks *TLR4*. Functional studies are needed, however, to elucidate the role played by each TLR in the fish immune response as well as their specificity.

4. Seabream IL-1 β secretion

Earlier studies in mammals have demonstrated that extracellular ATP acting on P2X₇ purinergic receptors promotes IL-1 β post-translational processing and secretion (Cerretti et al., 1992; Andrei et al., 1999; Laliberte et al., 1999). Surprisingly, we found that extracellular ATP failed to promote the post-translational processing and release of proIL-1 β in primed gilthead seabream leukocytes. However, extracellular ATP induced a rapid release

of a mature sIL-1 β form of about 22 kDa from SAF-1 fibroblast cells with a concomitant reduction of the pro-IL-1 β species that remained cell-associated. Furthermore, we demonstrated that the mature sIL-1 β form is present in a particulate fraction that has been previously been shown to contain two types of membrane vesicle: exosomes and microvesicles (Heijnen et al., 1999). Exosomes are derived from the exocytosis of endolysosome-related multivesicular bodies, while microvesicles are generated by surface shedding and are associated with PS exposure (Heijnen et al., 1999). The translocation of PS to the outer leaflet of the cell membrane suggests that sIL-1 β may be released within microvesicles rather than within exosomes. This would be in agreement with previous studies in human THP-1 monocytes (MacKenzie et al., 2001) and platelets (Lindemann et al., 2001), where IL-1 β is released by microvesicle shedding.

The mechanism involved in the cleavage of fish IL-1 β has also been clarified in this study. This is particularly important in view of the fact that all fish, amphibian and bird IL-1 β genes sequences cloned so far lack a conserved ICE recognition site (Bird et al., 2002a). We have demonstrated that the specific ICE inhibitor YVAD-CHO prevents the processing but not the release of sIL-1 β by primed SAF-1 cells, suggesting that fish IL-1 β needs to be post-translationally processed to a 22 kDa polypeptide by an ICE protease before being secreted to play its physiological role. It is tempting to speculate on the relevance of a conserved Asp residue (Asp₆₀ in gilthead seabream) in the cleavage of fish proIL-1 β : this Asp is also found in all known non-mammalian IL-1 β sequences, and cleavage at this position would yield a mature polypeptide with a molecular weight of approximately 22 kDa. On the other hand, the presence of ICE enzymes at this level of phylogeny is not surprising; we have found two sequences of the zebrafish *Danio rerio* (EMBL accession numbers AF233434 and AF327410) and one of the pufferfish (SINFRUT00000075787) that show a high degree of homology to mammalian ICE. However, our attempts to identify a gilthead seabream ICE homologue using a homology cloning approach have been unsuccessful to date.

Precisely why gilthead seabream primary immune cells are unable to respond to extracellular ATP remains to be clarified and will require the molecular cloning of the fish P2X₇ receptor homologue. A BLAST search against the pufferfish genomic database revealed the presence of a predicted transcript (SINFRUT00000054475) that codes for a P2X₇ receptor protein showing 46% identity and 61% similarity to the human P2X₇ receptor. Studies are in progress in our laboratory to clone and characterize the gilthead seabream P2X₇ receptor. This would facilitate expression studies in primary leukocytes and SAF-1 cells, as well as searches for proteins that may interact with it. In mammals, P2X₇ receptor interacts with several proteins to form a receptor signalling complex that may initiate the cytoskeletal rearrangements observed following receptor activation (Kim et al., 2001; Wilson et al., 2002). For example, epithelial membrane proteins (EMPs) interact with the C terminus of the P2X₇ receptor and are able to induce membrane blebbing, PS flip and cell death when overexpressed in HEK293 cells (Wilson et al., 2002). These findings suggest that the interaction of the P2X₇ receptor with EMPs may mediate some aspects of the downstream signalling following P2X₇ receptor activation. Therefore, the inability of extracellular ATP to promote PS flip, cell death, microvesicle shedding and IL-

1 β release in gilthead seabream immune cells may be related to the expression and/or activation of any of the components of the P2X₇ receptor signalling complex.

5. Conclusion

In summary, the cloning of *IL-1 β* from this marine fish has contributed to our understanding of the phylogeny of this cytokine. The expression data provided support the hypothesis that monocytes/macrophages are among the main IL-1 β producing cells in fish after appropriate stimulation with pathogen-derived molecules and lymphocyte-derived cytokines. Our data suggest that fish IL-1 β is intracellularly accumulated following activation and that a second stimulus, such as ATP, is required for post-translational processing by an ICE-like protease and release within microvesicles. However, the inability of extracellular ATP to promote IL-1 β secretion in primary immune cells might also indicate the absence of a functional P2X₇ receptor signalling complex in these cells as well as the involvement of signals other than ATP in the secretion of IL-1 β in fish.

