

9



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS. UNAM

**“CONTRIBUCION DE LA CADENA TCR ϵ
Y EL CO-RECEPTOR CD4
EN LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A :

KAREN ELIZABETH / NAVA CASTRO

ASESORA: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

MEXICO, D.F.,

2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcionado

NOMBRE: Karen Elizabeth
Nava Castro

FECHA: 5 Noviembre 2002

FIRMA: Karen Elizabeth

**“Contribución de la cadena TCR ζ
y el co-receptor CD4
en la activación de los linfocitos T.”**

Karen Elizabeth Nava Castro

Asesora: Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins a larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say.

Agradecimientos

Gracias a mis padres y a mis abuelos, que siempre nos han dado el mejor ejemplo a seguir...

Gracias a Gloria, Eduardo y Socorro, que me han apoyado siempre en este oscuro asunto de hacer ciencia...

A mi tía Ivon por haberme enseñado este camino...

A mi tía Dora por estar siempre conmigo...

Mis queridos amigos:

Mis primos: Javier, Ernesto, Germán, Rubén, Nancy, Daniel, Alpha, Erika, Jorge, Karla, Paola, Carlitos y Fer, Agustín, Brina, Lily y Lulú, Abel y Breneli, Fer y Alejandra, Andrea y Mariana.

Los doce biomédicos de la luz: Paco, Alvaro, Daniel, Luis, David, Héctor, Mary, Naima, Liv, Yayoi y Yuriria.

Los del lab: Pepe, Paula, Horacio, Ramsés, Don Carmelo y Marce.

Las malas influencias: Paula Santoyo y Alejandro.

Los del mi primer laboratorio: Gisela, Arturo, Oswaldo y Alejandro Huerta.

Mis tíos...

Y todos los que faltan y no mencioné...

Hoy termino una etapa de mi vida!

Les incluyo a todos en esta lista con un propósito.

Para decirles que los quiero y lo breve que ha sido este tiempo entre personas tan maravillosas y admirables.

"No conozco a la mitad de ustedes, ni la mitad de lo que yo querría; y lo que yo querría es menos de la mitad de lo que la mitad de ustedes merece..."

No es cierto...lo único que les quiero decir es:

¡Mil gracias a todos por haber estado conmigo durante estos últimos cuatro años de mi existencia!

I, Índice

I.	Índice.....	4
II.	Resumen.....	7
III.	Introducción	
	a. Respuesta inmunológica innata y respuesta inmunológica adaptativa.....	9
	b. Los linfocitos.....	11
	c. El Receptor para el antígeno del Linfocito T (TCR).....	13
	d. El Complejo TCR ζ /CD3.....	18
	e. Moléculas Co-receptoras.....	18
	f. Señalización a través del TCR	
	i. Participación de las cinasas de tirosina Lck/ZAP-70 y fosforilación de las regiones ITAM.....	22
	ii. Proteínas adaptadoras.....	23
	iii. Activación de la vía de las MAP cinasas.....	24
	iv. Liberación de Calcio intracelular.....	24
	v. Rearreglo del citoesqueleto.....	26
	vi. Papel de los microdominios de membrana "lipid rafts" en la señalización a través del TCR.....	27
	g. Desarrollo de los linfocitos T.....	32
	h. Dimerizadores químicos	
	i. La dimerización en la transducción de señales.....	37
	ii. Sistema de Dimerización.....	38
IV.	Justificación.....	44

V.	Hipótesis.....	46
VI.	Objetivos.....	46
VII.	Materiales y Métodos	
	a. Materiales	
	i. Vectores/Clonación.....	47
	ii. Líneas celulares.....	48
	iii. Dimerizadores.....	49
	iv. Anticuerpos.....	49
	b. Métodos	
	i. Transfección de células Jurkat E6-1 y Jurkat Tag.....	50
	ii. Tinción de FACS.....	51
	iii. Ensayos de fosforilación	
	1. Estimulación.....	51
	2. Inmunoprecipitaciones.....	52
	3. Inmunoblots.....	53
	iv. Flujos de Calcio.....	54
	v. Secreción de fosfatasa alcalina (SEAP).....	55
VIII.	Resultados	
	a. Expresión de las quimeras en el hibridoma de T murino By155.18.....	56
	b. Análisis de la fosforilación de las quimeras en el hibridoma de T By155.18.....	58
	c. Análisis del flujo de calcio inducido por el entrecruzamiento de las quimeras en el hibridoma By155.18.....	66
	d. Expresión de las quimeras en la línea de linfocitos T humana Jurkat E6-1.....	68
	e. Análisis de los patrones de fosforilación en la línea Jurkat E6-1.....	71

f.	Análisis del flujo de calcio inducido por el entrecruzamiento de las quimeras en la línea Jurkat E6-1.....	73
g.	Análisis de la activación de factores de transcripción inducida por el entrecruzamiento de las quimeras en la línea Jurkat Tag.....	75
IX.	Discusión.....	82
X.	Conclusiones.....	89
XI.	Bibliografía.....	90

II. Resumen

El linfocito T es capaz de responder a antígenos gracias a la expresión de un receptor llamado TCR ("T cell receptor"). Este receptor está asociado a un conjunto de proteínas capaces de transducir señales conocidas como complejo TCR ζ /CD3. Este complejo está constituido por las cadenas CD3 γ , CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ y un dímero de TCR ζ . La complejidad del módulo TCR ζ /CD3 ha llevado a postular que estas distintas cadenas pudieran tener un papel cuantitativo, amplificando la señal de activación, o bien, un papel cualitativo, permitiendo la discriminación de señales a través de cada una de ellas de forma individual. Los estudios dirigidos a resolver cuál es el papel de las cadenas del complejo, se basaron en la eliminación de las cadenas; y demostraron que el proceso de diferenciación de los linfocitos T se detenía en diferentes puntos dependiendo de la cadena que se eliminaba. Sin embargo los resultados fueron difíciles de interpretar, ya que la eliminación de las cadenas en ocasiones afectaba la expresión o función de otras. Por otro lado, en linfocitos T maduros, los estudios dirigidos a investigar el papel de las cadenas se han basado en la generación de receptores quiméricos conteniendo los dominios citoplasmáticos de cada cadena fusionados a la región extracelular y transmembranal de distintas moléculas. Dichos estudios han generado resultados contradictorios, sobretodo cuando los receptores quiméricos se han expresado en ratones transgénicos donde la capacidad de activación funcional ha variado dependiendo de la quimera estudiada. En conclusión, la contribución individual de cada una de las cadenas a las señales mediadas por el complejo TCR ζ /CD3 es aún una incógnita.

En este trabajo se analizó la contribución exclusiva de la cadena TCR ζ y del co-receptor CD4, en las vías de señalización involucradas en la activación de los linfocitos T. Para imitar la activación de las cadenas, se utilizó un sistema de dimerización que nos permite entrecruzar intracelularmente la cadena TCR ζ y el co-receptor CD4. Se generaron quimeras que contienen

las colas citoplasmáticas de ζ y CD4, unidas a tres copias del ligando para el dimerizador, Las quimeras se expresaron establemente en un hibridoma murino de células T y en líneas tumorales de linfocitos T humanos. La función de las quimeras se analizó mediante el análisis de fosforilación de moléculas que participan en la cascada de señalización del TCR, la elevación de calcio intracitoplásmico y la activación de factores transcripción importantes en la activación de los linfocitos T. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la cadena TCR ζ es capaz de inducir una señal de activación que involucra la fosforilación de esta cadena así como la fosforilación de la cinasa ZAP-70. Así mismo, la cadena TCR ζ es capaz de inducir la liberación de calcio citoplásmico y la activación de factores de transcripción, como NF-AT. Por otro lado, la expresión de la quimera de CD4 individualmente, fue capaz de aumentar los niveles de fosforilación basal de moléculas "cascada abajo" en la señalización iniciada a través del complejo TCR ζ /CD3, como lo son las cinasas Erk-1 y 2 así como de inducir flujo de calcio intracitoplásmico. Cuando se co-expresó la quimera de CD4 con la quimera de TCR ζ se observó un mayor grado de fosforilación en tirosina de la cadena TCR ζ , así como un mayor reclutamiento de la cinasa ZAP-70 fosforilada. Sin embargo, no se observó un incremento en la elevación de calcio obtenida con la quimera de TCR ζ individualmente.

III. Introducción

III.a. Respuesta inmunológica innata y adaptativa.

El sistema inmunológico es un conjunto de mecanismos de defensa en contra microorganismos que pueden ser nocivos para el organismo. La primera respuesta que se genera se conoce como respuesta inmunológica innata. Este tipo de respuesta reconoce patrones moleculares que se encuentran conservados en los microorganismos. A estos patrones se les conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's o "Patogen Associated Molecular Patterns") y son reconocidos específicamente a través de receptores que se encuentran presentes en la superficie de las células del sistema inmunológico. Además de que estos receptores inducen el reclutamiento de otras células del sistema inmunológico, son capaces de inducir la activación de otros mecanismos de eliminación del microorganismo, como la fagocitosis (descrita más adelante).

Además del reconocimiento a través de estos receptores, se han descrito otros mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica innata, entre estos mecanismos se encuentran: 1) el sistema del complemento y 2) la fagocitosis. El sistema del complemento es un conjunto de más de 30 proteínas que se encuentran presentes en la sangre. La activación del sistema del complemento permite la eliminación directa del patógeno o el recubrimiento del mismo y además permite el reclutamiento de otras células del sistema inmunológico que ayudarán a la eliminación de éste. La fagocitosis es el proceso mediante el cual los microorganismos que penetran al organismo son ingeridos por células especializadas, entre los que se encuentran los macrófagos y los neutrófilos. Cuando una célula fagocítica ha internalizado al patógeno, es capaz de secretar citocinas y quimiocinas que actúan sobre otras células del sistema inmunológico y las activan. Entre las citocinas que secretan los macrófagos se encuentran

las interleucinas 1, 6 y 12 (IL-1, IL-6, IL-12), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la quimiocina, interleucina 8 (IL-8) (revisado en (1, 2)). Sin embargo, los mecanismos de inmunidad innata no siempre son suficientes para eliminar al microorganismo, es por eso que se requiere de la participación de un segundo mecanismo de defensa conocido como respuesta inmunológica adaptativa.

La respuesta inmunológica adaptativa es la respuesta que se caracteriza por el reconocimiento específico de antígenos particulares de un patógeno y por ser capaz de reconocer a estos antígenos posteriormente. A esto se le conoce como memoria inmunológica.

Los antígenos se definen como todas aquellas moléculas que puedan ser reconocidas por los receptores de las células de la respuesta inmunológica adaptativa. Estos antígenos pueden ser desde moléculas que son reconocidas por su estructura terciaria, hasta pequeños fragmentos de moléculas que han sido previamente procesados o cortados y que sólo poseen una estructura primaria. El reconocimiento de estos antígenos se lleva a cabo por receptores específicos que se encuentran presentes en la superficie de un grupo de células especializadas conocidas como linfocitos. Existen dos grupos de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B son los encargados de reconocer los antígenos que presentan estructura terciaria, mientras que los linfocitos T son los encargados de reconocer los antígenos previamente procesados, presentados en el contexto del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), por las células presentadoras de antígenos.

III.b. Los linfocitos

Los linfocitos, como se mencionó anteriormente, son las células encargadas de mediar la respuesta inmunológica adaptativa, ya que son capaces de reconocer específicamente a un antígeno y montar una respuesta que permite la eliminación o la neutralización del mismo.

Los linfocitos son células de 6-10 μm de diámetro, con un núcleo denso y muy poco citoplasma, así como con pocos organelos. En individuos sanos, los linfocitos se encuentran en estado de reposo, es decir, no sintetizan DNA y sintetizan cantidades mínimas de RNA y proteínas. Una vez que los linfocitos reconocen al antígeno, las células en reposo entran en un estado de activación. Este estado de activación se caracteriza por el aumento de tamaño de las células, la síntesis de RNA en mayores cantidades que les permite prepararse para la síntesis de DNA y la división celular. Después de algunas divisiones, las células se comienzan a diferenciar en células efectoras. Como se menciona anteriormente, existen dos grupos de linfocitos, los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B son células que secretan anticuerpos y participan en la respuesta humoral contra patógenos extracelulares, mientras que los linfocitos T participan en la respuesta celular contra patógenos intracelulares.

Los linfocitos B son capaces de reconocer antígenos como proteínas intactas o polisacáridos tanto en circulación como en tejidos. Los linfocitos B reconocen a estos antígenos a través de un receptor que se expresa en la superficie del linfocito. Este receptor se conoce como "Receptor de antígenos de las células B" (BCR o "B Cell Receptor"). Este receptor está formado por una forma de la inmunoglobulina anclada a la membrana. Esta molécula se asocia a dos cadenas polipeptídicas capaces de transducir señales. Los linfocitos B maduros expresan dos clases de receptor, una inmunoglobulina IgM y una inmunoglobulina IgD, ambas de superficie. Una vez que los linfocitos B han sido activados secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas

que tienen la misma especificidad que la inmunoglobulina del receptor. Estas inmunoglobulinas son capaces de reconocer moléculas en la superficie del patógeno facilitando la opsonización del mismo o eliminan la acción de las toxinas secretadas por el patógeno inhibiendo la unión con su blanco.

Los linfocitos T maduros se dividen en dos grupos principales: los linfocitos T $\alpha\beta$ y los linfocitos T $\gamma\delta$. Esta clasificación depende de las cadenas que forman su receptor. Además de esta clasificación, los linfocitos T $\alpha\beta$ se subdividen en linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4, dependiendo de la expresión de los co-receptores CD4 o CD8. Los linfocitos T CD8 median la respuesta en contra de patógenos intracelulares y los linfocitos T CD4 actúan principalmente regulando la función de otras células del sistema inmunológico.

Los linfocitos $\gamma\delta$ constituyen menos del 5% de la población total de linfocitos T. El receptor de estas células no reconoce las moléculas clásicas del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Sin embargo algunos de estos linfocitos son capaces de reconocer antígenos no peptídicos -como lipoglicanos derivados de bacterias presentadas por la molécula CD1- y algunos otros pueden reconocer algunas moléculas fosforiladas. Los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden encontrar en las mucosas intestinales, representan aproximadamente el 50% de los linfocitos presentes en la mucosa intestinal del ratón y del pollo y el 10% en el humano. La función de los linfocitos $\gamma\delta$ no ha sido bien caracterizada, sin embargo, dada su ubicación y su especificidad, se ha propuesto que su función es iniciar una respuesta contra microbios en estos sitios mediante el reclutamiento de otras células como son los linfocitos T $\alpha\beta$.

Además, existe un subgrupo de linfocitos T denominados linfocitos T NK1.1. Las células T NK 1.1 son activadas en respuesta a infección por parásitos extracelulares. Los linfocitos T NK 1.1 activados secretan citocinas como IL-4 que promueven la producción de anticuerpos y la

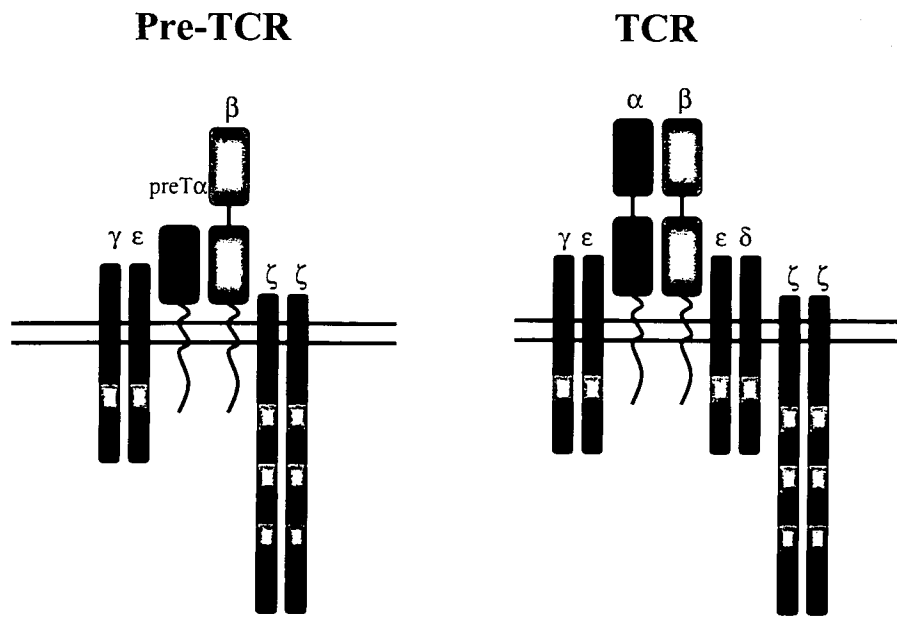
polarización de una respuesta inmunológica humoral. Este subgrupo de linfocitos se caracteriza por la expresión del receptor de las células NK o "natural killer", NK 1.1. También expresan un receptor de linfocito T $\alpha\beta$ y pueden o no expresar el co-receptor CD4. Otra característica de los linfocitos T NK 1.1 es que reconocen a la molécula CD1.

III.c. El receptor para el antígeno del linfocito T (TCR)

Los linfocitos T $\alpha\beta$ reconocen a los antígenos a través de un receptor que se expresa en su membrana. Este receptor es conocido como "Receptor para el antígeno del linfocito T" (TCR, "T cell receptor"). Este receptor es responsable de la interacción específica con los péptidos antigénicos presentados en el contexto de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, "Mayor Histocompatibility Complex"), permitiendo la activación del linfocito y la generación de una respuesta específica contra el antígeno que fue presentado.

Los linfocitos T $\alpha\beta$ expresan dos diferentes receptores dependiendo de la etapa de maduración en el que se encuentren. Durante las primeras etapas del proceso de diferenciación de las células progenitoras a linfocitos T maduros, se expresa una forma inmadura del receptor conocida como pre-TCR. Una vez que los linfocitos han alcanzado su maduración expresan la forma madura del receptor, el TCR. (Figura 1)

La forma madura del receptor, conocida como TCR, está compuesto por un heterodímero de cadenas polimórficas glicosiladas, que pueden ser $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$. Las cadenas del heterodímero están unidas entre sí por un puente disulfuro formado entre dos cisteínas que están ubicadas en las regiones extracelulares proximales a la membrana. Las regiones extracelulares de las cadenas están involucradas en el reconocimiento de los péptidos antigénicos y de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Ambas cadenas contienen una región

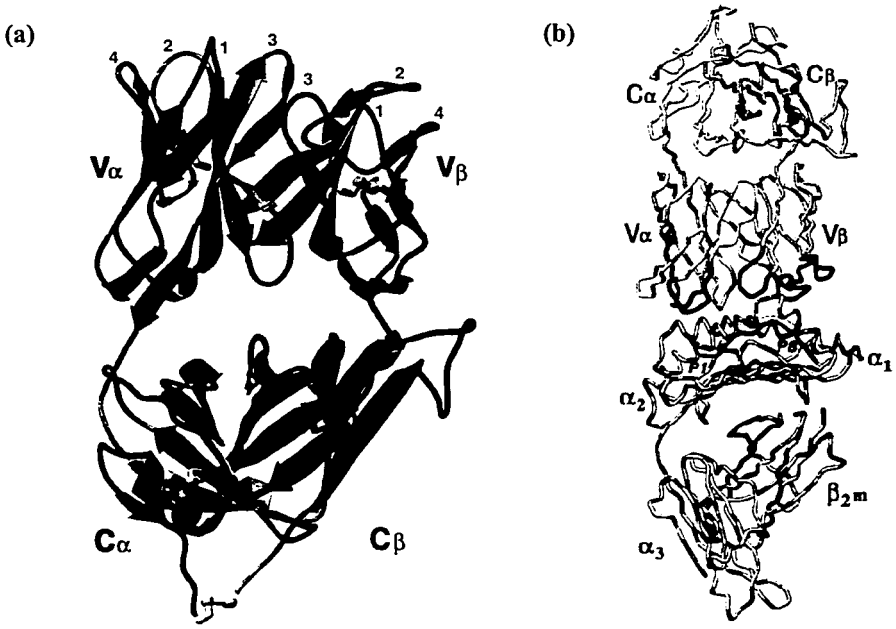


 ITAM

Figura 1. Estructura de los receptores TCR y pre-TCR. El pre-TCR está compuesto por las cadenas preTα y β. Se asocia a un dímero de la cadena TCRζ y las cadenas CD3 ε y γ. El TCR está compuesto por las cadenas α y la cadena β. Se asocia a un dímero de la cadena TCRζ, y los heterodímeros CD3εδ y CD3εγ.

hidrofóbica ubicada en el extremo carboxilo que les permite atravesar una vez la membrana y terminar con un dominio intracelular de aproximadamente 7 a 9 aminoácidos (3). Las cadenas que forman el receptor se generan a partir del rearrreglo somático de los diferentes fragmentos de los genes V, D y J presentes, en el humano, en el cromosoma 14 para la cadena α y en el cromosoma 7 para la cadena β . En el ratón, los genes de la cadena α se encuentran en el cromosoma 14 y los de la cadena β se encuentran en el cromosoma 6. Este rearrreglo de los diferentes fragmentos permite la generación de diversas cadenas con la capacidad de unir diferentes péptidos y diferentes moléculas del MHC. Se sabe que existen regiones de los fragmentos V, D y J que se han conservado, pero también existen regiones con un alto grado de variabilidad. Estas regiones son conocidas como CDR's ("Complementary-Determining Regions"). Cada cadena del TCR contiene 4 regiones CDR (CDR1, 2, 3 y 4). En estudios de análisis cristalográfico, se ha demostrado que las regiones CDR1 y CDR2 de los segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ del TCR hacen contacto con las estructuras de α -hélice de las moléculas de clase I y II que forman el surco en donde se une el péptido. Por otro lado, la región CDR3 es la encargada de hacer el contacto con los aminoácidos expuestos del péptido unido a la molécula del MHC (4). (Figura 2)

La forma inmadura del receptor, el pre-TCR, está formada por una cadena pre-T α y por la cadena β , que posteriormente formará parte del receptor maduro antes descrito. La cadena pre-T α es una proteína transmembranal cuya estructura es similar a las inmunoglobulinas. Esta cadena, a diferencia de la cadena α del receptor maduro, contiene sólo un dominio de inmunoglobulina en su región extracelular. Y al igual que la cadena β , la cadena pre-T α contiene una cisteína cercana a la región transmembranal que forma el puente disulfuro entre esta cadena y la cadena β permitiendo la formación del heterodímero (revisado en (5)).



Modificada de Fundamental Immunology. 4ta. Edición. 1999.

Figura 2. Estructuras del TCR y del Complejo TCR/MHC/péptido. (a) Estructura completa del receptor para el antígeno del Linfocito T. Se muestran las cadenas α y β (morado y azul) y las regiones CDR's marcadas con números. (b) Estructura cristalográfica del complejo TCR/MHC/péptido. Se muestra el péptido en amarillo y los aa de unión con las letras P1-P8. Las regiones CDR se señalan con color.

Se sabe que el pre-TCR, a diferencia del TCR, no requiere de un ligando externo para mediar sus funciones, ya que la expresión de cadenas pre-T α y TCR β que carecen de los dominios extracelulares fue capaz de rescatar el fenotipo de ratones Rag-/- . En estos ratones, el proceso de diferenciación de los linfocitos T se detiene en el estadio de dobles negativos (6, 7) (ver más adelante). La cadena pre-T α contiene la región transmembranal que se encuentra presente en las cadenas TCR α y TCR δ y que se propone está involucrada en la asociación del TCR con el complejo CD3. La cola citoplásmica de la cadena pre-T α está formada por 31 aminoácidos y contiene sitios de fosforilación en serinas y treoninas, así como una región rica en prolina, que pueden funcionar como sitios de unión para dominios SH3. Recientemente se ha demostrado que la cola citoplásmica de la cadena pre-T α tiene un papel en la señalización a través del receptor que hasta ahora no había sido descrito. Inicialmente se pensó que un residuo de cisteína, yuxtapuesto a la membrana, que es potencialmente susceptible de palmitoilación, podría ser importante para el reclutamiento del pre-TCR en microdominios de membrana o "lipid rafts", y por tanto pudiera ser crucial para la señalización a través del pre-TCR. Sin embargo, cuando se generaron ratones transgénicos para mutantes de pre-T α con una sustitución de esta cisteína por alanina, sin la región rica en prolina, o sin la cola citoplásmica completa, se demostró que sólo estos dos últimos, pero no el mutante en la cisteína yuxtapuesta a la membrana, eran capaces de reconstituir el desarrollo tímico de ratones deficientes de la cadena pre-T α (8). La cadena pre-T α es una cadena invariante cuyos genes se encuentran codificados en el cromosoma 6 en el humano y en el cromosoma 17 en el ratón.

III.d. El complejo TCR ζ /CD3

El TCR, para inducir una señal, requiere de la asociación del complejo TCR ζ /CD3 (9, 10). Este complejo está formado por un dímero de la cadena TCR ζ , dos cadenas CD3 ϵ , una cadena CD3 γ y una cadena CD3 δ (11). Las regiones extracelulares de las cadenas γ , δ y ϵ poseen estructuras similares. En estos dominios se encuentran pares de cisteínas que forman puentes disulfuro, tanto intracadena, para generar la estructura similar al dominio de inmunoglobulina, como intermoleculares, que permiten la formación del complejo. En el caso de la cadena TCR ζ , el dominio extracelular consiste de sólo 9 aminoácidos y contiene una cisteína que está involucrada en la formación del dímero $\zeta\zeta$. Todas las cadenas del complejo poseen aminoácidos hidrofóbicos conservados que les permite atravesar la membrana. Los dominios intracelulares de las cadenas constituyen los dominios de "señalización" del TCR. Cada una de las cadenas del complejo contienen regiones consenso de 18 aminoácidos conocidas como ITAM ("Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif"). Estas regiones tienen la secuencia DX₂YX₂L/IX_{7,8}YX₂L/I. La cadena ζ contiene 3 secuencias ITAM y las cadenas γ , δ y ϵ contienen una secuencia ITAM cada una (Figura 1). Las tirosinas presentes en estas secuencias tienen la capacidad de ser fosforiladas. Actualmente se ha descrito que este evento es imprescindible para la activación de los linfocitos T (revisado en (9)).

III. e. Moléculas Co-receptoras

Como se mencionó anteriormente, existen dos clases de linfocitos T efectoras, los linfocitos CD4 "de ayuda" y los linfocitos CD8 "citotóxicos". Estas dos clases se diferencian además de su función, por la expresión en la membrana de los co-receptores CD4 y CD8. Cada co-receptor es capaz de reconocer una región no polimórfica de una clase de moléculas del

Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos que expresan el co-receptor CD4 reconocen al MHC de clase II y los linfocitos que expresan el co-receptor CD8 reconocen al MHC de clase I. En términos generales, los linfocitos que expresan CD4 están involucrados en la respuesta inmunológica contra patógenos extracelulares, mientras que los linfocitos que expresan CD8 participan en la respuesta citotóxica contra patógenos intracelulares (12).

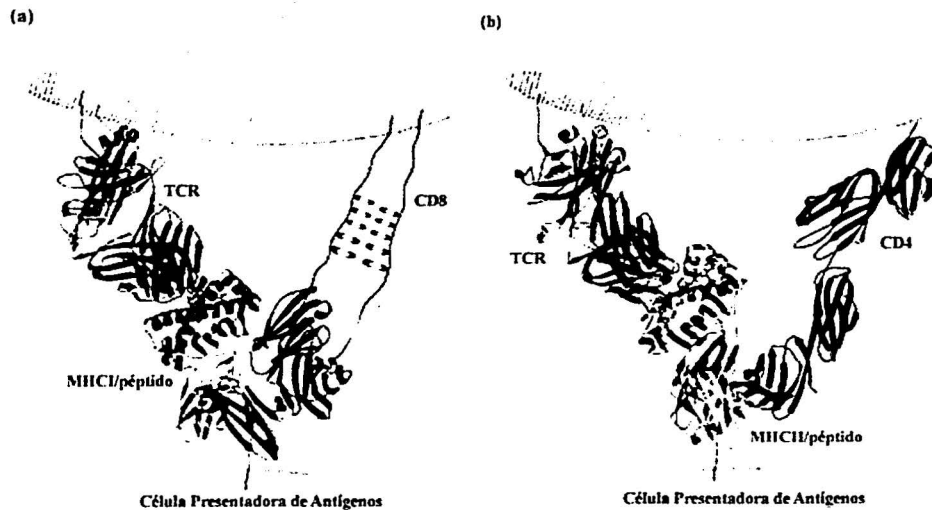
El co-receptor CD8 es un heterodímero formado por las cadenas α y β unidas por un puente disulfuro. Cada cadena contiene un dominio de inmunoglobulina unido a una cadena polipeptídica que permite su anclaje a la membrana. El co-receptor CD8 también puede estar formado por un homodímero de la cadena α . La cadena α interactúa con el dominio α_3 de las moléculas de MHC clase I (13).

El co-receptor CD4 es una molécula de 55 kDa., tanto en el humano como en el ratón, está compuesta por 4 dominios extracelulares homólogos a los de inmunoglobulina (llamados D1 a D4), una región transmembranal y una cola citoplásmica de aproximadamente 40 aminoácidos (14). Los primeros dos dominios forman una estructura de vástago rígida y se unen a otra estructura similar formada por los dominios 3 y 4 a través de una región de bisagra que se encuentra entre los dominios 2 y 3. El análisis de la interacción de CD4 con el MHC en ensayos de unión TCR-independiente, utilizando moléculas de CD4 modificadas por mutagénesis, sugiere que los 2 dominios de la región amino, D1 y D2, interactúan con la región β_2 de la molécula del MHC clase II (revisado en (15)). Con respecto a los dominios proximales a la membrana, se ha observado que el fragmento extracelular de CD4 cristaliza como un dímero que se asocia a través del dominio D4 (16, 17) y la alteración de la interfase entre las dos moléculas inhibe la función de este co-receptor. Por otro lado, las estructuras cristalográficas de moléculas del MHC clase II humanas y murinas sugiere la formación de superdímeros, o dímeros de dímeros, en los

que dos moléculas del MHC clase II se encuentran alineados en una orientación cara a cara. En este superdímero, se propone la formación de un sitio combinado de CD4 por el dominio $\alpha 2$ en un heterodímero con el sitio $\beta 2$ del otro heterodímero. En trabajos en los que se ha alterado la estructura de CD4 en este dominio apoya la idea de que CD4 interactúa con dos moléculas del MHC a través de las regiones $\alpha 2$ y $\beta 2$ en la molécula del MHC (revisado en (18)) (Figura 3).

La interacción entre los co-receptores y las moléculas del MHC es de baja afinidad. Sin embargo, la capacidad de interactuar con las regiones no polimórficas del MHC permite la interacción simultánea del TCR y el co-receptor con la molécula del MHC. Esto permite la formación de un complejo tetramérico con mayor estabilidad (19, 20). Además de estabilizar la interacción entre el TCR y el MHC, los co-receptores contribuyen a la señal del TCR gracias a la unión con la cinasa citoplásmica Lck a través de su cola citoplásmica.

Ambos co-receptores interactúan de manera no-covalente con las cisteínas C^{20} y C^{22} presentes en la región N-terminal de Lck. En el caso de CD4 la interacción se lleva a cabo a través de las cisteínas C^{418} y C^{420} en el CD4 murino y las cisteínas C^{420} y C^{422} en el CD4 humano (21-23). La interacción entre Lck y CD4 es mayor que con CD8 (24). Además, se ha demostrado que estos mismos aminoácidos están implicados en la interacción con la proteína adaptadora LAT, que es imprescindible en la señalización a través del TCR (25). Existe evidencia que sugiere que las diferencias en la interacción de la cinasa con los co-receptores pueden generar diferentes señales y por lo tanto diferentes respuestas (26, 27). Esto podría explicar las diferencias en los procesos de selección así como en la generación de los dos subgrupos de linfocitos T.



Modificada de Gao, G.F., et al. Trends in Immunology. 2002.

Figura 3. Modelo de interacción entre los complejos TCR/MHC/péptido y los co-receptores. (a) Interacción entre moléculas de MHC clase I (verde y amarillo) y el co-receptor CD8, formado por un dímero de la cadena α (rojo y azul) (b) Interacción entre moléculas de MHC clase II (verde y amarillo) y el co-receptor CD4 (azul).

III. f. Señalización a través del TCR

El reconocimiento de los antígenos es un evento crucial para la activación de los linfocitos. La interacción con el antígeno inicia una serie de eventos que convergen en la activación de factores de transcripción que generan diferentes respuestas. En el caso de los timocitos -como se les llama a los linfocitos inmaduros durante el proceso de diferenciación-, la señal puede generar la supervivencia de la célula o puede también iniciar su muerte por un proceso conocido como "apoptosis". En el caso de los linfocitos T maduros, las señales pueden generar la activación y diferenciación a células efectoras o el paso a un estado de "no-respuesta" o "anergia".

i. Participación de las cinasas de tirosina: Lck, ZAP-70 y la fosforilación de las regiones

ITAM

El primer evento que ocurre después de la interacción TCR/MHC/péptido es la activación de las cinasas de tirosina (que añaden fosfatos a tirosinas) de la familia Src (Lck, Fyn, Yes) (28) (29). Estas cinasas contienen en su extremo amino terminal (N-terminal) dominios SH2 y SH3 involucrados en la interacción con otras proteínas y en su extremo carboxilo terminal (C-terminal) un sitio de regulación (30). Este sitio de regulación es una tirosina que se encuentra fosforilada y que, al ser defosforilada por la fosfatasa CD45, permite la activación de la cinasa (31). Una vez que la cinasa es activa, añade fosfatos a las tirosinas presentes en las regiones ITAM de las cadenas TCR ζ (32) y CD3 ϵ , γ y δ (33). Los pares de tirosinas fosforiladas son sitios de anclaje para las cinasas de tirosina de la familia Syk: Syk y ZAP-70 ((34, 35), revisado en (36)). Las cinasas de esta familia contienen dominios SH2 *in tandem* que interaccionan específicamente con los ITAM's bi-fosforilados de las cadenas del complejo TCR ζ /CD3, es

decir, en los que ambas tirosinas han sido fosforiladas (37, 38). La unión de ZAP-70 a los ITAM's bi-fosforilados le permite alinearse con la cinasa Lck y ser fosforilada (32, 39). Se ha observado que la fosforilación de ZAP-70 por Lck aumenta su actividad de manera considerable (40). La actividad de esta cinasa es imprescindible para la señalización a través del TCR, ya que los ratones deficientes de esta cinasa tienen defectos en el proceso de diferenciación de los linfocitos T (41).

ii. Proteínas adaptadoras

La acumulación de proteínas fosforiladas en tirosinas cerca del complejo TCR ζ /CD3 permite el reclutamiento de otras proteínas. A estas proteínas se les conoce como proteínas adaptadoras. Las proteínas adaptadoras se definen como proteínas sin actividad enzimática pero que contienen diferentes dominios de unión para otras proteínas ("protein-binding motifs") (42). La primera proteína que participa en la señalización a través del TCR es la proteína transmembranal LAT. Esta proteína adaptadora contiene 9 sitios de fosforilación en tirosina y es el principal blanco de la cinasa ZAP-70 (43). La fosforilación de estos sitios le confiere la capacidad de unir otras proteínas que contengan dominios SH2, incluyendo tanto adaptadoras como Grb2 y GADS, como otras proteínas con función enzimática, como la fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1), ITK y la PI3K (43) (44). La asociación de GADS con LAT, a través de un dominio SH3 presente en GADS, permite reclutar a otra proteína adaptadora llamada SLP-76 (42). SLP-76 es entonces fosforilada en dos sitios por ZAP-70 (43) y es capaz de interactuar, a su vez, con otras proteínas como Nck y Vav (45). El reclutamiento de estas proteínas tiene como finalidad iniciar respuestas funcionales como: la activación de la vía de las MAP cinasas (MAPK), el flujo de calcio y el rearrreglo del citoesqueleto.

iii. Activación de la vía de las MAP cinasas

La vía de las MAP cinasas es un grupo de vías de señalización que se caracterizan por la fosforilación sucesiva de cinasas con actividad dual, que pueden actuar sobre tirosinas o serinas y treoninas; o cinasas que actúan sólo en serinas y treoninas. Esta vía está formada por una cinasa activada por mitógenos ("MAPK" o "mitogen-activated protein kinase"), una cinasa que fosforila a la MAPK en tirosinas y treoninas (MAPKK); y una cinasa que fosforila y activa, a su vez, a la MAPKK en serinas (MAPKKK). Esta vía se activa gracias al reclutamiento del factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GTP/GDP), Sos, por la proteína Grb2, con la cual se asocia de manera constitutiva. Cuando Sos es reclutada a la membrana, es capaz de activar a Ras. Ras, en estado de reposo, está asociada a GDP, cuando es activada se añade un fosfato al GDP y se convierte en GTP. Ras-GTP es capaz de interactuar con la cinasa Raf-1, la MAPKKK. La localización de Raf-1 a la membrana aumenta su actividad de cinasa y es entonces capaz de actuar sobre sus blancos Mek-1 y Mek-2, las MAPKK. Estas cinasas fosforilan a su vez, a Erk-1 y Erk-2, las MAPK y permiten que se transloquen al núcleo y fosforilen algunos factores de transcripción como Fos y Jun, que forman el complejo AP-1, entre otros. (revisado en (46-48))

iv. Flujo de calcio

El flujo de calcio es también un evento necesario para activar o inducir la maduración de los linfocitos T. Este evento ocurre gracias a la activación de la Fosfolipasa C γ -1 (PLC γ 1). Como se menciona anteriormente, la PLC γ 1 es reclutada a la membrana gracias a la interacción con la proteína adaptadora LAT y entonces puede ser fosforilada en tirosina y activada por las cinasas Lck, ZAP-70 y las cinasas de la familia Tec: Itk y Rlk (49-51). La PLC γ 1 es una proteína que

hidroliza el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂) que se encuentra en la membrana, en fosfatidil inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). El IP₃ induce la liberación de calcio en dos fases. La primera elevación de calcio se debe a la salida de calcio de las pozas intracelulares por la interacción del IP₃ con sus receptores (IP₃R-1, 2 y 3) presentes en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esta primera liberación de calcio eleva la concentración de calcio de 100 nM a 500 nM. La segunda elevación de calcio se genera por la apertura de los canales presentes en la membrana plasmática, en los linfocitos se conocen como canales CRAC (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel), sin embargo, los mecanismos que participan en esta segunda fase no han sido claramente determinados. El calcio liberado al citoplasma del linfocito activa algunas enzimas dependientes de calcio como la fosfatasa de serinas/treoninas, Calcineurina. Esta fosfatasa actúa sobre el factor de transcripción NF-AT (52). La función de la fosfatasa es defosforilar NF-AT para permitir su translocación al núcleo. Existen otras vías que activan factores de transcripción dependiendo de los niveles intracelulares de calcio, tales como la vía mediada por NF-κB y JNK (c-Jun terminal kinase) (53) (revisado en (54)).

Por otro lado, el Diacil glicerol (DAG) recluta a la membrana a la cinasa de serina/treonina, PKCθ (Protein kinase Cθ), en donde es activada por la cinasa Lck. Se ha demostrado que PKCθ posee un papel importante en la activación del linfocito T ya que la inhibición de la actividad de esta cinasa bloquea este evento (55) y la sobreexpresión de esta proteína aumenta aproximadamente 6 veces la producción de IL-2 después de la estimulación con anti-CD3 y PMA (phorbol myristate acetate) (56). PKCθ está involucrada en la activación del complejo de transcripción AP-1 (Fos-Jun) a través de la activación de la MAPK cinasa Erk-1 que a su vez activa a la cinasa JNK (c-Jun N-terminal kinase) (57). La cinasa JNK fosforila dos

serinas que se encuentran en el dominio de activación de c-Jun (58). Se ha descrito también que la cinasa PKC θ es capaz de interactuar con la cinasa IKK ϵ e inducir la activación del factor de transcripción NF- κ B (59).

v. Rearreglo del citoesqueleto

Finalmente, el rearreglo del citoesqueleto es también necesario para la activación de los linfocitos, ya que permite formar una unión estable entre el linfocito T y la célula presentadora de antígenos, que muestra el antígeno a través de la molécula del MHC. Esta unión estable entre las células se lleva a cabo en diferentes etapas: la primera implica la interacción estable entre el TCR y el MHC. La segunda implica que el linfocito adquiera una forma redonda. Finalmente, la tercera etapa implica que el linfocito interactúe, a través de una mayor área de contacto, con la célula presentadora (60), formando lo que se ha llamado la Sinapsis Inmunológica (61, 62). La formación de la sinapsis inmunológica implica inicialmente señales a través de diferentes receptores presentes en la superficie de la célula, como CD28, CD2 y la integrina LFA-1 y posteriormente, señales a través del TCR. Se ha propuesto que la molécula adaptadora SLP-76 fosforilada es capaz de interactuar con la proteína Vav-1 y la adaptadora Nck. Nck, a su vez, es capaz de interactuar con la cinasa Pak (p21-activated kinase). La formación del complejo SLP-76/Vav-1/Pak facilita el acercamiento de GTPasas de la familia de Rho con la cinasa Pak (63, 64). Existen diversos trabajos en donde se describe el papel de esta familia de GTPasas, así como de Pak en la movilización del citoesqueleto (65-68) (revisado en (69)).

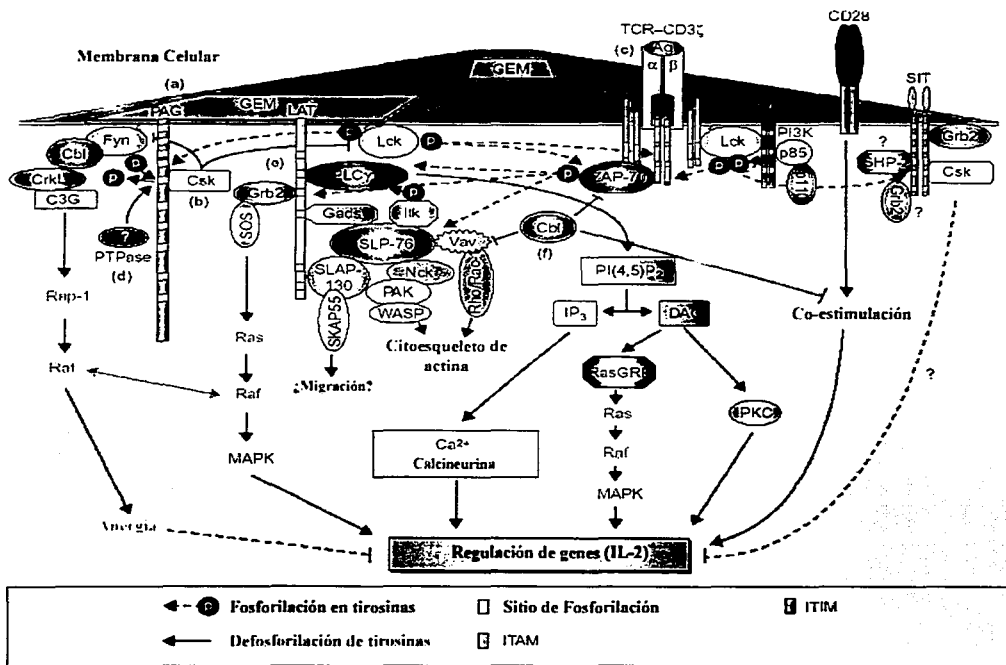
La activación de factores de transcripción como NF-AT, NF- κ B y el complejo AP-1 a través de la vía de las MAP cinasas, la liberación de calcio y la activación de la cinasa PKC θ

permite la expresión de los genes que están involucrados tanto en la activación como en la maduración de los linfocitos T (Figura 4).

III. g. Papel de los microdominios de membrana "lipid rafts" en la señalización a través del TCR.

La modulación de las señales inducidas por el TCR es esencial para la regulación de la respuesta en contra del antígeno. Esta modulación depende de la compartimentalización de las moléculas que participan en las señales inducidas por el TCR en diferentes regiones de la membrana. Actualmente se ha descrito que la membrana plasmática no es homogénea (70), sino que por el contrario, está formada por diversos microdominios que podrían semejar a pequeñas islas que flotan en la superficie de la célula. A estos dominios se les ha llamado "microdominios de membrana" o "lipid rafts" y fueron identificados por su insolubilidad a detergentes no iónicos como el Tritón X-100 a bajas temperaturas. Estos dominios que se caracterizan por ser ricos en colesterol, glicerosfolípidos, esfingolípidos y en proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), poseen diferentes características biofísicas que les permiten ensamblarse en estas estructuras. Dado que estas estructuras reclutan moléculas diferencialmente, se ha propuesto que los microdominios pueden funcionar como "plataformas de señalización".

En el caso del reconocimiento antigénico, cuando un linfocito hace contacto con la célula presentadora, se forma una estructura llamada "sinapsis inmunológica" (IS o "Immunological Synapse"). La sinapsis inmunológica es una estructura dinámica que cuando llega a su estado "maduro" se caracteriza por la localización ordenada de distintas moléculas en la superficie de contacto entre el linfocito T y la APC. La sinapsis inmunológica consta de un núcleo central que contiene el TCR interaccionando con el MHC/péptido, junto con moléculas importantes en la señalización (CD4, ZAP-70, PCK θ , entre otras). A esta región se le ha llamado "cSMAC"

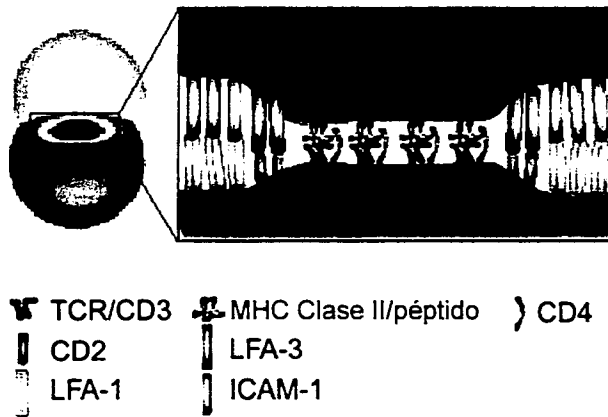


Modificada de Leo, A., et al. *Curr. Opin. Immunol.* 2001.

Figura 4. Señalización a través del TCR. La interacción entre el TCR con el MHC/péptido induce la activación de tres vías principales: la vía de las MAP cinasas, la liberación de calcio intracelular y el rearreglo del citoesqueleto. Estas vías convergen en la transcripción de genes como el de la citocina IL-2, importante en la proliferación de los linfocitos T.

("central supramolecular activation cluster"). Además de las moléculas de señalización, contiene moléculas de adhesión como CD2, ubicada principalmente en la periferia de esta estructura. Esta estructura está rodeada por un anillo periférico llamado "pSMAC" ("peripheral supramolecular activation cluster") que permitirá estabilizar el contacto entre las dos células y en el que se encuentran principalmente moléculas de adhesión como la integrina LFA-1 (Figura 5). Para que se forme esta estructura ordenada se requiere de una primera interacción entre las moléculas de adhesión cuya característica es que son moléculas de gran tamaño. Esto permite el acercamiento de las dos células de manera inespecífica y anterior al reconocimiento del péptido por parte del MHC y posteriormente se da la interacción entre varias moléculas de TCR con las del complejo MHC/péptido en la célula presentadora de antígenos. En esta etapa de la formación de la sinapsis ocurre un movimiento lateral de moléculas desde dentro de la sinapsis hacia fuera y viceversa, de manera que las moléculas de adhesión se excluyen de la zona de contacto central permitiendo el reclutamiento del TCR así como de los co-receptores y del resto de las moléculas involucradas en la señalización en la región central. Este reclutamiento depende generalmente de su capacidad para asociarse a los microdominios de membrana. (revisado en (71-73))

Se ha descrito que en células T hay diversas moléculas que son capaces de reclutarse a los microdominios gracias a la adición post-traducciona l de algunos lípidos. Por ejemplo, la palmitoilación, miristilación o farnecilación permiten este reclutamiento a los microdominios. Por otra parte, el tamaño de las moléculas así como las características de sus dominios transmembranales son también factores importantes para el reclutamiento o la exclusión a los microdominios. Entre las moléculas que se reclutan constitutivamente a los microdominios de membrana se encuentran las cinasas de la familia Src, Lck y Fyn. Se ha descrito que estas cinasas se reclutan a los microdominios gracias a que contienen dos sitios de acetilación en el dominio amino-terminal. La delección de estos sitios impide su co-localización a los microdominios y su



Modificada de Davis, D., et al. Trends in Immunology. 2002.

Figura 5. Estructura de la Sinapsis Inmunológica. La sinápsis inmunológica está formada por dos regiones principales: la región central (cSMAC) y la región periférica (pSMAC). En la región central se encuentran los complejos TCR/MHC/péptido, así como otras moléculas señalizadoras como ZAP-70, PKC, Lck y los co-receptores, entre otras. Esta estructura central es estabilizada por la región periférica (anillo periférico), que contiene principalmente moléculas de adhesión como LFA-1.

capacidad de señalar de manera adecuada. Otra molécula imprescindible para la señalización a través del TCR es la molécula adaptadora LAT. Esta adaptadora se encuentra constitutivamente asociada a los microdominios por un sitio de palmitoilación. Las mutantes que carecen de estos sitios no son capaces de ser fosforiladas por la cinasa ZAP-70 y por lo tanto, no son capaces de inducir señales. Las cadenas del complejo TCR ζ /CD3 se excluyen o se asocian débilmente a los microdominios en condiciones basales. Sin embargo, cuando ocurre la interacción del TCR con el MHC, este complejo, ya fosforilado, se localiza en los microdominios en donde pueden interactuar con la cinasa ZAP-70 e iniciar la cascada de señalización involucrada en la activación.

Existen otras moléculas que se encuentran involucradas en la regulación de las señales del TCR. Entre estas moléculas se encuentra la fosfatasa CD45. Esta fosfatasa está involucrada en la activación de la cinasa Lck pero de igual manera podría ser capaz de defosforilar las cadenas del complejo TCR/CD3. Por esta razón, CD45 es inicialmente reclutada a los microdominios con la finalidad de activar a Lck pero posteriormente, es excluida de éstos. En este caso, se ha propuesto que la exclusión de la fosfatasa CD45 se debe a que su dominio transmembranal es más corto que los presentes en las moléculas residentes de los microdominios (como CD2, CD4 y CD8) y no son capaces de atravesar la membrana en los microdominios, ya que se supone que estas regiones son más anchas que el resto de la membrana.

Otras moléculas se reclutan a los microdominios como consecuencia de la interacción TCR/MHC, entre estas proteínas se encuentran ZAP-70, PKC, PLC γ -1, la molécula adaptadora SLP-76, etc. (revisado en (74))(Ver Tabla 1) El reclutamiento de estas moléculas permite concentrar las proteínas necesarias para inducir las diferentes señales que requiere la célula para activarse. De hecho, se ha propuesto que dependiendo del reclutamiento de unas proteínas u otras

a la región de la sinapsis se pueden modular las señales y por lo tanto, modificar las respuestas de la célula. Si embargo, esta hipótesis es aún un tema de controversia.


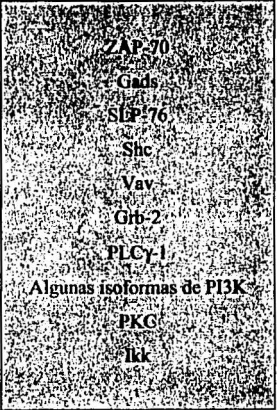
Incluidas constitutivamente	Excluidas durante la interacción TCR MHC	Reclutadas durante la interacción TCR MHC
	<p>CD45</p>	

Tabla 1. Componentes de la cascada de señalización del TCR presentes el microdominios de membrana en células en reposo o activadas(74).

III. h. Desarrollo de los linfocitos T

Los progenitores de los linfocitos T se generan durante el desarrollo fetal en el hígado y después del nacimiento, en la médula ósea. En el ratón, estos progenitores salen en grupos desde hígado hacia el timo a partir del día 11 de gestación. El primer grupo de células progenitoras llega al timo antes del día 13 de gestación. Estas células generarán el repertorio de células

maduras durante el período de gestación y durante la primera semana después del nacimiento. El segundo grupo de células llega al timo después del día 13 de gestación. Estas células generarán el repertorio de células maduras aproximadamente en el día 7 después del nacimiento. Una vez en el timo, los linfocitos inmaduros o timocitos migran desde la corteza del timo hasta la zona medular. Durante este recorrido, los timocitos reciben señales que inducen su diferenciación desde células progenitoras hasta linfocitos T "naïve".

El proceso de maduración se divide en diferentes estadios dependiendo de la expresión en superficie de diferentes moléculas, CD25, CD44 y los co-receptores CD4 y CD8. De acuerdo a la expresión de las moléculas co-receptoras, el proceso de maduración se divide en tres estadios: el estadio de dobles negativos (DN, double negative, CD4⁻CD8⁻), en el que no expresan co-receptores; el estadio de dobles positivos (DP, double positive, CD4⁺CD8⁺), en el que se expresan ambos; y el estadio de positivos sencillos (SP, single positive, CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺), en el que la célula regula negativamente la expresión de uno de los co-receptores. (Figura 6)

Durante el estadio de dobles negativos (DN) se lleva a cabo el rearreglo genético de la cadena β del TCR. En este momento se expresa en la superficie un receptor inmaduro formado por la cadena β rearreglada y una cadena α inmadura, pre-T α (5). La señal de este receptor inmaduro detiene el rearreglo de la cadena β (selección β) e induce el inicio del rearreglo de la cadena α y la expresión de ambos co-receptores en la superficie. En este momento los timocitos pasan al estadio de dobles positivos (DP). Durante este estadio, los timocitos expresan un receptor maduro y sufren dos procesos de selección; la "selección positiva", que elige los timocitos que expresan receptores con especificidades potencialmente útiles, es decir, que reconocen a un péptido propio asociado a moléculas del MHC con una avidéz intermedia ((75) y revisado en (76, 77)); y "la selección negativa" o "delección clonal", que induce la muerte por

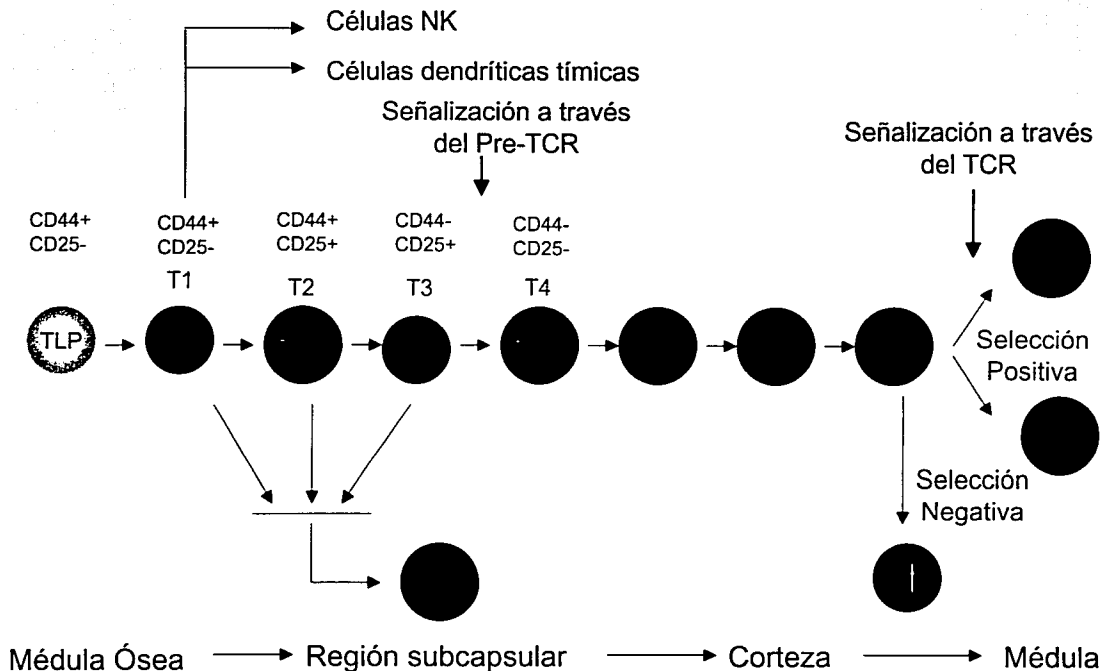


Figura 6. Estadios de diferenciación de linfocitos T. El proceso de diferenciación se divide en tres etapas caacterizadas por la expresión de los co-receptores: el estadio de Dobles Negativos (naranja), el estadio de Dobles positivos (rojo) y el estadio de Positivos Sencillos (morado y azul). Los linfocitos se seleccionan por dos eventos: la selección positiva, que selecciona los TCR que reconocen el antígeno con afinidad intermedia; y la selección negativa, que elimina los TCR que reconocen el antígeno con afinidad alta, los cuales pueden ser linfocitos autoreactivos.

apoptosis de aquellos timocitos cuyo TCR tiene una alta avidéz por péptidos propios expresados por las células del estroma (timocitos que pueden ser autoreactivos) (78). Al mismo tiempo que se seleccionan positivamente, se lleva a cabo la elección del co-receptor, que determinará el fenotipo de linfocito: CD4 "ayudador" versus el fenotipo CD8 "citotóxico" (revisado en (76, 79-81)).

La elección de co-receptor es uno de los procesos de selección que no han sido explicados todavía. Se ha propuesto que los co-receptores juegan un papel importante durante este proceso. Se han descrito diferentes modelos para explicar la elección de los co-receptores. Estos modelos proponen diferentes mecanismos por los cuales se induce la elección de linaje. Sin embargo, las moléculas que participan en la elección son las mismas, el TCR, el co-receptor y el MHC/péptido se encuentran presentes en todos los modelos, mientras que la participación de otras moléculas, como Notch, se han descrito sólo para algunos modelos (82). Entre los modelos descritos se encuentran: el modelo instructivo, el modelo estocástico y el modelo de intensidad de señal. El modelo instructivo se basa en la especificidad de la interacción de CD4 con moléculas del MHC clase II y de CD8 con moléculas del MHC clase I cuando el receptor reconoce a un péptido propio presentado por las moléculas de MHC de las células del estroma tímico. Este modelo propone que el co-receptor CD4, al interactuar con una molécula MHC clase II, induce la regulación negativa de la expresión de CD8. De manera similar, el co-receptor CD8, al reconocer un MHC clase I, induce la regulación negativa de la expresión de CD4. En este modelo se asume que el timocito es "instruido" hacia un linaje determinado por la interacción del co-receptor con el MHC correspondiente.

Por otro lado, el modelo estocástico propone que existe una regulación negativa de la expresión de uno de los dos co-receptores inicial y "al azar", sin que se requiera la interacción a través del TCR. Por ejemplo, si un timocito regula negativamente CD8 y mantiene el co-receptor

CD4 y posteriormente interacciona con un péptido/MHC clase II con baja afinidad, entonces se induce la supervivencia de la célula. En cambio, si el timocito tiene un TCR específico para péptido/MHC de clase I no recibirá una señal adecuada y no será rescatado de la muerte celular programada (muerte por "negligencia") (83).

Finalmente, el modelo de intensidad de señal se basa en la "cantidad de señal" que la célula recibe como consecuencia de la señalización a través del TCR. Este modelo propone que la señal puede estar dada por la participación de los co-receptores particularmente, ya que la expresión de una quimera que contiene el extremo extracelular y transmembranal de CD8 y la cola citoplasmática de CD4, genera que las células se diferencien en linfocitos con fenotipo de CD4 ayudadoras pero que respondían por MHC clase I (26, 84). En la actualidad hay gran evidencia de que la diferenciación hacia los linajes de CD4 o CD8 requieren la participación de vías de señalización diferentes (revisado en (85, 86)). Uno de los modelos que podrían explicar la diferencia entre la señal requerida para la diferenciación de CD4 y no de CD8, se basa en el balance relativo de la señal generada por el TCR. En este contexto, se ha demostrado la cinasa Lck juega un papel importante en la elección del co-receptor y esto puede ser debido a que existe una mayor afinidad de Lck por CD4 que por CD8 (85). Por ejemplo, si se expresa una mutante activa de Lck se dirige la diferenciación a linaje CD4 y si se expresa una mutante inactiva, se dirige la diferenciación a linaje CD8 (87). De igual manera, se ha demostrado que la MAP cinasa, Erk, juega un papel importante en la diferenciación. El uso de mutantes e inhibidores de las moléculas cascada arriba de la MAP cinasa Erk (cinasa de MAP cinasa y Mek) (88), demuestran que la activación de esta cascada de señalización dirige la diferenciación a células CD4 SP. En este mismo trabajo, se describe que el uso de estos inhibidores no elimina la diferenciación de los linfocitos CD8 SP.

Por otro lado, se ha descrito que Notch, inicialmente descrito como receptor transmembranal cuya activación participa en la elección de linaje celular en *Drosophila* sp. (89), está involucrado en la diferenciación de los linfocitos T en el timo. Se ha descrito que Notch participa en la elección de linaje T vs. B, $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ y en CD4 vs CD8 (revisado en (90)). Se ha demostrado que Notch posee un papel importante en la elección de linaje CD4 vs CD8, ya que mutantes activada de Notch dirigen a CD8 SP (91). Estudios recientes han demostrado que la señal de Notch actúa sobre el silenciador de CD4 (92, 93). Sin embargo aún existe controversia sobre el papel real de Notch en los procesos de selección tímica así como en la elección de linaje.

III. i. Dimerizadores químicos

III. i. i. La dimerización en la transducción de señales

Las interacciones específicas entre proteínas son esenciales para la mayoría de los procesos biológicos. Un tipo de interacción entre proteínas es la dimerización, esto es, la formación de un complejo formado por dos proteínas relacionadas.

La dimerización es un evento común en la transducción de señales, ya que permite regular, a través de diferentes mecanismos, la interacción entre las proteínas involucradas en la generación de estas señales. La dimerización permite orientar y acercar a las proteínas. Un ejemplo de ello es el que presenta el receptor de TGF- β . En este caso, el acercamiento de dos receptores permite la trans-fosforilación de las cadenas citoplásmicas de cada uno de ellos (94). Otra ventaja de la dimerización es que se pueden reclutar dos proteínas con funciones diferentes. En este caso la interacción de dos proteínas puede generar un complejo con función negativa, mientras que si una de esas proteínas interacciona con otra, la función del complejo pueda ser

positiva. En muchos casos se ha observado también que la formación de dímeros aumenta la afinidad del complejo por su ligando, por ejemplo el heterodímero Fos-Jun (95).

Los receptores de los linfocitos B y T (BCR y TCR), son complejos multiproteicos que contienen tanto dominios de unión al antígeno, como subunidades con capacidad para transducir señales. En el caso del receptor del linfocito T, las cadenas α y β son las encargadas de reconocer al antígeno, mientras que las cadenas asociadas que forman el complejo CD3 y la cadena del TCR ζ se encargan de iniciar la señal. Los estudios realizados con estas cadenas están basados en el diseño de moléculas quiméricas que contienen los dominios extracelulares de otras proteínas y las colas citoplásmicas de las cadenas del complejo. En estos estudios, el entrecruzamiento de las moléculas quiméricas es capaz de inducir tanto señales tempranas como tardías, demostrando que estas cadenas son las encargadas de iniciar la señal y que era necesaria la oligomerización de estas cadenas (96, 97). Más tarde, se demostró que era necesaria la oligomerización y no la dimerización de la cadena del TCR ζ para inducir una señal (98, 99). En otros estudios se demostró que los complejos de TCR/MHC/péptido forman oligómeros en solución (100). Este efecto es específico, ya que sólo se observa cuando se presenta el péptido correcto. La oligomerización dependiente del péptido observada en estos estudios sugiere que diferentes péptidos pueden inducir diferentes grados de oligomerización y esto, repercutir en la intensidad de señal que reciba el linfocito.

III. i. ii. Sistema de dimerización

Ya que la dimerización y oligomerización de proteínas son eventos usuales en la biología de las células, se han diseñado sistemas que sean capaces de inducir la dimerización de estas proteínas. Estos métodos están basados en el uso de moléculas orgánicas de bajo peso molecular

capaces de permear la membrana e interactuar con dos ligandos al mismo tiempo e inducir su dimerización. A estas moléculas se les conoce como "inductores químicos de dimerización" (chemical inducers of dimerization, CIDs). Estos inductores constan de dos dominios que reconocen específicamente dominios que han sido fusionados a las proteínas de interés.

El primer dimerizador, el FK1012-H2, se generó a partir de la droga inmunosupresora FK506. El efecto inmunosupresor de esta droga sobre la actividad de los linfocitos T, depende de su interacción con la proteína chaperona FKBP-12 ("FK506 binding protein 12"). Una vez que la droga se une a la chaperona FKBP-12, es capaz de interactuar e inhibir a la fosfatasa calcineurina. Esta fosfatasa está involucrada en la activación del factor de transcripción NF-AT, de manera que si este factor no es defosforilado, no puede translocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción. Como consecuencia, no se completa la señal de activación y por lo tanto se inhibe la respuesta del linfocito T.

El dimerizador FK1012 se generó al unir dos moléculas de FK506 a través del sitio de unión a calcineurina. Este dímero contiene los dos dominios de unión con el ligando, el FKBP-12, pero, puesto que carece de los dominios que interactúan con la calcineurina, este dimerizador no interfiere con la actividad celular (Figura 7).

Los dimerizadores o moléculas inductoras de la dimerización se utilizaron por primera vez para entrecruzar la cadena del TCR ζ . En este trabajo se diseñó una quimera que contenía la cola citoplasmática de la cadena ζ y un módulo de unión de la molécula inductora de dimerización. Esta quimera estaba anclada a la membrana por un dominio de miristilación. En este estudio, el tratamiento con el dimerizador FK1012-H2 generaba la activación de un gen reportero dependiente del TCR (Figura 8) (98).

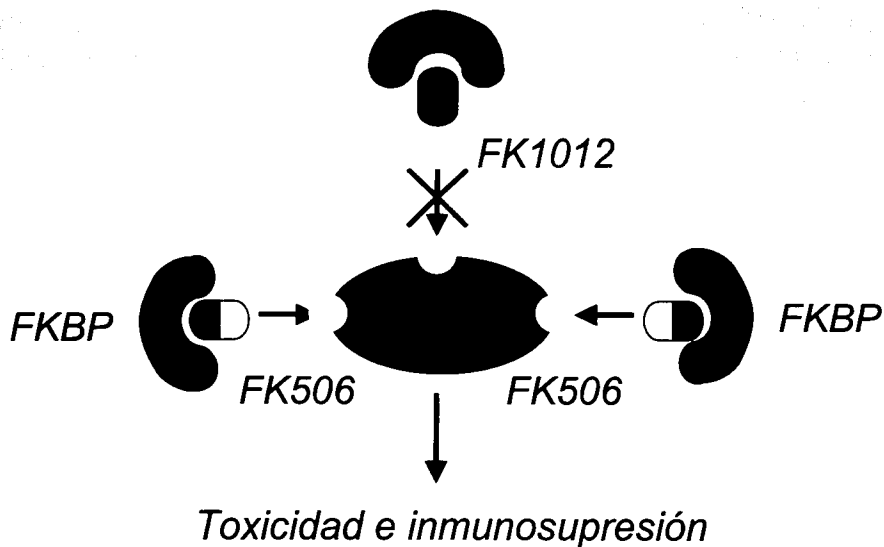


Figura 7. Efecto de la droga inmunosupresora FK506 vs. el dimerizador FK1012. La droga inmunosupresora FK506 se une a la inmunofilina FKBP-12 presente en la célula. La interacción entre estas dos proteínas permite la unión e inactivación de la fosfatasa Calcineurina. Esto inhibe la activación del factor de transcripción NF-AT. El dímero de la droga inmunosupresora FK506, llamado FK1012, no es capaz de interactuar con la fosfatasa. El dimerizador conserva los dominios de unión al FKBP-12 pero carece de los sitios de unión a la Calcineurina.

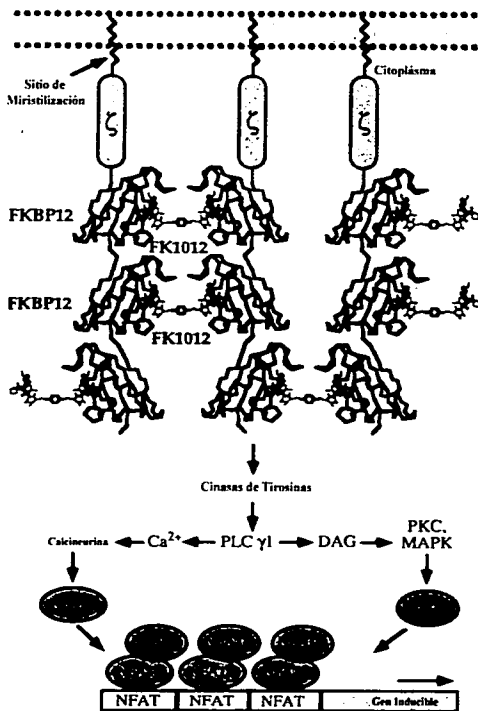
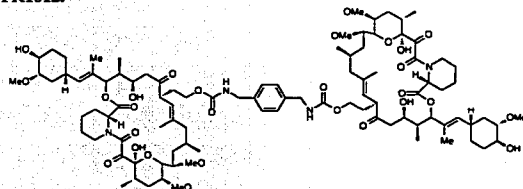


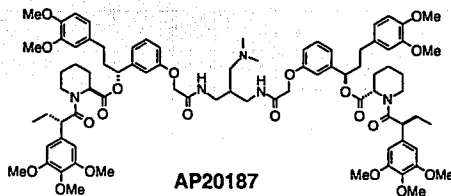
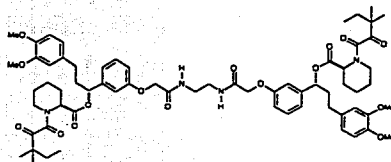
Figura 8. Activación de la cadena TCRζ por el entrecruzamiento intracelular a través de dimerizadores químicos. Spencer, et. al. (98), diseñaron un modelo de activación de la cadena TCRζ por medio del entrecruzamiento con dimerizadores químicos. En este trabajo se generó una quimera que contiene el dominio citoplásmico de la cadena TCRζ unida a tres copias del ligando para el dimerizador FK1012. En este trabajo se demostró que el entrecruzamiento exclusivo de esta cadena es suficiente para inducir la activación de factores de transcripción como NF-AT.

Actualmente se han desarrollado variantes sintéticas del dimerizador FK1012. Se diseñaron nuevos dimerizadores, entre ellos, nuevas variantes como el FK1012-H2, y los dimerizadores sintéticos AP1510 y AP20187. Estos últimos dimerizadores se generaron a partir de la estructura del FK1012-H2. El dimerizador AP1510 es la variante sintética del FK1012-H2, mientras que el AP20187 es una variante de menor tamaño, más estable y que interacciona específicamente con un nuevo ligando. El nuevo ligando es un FKBP-12 que contiene una mutación en el aminoácido 36 (F36V)(Figura 9). En el presente estudio se utilizaron los dimerizadores FK1012-H2 y AP1510 puesto que nuestras quimeras contienen la molécula silvestre de FKBP-12, y el nuevo dimerizador sólo interactúa con moléculas mutantes para la secuencia FKBP-12.

FK1012:



AP1510:



AP20187

Figura 9. Estructuras de los dimerizadores. El dimerizador FK1012 es el dímero de la droga inmunosupresora FK506. Este dímero fue generado a partir de la unión a través de la región de unión a Calcineurina por un anillo benzénico. El dimerizador AP1510 fue sintetizado a partir de la estructura y función del FK1012. Este dimerizador es más pequeño pero posee la misma afinidad por su ligando, el FKBP-12. El dimerizador AP20187 es una nueva versión capaz de interactuar solamente con un nuevo ligando, el FKBP-12*, que contiene una mutación en el aminoácido 36 (F→V)

IV. Justificación

La señalización a través del TCR es crucial en la activación de los linfocitos T. El resultado de esta señalización depende del estadio de diferenciación en que se encuentra el linfocito T. Así mismo, en linfocitos T maduros la señal mediada por el TCR puede inducir la activación del linfocito T, llevando a la proliferación y la diferenciación funcional, o bien, inducir un estado de "no respuesta", cuando la señal a través del TCR se da en ausencia de coestimulación. La capacidad del TCR para transducir señales, es conferida por su asociación al complejo TCR ζ /CD3. Hasta la fecha se han propuesto dos modelos para explicar la contribución de cada una de las cadenas del complejo CD3 a esta señal. El primer modelo postula que las cadenas del complejo tienen un papel cuantitativo. Es decir, los ITAMs poseen la misma función y sólo contribuyen amplificando las señales. Esta hipótesis se ha propuesto basándose en trabajos en los que se describe que el número de ITAMs utilizado para la reconstitución del fenotipo de ratones "knock out" para la cadena TCR ζ (101), se correlaciona con el grado de desarrollo de los linfocitos T, apoyando su contribución cuantitativa. Por otro lado, el segundo modelo postula que cada cadena puede contribuir de manera cualitativa, generando señales diferentes durante el proceso de maduración y/o activación de los linfocitos T (101). Este se propone con base en estudios *in vitro* en los que se ha demostrado que los ITAMs presentes en las distintas cadenas tienen afinidad diferencial por diversos sustratos, sugiriendo una diferencia cualitativa entre las distintas cadenas del complejo CD3. Por lo tanto aún existen incógnitas sobre la contribución individual de las cadenas del complejo, así como de los co-receptores, en las señales involucradas durante la diferenciación y activación de los linfocitos T.

Para el análisis de las señales iniciadas por el complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros, se han generado quimeras con los dominios citoplasmáticos de cada cadena. Algunos

de estos estudios proponen que la cadena TCR ζ es suficiente para inducir una señal completa de activación, pero otros contradicen esta hipótesis. En nuestro laboratorio se estudió previamente el papel de la cadena TCR ζ en líneas tumorales de linfocitos T, así como en el desarrollo y la activación de los linfocitos T utilizando un modelo de ratón transgénico. En este trabajo, los resultados obtenidos demostraron que *in vitro* utilizando la línea tumoral de linfocitos T, la cadena TCR ζ fue capaz de inducir una señal completa de activación determinada por la fosforilación de esta cadena, así como por la activación de factores de transcripción imprescindibles en la activación de los linfocitos T. Sin embargo, el estudio de linfocitos T maduros y timocitos del ratón transgénico, la activación individual de TCR ζ fue incapaz de dar todas las señales requeridas para inducir la diferenciación de timocitos y la activación funcional de los linfocitos T periféricos. Estos resultados nos llevan a postular que *in vivo* otras cadenas o el co-receptor CD4 son necesarias para complementar las señales iniciadas a través de la cadena TCR ζ .

Los co-receptores tienen un papel importante en la activación de los linfocitos T. Los co-receptores estabilizan la interacción entre el TCR y las moléculas del MHC, gracias a que interactúan al mismo tiempo con las moléculas del MHC. Dado que los co-receptores están asociados a través de su dominio citoplásmico a las cinasas de la familia Src, Lck y Fyn, el acercamiento de los co-receptores al TCR permite reclutar a estas cinasas a los dominios intracelulares de las cadenas del complejo TCR ζ /CD3 y de esta manera, iniciar la cascada de señalización del TCR. Esta segunda función de los co-receptores nos sugiere que estas moléculas puedan tener un papel importante en la amplificación de la señal del TCR. Es por ello que en este trabajo pretende entender mejor la contribución bioquímica y funcional del co-receptor CD4 a las señales iniciadas a través de TCR ζ .

V. Hipótesis

La contribución del co-receptor CD4 a las señales inducidas a través de la cadena TCR ζ , permite potenciar vías de señalización, que se traducen en la optimización de la respuesta funcional del linfocito T.

VI. Objetivos

- 1) Expresar las quimeras de las cadenas TCR ζ y el co-receptor CD4 en el hibridoma de linfocitos T murinos By155.18 y las líneas de linfocitos T tumorales Jurkat E6-1 y Jurkat Tag.
- 2) Analizar la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ como consecuencia del entrecruzamiento extracelular (con el anticuerpo anti-CD2) e intracelular (con el dimerizador) en presencia y ausencia de la quimera del co-receptor CD4.
- 3) Evaluar la capacidad de las quimeras para inducir respuestas "cascada abajo" en la señalización como la elevación de calcio intracelular y la activación de factores de transcripción.

VII. Materiales y Métodos

VII. a. Materiales

VII. a. i. Vectores/Clonación

Para generar la quimera de ζ (CD2- ζ -FKBPx3) se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente ~700 pb que contiene los dominios extracelular y transmembranal de la molécula CD2 humana. Este fragmento fue clonado en el plásmido Bluescript (pSK-) utilizando las enzimas de restricción XbaI y XhoI. Posteriormente se insertó en el extremo 3' un fragmento de 320 pb que contiene el dominio citoplásmico de TCR ζ murino, previamente purificado del plásmido MZE (98). Finalmente se colocaron tres copias de la secuencia que codifica para la inmunofilina humana FKBP-12 (~1Kb) previamente purificadas a partir de la digestión con XhoI del plásmido M3FE.

Para generar la construcción que contiene el CD4 murino, se amplificó por PCR el fragmento que corresponde al dominio citoplásmico (aminoácidos 384-447) utilizando la DNA polimerasa de alta eficiencia (PFU, Stratagene, USA). En el extremo 5' se añadió un sitio de restricción Sal I y en el extremo 3' se añadió un sitio de restricción Xho I para facilitar la ligación con la región 5'CD2 y con el fragmento FKBP-12 en posición 3'. El fragmento amplificado se cortó con las enzimas Sal I y Xho I. Este fragmento se insertó en el plásmido que contenía la región extracelular y transmembranal del CD2 clonado en pSk- (linearizado previamente con Xho I). A este plásmido se le insertó el fragmento FKBP-12x3.

Para expresar las quimeras en células eucariotas, se cortaron las construcciones de las quimeras y se insertaron en el plásmido PBJ5 utilizando las enzimas de restricción XbaI y EcoRI (98).

VII. a. ii. Líneas Celulares

Se utilizó un hibridoma de linfocitos T murino, la By155.18 (donado por la Dra. Barbara Bierer; Dana Farber Cancer Institute, Boston MA, USA) y dos líneas de linfocitos T humanos: las células Jurkat E6-1 (ATCC #177) y células Jurkat Tag (donadas por el Dr. Stuart Schreiber; Department of Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA). Todas las líneas se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Gibco BRL Grand Island, NY, USA) complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco BRL Grand Island, NY, USA), glutamina (292 $\mu\text{g/ml}$), estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml (Gibco BRL Grand Island, NY, USA) y HEPES 12.5 mM (Gibco BRL Grand Island, NY, USA). Para las electroporaciones se utilizó medio RPMI 1640 con 10% de SFB, glutamina 292 $\mu\text{g/ml}$, estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml en ausencia de HEPES. En el caso de las estimulaciones, para disminuir la fosforilación basal de las proteínas de la célula, se utilizó medio RPMI 1640 complementado con 0.5% de SFB, glutamina 292 $\mu\text{g/ml}$, estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml y HEPES 12.5 mM. Las líneas E6Z4 y E6CD4G5, que expresan establemente las quimeras de la cadena TCR ζ ; y CD4 respectivamente, se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), glutamina (292 $\mu\text{g/ml}$), estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml, HEPES 12.5 mM y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ geneticina (G-418 Sulfate. Gibco BRL Grand Island, NY, USA). Las líneas estables, Tag ζ y TagCD4, que expresan establemente las quimeras de la cadena TCR ζ ; y CD4 respectivamente, se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), glutamina (292 $\mu\text{g/ml}$), estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml, HEPES 12.5 mM y 1.9 $\mu\text{g/ml}$ geneticina.

VII. a. iii. Dimerizadores

Se utilizó una versión modificada del dimerizador original FK1012-A, el dimerizador FK1012-H2. Este dimerizador fue sintetizado por el Dr. Steve Diver, del Departamento de Biología Química de la Universidad de Harvard, Cambridge, MA, USA. También se utilizó un dimerizador sintético, el AP1510 (102). Este dimerizador está diseñado en base al dimerizador FK1012-H2 pero tienen un menor tamaño y posee una actividad más potente en ensayos de transcripción *in vitro* (proveído por la compañía Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA).

VII. a. iv. Anticuerpos

Para la tinción de las moléculas en la superficie se utilizó el anticuerpo primario anti-CD2 humano biotinilado (1/200-1/400 v/v)(TS2.18, proporcionado por la Dra. B. Bierer, Dana Farber Cancer Institute, Boston MA, USA). Para reconocer este anticuerpo primario se utilizó estreptavidina conjugada a ficoeritrina (1/200 v/v)(streptavidin-PE, Pharmingen). Para la tinción intracelular de las quimeras se utilizó el anticuerpo Anti-HA acoplado a FITC (1/200) (12CA5, purificado en nuestro laboratorio).

Para la estimulación de los linfocitos T humanos, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Anti-CD3 murino biotinilado (2C11 5µg/ml), anti-CD3 humano biotinilado (OKT3bn, 5 µg/ml) y anti-CD2 humano biotinilado (TS2.18bn, 5µg/ml). En el caso del hibridoma de ratón, se utilizó el anticuerpo anti-CD3 biotinilado (145-2C11, Pharmingen). Para entrecruzar los anticuerpos primarios se utilizó estreptavidina purificada (10 µg/ml, Pierce).

Para las inmunoprecipitaciones y la detección de las quimeras, así como de las moléculas participantes en la cadena de señalización se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-HA (12CA5, Roche. Immunoblot, 3 µg/ml), anti-HA (F-7, Santa Cruz Biotechnology Inc.

Inmunoprecipitación con 2 µg/muestra), anti-HA (12CA5, purificado en nuestro laboratorio. Inmunoprecipitación, 2 µg), anti-ζ (B610.2, Santa Cruz Santa Cruz Biotechnology Inc. Inmunoprecipitación con 1 µg/muestra, Inmunoblot, 1 µg/ml), anti-CD4 (C-18, Santa Cruz Santa Cruz Biotechnology Inc. Inmunoprecipitación con 3 µg/muestra, Inmunoblot, 3 µg/ml), anti-Lck (3A5, Santa Cruz Biotechnology Inc. Inmunoprecipitación con 1 µg/muestra, Inmunoblot, 1 µg/ml), anti-Zap70 (LR, Santa Cruz Biotechnology Inc. Inmunoprecipitación con 1 µg/muestra, Inmunoblot, 1 µg/ml), anti-fosfoErk (pErk, E-4, Santa Cruz Biotechnology Inc. Inmunoblot, 0.75 µg/ml), anti-fosfotirosina (pTyr, 4G10). Upstate Biothechnology. Inmunoblot, 1 µg/ml). Los anticuerpos primarios fueron detectados con los anticuerpos: anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra unidos a peroxidasa (1/2000, Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ). En todos los casos se reveló con ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ) siguiendo las instrucciones indicadas por la compañía.

VII. b. Métodos

VII. b. i. Transfección de células Jurkat E6-1 y Jurkat Tag

Para generar líneas que expresan transitoriamente las quimeras se electroporaron 10^7 células Jurkat Tag con 5 µg de los plásmidos CD2ζMA o CD2CD4MA. Se utilizó un electroporador BTX modelo ECM630 (BTX). Las condiciones de electroporación utilizadas fueron: 960µF, 125 ohms, 240 volts en 300µl de medio para electroporar. Las células se incubaron en 10 ml de medio RPMI completo por 18 horas. Posteriormente se pasaron a cajas con 10 ml de medio de ayuno y se incubaron 18 horas más.

Para las transfecciones estables, se utilizaron 10^7 células y se electroporaron con 10 µg de los mismos plásmidos previamente linearizados con la enzima EcoRI. Las células se recuperaron

en 10 ml de medio completo y posteriormente se pasaron a medio completo con geneticina (1.2 $\mu\text{g/ml}$ o 1.9 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar las células que han integrado el DNA en su genoma.

VII. b. ii. Inmunotinción

5 x 10⁵ células se resuspendieron en 50 μl de solución de lavado de FACS (PBS pH. 7.4, 2% SFB y 0.02% Azida de Sodio), y se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm. Las células se incubaron con 50 μl de solución de lavado con el anticuerpo primario, se incubaron por 30 minutos a 4°C, se centrifugaron y se eliminaron los sobrenadantes. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se lavaron tres veces con 200 μl de solución de lavado. Después del último lavado, las células se incubaron con 50 μl de solución de lavado con el anticuerpo secundario por 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron tres veces con 200 μl de solución de lavado y se fijaron con 100 μl de solución de fijación (PBS pH. 7.4, 4% de Paraformaldehído). Las células se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta analizarlas utilizando un citómetro de flujo (FACScan®, Becton & Dickinson). Las tinciones fueron analizadas utilizando el programa Cell Quest® (Becton & Dickinson).

iii. Ensayos de fosforilación

1. Estimulación

Se contaron las células y se inocularon 10⁷ células en cajas de petri con 10 ml de medio RPMI 0.5% de SFB por 18 horas, para disminuir la fosforilación basal. Se centrifugaron y se resuspendieron en 300 μl de medio RPMI 0.5% de SFB con: 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo primario (anti-CD3 o anti CD2) o 1 μM del dimerizador (FK1012-H2 o AP1510). Las células estimuladas con los anticuerpos se incubaron a 4°C por 15 minutos y posteriormente se les añadió 10 $\mu\text{g/ml}$

del anticuerpo secundario o estreptavidina. Se incubaron 3 minutos a 37°C y se detuvo la estimulación con 600 µl de solución de "stop" a 4°C (PBS, 20mM NaF y 1mM Na₃VO₄). Las células que fueron estimuladas con el dimerizador se incubaron 20 minutos a 37°C y se detuvo la estimulación con 600 µl de solución de "stop" a 4°C. Todas las células se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron para lisar en 100 µl de solución de lisis (1% Triton X-100, 20mM Tris pH 7.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 1mM Na₃VO₄, Aprotinina 10µg/ml, Leupeptina 10µg/ml, Pepstatina A 1µg/ml, DTT 1µM y PMSF 10µg/ml). Las células se incubaron con la solución de lisis por 10 minutos a 4°C y se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm. Finalmente se recuperaron los sobrenadantes.

2. Inmunoprecipitaciones

A partir de 100 µl de los sobrenadantes, se tomaron 20 µl para correr lisados totales y al resto del lisado (80 µl) se le añadió 300 µl de solución de lisis y el anticuerpo para inmunoprecipitar. Se incubó por 1 hora a 4°C en agitación y posteriormente se le añadió 30 µl de Proteína G-Agarosa (Invitrogen Corporation, Carlsband, CA, USA) y se dejó incubando por 18 horas a 4°C en agitación.

Las muestras se centrifugaron por 1 minuto a 8000 rpm y las pastillas de agarosa se lavaron con 600 µl de solución de lisis, se centrifugaron por 1 minuto a 8000 rpm. Este lavado se repitió 3 veces. Finalmente las pastillas se resuspendieron en 30 µl de solución de lisis y se añadió 30 µl de colorante para proteínas (20 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% Glicerol y Azul de Bromofenol). A los lisados totales se les añadió 20 µl de colorante para proteínas. Todas las muestras (inmunoprecipitaciones y lisados) se hirvieron por 5 minutos a 95°C y se centrifugaron

por 10 minutos a 13000 rpm. Para identificar las proteínas, las muestras se separaron en geles de acrilamida al 10% (161-0158, Bio Rad Laboratories, CA, USA) en condiciones desnaturalizantes.

3. Inmunoblots

Se utilizaron membranas de difloruro de polivinilo (PVDF) de 0.45 μ M (IPVH00010, Inmubilon-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Las membranas se cortaron al tamaño de los geles y se hidrataron en metanol al 100% por 20 segundos, se lavaron con agua por 2 minutos y se dejaron en solución de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 200 mM, Metanol 20%) por 5 minutos. Se hizo un "sándwich" colocando, desde abajo hacia arriba: dos capas de papel Whatman (al mismo tamaño que el gel y la membrana), el gel, la membrana y dos capas de papel Whatman. El papel fue previamente humedecido con la solución de transferencia. El "sándwich" se colocó en el aparato de transferencia (Panter Semidry Electrobloetter, Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA.) y se transfirió por 1 hora a 10 volts o 1 amp. Al finalizar la transferencia las membranas se bloquearon con una solución de TSA (Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Azida de Sodio 0.02%), 0.1% Tween 20 y 5% de BSA (para 4G10) o 5% leche Carnation sin grasa (para el resto de los anticuerpos) por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación. Se sacaron las membranas y se incubaron en TSA, 0.1% Tween 20, 1% de BSA o 1% de leche y el anticuerpo primario. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación. Se sacaron las membranas y se lavaron tres veces con TS (Tris 50 mM pH 7.6 y NaCl 150 mM), 0.1% Tween 20 (10, 5 y 5 minutos). Se incubaron en TS, 0.1% Tween 20, 1% de BSA o 1% de leche y el anticuerpo secundario. Se incubaron por 20 minutos y se lavaron cuatro veces con TS, 0.1% Tween 20 (10, 5, 5 y 5 minutos). Las proteínas se revelaron

con ECL (Amersham Pharmacia. England) por 1 minuto y se expusieron de 5 a 45 minutos en placas de rayos X (Biomax MR, KODAK, Sigma Aldrich. St. Louis. MO. USA).

iv. Flujos de Calcio

Se marcaron 5×10^6 células con Fluo-3 (F-1242, Molecular Probes, Oregon, USA) y Fura-Red (F-3021, Molecular Probes, Oregon, USA) siguiendo el siguiente protocolo: Se preparó una solución de Ácido Plurónico (0.5µg/ml) en 5 ml de medio RPMI al 2% de Suero Fetal Bovino (P-6867, Molecular Probes, Oregon, USA). Se diluyeron los viales de Fluo3 y Fura Red en 50 µl de DMSO estéril y se preparó la solución de tinción 2x, añadiendo 30 µl de Fluo3 (6µg/ml) y 50 µl de Fura Red (10µg/ml) a los 5 ml de medio RPMI al 2% de SFB + Ácido plurónico. Esta solución es utilizada para permeabilizar las células y permitir la entrada de los fluoróforos. Aparte, se contaron las células y se diluyeron en medio RPMI al 2% de suero Fetal Bovino a 1×10^7 células por ml. Se mezcló 1:1 la suspensión de células y la solución de tinción 2x (ejem. 0.5 ml de células y 0.5 ml de la solución de tinción 2x) y se incubaron por 45 minutos a 37°C, agitando cada 10 minutos. Se lavaron las células 3 veces con 1 ml de medio RPMI al 2% SFB. Las pastillas celulares se resuspendieron en medio RPMI al 2% de suero fetal Bovino y se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente, agitando cada 10 minutos. Las células se lavaron nuevamente con 1 ml de RPMI sin SFB y se resuspendieron finalmente en 1 ml de este medio. Para las estimulaciones, se prepararon tubos de FACS con 1 ml de medio sin SFB. Al momento de pasarlas por el FACS, se le añadieron 300 µl de la suspensión de células a cada tubo y se colocaron a 37°C. Se estimularon añadiendo al momento: los dimerizadores FK1012-H2 o AP1510 (1µM), anti-CD3biotina (5µg/ml) o anti-CD2 biotina (5µg/ml) seguidos de estreptavidina (10µg/ml). Para verificar las

condiciones de las células y la máxima liberación de calcio se añadió el ionóforo Ionomicina (500ng/ml). La ionomicina forma poros en la superficie de la membrana celular permitiendo la entrada del calcio presente en el medio. Los resultados fueron adquiridos utilizando un Citómetro de Flujo marca FACScan® (Becton and Dickinson) y el programa CellQuest® (Becton and Dickinson). Para analizar los flujos de calcio se utilizó el programa FACS Assistant® (Becton and Dickinson), que permite calcular la razón de las fluorescencias FL1/FL3 y los resultados fueron importados en el programa Microsoft Excel® para graficar.

v. Secreción de Fosfatasa Alcalina (SEAP)

10^7 células de las líneas estables E6-1 (silvestre), E6 ζ y E6CD4 se transfectaron transitoriamente con 5 μ g del plásmido que contiene el gen de la fosfatasa alcalina como gen reportero y los sitios de unión a NF-AT. Se incubaron en cajas de 96 pozos con 100 μ l de medio RPMI 1640, 10% de SFB a una concentración de 7×10^5 células por pozo. Las células fueron estimuladas añadiendo 100 μ l de medio con: 2nM de PMA (phorbol myristate acetate) + 1 μ M de ionomicina, 5mg/ml de anticuerpos (anti-CD3 o anti-CD2) ó 1 μ M de los dimerizadores FK1012-H2 o AP1510 y se incubaron por 24 horas a 37°C. Para verificar que nuestros resultados son producto de la actividad de la fosfatasa alcalina, se incubaron las células a 65-70°C por 2 horas. A esta temperatura la fosfatasa alcalina no pierde su actividad, mientras que las fosfatasas del medio de cultivo sí se inactivan. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes de cada pozo y se incubaron a 37°C por 24 horas con el sustrato de la fosfatasa alcalina, 4-metil-lumberiferilfosfato (M-3168, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La actividad de fosfatasa alcalina se leyó a 355nm de excitación y 460 nm de emisión utilizando un lector de fluorescencia (FluorosKan).

VIII. Resultados

VIII. a. Expresión de las quimeras en la línea de linfocitos T murina By155.18

Para analizar el papel la cadena TCR ζ y del co-receptor CD4 en la señalización mediada por el receptor del linfocito T (TCR) se utilizó un sistema de dimerización que nos permite entrecruzar específicamente la proteína de interés y de esta manera, poder evaluar la contribución de cada una de las cadenas de manera individual. De la misma manera, podemos analizar las señales inducidas por dos o más cadenas al mismo tiempo. Nuestro sistema de dimerización se basa en la utilización de quimeras que contienen los dominios citoplasmáticos de las cadenas TCR ζ y del co-receptor CD4 como nuestras proteínas de interés. Las quimeras se ubican en la membrana gracias a que contienen los dominios extracelular y transmembranaral de la molécula del CD2 humano (CD2). Las quimeras contienen en el dominio carboxilo terminal, tres copias de la inmunofilina FKBP-12, como ligando de nuestro dimerizador y un epítipo de la Hemaglutinina (HA) del virus de la Influenza como marcador (YPYDVPDYA) (Figura 10). Cabe mencionar que en el caso de la cadena TCR ζ , la cola citoplásmica contiene las regiones ITAM involucradas en la señalización, y en la quimera de CD4 contiene el sitio de interacción con la cinasa Lck. Asimismo, la presencia del dominio extracelular de la molécula CD2 humana nos permite entrecruzar exteriormente las quimeras con la finalidad de generar una señal máxima de activación.

Las quimeras CD2 ζ cit-FKBP-12x3 y CD2-CD4cit-FKBP-12x3 fueron expresadas establemente en un hibridoma de linfocitos T murino, el By155.18, y se generaron clonas para obtener poblaciones homogéneas con alta expresión (clona 2 para la quimera de la cadena TCR ζ , y las clonas 6 y 22, para la quimera de CD4). Este hibridoma fue elegido para la expresión de nuestras quimeras ya que es deficiente en la expresión de CD2 murino. Esto, además de que

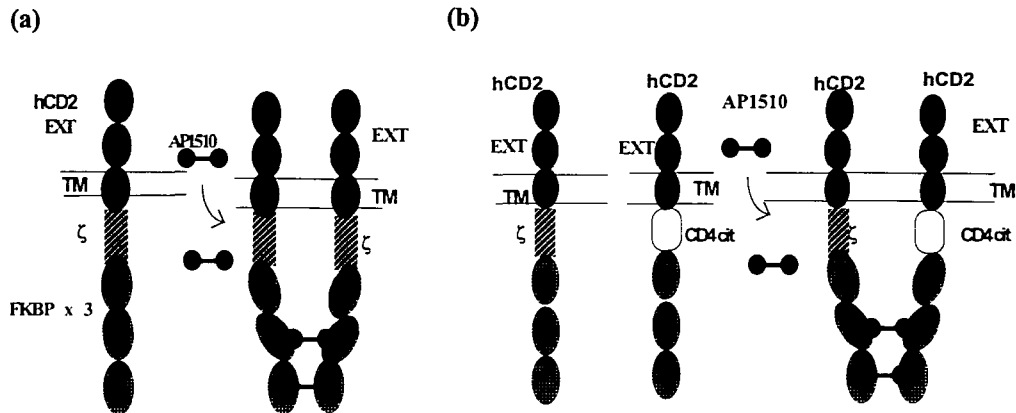


Figura 10. Estructura de las quimeras de las cadenas TCR ζ y de CD4. Se diseñaron quimeras que contienen los dominios extracelular y transmembranal de la molécula CD2 humana, el dominio intracelular de las cadenas TCR ζ y CD4 unidos a tres copias de la inmunofilina FK1012. En el extremo carboxilo-terminal se añadió la secuencia del epítipo HA del virus de Influenza. Este diseño nos permite analizar la contribución de (a) una sola cadena (homodimerización), por ejemplo, sólo TCR ζ ; o (b) de más de una cadena (heterodimerización), TCR ζ y CD4.

nuestras quimeras contienen el CD2 humano, nos permite distinguir claramente que las señales observadas son generadas únicamente por las quimeras mediante el entrecruzamiento con anticuerpos anti-CD2. Además, el hibridoma By155.18 ha sido ampliamente utilizado por el grupo de la Dra Barbara Bierer (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) para el estudio de la función de mutantes puntuales de la molécula CD2 humana. Las clonas se eligieron mediante una tinción con anticuerpos específicos contra el dominio extracelular de la quimera, utilizando el anticuerpo anti-CD2 (TS2-18) (Figura 11). La expresión se verificó también inmunoprecipitando las quimeras con anticuerpos específicos para el epítipo HA (12CA5 y F-7) y posteriormente mediante ensayos de inmunoblot utilizando estos mismos anticuerpos. Nosotros esperamos observar nuestras quimeras como una banda que migra en aproximadamente 83 Kda (Figura 12a). Se probaron cuatro diferentes anticuerpos contra este epítipo para verificar tanto la expresión como la mejor condición de detección de las quimeras en esta línea. De igual manera, la expresión de las quimeras pudo ser detectada utilizando anticuerpos que reconocen los dominios intracelulares de la cadena TCR ζ y el co-receptor CD4 mediante ensayos de inmunoprecipitación e inmunoblot (Figura 12b). Las diferencias en la detección de la expresión de las quimeras, obtenidas por los diferentes anticuerpos, se debe principalmente a las características de los mismos.

VIII. b. Análisis de la fosforilación de las quimeras en la línea By155.18

La activación de la cascada de señalización a través del TCR requiere de la fosforilación de las tirosinas presentes en las regiones ITAM de las cadenas del complejo TCR ζ /CD3. Como se menciona anteriormente, se requiere de la actividad de las cinasas de la familia Src, en particular de la cinasa Lck. Esta cinasa es reclutada a las cadenas del complejo TCR ζ /CD3 gracias a que es

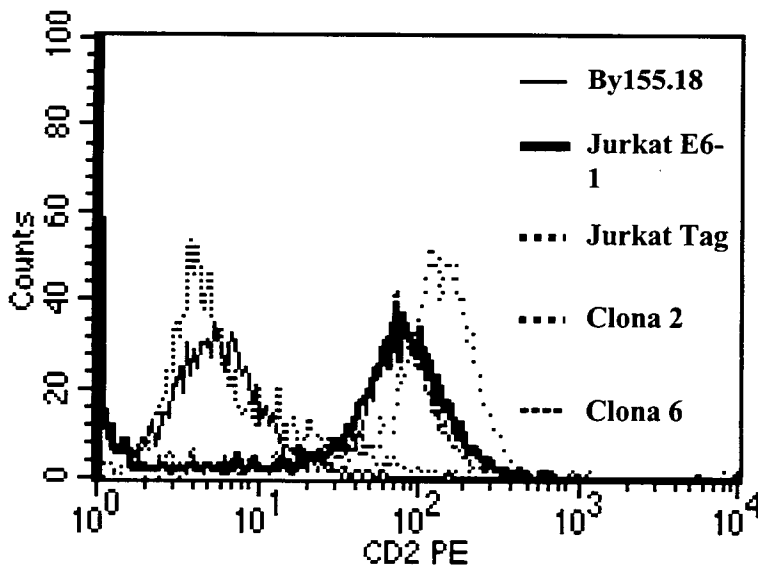
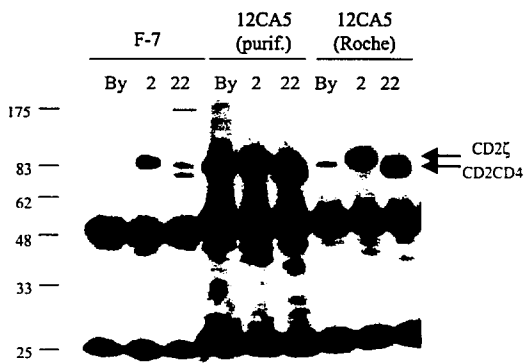


Figura 11. Expresión de quimeras en hibridoma murino By155.18. Se tiñeron 0.5×10^6 células de las líneas By155.18, Clona 2, Clona 22, Jurkat E6-1 y Jurkat Tag con el anticuerpo anti-CD2 humano (TS2.18) acoplado a biotina + EstreptavidinaPE. Las fluorescencia se detectó mediante la utilización de un citómetro de flujo (FACScan) y se analizaron utilizando el programa CellQuest®.

(a)



(b)

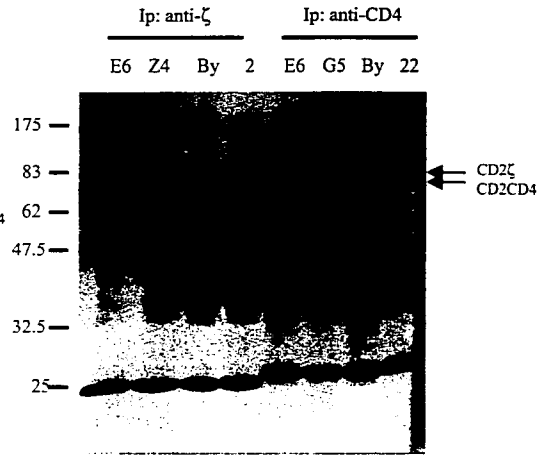


Figura 12. Detección por inmunoblot de las quimeras en el hibridoma murino By155.18. 1×10^7 células de las líneas By155.18, Clona 2, Clona 22 se lisaron e inmunoprecipitaron con (a) diferentes anticuerpos anti-HA ($2\mu\text{g}$ de F-7 y 12CA5) y se revelaron por inmunoblot con anti-HA ($3\mu\text{g/ml}$ de 12CA5, Roche). (b) Inmunoprecipitación de las quimeras expresadas en la línea By155.18 y E6-1 con los anticuerpos anti-TCR ζ ($2\mu\text{g}$ de B610.2) y anti-CD4 ($3\mu\text{g}$ de C-18). La quimeras se revelaron por inmunoblot con anti-HA ($3\mu\text{g/ml}$ de 12CA5, Roche).

capaz de asociarse con los co-receptores CD4 y CD8. Cuando se lleva a cabo el reconocimiento del péptido, la interacción entre los co-receptores y las moléculas del MHC permite el acercamiento de Lck a las cadenas del complejo, lo que permite inducir la fosforilación de las tirosinas presentes en las secuencias ITAM.

Para determinar la funcionalidad de nuestras quimeras se estimularon las células con anticuerpos anti-CD3 murino (2C11) –para entrecruzar el complejo endógeno-, con anticuerpos anti-CD2 humano –para entrecruzar las quimeras extracelularmente- y con los dimerizadores AP1510 y FK1012 –para entrecruzar las quimeras intracelularmente. En estos ensayos se observó que el entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ , utilizando el anticuerpo anti-CD2, induce una fuerte fosforilación de la quimera pero no induce la fosforilación de la cadena TCR ζ endógena. Así mismo, la estimulación con anticuerpos anti-CD3, induce la fosforilación de las cadenas TCR ζ endógenas (observadas como un dímero que migra en 21 y 23 Kda) pero no induce la fosforilación de la quimera. Sin embargo, en esta línea, el dimerizador no es capaz de inducir una fosforilación significativa de la quimera de la cadena TCR ζ cuando ésta se entrecruza individualmente (Figura 13a). Para confirmar que las bandas fosforiladas corresponden a la quimera de la cadena TCR ζ y las cadenas endógenas, se reveló la misma membrana con el anticuerpo anti-TCR ζ . Este blot confirmó que las bandas fosforiladas eran nuestra quimera. Cabe mencionar, que el anticuerpo anti-TCR ζ no es muy eficiente para reconocer a esta cadena fosforilada en el blot, ya que parece reconocer en sólo la forma no fosforilada de la cadena TCR ζ . Es decir, las bandas fosforiladas se observan menos intensas en el blot anti-TCR ζ y viceversa (Figura 13b). Por otro lado, nuestros resultados confirman que tanto la estimulación con el anticuerpo anti-CD2 como con el anticuerpo anti-CD3 induce el reclutamiento y la fosforilación

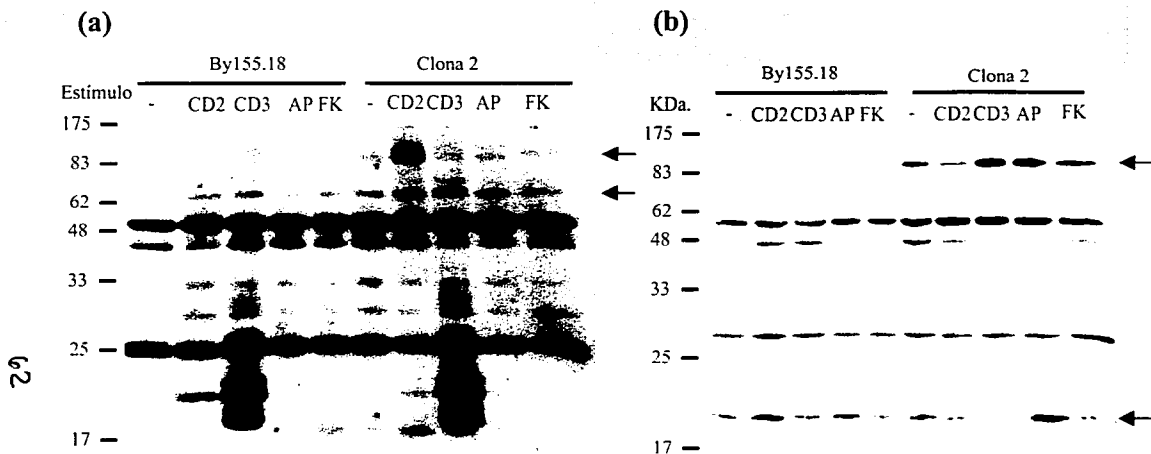


Figura 13. El entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ es capaz de inducir su fosforilación y la co-immunoprecipitación con la cinasa ZAP-70. 1×10^7 células de las líneas By155.18 y Clona 2 fueron estimuladas con $5\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos anti-CD3 murino (2C11), anti-CD2 humano (TS2.18) y los dimerizadores AP1510 y FK1012 ($1\mu\text{M}$). Se inmunoprecipitó la quimera con el anticuerpo anti-TCR ζ (6B10.2) y se detectó (a) la fosforilación por inmunoblot con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10). (b) La membrana fue sometida a "stripping" y posteriormente fue detectada la expresión de la quimera con el anticuerpo anti-TCR ζ (6B10.2). Las flechas señalan en (a) nuestra quimera de la cadena TCR ζ (arriba) y la cinasa ZAP-70 (abajo) y en (b) nuestra quimera (arriba) y la forma no fosforilada de la cadena TCR ζ endógena (p21, abajo). Las bandas que migran en 48 y 25 Kda. corresponden a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo para inmunoprecipitar.

de ZAP-70, puesto que al inmunoprecipitar la quimera y la cadena TCR ζ endógena utilizando el anticuerpo anti-TCR ζ se coimmunoprecipita esta cinasa fosforilada. (Figura 13a).

Para analizar la contribución del co-receptor CD4 en la señal inducida por la cadena TCR ζ , se expresó transitoriamente la quimera de CD4 en la línea estable de la cadena TCR ζ (Clona 2 + CD4). Se analizó la fosforilación de la cadena TCR ζ bajo las condiciones de estimulación utilizadas anteriormente, utilizando los anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3 y el dimerizador AP1510. En estos ensayos se observó que la presencia de la quimera de CD4 facilita la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ , tanto en la estimulación con anticuerpos anti-CD2 (Figura 14). En este caso se observó también la coimmunoprecipitación de la cinasa ZAP-70, incluso después de la estimulación con el dimerizador. (Figura 14). Esto sugiere que la fosforilación de la cadena TCR ζ inducida por el entrecruzamiento, tanto extracelular, como intracelular, es capaz de reclutar y activar a la cinasa ZAP-70. De esta manera, podría ser capaz de activar la vía de señalización del TCR.

Así mismo, se analizó la activación de moléculas "cascada abajo" en la señalización a través del TCR. En este caso, analizamos la activación de la cinasa Erk-1 después de la estimulación con los anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 y el dimerizador AP1510. En estos ensayos no observamos una clara diferencia en la fosforilación de esta cinasa cuando se utilizaron diferentes condiciones de estimulación. Sin embargo, se observó un nivel de fosforilación basal más alto en las líneas que expresan constitutivamente la quimera de CD4 (Clona 22 y Clona 22 co-transfectada con la quimera de la cadena TCR ζ) en comparación con el nivel obtenido en la línea By155.18 y la de la quimera de TCR ζ (Figura 15, abajo).

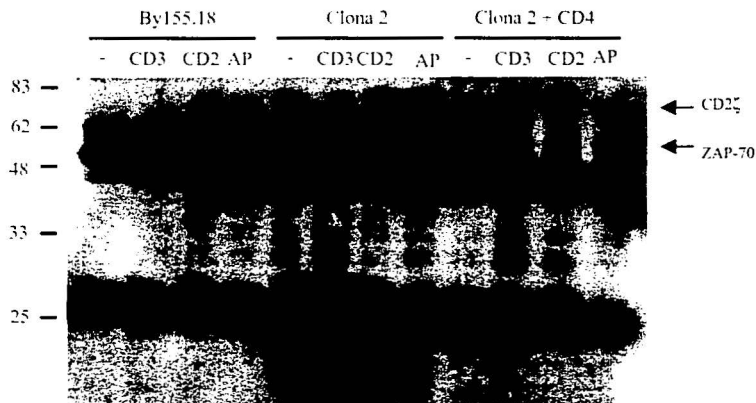


Figura 14. La co-expresión de la quimera de CD4 aumenta la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ . 1×10^7 células de las líneas By155.18, Clona 2 y Clona 2 co-transfectada con la quimera de CD2 fueron estimuladas con $5 \mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos anti-CD3 murino (2C11), anti-CD2 humano (TS2.18) y el dimerizador AP1510 ($1 \mu\text{M}$). Las quimeras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-TCR ζ (6B10.2) y se detectó la fosforilación por inmunoblot con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10). Las flechas muestran la quimera de la cadena TCR ζ (arriba) y la cinasa ZAP-70 (abajo). Las bandas que migran en 48 y 25 Kda. corresponden a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo para inmunoprecipitar.

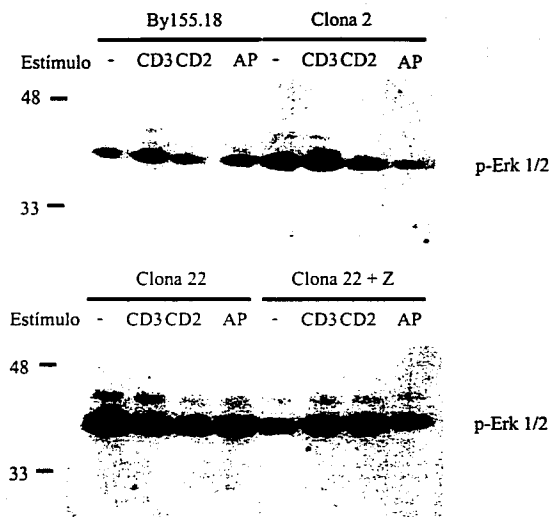


Figura 15. Fosforilación de la cinasa Erk-1 en las líneas estables de las quimeras de la cadena TCR ζ y CD4. 1×10^7 células de las líneas By155.18, Clona 2, Clona 22 y Clona 22 co-transfectada con la quimera de la cadena TCR ζ , se estimularon con $5\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos anti-CD3 murino (2C11), anti-CD2 humano (TS2.18) y el dimerizador AP1510 ($1\mu\text{M}$). Se analizó la activación de la cinasa Erk-1 mediante el análisis por inmunoblot de la fosforilación de esta cinasa utilizando el anticuerpo anti-pErk (E-4, $1\mu\text{g/ml}$).

VIII. c. Análisis de flujo de calcio inducido por el entrecruzamiento de las quimeras en la línea By155.18

Uno de los eventos más tempranos e importantes para la activación de los linfocitos T es la elevación de calcio intracelular generado por la activación de la fosfolipasa C γ -1 y la generación del segundo mensajero, IP $_3$. Esta elevación en la concentración de calcio se debe, inicialmente, a la salida de calcio del retículo endoplásmico, por la unión del IP $_3$ a canales específicos presentes en este organelo, y posteriormente por la entrada de calcio del medio extracelular al interior de la célula a través de algunos canales de calcio presentes en la membrana plasmática. La presencia del calcio en el citoplasma permite la activación de factores de transcripción como NF-AT, imprescindible para la activación completa del linfocito T.

Para analizar si las señales de la cadena TCR ζ y el co-receptor CD4 son suficientes para inducir la elevación del calcio intracelular se realizó un ensayo de liberación de calcio. Este ensayo consiste teñir las células con dos fluoróforos, Fura Red y Fluo 3. Estos colorantes modifican su fluorescencia cuando se encuentran en presencia de calcio (Figura 16). La finalidad de estos ensayos es observar la liberación de calcio intracelular inducida al estimular las células con el dimerizador o con anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3. Inicialmente esta línea no fue capaz de incorporar los fluoróforos, al parecer debido a la actividad de canales aniónicos presentes en estas células. Para determinar si estos canales estaban involucrados en la salida de los fluoróforos, se probó el inhibidor Probenecid. Al incubar las células con este inhibidor (0.5 mM) durante el protocolo de tinción, se observó que las células sí fueron capaces de incorporar los fluoróforos. Sin embargo, la incorporación de colorante fue menor que en otras líneas celulares (ver más adelante), ya que el flujo de calcio obtenido al añadir ionomicina, que abre todos los canales de calcio presentes en la membrana y genera la máxima elevación de calcio, no aumenta

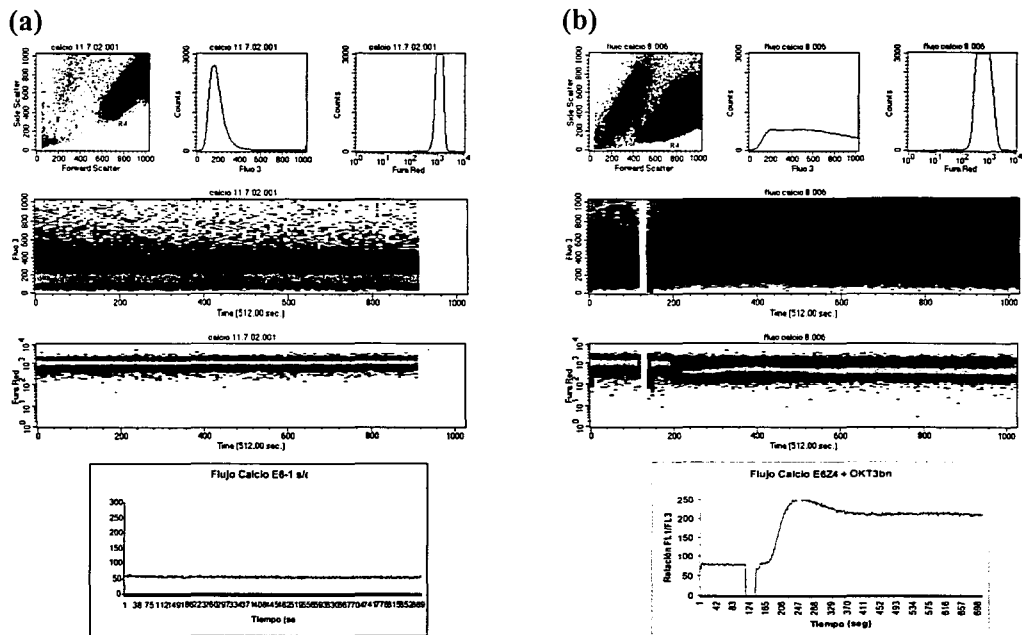


Figura 16. Descripción del análisis del flujo de calcio. Las células son teñidas con dos fluoróforos, FuraRed y Fluo3. Estos colorantes modifican su fluorescencia en presencia de calcio. La variación en la fluorescencia de estas moléculas nos permite identificar la liberación de calcio al citoplasma de las células como consecuencia de un estímulo. Para generar las gráficas del flujo de calcio (abajo), se utiliza el programa FACS Assistant y se grafican en Microsoft Excel. (a) Células sin estimular. No existe liberación de calcio y por lo tanto, no hay variación en la fluorescencia. (b) Células estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 (OKT3) que entrecruza el complejo CD3 endógeno y por lo tanto induce la liberación de calcio al citoplasma.

como se ha descrito. Utilizando estas condiciones, se estimularon las células con anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 y con el dimerizador AP1510. En estos ensayos, la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 fue capaz de inducir una liberación de calcio débil en comparación con el inducido al estimular las células con Ionomicina. Por otro lado, las estimulaciones con el anticuerpo anti-CD2 o el dimerizador AP1510 no fueron capaces de inducir la liberación de calcio intracelular (Figura 17). Los resultados obtenidos en esta línea celular, sugieren que el entrecruzamiento individual de la quimera de la cadena TCR ζ y la co-expresión de la quimera del co-receptor CD4 sólo es capaz de inducir la fosforilación de los ITAM's sin llegar a activar moléculas "cascada abajo" en la vía de señalización del TCR.

Dado que las características de esta línea no nos permitieron analizar todas las respuestas funcionales inducidas tras la activación condicional de nuestras quimeras, se decidió expresar las quimeras en otra línea de linfocitos T humana, la línea celular Jurkat E6-1.

VIII. d. Expresión de las quimeras en la línea de linfocitos T humana Jurkat E6-1

Las quimeras se expresaron tanto transitoriamente como establemente en esta línea de linfocitos T humanos. Posteriormente se eligieron dos clonas de las líneas estables cuya expresión, al igual que las clonas de la línea By155.18, fuera alta. Para la quimera de la cadena TCR ζ se eligió la clona Z4 (E6Z4) y para la quimera de CD4 se eligió la clona G5 (E6G5).

La línea de linfocitos T Jurkat E6-1 es una línea que expresa altos niveles de la molécula CD2 en su superficie. Este hecho dificultó nuestra evaluación del nivel de expresión de las quimeras por tinción de superficie con el anticuerpo anti-CD2. Por ello, se determinó la expresión de las quimeras mediante la inmunoprecipitación e inmunoblot utilizando los anticuerpos específicos para el epítipo HA (12CA5 y F-7) (Figura 18). Como se observa en esta figura, la

69

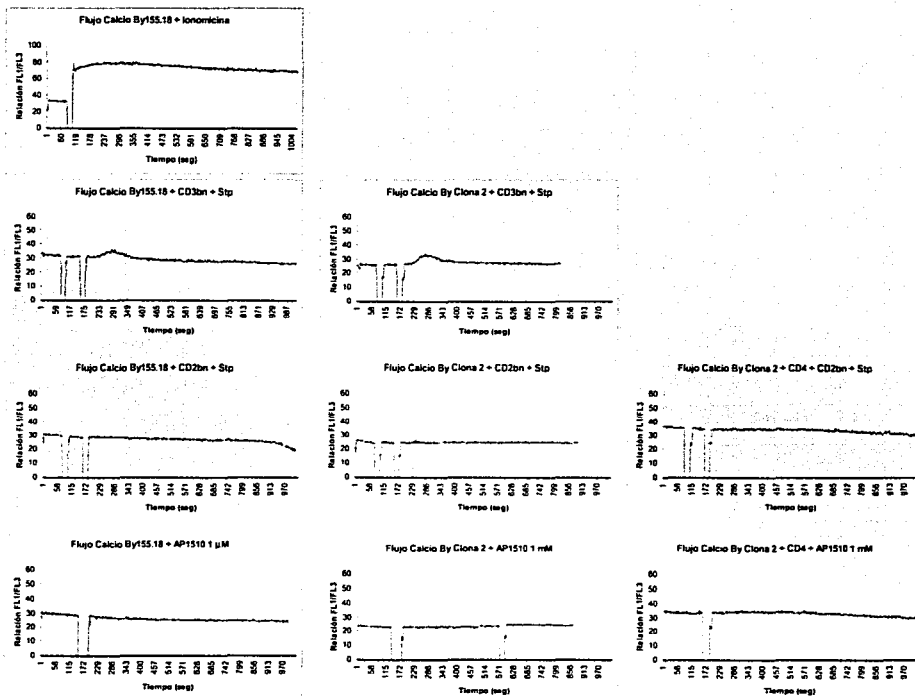


Figura 17. Análisis de la liberación de calcio intracelular en la línea By155.18. 1×10^7 células de las líneas By155.18, Clona 2 y Clona 22 fueron teñidas con los fluoróforos Fluo3 y FuraRed y posteriormente estimuladas con Ionomicina, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-CD3bn (2C11) o anti-CD2bn (TS2.18) o $1 \mu\text{M}$ del dimerizador AP1510. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (FACSscan) y los flujos se analizaron utilizando el programa CellQuest®.

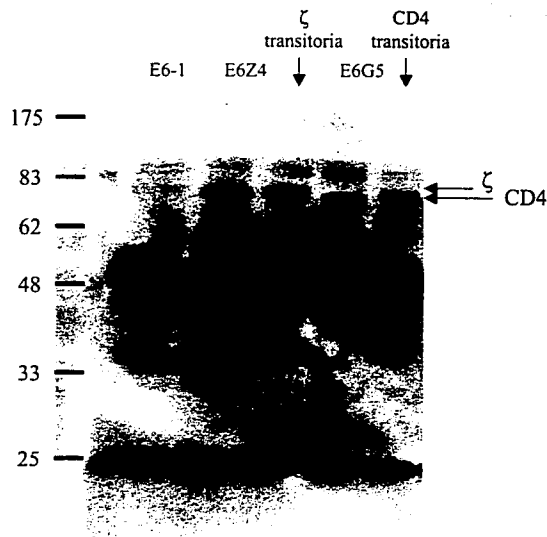


Figura 18. Detección por inmunoblot de las quimeras en la línea Jurkat E6-1. Las quimeras se expresaron establemente, E6Z4 y E6G5, y transitoriamente en la línea Jurkat E6-1. Se hicieron lisados de 1×10^7 células y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA ($2\mu\text{g}$ 12CA5, Roche) y se revelaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-HA ($3\mu\text{g/ml}$ de 12CA5, Roche). Las bandas observadas en 48 y 25 KDa. representan las cadenas pesada y ligera del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar.

expresión de nuestras quimeras en esta línea es menor a la detectada previamente en la línea By155.18 (Figura 12).

Como método alternativo para la detección de las quimeras, decidimos intentar la tinción intracitoplasmática de las mismas utilizando el anticuerpo anti-HA acoplado al fluoróforo FITC. Estos estudios demostraron que debido a la reactividad cruzada del anticuerpo 12CA5 es difícil detectar diferencias de expresión en las líneas transfectadas establemente con las quimeras de la cadena TCR ζ y CD4 respectivamente (Figura 19). Sólo cuando se probó la tinción con la línea By155.18 y la Clona 2 se pudo detectar un incremento visible de la fluorescencia promedio (Mean Fluorescence Intensity, MFI) en el histograma correspondiente a la fluorescencia FL1 correspondiente a FITC. (no se muestra). Sin embargo, este incremento es bajo en comparación con los ensayos de inmunoprecipitación e inmunoblot presentados previamente.

VIII. d. Análisis de los patrones de fosforilación en la línea E6-1

Decidimos analizar los patrones de fosforilación obtenidos en la línea estable de nuestra quimera de la cadena TCR ζ y la contribución de CD4 en la línea cotransfectada con esta quimera. Se analizaron los patrones de fosforilación separando, en geles desnaturalizantes, lisados totales de células estimuladas con los anticuerpos anti-CD2, antiCD3 y el dimerizador AP1510 y revelando con el anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10). En estos ensayos se observó que el entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ indujo un mayor nivel de fosforilación en comparación con las células sin estimular. Este efecto se observó tanto en la línea que expresa la quimera de la cadena TCR ζ como en la silvestre, por lo que concluimos que el aumento en la fosforilación se debe a la señalización a través del CD2 endógeno (Figura 20, arriba) (ver discusión).

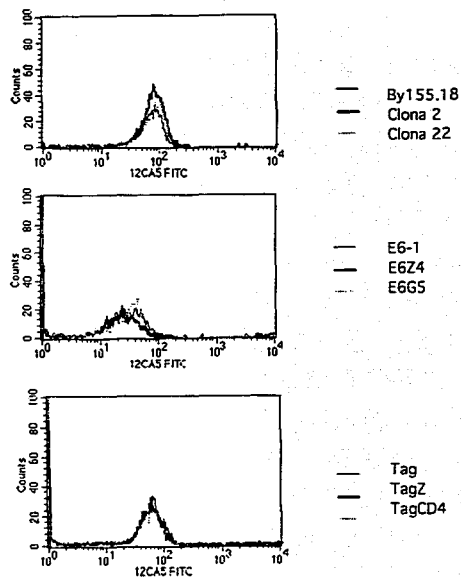


Figura 19. Tinción intracelular de las quimeras con el anticuerpo anti-HA-FITC. 1×10^6 células fueron teñidas intracelularmente con el anticuerpo anti-HA acoplado a FITC (dilución 1/200). La fluorescencia se detectó con un citómetro de flujo (FACScan) y analizadas con el programa CellQuest®. Se muestra la tinción de las líneas estables de las quimeras de la cadena TCR ζ (Clona2, E6Z4 y TagZ) y CD4 (Clona 22, E6G5 y Tag CD4) en las líneas By155.18, Jurkat E6-1 y Jurkat Tag.

Por otro lado, observamos que la expresión transitoria de la quimera de CD4 aumentó considerablemente los niveles de fosforilación basal. Pero este nivel de fosforilación no aumentó como consecuencia de la estimulación en comparación con la línea que expresa sólo la quimera de la cadena TCR ζ (Figura 20, arriba).

Además analizamos también la fosforilación de la cinasa Erk-1 como consecuencia de la estimulación. En este caso, se observó el mismo efecto que en los blots anti-fosfotirosina, la cinasa Erk-1 se fosforila como consecuencia de la estimulación con los dos anticuerpos, tanto en la línea silvestre como en la línea que expresa nuestra quimera. Y esta cinasa aumenta su nivel de fosforilación basal cuando se expresa la quimera de CD4 (Figura 20, abajo).

VIII. f. Análisis de flujo de calcio inducido por el entrecruzamiento de las quimeras en la línea Jurkat E6-1

A diferencia de la línea murina de linfocitos T, esta línea incorporó muy bien los colorantes Fluo 3 y Fura Red. En estos ensayos se entrecruzaron las quimeras tanto extracelularmente con el anticuerpo anti-CD2 como intracelularmente con el dimerizador. Como control de la estimulación se utilizó un anticuerpo anti-CD3 humano (OKT3) y como control de la tinción y viabilidad de las células se añadió ionomicina.

A pesar de las dificultades para detectar los niveles de expresión de las quimeras en esta línea, y puesto que estas líneas establemente transfectadas crecieron en presencia de medio de selección (con 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina), se decidió analizar la capacidad de nuestras quimeras para inducir la señalización que inicia la liberación de calcio intracelular. Para esto, se repitieron los ensayos de liberación de calcio utilizando las mismas condiciones de estimulación usadas con la línea By155.18. En estos ensayos, la estimulación de la línea E6 sin transfectar induce un flujo

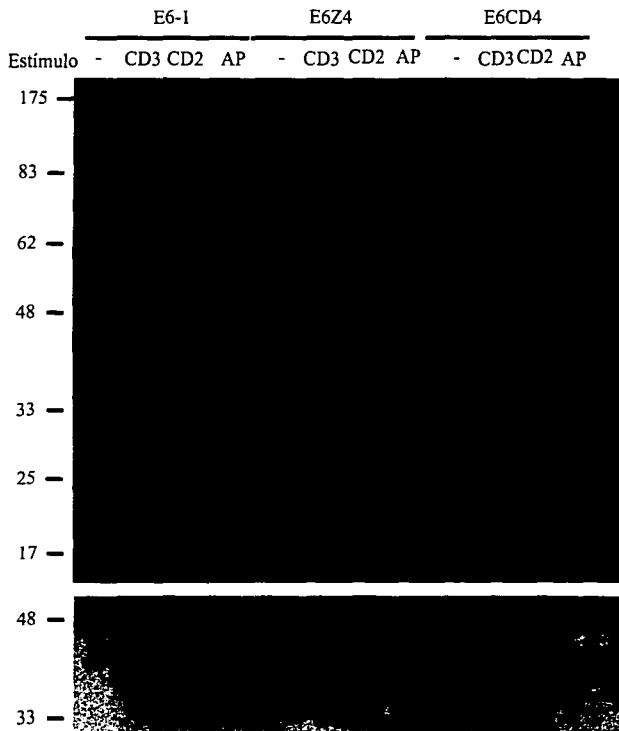


Figura 20. Patrones de fosforilación de las líneas E6-1, E6Z4 y E6G5. Se hicieron lisados de 1×10^6 células de las líneas E6-1, E6Z4 y E6G4 y se analizaron patrones de fosforilación revelando con el anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10, $1 \mu\text{g/ml}$)

TECIS CON
FALLA DE ORIGEN

Blot: 4G10 ($1 \mu\text{g/ml}$)

Blot: anti-pErk 1/2 ($1 \mu\text{g/ml}$)

de calcio sostenido y de baja intensidad, inducido por la estimulación de la molécula CD2 endógena. Sin embargo, la estimulación de la línea estable para la cadena TCR ζ con este estímulo, induce un flujo de calcio transitorio y de mayor intensidad en comparación con el inducido por el CD2 endógeno. Cuando se co-expresó la quimera de CD4 en estas células, la elevación de calcio intracelular inducido por el entrecruzamiento de las dos quimeras con el anticuerpo anti-CD2 fue de la misma intensidad que el inducido por la quimera de la cadena TCR ζ , pero de manera más rápida, como se observa con la pendiente de las curvas (Figura 21). En el caso de la quimera de CD4, se observó que la liberación de calcio inducida con el anticuerpo anti-CD2 fue similar con respecto a la pendiente del flujo obtenido por la estimulación de la molécula del CD2 endógena pero de mayor intensidad (Figura 21). Por otro lado, se observó que la estimulación con el dimerizador indujo un flujo de calcio muy débil y retrasado en la línea estable para la quimera de la cadena TCR ζ . Sin embargo, la elevación de calcio no se modificó al co-expresar la quimera de CD4 en la línea estable para la quimera de la cadena TCR ζ . Una posible explicación con respecto a este resultado puede ser que el nivel de expresión de la quimera de CD4 de forma transitoria en estas células no fue suficiente como para generar un adecuado entrecruzamiento (Ver discusión).

VIII. g. Análisis de la activación de factores de transcripción inducida por el entrecruzamiento de las quimeras en la línea Jurkat Tag.

El resultado final de la señalización a través del TCR es la activación de la transcripción de genes importantes para la proliferación de los linfocitos, entre ellos el gen de la Interleucina-2. Este gen está regulado por diversos factores de transcripción como el complejo AP-1 -formado por fos y jun- y otros como NF-AT y NF- κ B.

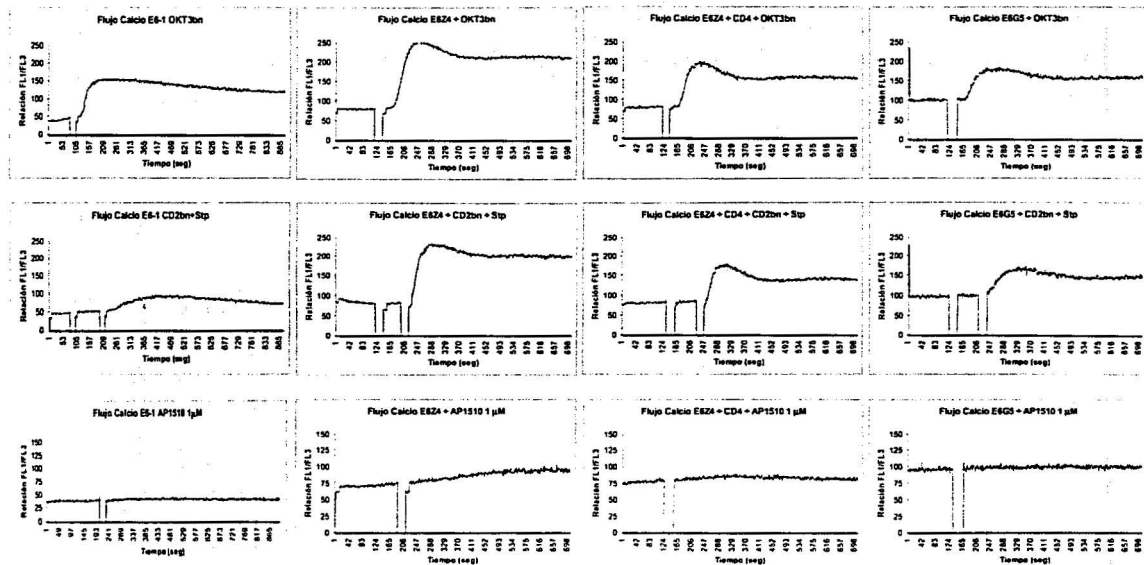


Figura 21. Análisis de la liberación de calcio intracelular en la línea Jurkat E6-1. 1×10^7 células de las líneas E6-1, E524 y E6G5 fueron teñidas como se describe en la figura 15. Posteriormente fueron estimuladas con Ionomicina, $5 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (OKT3) o anti-CD2 (TS2.18) o $1 \mu\text{M}$ del dimerizador AP1510. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (FACScan) y los flujos se analizaron utilizando el programa CellQuest®.

Para evaluar si la estimulación de las quimeras es capaz de inducir la activación de factores de transcripción, se utilizó un plásmido que contiene el gen de la fosfatasa alcalina unido a tres regiones de unión del factor de transcripción NF-AT. Cabe mencionar la transcripción de este plásmido está regulada por tanto por el promotor como por el origen de replicación (SV40ori/ SV40 origin of replication) del virus SV40, lo que nos permite replicar el plásmido cuando se encuentra en presencia del antígeno T grande de este virus. Cuando se activa la cascada de señalización a través del TCR, se activan diversos factores de transcripción; entre ellos, el NF-AT endógeno. Éste es capaz de unirse a los sitios de NF-AT presentes en el plásmido y por lo tanto, inducir la transcripción de la fosfatasa alcalina. Una vez que la fosfatasa es secretada al medio extracelular, defosforila su sustrato -el 4-metil-lumiferilfosfato- y entonces se convierte en una molécula fluorescente. De esta manera podemos evaluar la activación del factor de transcripción NF-AT mediante la fluorescencia generada como resultado del procesamiento del sustrato por la fosfatasa secretada en el sobrenadante. La fluorescencia se cuantifica utilizando un fluorímetro (Fluoroskan).

Para estos ensayos se requiere de altos niveles de expresión de la fosfatasa alcalina. Estos niveles de expresión no se pudieron obtener en la línea de Jurkat E6-1. Por esta razón, se decidió utilizar para estos ensayos otra línea de linfocitos T derivada de las Jurkat, las Jurkat Tag. Esta línea se originó a partir de las células Jurkat que fueron transfectadas establemente con el gen del antígeno T grande ("Large T antigen"/Tag) del virus SV40. Esto nos permitió la amplificación del plásmido reportero que contiene la secuencia SV40 ori (ver más arriba). Las quimeras se expresaron de manera transitoria y estable en esta línea celular. La expresión de las quimeras en las líneas estables fue determinada por la tinción extracelular con el anticuerpo anti-CD2 humano (TS2.18) (Figura 22). Estas células expresan también CD2 endógeno, sin embargo, lo hacen en menor cantidad que la línea Jurkat E6-1.

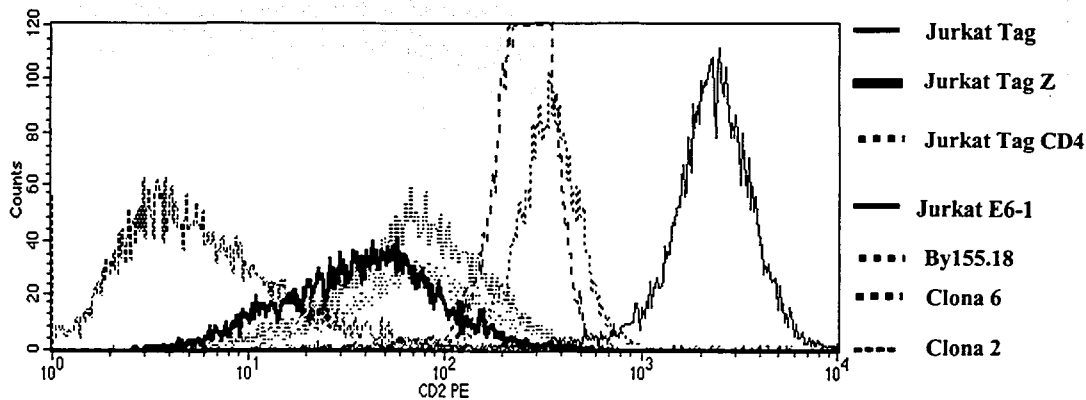


Figura 22. Expresión de quimeras en la línea de linfocitos T tumorales Jurkat Tag. 0.5×10^6 células de las líneas By155.18, Clona 2, Clona 22, Jurkat E6-1 y Jurkat Tag, como controles; y las líneas estables Jurkat Tag Z y Tag CD4 fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD2 humano (TS2.18) acoplado a biotina (1/400) + EstreptavidinaPE (1/200). Las florescencias se detectaron utilizando un citómetro de flujo (FACScan) y se analizaron utilizando el programa CellQuest®.

Como se menciona anteriormente, las quimeras fueron expresadas transitoriamente en la línea de linfocitos Jurkat Tag y fueron estimuladas utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD2 y los dimerizadores AP1510 y FK1012, así como con PMA + Ionomicina como control positivo. En estos ensayos se observó que la estimulación con CD2 en la línea que expresa la quimera de la cadena TCR ζ induce una leve activación de NF-AT, al igual que la estimulación con el dimerizador FK1012. Sin embargo, la estimulación con el dimerizador AP1510 no fue capaz de inducir la activación del factor de transcripción. (Figura 23). Cuando se probó la línea estable de la quimera de la cadena TCR ζ en estos ensayos, se observó un incremento leve en la activación de transcripción NF-AT como consecuencia de la estimulación con anti-CD2 y con el dimerizador AP1510 en comparación con los obtenidos en la línea silvestre (Figura 24).

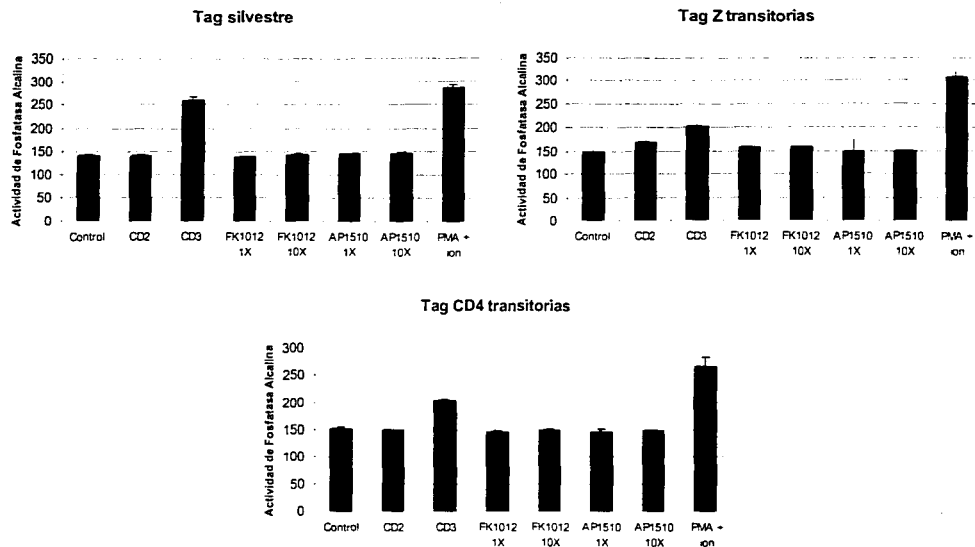


Figura 23. Análisis de la activación del factor de transcripción NF-AT en la líneas transitorias de las quimeras TCR ζ y CD4. 1×10^7 células de las líneas Tag fueron transfectadas con el plásmido que contiene el gen reportero de la fosfatasa alcalina y los plásmidos de las quimeras TCR ζ y CD4. 24 horas después fueron estimuladas por 16 horas con PMA+Ionomicina, $5 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3bn (OKT3) o anti-CD2bn (TS2.18) o $1 \mu\text{M}$ del dimerizador AP1510. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó por la fluorescencia que emite el sustrato cuando es defosforilado por la enzima. Para ello se utilizó un lector de fluorescencia (FluorScan). Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en triplicados.

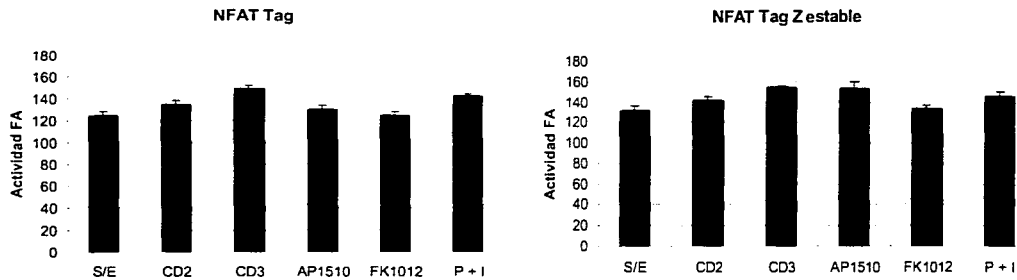


Figura 24. Análisis de la activación del factor de transcripción NF-AT en la línea estable de la quimera TCR ζ . 1×10^7 células de las líneas Tag, TagZ y TagCD4 fueron transfectadas con el plásmido que contiene el gen reportero de la fosfatasa alcalina. Se estimularon y analizaron como se describe en la Figura 20. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en triplicados.

IX. Discusión

La finalidad de este trabajo consiste en determinar la contribución individual de la cadena TCR ζ y del co-receptor CD4 a la señalización iniciada a través del complejo TCR/CD3. Por este motivo se generaron quimeras que contienen los dominios intracelulares de las cadenas TCR ζ y del co-receptor CD4 ancladas a la membrana por los dominios extracelular y transmembranal de la molécula del CD2 humano. Además, estas proteínas están unidas a tres copias de la inmunofilina FKBP-12 que es el ligando de los dimerizadores AP1510 y FK1012. La finalidad de incluir estos sitios blanco de los dimerizadores es inducir el entrecruzamiento de las moléculas quiméricas intracelularmente como una forma alterna al entrecruzamiento extracelular con anticuerpos y como una herramienta para generar una activación más regulada. Además, mediante la utilización de diferentes concentraciones del dimerizador, así como de diferentes números de copias del ligando para el dimerizador, podemos modular los distintos grados de entrecruzamiento de la quimera (dimerización, oligomerización, multimerización). Por otro lado, podemos analizar la contribución de una sola quimera (homodimerización) o de más de una quimera.(heterodimerización).

Las quimeras fueron expresadas en diferentes líneas de linfocitos T maduros para semejar la activación de la célula *in vitro*. Se utilizó inicialmente un hibridoma de linfocitos T murinos cuya característica principal es que carece de la expresión de CD2 endógeno. Esto nos permite identificar de manera sencilla, mediante anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de las quimeras, la expresión de nuestras proteínas. Se generaron clonas para cada una de las quimeras y se eligió la clona cuya expresión fuera alta. Se obtuvo la Clona2, que expresa la quimera de la cadena TCR ζ y las Clonas 6 y 22, para la quimera de CD4, que expresaban la quimera de manera similar. Una vez identificada la expresión de las quimeras se determinó la función de las mismas

mediante el entrecruzamiento de éstas utilizando tanto anticuerpos contra el dominio extracelular, como con los dimerizadores, que reconocen el dominio intracelular. En los ensayos de estimulación se observó que la estimulación extracelular de la quimera de la cadena TCR ζ fue capaz de inducir la fosforilación de ésta, así como de reclutar a la cinasa ZAP-70. Estos mismos resultados fueron obtenidos en las células a las que se les co-expresó la quimera de CD4, observándose un incremento en la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ . Sin embargo, la estimulación de esta quimera con los dimerizadores fue capaz de inducir una leve fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ sólo en la línea que expresaba la quimera de CD4. Estos resultados confirman que CD4 (y presumiblemente la cinasa Lck asociada a su región citoplasmática) es una molécula fundamental para la amplificación de la señal iniciada tras la interacción del TCR con el MHC/péptido. De manera interesante, observamos que la expresión de la quimera de CD4 en esta línea aumentó de manera considerable los niveles de fosforilación basal de la cinasa Erk-1/2, lo que sugiere que la presencia de la quimera de CD4 en los microdominios de membrana –presumiblemente facilitada por el dominio transmembranal de CD2- podría aumentar la actividad de la cinasa Lck, la cual se encuentra asociada a su cola citoplasmática, en las vías de señalización que se encuentran río abajo del complejo TCR/CD3.

El hibridoma murino By155.18 posee características diferentes a los linfocitos T normales, tales como la morfología (estas células son de mayor tamaño, de forma irregular) y la capacidad de adherirse a las cajas de cultivo. Otra característica particular de estas células es que fueron incapaces de incorporar los colorantes utilizados para los ensayos de liberación de calcio intracitoplásmico. Esto nos llevó a pensar que las células pudieran tener algún mecanismo que no permitiera la entrada de nuestros dimerizadores o facilitara la salida automática de los mismos, así como podría suceder con los fluoróforos. Por este motivo decidimos probar el inhibidor de

canales aniónicos Probenecid (Sigma). Cuando las células se incubaron con el inhibidor, se recuperó la capacidad de incorporar los fluoróforos utilizados para los ensayo de elevación de calcio. Sin embargo, esto no facilitó la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ como consecuencia de la estimulación con los dimerizadores. Estos resultados nos sugieren que estos canales no están involucrados con la falta de fosforilación de nuestra quimera como resultado de la estimulación con los dimerizadores. Nuestros resultados sugieren que la falta de fosforilación podría deberse a que el entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ mediante anticuerpos es de mayor grado en comparación con el generado por los dimerizadores. Por otro lado, es probable que la composición de los microdominios de membrana de esta línea celular sea distinta a la de otras líneas de linfocitos T tumorales como las Jurkat E6-1 o las Jurkat Tag, de la misma manera que se han reportado diferencias entre tipos celulares distintos y células en distintos estadios de diferenciación. (103). Esto podría explicar diferencias en las fosforilaciones obtenidas con la línea Jurkat Tag, donde nuestro grupo demostró que tanto el entrecruzamiento extracelular (con anticuerpos anti-CD2) como el entrecruzamiento intracelular (con el dimerizador) de la quimera de la cadena TCR ζ es capaz de inducir una fuerte fosforilación de la quimera, así como el reclutamiento y la activación de la cinasa ZAP-70 (104).

Para poder realizar otros ensayos funcionales con los receptores quiméricos, decidimos expresar nuestras quimeras en otra línea de células T cuyas características fueran más parecidas a los linfocitos T normales. Para ello, decidimos expresar las quimeras en la línea de linfocitos T humanos, Jurkat E6-1. Esta línea tiene el inconveniente de expresar en la superficie grandes cantidades de la molécula CD2 endógena, lo que no nos permitiría caracterizar la expresión de las quimeras mediante la tinción con anticuerpos contra el dominio extracelular de nuestras quimeras. Para esto decidimos utilizar el anticuerpo que reconoce el epítipo HA ubicado en el

extremo carboxilo-terminal de nuestra quimera (12CA5). Se comparó la expresión de las quimeras tanto en las líneas estables como en líneas que las expresan de manera transitoria. En ambos casos, la expresión de las quimeras fue menor que la expresión de las quimeras en el hibridoma murino. También se analizó la expresión mediante la tinción intracelular con el anticuerpo anti-HA acoplado a FITC, pero en estos ensayos no se pudo determinar la expresión dado que nuestro anticuerpo reconoce también alguna molécula presente de manera constitutiva en las células.

Se analizaron los patrones de fosforilación de las líneas estables en la línea E6-1 y se observó un incremento en la fosforilación como consecuencia de la estimulación con los anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3. Sin embargo este aumento se presenta tanto en la línea silvestre como en la que expresa nuestra quimera de la cadena TCR ζ , por lo que suponemos que este efecto se debe a la señalización a través del CD2 endógeno (105, 106). Este efecto se obtuvo también para la fosforilación de la cinasa Erk-1/2. Se observó también que la expresión de la quimera de CD4 aumenta los niveles basales de fosforilación, lo que sugiere que la presencia de CD4 en los microdominios puede estar facilitando la fosforilación de las proteínas presentes de manera constitutiva en estas regiones y por lo tanto mantener un estado de activación parcial de la vía de señalización (ver más adelante).

Utilizando estas células, se realizaron los ensayos de elevación de calcio intracelular después del entrecruzamiento extracelular e intracelular de las quimeras. Tanto en la línea E6-1 transfectada establemente con la quimera de la cadena TCR ζ , como en la que se co-expresa la quimera de CD4, el flujo de calcio intracelular obtenido fue de mayor intensidad y de mayor pendiente que el obtenido en las células E6-1 que carecen de la expresión de las quimeras. Este flujo de calcio es similar al flujo inducido por la estimulación con anticuerpos anti-CD3. El flujo

de calcio que se observa en las células control se debe a la cascada de señalización inducido por el CD2 endógeno y es un flujo cuya pendiente es menor. Estos resultados concuerdan con lo descrito en diversos trabajos anteriores que demuestran que la señalización a través del CD2 tras el entrecruzamiento con anticuerpos es capaz de inducir la activación de la PLC γ -1 y por lo tanto generar la elevación de calcio intracelular ((107, 108) y revisado en (109)). En estos ensayos se observó también un ligero flujo de calcio inducido por la estimulación de la quimera de la cadena TCR ζ , este flujo es más lento y más tardío, a diferencia del inducido por el anticuerpo anti-CD2. Esto concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio, donde se estimularon timocitos de ratones transgénicos para la quimera de la cadena TCR ζ (105).

Finalmente, las quimeras se expresaron de manera transitoria y estable en la línea Jurkat Tag. Los niveles de expresión de las líneas estables TagZ y TagCD4 se determinaron por la expresión en superficie del dominio CD2 humano. Como se observa en la figura 23, la expresión de nuestras quimeras es muy baja con respecto a la obtenida en las células By155.18.

Los ensayos de activación del factor de transcripción NF-AT demuestran que el entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ en las líneas que la expresan transitoriamente, por el anticuerpo anti-CD2 humano fue capaz de inducir la activación de NF-AT. En este caso, la estimulación con los dimerizadores FK1012 y AP1510 no fueron capaces de inducir la activación de NF-AT, a diferencia de resultados previos obtenidos por nuestro grupo (105), posiblemente debido a una menor expresión de las quimeras en las células transfectadas transitoriamente. En el caso de la quimera de CD4, no se observó activación de NF-AT como consecuencia del entrecruzamiento con el anticuerpo anti-CD2 o con los dimerizadores. Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente con este sistema (104). La baja activación de NFAT obtenida en líneas transitorias nos condujo a realizar los mismos ensayos en líneas estables Jurkat Tag, que

expresaban TCR ζ y CD4 respectivamente. El entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ , tanto con el anticuerpo anti-CD2 como con el dimerizador AP1510 en las líneas estables fue capaz de inducir una activación moderada de NF-AT. Los bajos niveles de NFAT obtenidos en nuestros ensayos puede deberse a una baja expresión de las quimeras, así como a la poca sensibilidad obtenida con este gen reportero. Actualmente se pretenden utilizar otros genes reporteros, como el gen de la luciferasa, cuya sensibilidad es mayor.

Uno de las limitaciones del sistema empleado en el presente trabajo, como se mencionó anteriormente, es el hecho de que los dimerizadores utilizados (FK1012 y AP1510) además de unirse a su ligando presente en los receptores quiméricos, puede también interactuar con las moléculas de FKBP-12 endógenas, abundantes en la célula (110), y de esta manera se podría diluir la acción entrecruzadora de los dimerizadores. Por ello, en nuestro laboratorio se están actualmente diseñando nuevos receptores quiméricos que contienen un nuevo ligando mutante, FKBP-12 (F36V), que solo es reconocido por un nuevo dimerizador AP20187. Con este sistema pretendemos continuar estudiando el papel de cada uno de los componentes del complejo TCR/CD3 y del co-receptor CD4 en el desarrollo y la activación de los linfocitos T.

Nuestros estudios no se han enfocado a investigar en detalle el papel de los microdominios de membrana en la señalización iniciada por el entrecruzamiento individual de receptores quiméricos. Se ha demostrado que las regiones transmembranales y /o extracelulares de receptores quiméricos podrían facilitar en menor y mayor grado el reclutamiento en los microdominios de membrana (74). Las características transmembranales que confieren la translocación a estos microdominios no se conocen, pero sabemos que en principio la región utilizada en nuestro estudio (la región transmembranal del CD2 humano), debería ser capaz de translocarse a los microdominios de membrana. Sin embargo la

permanencia estable en estas regiones podría requerir el inicio de la señal por un lado y la interacción con el citoesqueleto de actina por otro lado (111)(53), lo cual favorece la formación de la sinapsis inmunológica conduciendo a la activación completa del linfocito T. Estos estudios nos ayudarán a entender mejor la función de los receptores quiméricos.

X. Conclusiones

- 1) El entrecruzamiento de la quimera de la cadena TCR ζ por anticuerpos anti-CD2 humano es capaz de inducir
 - a. la fosforilación de la misma y de la cinasa ZAP-70 en la línea By155.18,
 - b. la liberación de calcio simulando el flujo generado al entrecruzar el complejo CD3 endógeno en la línea Jurkat E6-1
 - c. la activación del factor de transcripción NF-AT y por lo tanto, completar la vía de señalización del TCR pero en un menor grado en comparación con la estimulación de todo el complejo.
- 2) La expresión de la quimera de CD4 en las líneas de la quimera de la cadena TCR ζ , es capaz de incrementar la fosforilación de la quimera de la cadena TCR ζ , sin tener efecto en eventos más tardíos en la activación como el flujo de calcio o la activación de factores de transcripción.
- 3) El entrecruzamiento de la quimera de CD4 en las líneas estables, es capaz de:
 - a. inducir un nivel de fosforilación basal mayor en la célula, en comparación con la línea silvestre, como se observa en los lisados totales y en la fosforilación de la cinasa Erk-1.
 - b. generar un flujo de calcio mayor al obtenido en la línea silvestre por el CD2 endógeno.
- 4) El entrecruzamiento de la quimera de CD4 no es capaz de activar factores de transcripción.

XI. Bibliografia

1. Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593.
2. Magor, B. G., and K. E. Magor. 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev Comp Immunol* 25:651.
3. Campbell, K. S., B. T. Backstrom, G. Tiefenthaler, and E. Palmer. 1994. CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Semin Immunol* 6:393.
4. Bentley, G. A., and R. A. Mariuzza. 1996. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 14:563.
5. von Boehmer, H., and H. J. Fehling. 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15:433.
6. Fehling, H. J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, and H. von Boehmer. 1995. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375:795.
7. Irving, B. A., F. W. Alt, and N. Killeen. 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905.
8. Aifantis, I., C. Borowski, F. Gounari, H. D. Lacorazza, J. Nikolich-Zugich, and H. von Boehmer. 2002. A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development. *Nat Immunol* 3:483.
9. Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman, and C. Terhorst. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6:629.
10. Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263.
11. Weiss, A. 1993. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73:209.
12. Janeway, C. A., Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645.
13. Salter, R. D., A. M. Norment, B. P. Chen, C. Clayberger, A. M. Krensky, D. R. Littman, and P. Parham. 1989. Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 338:345.
14. Maddon, P. J., S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmerman, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess, and R. Axel. 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9155.
15. Konig, R., S. Fleury, and R. N. Germain. 1996. The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 205:19.
16. Wu, H., P. D. Kwong, and W. A. Hendrickson. 1997. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 387:527.
17. Sakihama, T., A. Smolyar, and E. L. Reinherz. 1995. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6444.
18. Konig, R. 2002. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 14:75.

19. Luescher, I. F., E. Vivier, A. Layer, J. Mahiou, F. Godeau, B. Malissen, and P. Romero. 1995. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 373:353.
20. Garcia, K. C., C. A. Scott, A. Brunmark, F. R. Carbone, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 384:577.
21. Shaw, A. S., K. E. Amrein, C. Hammond, D. F. Stern, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59:627.
22. Shaw, A. S., J. Chalupny, J. A. Whitney, C. Hammond, K. E. Amrein, P. Kavathas, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1990. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 10:1853.
23. Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60:755.
24. Wiest, D. L., L. Yuan, J. Jefferson, P. Benveniste, M. Tsokos, R. D. Klausner, L. H. Glimcher, L. E. Samelson, and A. Singer. 1993. Regulation of T cell receptor expression in immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J Exp Med* 178:1701.
25. Bosselut, R., W. Zhang, J. M. Ashe, J. L. Kopacz, L. E. Samelson, and A. Singer. 1999. Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J Exp Med* 190:1517.
26. Itano, A., P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella, and E. Robey. 1996. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 183:731.
27. Robey, E., and B. J. Fowlkes. 1994. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 12:675.
28. Samelson, L. E., M. D. Patel, A. M. Weissman, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46:1083.
29. June, C. H., M. C. Fletcher, J. A. Ledbetter, and L. E. Samelson. 1990. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 144:1591.
30. Abraham, N., and A. Veillette. 1990. Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Mol Cell Biol* 10:5197.
31. Burns, C. M., K. Sakaguchi, E. Appella, and J. D. Ashwell. 1994. CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of src family kinases. *J Biol Chem* 269:13594.
32. Iwashima, M., B. A. Irving, N. S. van Oers, A. C. Chan, and A. Weiss. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263:1136.
33. Wange, R. L., and L. E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197.

34. Chan, A. C., B. A. Irving, J. D. Fraser, and A. Weiss. 1991. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9166.
35. Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, and A. Weiss. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649.
36. van Oers, N. S., and A. Weiss. 1995. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Semin Immunol* 7:227.
37. Hatada, M. H., X. Lu, E. R. Laird, J. Green, J. P. Morgenstern, M. Lou, C. S. Marr, T. B. Phillips, M. K. Ram, K. Theriault, and et al. 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 377:32.
38. Isakov, N., R. L. Wange, W. H. Burgess, J. D. Watts, R. Aebersold, and L. E. Samelson. 1995. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 181:375.
39. Chan, A. C., M. Dalton, R. Johnson, G. H. Kong, T. Wang, R. Thoma, and T. Kurosaki. 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *Embo J* 14:2499.
40. Couture, C., G. Baier, C. Oetken, S. Williams, D. Telford, A. Marie-Cardine, G. Baier-Bitterlich, S. Fischer, P. Burn, A. Altman, and et al. 1994. Activation of p56lck by p72syk through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14:5249.
41. Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A. C. Chan, and D. Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435.
42. Leo, A., and B. Schraven. 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr Opin Immunol* 13:307.
43. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83.
44. Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade, and L. E. Samelson. 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 275:23355.
45. Wunderlich, L., A. Farago, J. Downward, and L. Buday. 1999. Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29:1068.
46. Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* 13:339.
47. Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis. 1999. Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Sci STKE* 1999:PE1.
48. Rincon, M., R. A. Flavell, and R. J. Davis. 2001. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20:2490.
49. Scharenberg, A. M., and J. P. Kinet. 1998. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* 94:5.
50. Debnath, J., M. Chamorro, M. J. Czar, E. M. Schaeffer, M. J. Lenardo, H. E. Varmus, and P. L. Schwartzberg. 1999. rlk/TXK encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. *Mol Cell Biol* 19:1498.

51. Schaeffer, E. M., J. Debnath, G. Yap, D. McVicar, X. C. Liao, D. R. Littman, A. Sher, H. E. Varmus, M. J. Lenardo, and P. L. Schwartzberg. 1999. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* 284:638.
52. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707.
53. Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386:855.
54. Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497.
55. Altman, A., T. Mustelin, and K. M. Coggeshall. 1990. T lymphocyte activation: a biological model of signal transduction. *Crit Rev Immunol* 10:347.
56. Baier-Bitterlich, G., F. Uberall, B. Bauer, F. Fresser, H. Wachter, H. Grunicke, G. Utermann, A. Altman, and G. Baier. 1996. Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 16:1842.
57. Avraham, A., S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, and Y. Ben-Neriah. 1998. Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:2320.
58. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240.
59. Khoshnan, A., D. Bac, C. A. Tindell, and A. E. Nel. 2000. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165:6933.
60. Donnadieu, E., G. Bismuth, and A. Trautmann. 1994. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol* 4:584.
61. Shaw, A. S., and M. L. Dustin. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6:361.
62. Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221.
63. Bubeck Wardenburg, J., R. Pappu, J. Y. Bu, B. Mayer, J. Chernoff, D. Straus, and A. C. Chan. 1998. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9:607.
64. Wu, J., D. G. Motto, G. A. Koretzky, and A. Weiss. 1996. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 4:593.
65. Nobes, C. D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53.
66. Nobes, C. D., and A. Hall. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23:456.
67. Rottner, K., A. Hall, and J. V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9:640.
68. Hoichin, N. A., and A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 131:1857.

69. Acuto, O., and D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18:165.
70. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31.
71. Creusot, R. J., N. A. Mitchison, and N. M. Terazzini. 2002. The immunological synapse. *Mol Immunol* 38:997.
72. van Der Merwe, P. A., and S. J. Davis. 2002. Immunology. The immunological synapse--a multitasking system. *Science* 295:1479.
73. van der Merwe, P. A. 2002. Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14:293.
74. Cherukuri, A., M. Dykstra, and S. K. Pierce. 2001. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 14:657.
75. Blackman, M., J. Kappler, and P. Marrack. 1990. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248:1335.
76. Sebзда, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann, and P. S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17:829.
77. Spits, H. 2002. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2:760.
78. Nossal, G. J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229.
79. Singer, A., R. Bosselut, and A. Bhandoola. 1999. Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol* 11:273.
80. Basson, M. A., and R. Zamoyska. 2000. The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways. *Immunol Today* 21:509.
81. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309.
82. Allman, D., J. C. Aster, and W. S. Pear. 2002. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* 187:75.
83. von Boehmer, H., and P. Kisielow. 1993. Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell* 73:207.
84. Seong, R. H., J. W. Chamberlain, and J. R. Parnes. 1992. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* 356:718.
85. Basson, M. A., U. Bommhardt, P. J. Mee, V. L. Tybulewicz, and R. Zamoyska. 1998. Molecular requirements for lineage commitment in the thymus--antibody-mediated receptor engagements reveal a central role for lck in lineage decisions. *Immunol Rev* 165:181.
86. Hedrick, S. M., and L. L. Sharp. 1998. T-cell fate. *Immunol Rev* 165:95.
87. Hernandez-Hoyos, G., S. J. Sohn, E. V. Rothenberg, and J. Alberola-Ila. 2000. Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* 12:313.
88. Bommhardt, U., M. A. Basson, U. Krummrei, and R. Zamoyska. 1999. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* 163:715.
89. Goodbourn, S. 1995. Signal transduction. Notch takes a short cut. *Nature* 377:288.
90. Robey, E. 1999. Regulation of T cell fate by Notch. *Annu Rev Immunol* 17:283.
91. Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster, and P. Salmon. 1996. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87:483.

92. Kim, H. K., and G. Siu. 1998. The notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. *Mol Cell Biol* 18:7166.
93. Leung, R. K., K. Thomson, A. Gallimore, E. Jones, M. Van den Broek, S. Sierro, A. R. Alsheikhly, A. McMichael, and A. Rahemtulla. 2001. Deletion of the CD4 silencer element supports a stochastic mechanism of thymocyte lineage commitment. *Nat Immunol* 2:1167.
94. Heldin, C. H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213.
95. Hai, T., and T. Curran. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3720.
96. Irving, B. A., and A. Weiss. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64:891.
97. Letourneur, F., and R. D. Klausner. 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255:79.
98. Spencer, D. M., T. J. Wandless, S. L. Schreiber, and G. R. Crabtree. 1993. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 262:1019.
99. Pruschy, M. N., D. M. Spencer, T. M. Kapoor, H. Miyake, G. R. Crabtree, and S. L. Schreiber. 1994. Mechanistic studies of a signaling pathway activated by the organic dimerizer FK1012. *Chem Biol* 1:163.
100. Reich, Z., J. J. Boniface, D. S. Lyons, N. Borochoy, E. J. Wachtel, and M. M. Davis. 1997. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 387:617.
101. Love, P. E., and E. W. Shores. 2000. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 12:591.
102. Amara, J. F., T. Clackson, V. M. Rivera, T. Guo, T. Keenan, S. Natesan, R. Pollock, W. Yang, N. L. Courage, D. A. Holt, and M. Gilman. 1997. A versatile synthetic dimerizer for the regulation of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10618.
103. Leitenberg, D., F. Balamuth, and K. Bottomly. 2001. Changes in the T cell receptor macromolecular signaling complex and membrane microdomains during T cell development and activation. *Semin Immunol* 13:129.
104. Soldevila, G., C. Castellanos, M. Malissen, and L. J. Berg. 2001. Analysis of the Individual Role of the TCRzeta Chain in Transgenic Mice after Conditional Activation with Chemical Inducers of Dimerization. *Cell Immunol* 214:123.
105. Meinel, E., D. Lengenfelder, N. Blank, R. Pirzer, L. Barata, and C. Hivroz. 2000. Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J Immunol* 165:3578.
106. Martelli, M. P., H. Lin, W. Zhang, L. E. Samelson, and B. E. Bierer. 2000. Signaling via LAT (linker for T-cell activation) and Syk/ZAP70 is required for ERK activation and NFAT transcriptional activation following CD2 stimulation. *Blood* 96:2181.
107. Pantaleo, G., D. Olive, A. Poggi, W. J. Kozumbo, L. Moretta, and A. Moretta. 1987. Transmembrane signalling via the T11-dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. *Eur J Immunol* 17:55.
108. Weiss, M. J., J. F. Daley, J. C. Hodgdon, and E. L. Reinherz. 1984. Calcium dependency of antigen-specific (T3-Ti) and alternative (T11) pathways of human T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6836.

109. Bierer, B. E., and W. C. Hahn. 1993. T cell adhesion, avidity regulation and signaling: a molecular analysis of CD2. *Semin Immunol* 5:249.
110. Schreiber, S. L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251:283.
111. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422.