



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**Determinación del Papel de CD5 en el Desarrollo Tímico y su Posible Participación
en la Generación de Células T Reguladoras.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:
DIANA ANGÉLICA ORDOÑEZ RUEDA**

TUTORA RESPONSABLE: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

MÉXICO, D.F.,

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*Dedico este trabajo a mis padres
Carlos Julio Ordoñez y Ninfa Rueda.*

*A mis hermanos
Carlos Mauricio y Diego Alejandro.*

*Y de manera especial a mi abuelita
Rosa Delia Gualdrón.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi tutora la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por todo su apoyo y dedicación como tutora.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por concederme el apoyo económico para realizar mi doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Vianney Ortiz y Dra. Laura Bonifaz.

A los miembros de mi jurado de grado: Dr. Arturo Edgar Zenteno, Dr. Enrique Ortega, Dra. Laura Bonifaz, Dr. César González y Dr. Leopoldo Santos, por tomarse el tiempo para leer y corregir esta tesis.

Al biólogo Jesús Ramsés Chávez Ríos por su apoyo técnico durante la realización de todo mi doctorado.

A la Dra. Adelaida Sarukhan Casamitjana por sus buenos consejos.

A mis compañeros del laboratorio: Karen, Paula, Ramsés, Germán, Nelly y Xóchitl.

A mis amigos Anita, Lupe, Julio, Maite, Gustavo y Erick por todo su apoyo y comprensión.

A Miguelito por sus enseñanzas, por los buenos vinos y los dulces momentos.

A la señora Leticia y al señor Cuauhtémoc por su amor y dedicación y por fungir como mis padres aquí en México.

Por último a Fernando Villa gracias por compartir conmigo los días azules y los grises.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo de los Linfocitos T	1
Ontogenia del timo	3
Células epiteliales tímicas	3
Proceso de desarrollo	4
Elección CD4 versus CD8	11
Quimiocinas y desarrollo de las células T	13
Papel de Notch en el desarrollo de las células T	14
Lineaje α/β versus γ/δ	15
Desarrollo de otros lineajes celulares	16
2. Células T Reguladoras	16
Desarrollo de las células T reguladoras	17
Localización tímica	20
Mecanismos de supresión	21
Inducción de células T reguladoras en periferia	22
3. CD5	23
Estructura	23
Regulación transcripcional	24
Expresión y función	26
Señalización	28
Ligandos	32
CD5 y el reconocimiento antigénico	34
II. JUSTIFICACIÓN	35
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
V. RESULTADOS	40
Expresión de CD5 en células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	41
Análisis de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ en ratones deficientes de CD5	42
Determinación de poblaciones tímicas en ratones deficientes de CD5	44
Análisis de apoptosis celular en timocitos deficientes de CD5	45
Señalización intracelular del TCR en ausencia de CD5	50
Origen de las células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	52

Análisis de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ en nódulos linfoides	56
Determinación de la capacidad supresora de las células T reguladoras	57
VI. DISCUSIÓN	59
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. PERSPECTIVAS	62
IX. BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

La población de células T reguladoras mejor caracterizadas son las llamadas células T reguladoras naturales c, un subgrupo de células T CD4+, que expresan CD25, CD62, CTLA-4, GITR y el factor de transcripción Foxp3. Las nTregs juegan un papel crucial en la inducción de tolerancia inmunológica y la prevención de autoinmunidad. Modelos transgénicos para el receptor de célula T (TCR) indican que las células T reguladoras antígeno específicas se seleccionan bajo interacciones de alta avididad, en presencia de su péptido agonista. CD5 es una glicoproteína de superficie de 67 kDa, involucrada en modular las señales inducidas por el TCR actuando como regulador negativo durante el desarrollo de los timocitos. Se sugiere que CD5 podría rescatar de la selección negativa a timocitos que expresan TCRs de alta afinidad, entre los cuales podrían encontrarse células comprometidas al linaje regulador. Nosotros decidimos investigar el papel de CD5 en la selección y función de las nTregs. Postulamos que la deficiencia de CD5 afectara la selección de las células T reguladoras, incrementando o disminuyendo su porcentaje y número absoluto. Se analizó la expresión de CD5 en las nTregs de timo y periferia, así como la presencia de esta subpoblación en ratones silvestres y deficientes de CD5. El origen y la actividad supresora de las nTregs se determinaron mediante cultivos de timos fetales y ensayos de supresión, respectivamente. Por último se analizó la fosforilación de moléculas (ERK1/2, p-Cbl, PI3K-AKT) implicadas en las señales del TCR en células nTregs derivadas del timo. Se observó un incremento en la expresión de CD5 en nTregs de timo y ganglios linfáticos. Los resultados obtenidos indican timo y ganglio de ratones deficientes de CD5 muestran un incremento en el porcentaje y números absolutos de las nTregs. Este efecto es acompañado por un incremento en la apoptosis de las células T naive de estos ratones y correlaciona con un bloqueo en la fosforilación de AKT. Las nTregs generadas en los ratones deficientes de CD5 son funcionales y derivan del timo. Concluimos que la ausencia de CD5 genera un enriquecimiento de nTregs derivadas de timo, acompañado por la apoptosis preferencial de las células naive mientras las nTregs

se mantienen resistentes a la muerte celular. Finalmente, CD5 no es requerido para la actividad supresora de las nTregs.

ABSTRACT

It has been suggested that high affinity/avidity interactions are required for the thymic selection of naturally occurring regulatory T cells. Here, we investigated the role of CD5, a negative regulator of T Cell Receptor signaling, in the selection and function of nTregs. Analysis of CD5^{-/-} mice showed a significant increase in the percentage and absolute numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ thymocytes and peripheral T lymphocytes, compared to Balb/c mice. Thymi from CD5^{-/-} mice showed reduced cellularity due to increased apoptosis, which preferentially affected naive T cells. To characterize nTreg selection at the molecular level we investigated the phosphorylation of Erk, c-Cbl, PI3K and Akt. CD5^{-/-} nTregs showed increased basal levels of p-Erk compared to wild type nTregs. Interestingly, in response to CD3 plus CD28 costimulation, CD5^{-/-} naive T cells but not CD5^{-/-} nTregs, showed lower levels of p-Akt. Finally, CD5^{-/-} nTregs were thymus-derived and fully functional. We conclude that the enrichment of nTregs observed in the absence of CD5 signaling is due to *de novo* generation of nTregs and to selective reduction of CD4⁺CD25⁻ naive thymocytes. Furthermore, we provide new evidence supporting a potential role of CD5 in thymocyte survival, through a mechanism that may involve the phosphorylation of Akt.

I. INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo de los Linfocitos T

La mayoría de los lineajes de células hematopoyéticas maduran en la médula ósea, sin embargo, el desarrollo de las células T ocurre en un órgano linfoide primario llamado timo. El timo está anatómicamente dividido en corteza, donde la diferenciación toma lugar y en médula, donde las células recién generadas terminan de madurar antes de salir a poblar los órganos linfoides periféricos (1). (Figura 1).

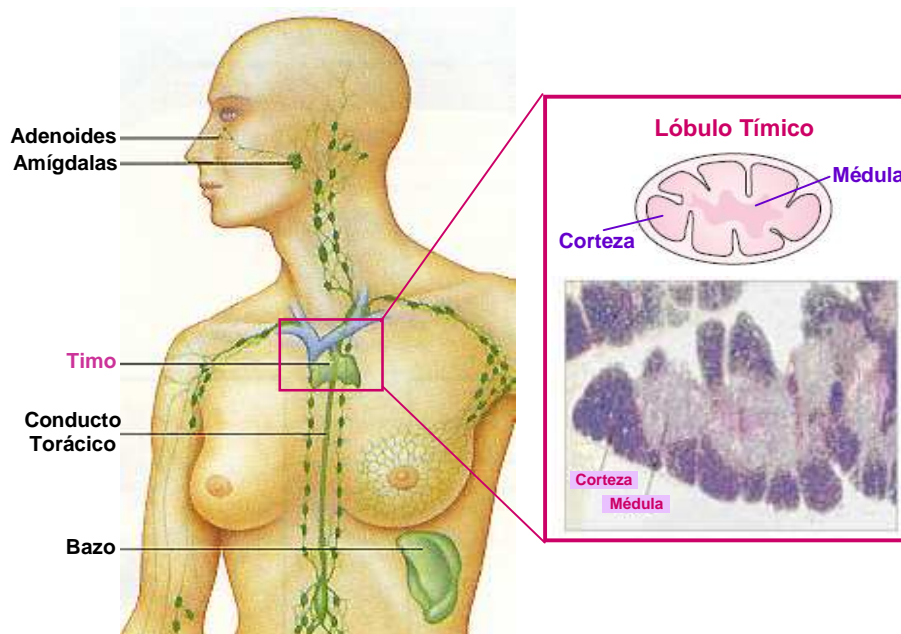


Figura 1. Timo. Órgano bilobulado situado en el mediastino anterior. En el dibujo esquemático y la micrografía de microscopía óptica se muestran las regiones especializadas del timo; la corteza y la médula tímica. Modificado de Abbas, 2002.

El desarrollo inicia cuando progenitores linfoides provenientes médula ósea o hígado fetal entran al timo donde gracias a interacciones con células del estroma y a diversos factores solubles, se diferencian a células T maduras, que expresan un receptor antigénico funcional conocido como receptor de la célula T (TCR). Entre los lineajes celulares que pueden ser generados en el timo se encuentran; células T α/β , células T γ/δ , células T reguladoras y células T naturales asesinas (NKT) (2).

El desarrollo tímico es un proceso altamente regulado durante el cual varios puntos de control funcionan para limitar la producción de células que expresen TCRs no funcionales o autorreactivos. Este proceso se caracteriza por la expresión de moléculas específicas en la superficie de los timocitos o células T inmaduras, entre las cuales la expresión de los correceptores CD4 y CD8 identifican los principales estadios del desarrollo de los timocitos: doble negativo (DN, CD4⁻CD8⁻), doble positivo (DP, CD4⁺CD8⁺) y simple positivo (SP, CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺).

Los timocitos DN representan el subgrupo más inmaduro de timocitos. La expresión y señalización de un receptor inmaduro, llamado pre-TCR, permite la transición al estadio doble positivo, durante el cual los timocitos co-expresan CD4 y CD8 y expresan por primera vez un TCR maduro. La interacción de este receptor con péptidos endógenos expresados por células del estroma tímico, en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), da lugar a tres procesos de selección: selección positiva, selección negativa y elección de lineaje CD4/CD8. El resultado de estos procesos es la generación de timocitos simples positivos maduros CD4 o CD8, que tras su salida a los órganos linfoides secundarios se convertirán en células efectoras colaboradoras o citotóxicas, respectivamente.

Cada uno de los eventos de maduración ocurre en regiones definidas del timo y comprende interacciones con células residentes que se encuentran en esas regiones anatómicas. Los timocitos DN migran de la región cortico-medular a la región subcapsular donde progresan hasta el estadio DP, una vez se diferencian al estadio DP se dirigen a la corteza tímica donde interactúan con las células epiteliales corticales. Por último, los timocitos seleccionados positivamente en corteza, se mueven hacia la médula tímica, donde ocurre la selección negativa mediada principalmente por las células epiteliales medulares y por las células dendríticas. Defectos en la arquitectura tímica o en la migración de los timocitos conllevan a deficiencias en su desarrollo, indicando que el movimiento de los timocitos a través del timo es de vital importancia para los procesos de selección.

Ontogenia del timo

Durante la embriogénesis murina, el primordio tímico se genera a partir del tercer saco faríngeo endodérmico entre los días embrionarios E10.5 y E11.5 y requiere la acción coordinada de los factores de transcripción Hoxa3, Pax1, Pax 9, Eya 1 y Six 1, que participan en los procesos de posicionamiento, iniciación y diferenciación del primordio (3). El primordio tímico recién formado carece de las regiones histológicamente definidas como corteza y médula, y se compone principalmente de progenitores tímicos epiteliales que entran a través de la región córtico-medular mediante mecanismos quimio-atrayentes (4). Entre estos se encuentran células progenitoras del epitelio tímico (TEPC) con fenotipo MTS20⁺MTS24⁺, que además expresan las citoqueratinas K5 y K8 (5).

La diferenciación de las TEPCs da lugar a la generación de las células epiteliales de corteza y médula (6) y requiere de manera particular del factor transcripcional Foxn1 (7). Ratones deficientes de Foxn1, denominados ratones desnudos, presentan un bloqueo en el desarrollo de las células tímicas epiteliales, que afecta la generación de las células T y produce a su vez inmunodeficiencias severas (8-10), indicando que éstas son esenciales para el desarrollo de las células T. Por otro lado, el establecimiento de las regiones corticales y medulares del timo requiere de interacciones entre células tímicas epiteliales inmaduras y timocitos en desarrollo (11), los timocitos proporcionan señales que participan en la diferenciación y organización de las células epiteliales del timo (12,13), fenómeno conocido como “crosstalk” (12).

Células epiteliales tímicas y su papel en desarrollo

Células tímicas corticales

Las células tímicas epiteliales corticales (cTECs) se caracterizan por la expresión de la molécula de adhesión de célula epitelial 1 (EpCAM1) y por la expresión de Ly51. Una característica funcional importante de estas células es su participación en la selección positiva de los timocitos mediante la expresión de moléculas MHC I y MHC II (13). Existe evidencia que sugiere que las células corticales poseen mecanismos de procesamiento y presentación antigénica particularmente distintos a los presentes en células tímicas

medulares y células dendríticas (DCs), que podrían influenciar su habilidad para mediar la selección positiva (14).

Células tímicas medulares

La médula tímica provee de un micro-ambiente especializado que facilita la remoción de timocitos que expresan TCRs auto-reactivos, proceso conocido como selección negativa. Este micro-ambiente está compuesto de timocitos medulares, células dendríticas, macrófagos y células epiteliales medulares.

Existe un interés particular en las células epiteliales medulares (mTECs) por su capacidad de expresar diversos grupos de genes que codifican antígenos tejido-específicos (15). El factor clave en este proceso es el factor transcripcional AIRE, que controla la expresión de antígenos periféricos en timo, permitiendo el establecimiento de tolerancia hacia antígenos periféricos. Su deficiencia causa autoinmunidad órgano-específico en ratones y humanos (16-18) y anomalías en las células epiteliales medulares (19), indicando que también podría contribuir a su diferenciación.

Proceso de desarrollo

La población de timocitos DN es dividida en cuatro estadios sucesivos de diferenciación con base en la expresión de CD44 y CD25: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻) (20, 21). Los progenitores intratímicos más tempranos conocidos como progenitores tímicos tempranos (ETP) se encuentran dentro del subgrupo DN1. Esta población se define por su habilidad para proliferar ampliamente y su capacidad para generar poblaciones celulares de los lineajes α/β , γ/δ , (22), células dendríticas y células naturales asesinas (NKs), esta población también conserva cierto potencial de diferenciación mieloide y hacia el linaje B (23).

La expresión de CD25 en las timocitos DN1 da lugar a la progresión al estadio DN2 que se caracteriza por su activa proliferación y porque, al igual que los progenitores DN1, conservan potencial hacia los lineajes de células dendríticas y NKs (23).

El compromiso al linaje T ocurre en el estadio DN3, y está acompañado por la reducción en la expresión de CD44. Durante este estadio ocurre el rearreglo de los loci TCR β ,

TCR γ y TCR δ , mediados por los genes activadores de recombinación (RAG) (24-26). Se postula que los dos lineajes de células T α/β , y γ/δ divergen en este estadio y aunque los detalles precisos del proceso de compromiso no se encuentran del todo claros, está generalmente aceptado que señales que derivan del ensamblaje correcto del receptor, son requeridas para la supervivencia y diferenciación a lo largo de cada lineaje. Para las células γ/δ , es el complejo $\gamma/\delta/CD3$ y para la células que se diferencian hacia el lineaje α/β , es el pre-receptor de la célula T o pre-TCR (27).

Los timocitos DN3 que se diferencian al lineaje α/β , expresan una cadena TCR β funcional que se asocia con una cadena invariante pre-TCR α (pT α) y el complejo CD3 para formar el pre-TCR. La señalización mediada por el pre-TCR rescata de la apoptosis, de la expansión celular intensa, detiene la recombinación del locus β (exclusión alélica) y media la diferenciación al estadio doble positivo, proceso conocido como selección β (28). El rol crítico de la formación del pre-TCR en el desarrollo del lineaje α/β está evidenciado por el arresto en el desarrollo de los timocitos en el estadio DN3, que se observa en ratones deficientes para Rag1, Rag2 o algunos de los componentes del complejo pre-TCR (29).

Durante la transición al estadio doble positivo inducido por el pre-TCR, los timocitos disminuyen la expresión de CD25, (estadio DN4) y progresan de forma breve a un estadio intermedio CD8⁺ denominado inmaduro simple positivo (ISP), tras el cual ocurre la diferenciación al estadio doble positivo (29).

La mayoría de los timocitos DP expresan un TCR en superficie pero permanecen en un estado indiferenciado, con una alta expresión de la recombinasa RAG, esto les permite diferentes rearrreglos de la cadena TCR α que son probados en busca de un apareo exitoso con la cadena TCR β ya rearrreglada (27). Alrededor del 90% de los timocitos DP expresan TCRs que interactúan de manera débil con los complejos péptido-MHC disponibles, de manera que las señales intracelulares requeridas para mantener su viabilidad no son generadas, dando lugar la muerte por negligencia (30, 31).

Los timocitos DP pueden ser rescatados por interacciones de avidéz intermedia entre el TCR y complejo péptido-MHC, mediante el proceso de selección positiva. Las células seleccionadas positivamente producen señales que resultan en la represión de los genes

RAG, supervivencia, migración hacia la médula y diferenciación hacia el estadio SP (32). De manera contraria, los timocitos que establecen interacciones de alta avidéz con los péptidos endógenos son deletados mediante selección negativa, un proceso que constituye el principal mecanismo de tolerancia central que asegura la eliminación de la mayoría de los timocitos autorreactivos (30, 31).(Figura 2).

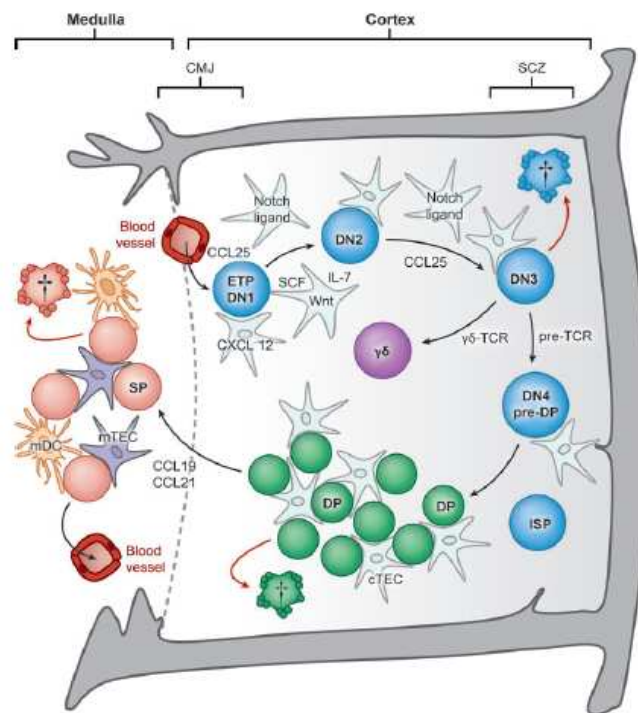


Figura 2. Desarrollo de células T en el timo. El proceso de desarrollo inicia con la entrada de progenitores al timo por vénulas del endotelio alto (HEV). Los progenitores se diferencian a lo largo de 3 estadios identificados por la expresión de los coreceptores CD4 y CD8. (DN, $CD4^+CD8^-$, DP $CD4^+CD8^+$ y SP $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$). En los timocitos DN3 ocurre la señalización del pre-TCR, que finaliza en la expresión de un TCR maduro en la subpoblación DP. En este estadio ocurren los procesos de muerte por negligencia, selección positiva, compromiso a linaje CD4/CD8 y selección negativa, estos procesos dependen de la avidéz de la interacción del TCR con péptidos acoplados a moléculas MHC, expresados por células epiteliales tímicas. Factores solubles derivados del timo también participan en las diferentes etapas del desarrollo. Modificado de Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2007.

Señales mediadas por el TCR

Los procesos de selección positiva y negativa, así como el compromiso hacia CD4 o CD8, requiere de las señales inducidas por la interacción del TCR con los complejos péptido-MHC. Una de las grandes preguntas referentes al desarrollo de las células T, es como las señales a través de un mismo receptor pueden generar respuestas funcionales tan opuestas como muerte y diferenciación (27). Para entender como el mismo TCR es capaz de inducir diferentes procesos de selección, es necesario entender las vías de señalización inducidas por su entrecruzamiento (33). (Figura 3).

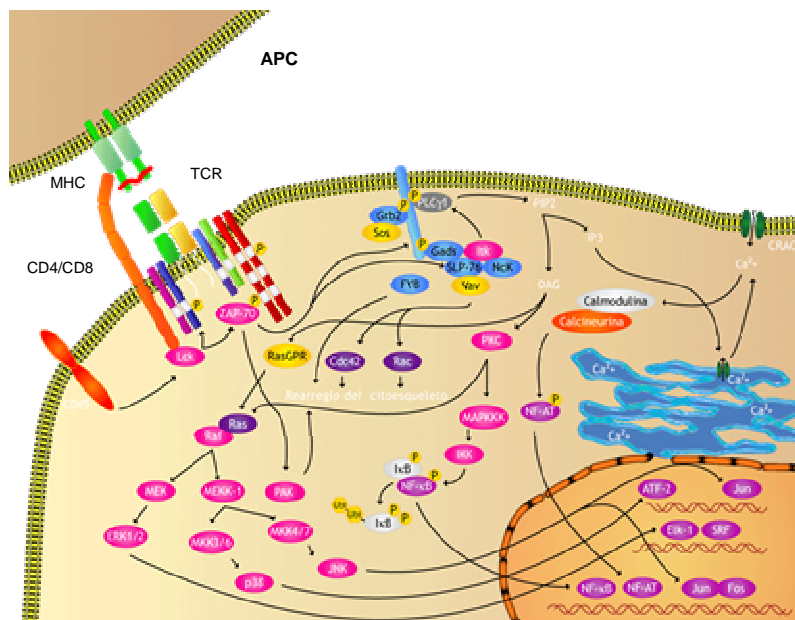


Fig. 3. Señalización del TCR. La interacción del complejo MHC-péptido-TCR desencadena la activación de diferentes vías intracelulares que promueven la transcripción y expresión de genes involucrados en supervivencia, proliferación, diferenciación y apoptosis. Las principales vías son; MAP cinasas, movilización de calcio y re-arreglo de citoesqueleto. Modificado de Lin y Weiss, 2001.

El reconocimiento antigénico, da lugar a la activación de la proteína cinasa específica de linfocitos Lck que se encuentra asociada al complejo TCR-CD3 así como a la cola citoplásmica de los coreceptores CD4 y CD8 (34-36). Una vez activada, Lck fosforila a los motivos de activación del inmunoreceptor vía tirosina (ITAMs), presentes en los dominios citoplásmicos de las cadenas del complejo CD3 [77; 78; 79]. La fosforilación de éstos motivos permite el reclutamiento de la cinasa ZAP-70 (37, 38), que es a su vez

fosforilada y activada por Lck. Una vez activa ZAP-70, fosforila a la proteína adaptadora LAT (39), que recluta otras proteínas adaptadoras y efectoras, activando tres importantes cascadas de señalización; la vía de las MAP cinasas (MAPK), la movilización de calcio y el rearrreglo del citoesqueleto (40). El resultado final de estas rutas de señalización es la activación de factores de transcripción que dan lugar a la expresión de génica, diferenciación y activación celular.

La vía de las MAP cinasas comprende fosforilaciones seriadas en residuos de tirosina, serina o treonina o solo en residuos de serina y treonina, mediadas por diversas proteínas cinasas. El reclutamiento del factor intercambiador de guanina (GEF) Sos, a través de la proteínas Grb2 (unida a LAT), da inicio a la activación de la vía. Una vez en membrana Sos activa a Ras (una pequeña GTPasa), que interactúa y activa a Raf-1 (MAPKKKs), la primera cinasa de la vía. Raf-1 fosforila y activa a MEK 1 y 2 (MAPKKs), éstas a su vez activan a las MAP cinasas ERK 1 y 2. Por otro lado, MEK 3,4 y 6 pueden activar a la MAP cinasa p38, mientras MEK 4 y 7 activan a JNK. Una vez activadas, las MAP cinasas ERK, JNK y p38, pueden entrar al núcleo y fosforilar los factores de transcripción; Ets, Elk-1, NFAT y el complejo AP-1 (Fos-Jun) entre otros (41).

La movilización de calcio, inicia con la activación de la fosfolipasa ($PLC\gamma$ -1), que es reclutada a la membrana mediante su interacción con LAT. Este reclutamiento facilita su activación por Lck, ZAP-70 y otras cinasas como Itk y Rlk (42-44). Una vez activada $PLC\gamma$ -1 hidroliza fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ($PI(4,5)P_2$) en fosfatidil inositol 1,4,5, tri-fosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (45). IP_3 es un segundo mensajero que interactúa con receptores (IP_3R 1,2 y 3) presentes en la membrana del retículo endoplásmico (ER) permitiendo la liberación de calcio de depósitos intracelulares.

El incremento de calcio citoplásmico activa la serina-treonina fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina, que desfosforila al factor transcripcional NF-AT, permitiendo su entrada a núcleo y activando la transcripción de genes específicos (45, 46). Por otro lado, el DAG recluta a RasGRP, un GEF de Ras, que a su vez activa Ras y la vía de las MAP cinasas (47).

Otro de los eventos importantes en la señalización del TCR es el rearrreglo del citoesqueleto, involucrado en mantener la estabilidad de la interacción TCR-péptido-MHC favoreciendo la formación de una sinapsis inmunológica madura (48, 49).

Selección positiva

La selección positiva es iniciada por el entrecruzamiento del TCR con complejos péptido-MHC de baja afinidad que son presentados por las células epiteliales de la corteza tímica. Varios componentes estructurales del TCR son requeridos en este proceso; ratones deficientes de la cadena TCR α no se desarrollan más allá del estadio DP, el rol de otros componentes como; TCR β , CD3 γ , CD3 ϵ y CD3 ζ en la selección positiva es más difícil de estudiar dado que la deficiencia de estos genes resulta en bloqueos tempranos del desarrollo (50-54). De manera interesante la deficiencia de CD3 δ no afecta la generación de DPs pero bloquea la selección positiva (55).

Un tema de vital importancia en el proceso de selección positiva es la naturaleza del ligando. Se sabe que la afinidad del TCR por el ligando de selección positiva es menor que para ligandos que inducen selección negativa (56-58). Varios estudios estructurales indican que los péptidos propios involucrados en la selección positiva son de baja afinidad, poco abundantes y están estructuralmente relacionados con péptidos antigénicos. Esto da lugar a la generación de células T maduras, que tienen alta afinidad por péptidos extraños, que generalmente están relacionados estructuralmente a los péptidos propios involucrados en la selección (27).

Selección negativa

Mientras la supervivencia de los timocitos es el resultado de la selección positiva, la selección negativa asegura la eliminación de los timocitos que reconocen antígenos propios con alta avidéz.

Existen dos vías de señalización implicadas en la inducción de apoptosis durante la selección negativa. La primera vía incluye receptores de superficie como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la molécula Fas, que contienen dominios de muerte asociados a Fas (59). Aunque muchos estudios muestran que las interacciones Fas-FasL

no son necesarias para la selección negativa, es aceptado que juegan un papel importante en casos de altas dosis de antígeno (60).

La segunda vía implica la activación de miembros de la familia de Bcl-2 y la subsiguiente activación de caspasa 9 (61). En esta vía el citocromo C que es liberado de mitocondria se une al factor (APAF-1) y activa a la caspasa 9 (62). La caspasa 9 inicia una cascada de activación y clivaje de otras caspasas, que resulta en la muerte celular.

Además del entrecruzamiento del TCR, la delección clonal requiere de factores co-estimuladores que son proveídos por células estromales (63, 64). La molécula CD28 proporciona señales co-estimuladoras que son requeridas para la selección negativa (63). Ratones deficientes de CD28 son resistentes a la apoptosis inducida por entrecruzamiento de CD3. De manera similar, el bloqueo de CD80 y CD86, los ligandos de CD28, afecta la selección negativa de células auto-reactivas (65).

Selección positiva versus selección negativa

Uno de los modelos que explica la diferencia entre las señales mediadas por el TCR que inducen diferenciación y muerte celular postula que ocurre una activación diferencial de la vía de las MAP cinasas. (Figura 4).

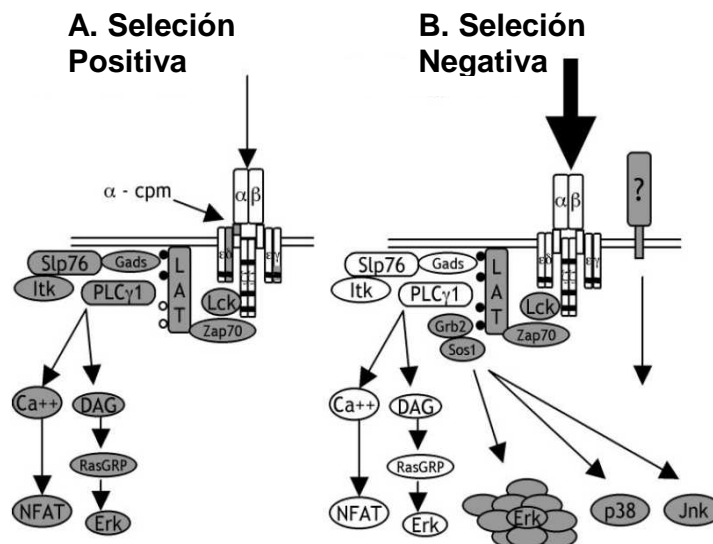


Figura 4. Diferencias en la señalización de la selección positiva y negativa. (A) Selección positiva: Una interacción de baja afinidad, induce una fosforilación parcial de LAT, esta proteína recluta el complejo

Gads/SLP-76/Itk que induce la activación de PLC- γ y resulta en la producción de DAG y Calcio. El DAG activa a RasGRP, que a su vez estimula una baja y sostenida activación de Erk, mientras el calcio activa NFAT. (B) Selección negativa: Un ligando de alta afinidad en presencia de co-estimulación resulta en una activación completa de LAT, el reclutamiento de Grb2/Sos1 y una activación fuerte y transitoria de Erk junto con p38 y JNK. Tomado de Starr y Hogquist, 2003.

Este modelo predice que la selección positiva induce una activación baja pero sostenida de ERK, mientras la selección negativa ocurre en respuesta a una activación fuerte y de corta duración de ERK, acompañado por la activación de JNK y p38 (27).

La identificación de RasGRP, un segundo activador de Ras, permitió la postulación de un modelo en el que las interacciones de baja avidéz producen la activación de Ras vía RasGRP generando una activación baja y sostenida de ERK, que promueve la diferenciación. De manera alternativa, interacciones de alta avidéz, en presencia de señales co-estimuladoras producen una activación de mayor magnitud y corta duración de ERK, mediada por Grb2/Sos, y la activación adicional de JNK y p38, dando lugar a la selección negativa. Aún no queda claro, de que forma la selección negativa resulta de la activación de de JNK y p38 (27).

Este modelo, de selección podría basarse a su vez, en la fosforilación diferencial de la proteína adaptadora LAT, dado que los residuos fosforilados de tirosina requeridos para el reclutamiento de Grb2 son diferentes a los necesarios para la activación de PLC γ -1 (66). De manera alternativa, las señales co-estimuladoras podrían amplificar la activación de JNK y p38 dependientes de Grb2 (27).

Elección CD4 versus CD8

Las células T maduras α/β comprenden dos lineajes, típicamente definidos por la expresión exclusiva de CD4 o CD8. Las células T que expresan la glicoproteína de membrana CD4 están restringidas para reconocer antígenos unidos a moléculas MHC clase II, mientras las células que expresan CD8, una proteína dimérica de membrana, reconocen antígenos unidos a moléculas MHC clase I. La expresión de uno u otro coreceptor corresponde a la restricción de MHC y define dos poblaciones funcionales de linfocitos T: las células T CD4⁺ que generalmente funcionan como células colaboradoras y

las células CD8⁺ que funcionan como células citotóxicas, aunque en algunos casos pueden realizar actividades funcionales ambiguas (67).

Los eventos implicados en la diferenciación hacia uno u otro lineaje han sido ampliamente estudiados, aunque continúan siendo controversiales. A continuación se exponen los modelos propuestos para explicar el compromiso hacia CD4 ó CD8.

Modelo estocástico/selectivo

Este modelo propone que los timocitos reducen de manera aleatoria la expresión de uno de los dos correceptores CD4/CD8 antes o durante el proceso de selección positiva. Solo aquellos timocitos que mantengan la expresión del coreceptor que correlacione con la especificidad del TCR reciben señales de supervivencia y completa su proceso de desarrollo. Caso contrario, los timocitos que mantienen el coreceptor equivocado mueren por apoptosis.

Modelo Instructivo

Ese modelo propone que las señales inducidas por el TCR y el coreceptor dirigen el compromiso. El entrecruzamiento del TCR con un complejo péptido-MHC clase I, instruye al timocito para que disminuya la expresión de CD4, mientras la interacción con un complejo péptido-MHC clase II inducirá la disminución de CD8. La ausencia de células T restringidas a MHC clase I o II que se observa en ratones deficientes de CD8 o CD4 respectivamente (68, 69), indica la importancia de los coreceptores en la elección de lineaje y da apoyo a este modelo.

Intensidad de la señal

Este modelo representa una nueva interpretación del modelo instructivo y propone que señales de alta intensidad inducen la diferenciación hacia el lineaje CD4 mientras, señales débiles inducen la diferenciación hacia el lineaje CD8. La estimulación *in vitro* de timocitos DP con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD4, produce una fosforilación prolongada de CD3 ζ , CD3 ϵ , ZAP-70, la activación de la vía de las MAP cinasas e induce compromiso al lineaje CD4. En contraste, la diferenciación hacia CD8 solo requiere del entrecruzamiento de CD3 que induce la fosforilación de CD3 ζ y una fosforilación menor de ZAP-70 (70, 71).

Otro de los modelos propuestos, define como característica clave para la elección de linaje, la duración de la señal, más que la intensidad de la misma. Mediante un sistema experimental que incluye un cultivo de timo fetal de dos pasos, Germain y colaboradores, proponen que el compromiso es determinado por la duración de una señal inicial vía TCR que puede ser influenciado por los coreceptores. La diferenciación hacia CD4 requiere una estimulación inicial de mayor duración mientras el compromiso hacia CD8 ocurre tras una corta estimulación (72-74).

Estudios adicionales se han encaminado a estudiar los mecanismos transcripcionales involucrados en la expresión de CD4 y CD8 y la participación de otras moléculas en la decisión de linaje.

Quimiocinas durante el desarrollo de las células T

El desarrollo de las células T es un proceso dinámico que inicia con el reclutamiento de progenitores tímicos de la circulación y culmina con la exportación de células T maduras de nuevo a la circulación. Los precursores tímicos entran al timo por las venulas post-capilares cerca de la región cortico-medular (75), una vez en el timo, sufren una serie de migraciones que están íntimamente relacionadas con su programa de desarrollo.

El proceso de migración está controlado por la expresión de quimiocinas y sus receptores (76). Los timocitos expresan de manera diferencial receptores para quimiocinas durante los diferentes estadios de maduración, y sus ligandos son producidos por elementos estromales particulares del timo, definiendo microambientes específicos (77-79). Además de la quimiocinas, otras moléculas de adhesión como las selectinas y las integrinas actúan en concierto para regular el tráfico de los timocitos a través del timo (80, 81).

Las quimiocinas son citocinas quimioatrayentes, de bajo peso molecular (8-10kDa), que transducen señales a través de su unión con receptores de 7 pasos transmembranales acoplados a proteínas G heterotrimericas. Las quimiocinas participan en controlar la migración selectiva de leucocitos a sitios de inflamación y están implicadas en procesos de diferenciación celular, desarrollo, homeostasis, angiogénesis y activación de integrinas durante el proceso de extravasación y degranulación (82-88).

Los precursores que entran al timo, expresan CCR9, cuyo ligando CCL25 es expresado por células tímicas epiteliales (89). Los timocitos DN migran hacia la región subcapsular bajo la influencia de varias quimiocinas. En particular, CXCL12, CCL19 y CCL21 son esenciales para este proceso. Timocitos deficientes del receptor de CXCL12 (CXCR4), son incapaces de migrar hacia la corteza desde la región cortico-medular, lo que resulta en un bloqueo en el estadio DN1 (90).

Tras la selección β , los timocitos migran a la corteza donde se diferencian a DP tras su interacción con complejos péptido-MHC expresados por células epiteliales de corteza cerca de la región cortico-medular. Las señales del TCR asociadas con la selección positiva inducen cambios en la expresión de integrinas y receptores de quimiocinas.

Los timocitos que se seleccionan positivamente aumentan la expresión de CCR7 (91) y CCR9 (79, 92) y migran hacia la médula. Los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21 son expresados principalmente por células medulares del epitelio tímico (91). La mutación de CCR7 y sus ligandos da lugar a la acumulación de timocitos $CD4^+CD8^-$ y $CD4^-CD8^+$ en la corteza (91).

Entre las señales que regulan el movimiento de los timocitos maduros SP de nuevo a la circulación, se encuentra el receptor de esfingosina 1 fosfato tipo 1 (S1P1), que se considera clave para la salida de las células T maduras del timo y la salida de linfocitos de los ganglios linfáticos (93). Otra molécula implicada en la salida del timo es el receptor de lectina tipo-C CD69, cuya expresión se reduce en timocitos maduros antes de su salida del timo, su sobre-expresión da lugar a la retención de timocitos maduros en la médula (94).

Papel de Notch en el desarrollo de las células T

Notch es una familia de receptores transmembranales tipo I, altamente conservados e involucrados en la regulación de decisiones celulares durante el desarrollo de diferentes especies (95). Participa en varios procesos a lo largo del desarrollo de los linfocitos, que incluyen la especificación hacia el lineaje T, el mantenimiento de progenitores tempranos, supervivencia de timocitos DN3 y posiblemente diferenciación al lineaje γ/δ (29).

Se han identificado cuatro receptores Notch (Notch 1-4), que pueden unirse a cinco ligandos conocidos como delta-“like” 1 (DL-1), DL-3, DL- 4, Jagged 1 y Jagged 2. La vía canónica de señalización es iniciada por la unión receptor-ligando que induce dos proteólisis sucesivas de Notch. La primera es mediada por la proteasa ADAM que remueve la mayor parte del dominio extracelular del receptor, la segunda proteólisis es mediada por una γ -secretasa dependiente de presenilina que cliva la región transmembranal, liberando así el dominio intracelular del receptor (Notch-IC). Una vez libre Notch-IC, se transloca al núcleo, donde regula de manera directa la expresión de genes blanco vía interacción con el factor de transcripción CSL. Entre los genes blancos de Notch que se han identificado se encuentran; Hes1, Hes5, Her1, Deltex y Nrarp (29).

La función mejor establecida para Notch en el sistema hematopoyético es su papel en la especificación del lineaje de células T. Aunque los timocitos expresan Notch 1, 2, y 3, la especificación al lineaje T es mediada exclusivamente por Notch 1. Su delección resulta en un bloqueo completo del desarrollo de las células T e induce la diferenciación de células B inmaduras en el timo (96, 97). De manera contraria, la expresión de una forma constitutiva activa de Notch-IC en células progenitoras, da lugar a la generación de células T inmaduras en la médula ósea, y bloquea la generación de células B (98). En conjunto, estas evidencias indican que las señales dependientes de Notch sirven no sólo para inducir el lineaje T sino también para limitar el desarrollo de células B en el timo.

Las señales de Notch también participan en la generación y/o mantenimiento de los progenitores intratímicos más tempranos (ETP) y en su diferenciación hacia el estadio DN3 (99-101). La alta expresión y actividad de Notch 1 y 3, en el estadio DN3 correlaciona con su participación en mantener la supervivencia de esta subpoblación y su posible rol en la divergencia hacia los lineajes α/β y γ/δ , evento que se completa en el estadio DN3. Aunque la diferenciación al lineaje γ/δ es relativamente independiente de las señales de Notch, se postula que éstas señales pueden aumentar la diferenciación, favoreciendo la proliferación y/o supervivencia de las células γ/δ ya seleccionadas o de sus precursores intermedios (102-104).

Lineaje α/β versus γ/δ

Establecer el momento en que ocurre la diversificación hacia los lineajes α/β o γ/δ no ha resultado fácil debido a la falta de un marcador definitivo que distinga células de cada lineaje previo a la expresión del TCR. Estudios realizados en cultivos de células OP9 que expresan Delta-1 (OP9-DL1) indican que la divergencia inicia en el estadio DN2 y se completa en el DN3 (103).

La generación de células γ/δ ocurre tras la expresión y apareo de las cadenas TCR γ y TCR δ , y permite la diferenciación de los timocitos DN3 a lo largo del lineaje γ/δ (105, 106). A diferencia del desarrollo α/β , en la diferenciación de las células T γ/δ no existe evidencia de un punto crítico de control mediado por una forma inmadura del receptor; la selección de estas células ocurre como un evento enteramente dependiente del TCR (107).

El TCR γ/δ puede mediar diferenciación hacia el estadio DP de manera similar a la selección β , mediante un fenómeno asociado a la reducción de la expresión del receptor o de la intensidad de la señal (108). Se postula que señales relativamente débiles se asocian con el pre-TCR (109, 110), mientras que el TCR γ/δ transduce señales cuantitativamente mayores, quizá vía interacción con su ligando (108, 111).

Desarrollo de otros lineajes celulares

Los modelos de señalización diferencial de la selección tímica aplican para la mayoría de las células T α/β , sin embargo existen tres poblaciones cuyo desarrollo no sigue dichas reglas. Estas son; células NKT, linfocitos T intraepiteliales CD8 α/α y células T reguladoras. Para estas células, las interacciones de alta avididad con antígenos propios no resulta en delección clonal, sino que son requeridas para su diferenciación (27).

2. Células T Reguladoras

Las más estudiadas son las células reguladoras llamadas “naturally occurring” ó células reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺ (nTregs), que representan una pequeña población (5-10%) de las células CD4⁺ presentes en periferia y se caracterizan por la expresión

constitutiva de altos niveles de CD25 (IL-2 α R) y por la expresión de marcadores de activación como CTLA-4, GITR, CD62L, OX40 y CD103 (112, 113). Además de estas moléculas de superficie, las nTregs expresan de manera específica Foxp3, un factor de transcripción que ha demostrado ser clave para su desarrollo y función (114). La deficiencia de este gen en ratón y humano, da lugar a la ausencia de células T reguladoras y autoinmunidad sistémica (115-119).

Otra característica que las distingue de otras células T, es su fenotipo parcialmente anérgico, es decir que proliferan pobremente en respuesta a estimulación vía TCR y su crecimiento depende de la adición de interleucina 2 (IL-2) exógena (120).

Las células reguladoras naturales fueron inicialmente estudiadas por su participación en mantener la tolerancia hacia lo propio (121), prevenir enfermedades autoinmunes (122) y suprimir la respuesta a alo-injertos y tumores (123), las nTregs también participan en el re-establecimiento de las condiciones homeostáticas, una vez ha concluido una respuesta inmune efectora, previniendo así el desarrollo de respuestas inmunopatológicas dañinas (124). Evidencia reciente muestra que las células reguladoras naturales juegan un papel en modular la respuesta adaptativa inmune hacia virus bacterias y parásitos afectando de manera favorable o en algunos casos desfavorable para el huésped el resultado de la infección (125, 126).

Desarrollo de las células T reguladoras

Así como otras células T, las nTregs se desarrollan en el timo, a través de procesos de selección positiva y negativa. Inicialmente se pensaba que las nTregs representaban una población transitoria de células maduras recirculantes que adquirirían capacidad supresora tras el reconocimiento antigénico en periferia. Sin embargo la detección de células CD4⁺CD25⁺ en el timo de ratones neonatos previo a la generación de células activadas en periferia, demostró que las nTregs se generan en el timo (127) y pertenecen a un lineaje celular específico.

Las señales moleculares involucradas en el desarrollo de las células reguladoras naturales se encuentran en controversia. Se ha propuesto que interacciones de alta avidéz son requeridas para su selección, basado en modelos transgénicos en los cuales

la generación de células reguladoras específicas de antígeno, se ve favorecida por la expresión del antígeno en células tímicas estromales (128, 129). Se propone que la avidéz necesaria para su selección se sitúa justo antes de la requerida para inducir selección negativa. (Figura 5).

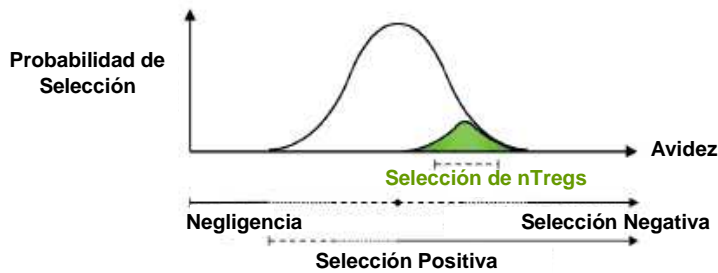


Figura 5. La avidéz en la selección de nTregs. Las células reguladoras naturales derivan de interacciones de alta avidéz con péptidos propios presentadas en el contexto del MHC. La avidéz requerida para su selección se encuentra muy cercana a la que induce selección negativa. Tomado de Maloy y Powrie, 2001.

Datos recientes muestran que la reducción de las señales inducidas por el TCR induce una disminución de las células T reguladoras, mientras el aumento de la intensidad de la señal del TCR favorece su generación. Ratones con defectos en la señalización a través de LAT/PLC- γ 1 (130) o en la vía Raf/Mek/Erk (131), exhiben una reducción o ausencia de las células T reguladoras respectivamente. Por otro lado, ratones deficientes de reguladores negativos del TCR como SHP-1 (132) o con actividad reducida de GITR (133), otro regulador negativo, muestran un enriquecimiento de células T reguladoras.

Estudios recientes indican que existen señales adicionales a las inducidas por el TCR, que están implicadas en la generación de las células T reguladoras(134). Los autores plantean un modelo en el cual la diferenciación hacia el linaje de las células T reguladoras ocurre mediante un proceso de 2 pasos; hay un paso inicial dependiente de las señales del TCR, en el que señales de alta avidéz dan lugar a la generación de células precursoras con $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^-$, esta etapa es sucedida por una fase independiente del TCR, en el cual las células precursoras expresan Foxp3 en respuesta a las citocinas IL-2 e IL-15, las cuales señalizan a través de la cadena gama común (γc) y activan la vía Jak/Stat. Aunque la habilidad de expresar Foxp3 correlaciona con la fosforilación de Stat5, ésta no es suficiente para la inducción de Foxp3, sugiriendo la participación de señales adicionales.

Por último, la importancia de la avidéz en la generación de las células T reguladoras naturales, es rebatido por los resultados obtenidos por Van Santen et al. (135). Donde se propone que el enriquecimiento de las células T reguladoras observado bajo condiciones de alta avidéz se debe a un cambio en la relación de las células T reguladoras y las no la reguladoras (células vírgen), como resultado de la muerte preferencial de las células vírgenes, mientras que las reguladoras muestran una mayor resistencia a la delección clonal inducida por antígeno.

Moléculas implicadas en su desarrollo

Existen varias moléculas clave cuya deficiencia o alteración funcional afectan la generación o función de las células reguladoras naturales y causan enfermedades autoinmunes.

El papel de interleucina 2 (IL-2) en la generación y/o mantenimiento de las nTregs es controversial. Algunos autores sugieren que la IL-2 es específicamente requerida para la generación y el mantenimiento de las nTregs, dado que la depleción de IL-2 mediante anticuerpos neutralizantes resulta en enfermedades autoinmunes que se asocian con números reducidos de células Foxp3+ en periferia (136).

Por otro parte, y mediante el uso de ratones Foxp3-EGFP “knockin”, se demostró que las señales de IL-2 no son críticas para la generación de células nTregs, ya que cantidades importantes de estas células son generadas en ratones deficientes de IL-2 y CD25. Sin embargo la deficiencia de IL-2R γ c (componente del receptor para IL-2), conlleva a la ausencia de nTregs indicando que otras citocinas que comparten este receptor, además de IL-2, estarían involucradas en el desarrollo de las células T reguladoras. Se ha demostrado que IL-7, IL-15 (137) y TSLP (138) también participan en la generación y/o mantenimiento de las células T reguladoras.

Otras de las moléculas críticas para el desarrollo de las nTregs son CD28 y CD40. Se postula que CD28 es requerida para la supervivencia de ésta población celular, ya que la deficiencia de esta molécula causa una reducción en el número de las células T reguladoras (139), al igual que la deficiencia de sus ligandos CD80 y CD86 (140).

Por otro lado, el número de células CD4⁺ CD25⁺ se ve reducido en ratones deficientes de CD40 y en menor grado en ratones deficientes de CD40L (141, 142). Sin embargo, en ratones deficientes de CD40 no se desarrolla autoinmunidad porque su deficiencia afecta la activación de las células T autorreactivas.

Localización tímica

Estudios sobre la generación de las células T reguladoras, sugieren que la médula tímica, lugar donde ocurre la selección negativa de timocitos autorreactivos, provee de un microambiente especializado para la diferenciación de las células T Foxp3⁺. Varios hallazgos respaldan esta noción:

1. La producción de timocitos Foxp3 aumenta durante el periodo neonatal, mismo en el que ocurre la maduración de la médula, por otro lado mutaciones en los componentes de señalización de la vía NFκB que afectan la arquitectura de la médula, afectan también la generación de las células T reguladoras (143, 144).
2. Análisis histológicos del timo de ratones Foxp3-GFP muestran acumulación preferencial de células Foxp3⁺ en la médula tímica (145)
3. La presencia de un grupo de células epiteliales llamados corpúsculos de Hassall, que expresan entre otras citocinas, linfopoyetina tímica estromal (TSLP) e interactúan con células dendríticas mieloides presentes también en la médula. Se postula que la TSLP activa a las células dendríticas, induciendo un aumento en la expresión de CD80 y CD86 sin estimular la producción de citocinas pro-inflamatorias, una vez “instruidas” por la TSLP, las células dendríticas pueden inducir la expresión de Foxp3 en timocitos CD4⁺ (146).

Sin embargo, se ha demostrado recientemente que las células epiteliales corticales pueden permitir la diferenciación de células T reguladoras (147). Este estudio indica que la presentación vía MHC clase II por las células dendríticas medulares del timo es dispensable para la diferenciación de Tregs. De manera adicional, identifica una población de células DPs Foxp3⁺ en corteza que no solo representan una cuarta parte de todos los timocitos Foxp3⁺ sino que además pueden diferenciarse a simples positivos maduros Foxp3⁺. Dado que la expresión de CD69, CCR7 y Foxp3 incrementa en los timocitos DPs,

se sugiere que las señales del TCR que dan lugar a la expresión de Foxp3, coinciden o son subsecuentes a la selección positiva y que una vez inducidas en corteza las células Foxp3⁺ migran hacia la médula explicando su predominante localización de estas células en médula, descrita anteriormente. (Figura 6)

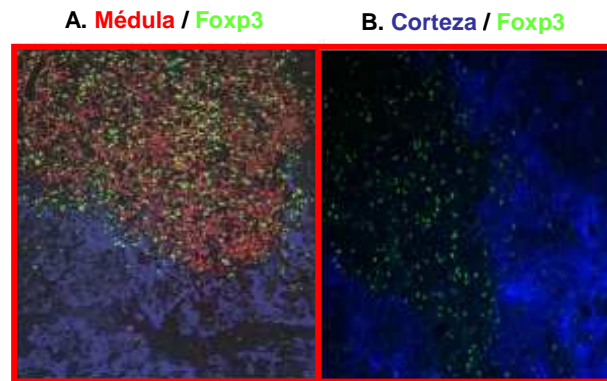


Figura 6. Diferenciación de células Foxp3⁺ en médula y corteza tímica. Inmunotinción de secciones tímicas de ratones Foxp3^{GFP+} donde se observa la presencia de timocitos Foxp3⁺ en (A) médula (rojo) y (B) corteza tímica (azul). Tomadas de Fontenot y Rudensky, 2005 y Liston y Rudensky, 2008 respectivamente.

Los autores proponen que la inducción de Foxp3 no se limita a una localización anatómica sino que al contrario varios tipos de APCs que incluyen cTECs, mTECS y DCs pueden soportar la diferenciación de células T reguladoras. Es posible que interacciones en la corteza sean requeridas más no suficientes para inducir Foxp3 y que el microambiente de médula sea requerido para completar el proceso de diferenciación, proporcionando señales secundarias.

Mecanismos de supresión

Se han sugerido varios mecanismos a través de los cuales las células T reguladoras pueden suprimir la proliferación de otras células. Estudios “*in vivo*” apuntan a la producción de citocinas como TGF- β e interleucina 10 (IL-10) así como la supresión dependiente del contacto célula-célula mediada por el receptor inhibitorio CTLA-4 (148). De manera contraria, estudios “*in vitro*” demuestran que la supresión es independiente de citocinas y CTLA-4 pero requiere de contacto célula-célula (149).

La supresión requiere que las células T reguladoras sean activadas a través de su TCR con un antígeno específico o un estímulo policlonal, una vez activadas pueden ejercer su

actividad supresora sobre células presentadoras de antígenos, células T vírgen/efectoras o ambos tipos celulares.

Las células reguladoras pueden disminuir la expresión de CD80 y CD86 en la APC y reducir así, su capacidad estimuladora (148). Por otro lado, pueden ejercer su función supresora a tiempos temprano de activación, como en el “priming” de la célula virgen. Se sabe, que durante la formación de la sinapsis inmune pueden inhibir el reclutamiento de PKC θ en la célula efectora, lo que da lugar a una sinapsis inmune inmadura, donde no se activa NF κ B y se bloquea la secreción de IL-2 (150). Otro mecanismo de supresión indica que las células T reguladoras tienen capacidad citolítica y pueden eliminar células T efectoras y APC mediante la expresión de Granzima A y perforina (151).

Recientemente se han descrito nuevos mecanismos de supresión que incluyen; la privación de citocinas (152) y la regulación de la migración de las células efectoras al sitio de la infección (125).

Inducción de células T reguladoras en periferia

Aunque las células T reguladoras naturales Foxp3⁺ son únicas entre otros subgrupos de células CD4⁺ y su compromiso a linaje inicia en el timo, se ha demostrado que bajo ciertas condiciones células CD4⁺CD25⁻ de periferia y células “naive” estimuladas *in vitro* pueden adquirir funciones supresoras.

Estas células descritas en modelos *in vivo* se denominan células T reguladoras adquiridas y se clasifican en Tr1 y TH3 (137). Las Tr1, se encuentran predominantemente en la mucosa intestinal, aunque carecen de la expresión de Foxp3, suprimen las reacciones inmunes hacia una amplia variedad de antígenos (153) mediante secreción de IL-10 y TGF- β (154). El grupo Th3 comprende células T con capacidad supresora cuya inducción ocurre tras la ingestión de antígeno vía oral (155, 156), esta población expresan altos niveles de Foxp3 (157) y secretan grandes cantidades de TGF- β (155).

Estudios realizados *in vitro* muestran que la estimulación de células CD4⁺CD25⁻ con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28, en presencia de concentraciones crecientes de TGF- β , da lugar a la inducción de Foxp3 de manera dosis dependiente de TGF- β

(158). La estimulación subóptima a través del TCR y CD28 induce la formación del complejo Foxp3-NFAT requerido para la generación y función de las células T reguladoras, e impide la interacción de NFAT con AP-1 (159).

3. CD5

Además del TCR otros receptores de superficie también participan en la selección de los timocitos, influyendo de manera positiva o negativa la respuesta del TCR. En particular, CD5, ha mostrado capacidad de regular de manera negativa la señal del TCR durante el desarrollo de los timocitos (160, 161), mientras transduce señales co-estimuladoras a las células T maduras (162).

Estructura

CD5 es una glicoproteína de superficie tipo I de 67kDa, que comprende una región extracelular de 350 aminoácidos, compuesto de 3 dominios tipo scavenger (D1,D2 y D3), una región transmembranal de 27 aminoácidos y una cola citoplásmica de 94 aminoácidos. Puede encontrarse como una proteína circulante en suero humano, producto del corte proteolítico a nivel de membrana tras la activación de los linfocitos (163). (Figura 7).

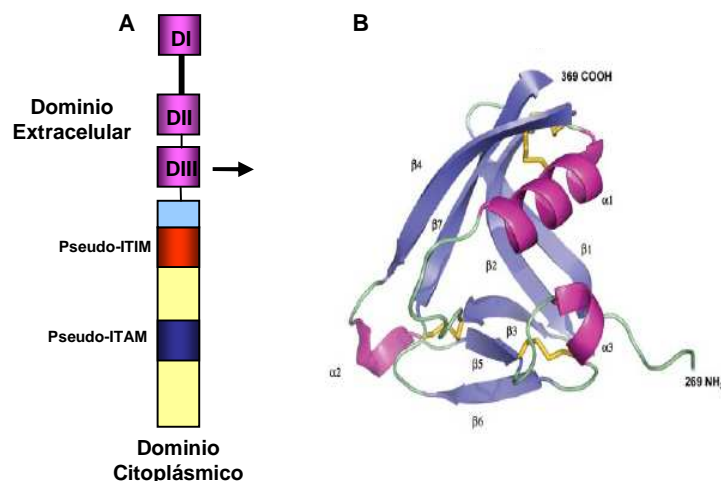


Figura 7. Estructura de CD5 humano. (A) Esquema de la organización de la molécula, se encuentran indicados los 3 dominios SRCR (DI-DIII), y las regiones; ITAM e ITIM presentes en el dominio citoplásmico.

(B) Representación (tipo listón) del dominio extracelular III (DIII) de CD5, las α -hélices están en morado y numeradas de $\alpha 1$ - $\alpha 3$, las láminas β se muestran en azul y van de $\beta 1$ - $\beta 7$, por último, los puentes di-sulfuro se observan en color amarillo. Tomado de Rodamilans y Motoya, 2007.

Es miembro de la superfamilia de receptores scavenger ricos en cisteína (SRCR-SF). La superfamilia incluye un grupo diverso de cerca de 30 proteínas de membrana o bien secretadas, presentes en diversas especies desde invertebrados hasta mamíferos superiores. Sus miembros se caracterizan por la presencia de uno o varios dominios ricos en cisteína llamados dominio tipo scavenger (SRCR), identificados inicialmente en el receptor scavenger tipo I de macrófagos. Cada SRCR está compuesto por 110 aminoácidos y contiene 6 u 8 cisteínas que forman puentes disulfuro entre ellas. El número de cisteínas permite la clasificación de la familia en dos grupos; el grupo A contiene dominios con 6 cisteínas, mientras el grupo B se compone de 8 cisteínas. (Revisado en (163))

CD5 es un miembro poco usual del grupo B, sus dominios D1 y D3 poseen 8 cisteínas, pero su dominio D2 posee solo 6 cisteínas, características del grupo A (163). Los dominios D1 y D2 se encuentran separados por una región espaciadora rica en prolina/treonina, y se ha demostrado que estos dominios participan en la unión de CD5 a un ligando recientemente descrito (164).

Por último, el dominio citoplásmico de CD5 carece de actividad catalítica intrínseca pero está bien adaptado para la transducción de señales contiene sitios potenciales de fosforilación de tirosina, que incluye 2 motivos similares de activación del inmunoreceptor vía tirosina, y un motivo similar de inhibición del inmunoreceptor vía tirosina (ITIM) y múltiples sitios potenciales de fosforilación en residuos de serina y treonina (165).

Regulación Transcripcional

El gen de CD5 murino se localiza en el cromosoma 19, mientras que en humano se localiza en el cromosoma 11q12.2, abarca aproximadamente 24.5 Kb y comprende 11 exones. La organización de los exones/intrones correlaciona con los dominios estructurales de la proteína CD5. Los exones 1 y 2 codifican para el péptido señal y los primeros aminoácidos de la proteína madura respectivamente. Los exones 3,5 y 6 codifican cada uno de los dominios SRCR extracelulares, mientras la región rica en

prolina/treonina que separa los dominos D1 y D2 es codificada por el exón 4. El exón 7 codifica la región transmembranal y los exones 8-10 la región citoplásmica. El codón de paro (stop) esta contenido en el exón 10, por último el exón 11 posee 2 señales de poliadenilación que dan lugar a 2 especies de RNA mensajero de 2.7 y 3.6 Kb (166).

Han sido reportados polimorfismos de la región extracelular de CD5 en ratón y en bovinos (167), pero no se han detectado estas variantes de CD5 en humano (168). De manera adicional, se han identificado 2 transcritos específicos para el gen de CD5 humano uno de 549 Kb que corresponde al RNAm total de CD5 y uno de menor tamaño 317Kb producto de splicing alternativo que codifica una proteína que carece de región citoplásmica con función desconocida (168).

El análisis de la región 5' del gen de CD5 murino y humano indican que el promotor del gen carece de una secuencia TATA canónica pero posee una secuencia similar a la de un iniciador (Inr) (169), secuencia crítica para el posicionamiento del complejo RNA polimerasa II para el inicio de la transcripción y presente en promotores que carecen de secuencias TATA (170).

Análisis detallados del promotor de CD5 realizados en la línea celular EL-4, muestran que la región promotora de 3kb posee a su vez, una secuencia reguladora de 43pb que posee sitios de unión para tres factores de transcripción; CCAAT, κ E2 y Ets (169). La mutagénesis directa de cada uno de estos sitios demostró que el sitio Ets es esencial para la actividad del promotor. La expresión de CD5 está regulada de manera positiva por la unión de proteínas Ets-1 a este sitio (170). Por otro lado, la unión de proteínas E47 al sitio κ E2, inhibe la actividad del promotor, regulando de manera negativa la expresión de CD5. La expresión de proteínas E47 disminuye progresivamente mientras la expresión de CD5 incrementa durante el desarrollo de los timocitos (171).

Una organización genómica similar ha sido reportada para el gen de CD5 murino. De manera interesante el mayor grado de homología (70%) se encuentra en una región corta de DNA que incluye los sitios de unión consenso para los factores de transcripción κ E2A y Ets-1 (172). Estas similitudes indican que ambos genes usan mecanismos transcripcionales similares.

Expresión y Función

CD5 se expresa en timocitos, células T maduras y en un subgrupo de células B llamado B1. Esta última población celular produce autoanticuerpos polireactivos y se encuentra expandida en algunos desordenes linfoproliferativos y autoinmunes (165).

La expresión de CD5 aparece en estadios muy tempranos del desarrollo de los timocitos y se considera uno de los primeros marcadores de superficie del compromiso al linaje T (165). Su expresión está regulada a lo largo de los diferentes estadios del desarrollo de las células T (173). En timocitos inmaduros DN se expresan bajos niveles de CD5, esta expresión basal aumenta una vez los timocitos señalizan a través del pre-TCR y pasan al estadio doble positivo. En este estadio, la expresión de CD5 está regulada por la intensidad de la señal del TCR y por la avidéz de la interacción TCR/ligando durante la selección.

Dentro de las señales que inducen selección positiva, aquellas con mayor avidéz inducen una alta expresión de CD5, mientras interacciones de menor avidéz inducen una menor expresión de CD5. Estos niveles relativos se mantienen en células T maduras. La habilidad de los timocitos para regular la expresión de CD5, dependiendo de la avidéz por su ligando constituye un mecanismo importante que permite modular la respuesta del TCR (160). (Figura 8).

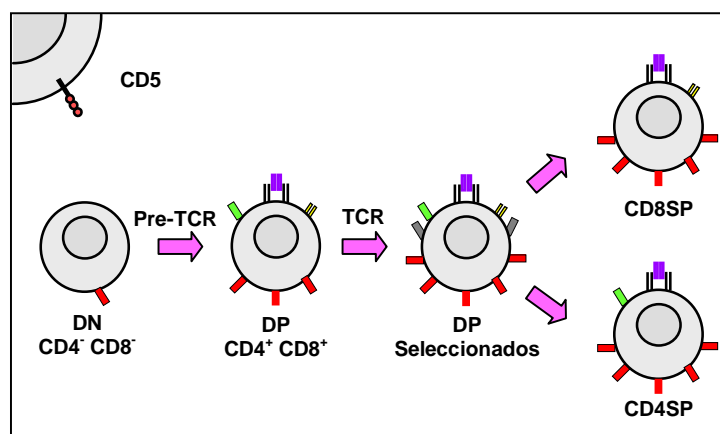


Figura 8. Expresión de CD5 durante el desarrollo de los timocitos. La expresión de CD5 es regulada durante el desarrollo en respuesta a la avidéz de la interacción del TCR. Su expresión aumenta tras la señalización del pre-TCR en timocitos DN y el TCR en DPs. Al igual que CD69, la expresión de CD5 aumenta

en timocitos post-seleccionados y esta se mantiene en timocitos SP como reflejo de la avidez de la interacción ocurrida en la selección. Modificada de Lozano, 2004.

Aunque estudios iniciales realizados en ratones deficientes de CD5 no revelaron cambios en las poblaciones tímicas generadas (174), posteriormente se demostró que la ausencia de CD5 mantiene a los timocitos hiperresponsivos a la estimulación a través del TCR (161). La estimulación de timocitos simples positivos deficientes de CD5 resulta en mayor proliferación, incremento en la movilización de calcio intracelular, mayor fosforilación de la fosfolipasa $C\gamma-1$ (PLC $\gamma-1$), LAT y VAV. Estos resultados permitieron postular a CD5 como regulador negativo de la señal del TCR.

La hiperrespuesta observada en timocitos deficientes de CD5 influye en la selección tímica y afecta el desarrollo de los timocitos. Estudios realizados en ratones TCR transgénicos deficientes de CD5 esclarecieron su papel en la selección de timocitos que reciben señales de alta y baja avidez, a través de su TCR.

En sistemas TCR transgénicos, se evaluó el efecto de la delección y la sobreexpresión de CD5 durante el desarrollo de los timocitos [198; 199]. La generación de células T fue evaluada en los modelos transgénicos HY y P14 descritos anteriormente (175-177). En el primero los timocitos expresan un TCR específico para un antígeno expresado exclusivamente en los machos. La expresión del antígeno induce la delección de los timocitos en desarrollo, mientras células CD8⁺ se generan de manera normal en las hembras (175). En el sistema P14 el receptor expresado es específico para la glicoproteína del virus coriomeningítico linfoide y se generan células CD8⁺ (176, 177).

Existe evidencia experimental que indica que dentro del rango de interacciones que promueven la selección positiva, las de mayor avidez incrementan la eficiencia de la selección positiva y permiten la generación de timocitos SP que expresan altos niveles del receptor transgénico (178). Bajo este criterio y dado que en el sistema P14 se generan una mayor cantidad de timocitos CD8⁺SPTCR^{hi} respecto a los generados en el sistema HY, se sugiere que en P14 hay una mayor eficiencia en la selección positiva debido a una interacción TCR-ligando-MHC de mayor avidez (173).

La ausencia de CD5, afecta de manera preferencial la generación de timocitos CD8⁺ en el

sistema P14, mientras la selección en el sistema HY permanece inalterada. Por otro lado, la sobreexpresión de CD5 en ambos sistemas, inhibe de manera importante la selección positiva en las hembras HY en las cuales se reducen los timocitos CD8SP TCR^{hi}, sin afectar la selección de esta población en ratones P14 (160). (Figura 9).

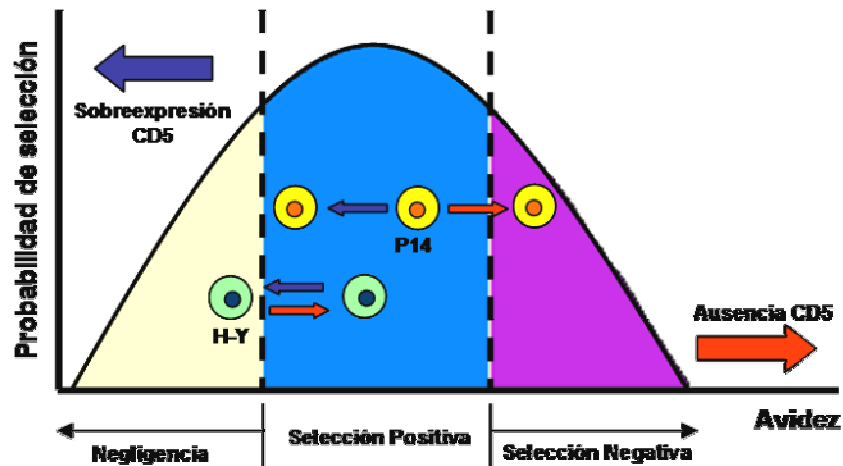


Figura 9. CD5 modula las señales del TCR durante el desarrollo. La ausencia o presencia de CD5 afecta la generación de los timocitos dependiendo del umbral de avididad en el que se seleccionen. Su ausencia dirige hacia la selección negativa a los timocitos que establecen interacciones de alta avididad (P14) por exceso de señal. Por el contrario, en timocitos que reciben señales de baja avididad (HY) su ausencia promueve la selección positiva, rescatándolos probablemente de la muerte por negligencia. La selección de los timocitos del sistema HY se ve comprometida cuando se sobre-expresa CD5, por una reducción de la señal.

Estos datos indican que en timocitos que expresan TCRs de alta avididad (P14) la ausencia de CD5 y por lo tanto de su efecto regulador provoca la selección negativa de los timocitos debido a que las señales del TCR exceden la avididad requerida para mantenerse dentro del umbral de selección positiva. Por otro lado, su sobreexpresión atenúa la selección positiva de timocitos que se seleccionan bajo interacciones de baja avididad, posiblemente por una excesiva modulación de las señales del TCR.

Señalización de CD5

Los eventos intracelulares mediados por CD5 son diversos y aunque han sido descritos en varios reportes, las bases moleculares implicadas en su función como modulador de las

señales del TCR de no se han definido aún.

Uno de los eventos tempranos que ocurre tras el entrecruzamiento del TCR es la activación rápida y transitoria de proteínas cinasas de tirosina (PTK), que fosforilan numerosos sustratos, entre los que se encuentra el dominio citoplásmico de CD5 (179, 180), que si bien esta desprovisto de actividad catalítica intrínseca, posee sitios potenciales de fosforilación, así como secuencias consenso para la unión de proteínas señalizadoras.

El dominio citoplásmico de CD5 posee cuatro residuos de tirosina susceptibles a fosforilación en las posiciones 378, 429, 441 y 463, las tirosinas 429 y 441 hacen parte de un motivo similar a los ITAMs encontrados en las moléculas accesorias que se asocian al TCR (181). Los ITAMs son blancos de fosforilación por cinasas de tirosina miembros de la familia Src y sirven como sitios de anclaje para proteínas que poseen dominios SH2, como Syk o ZAP-70 (37, 38). (Figura 10).

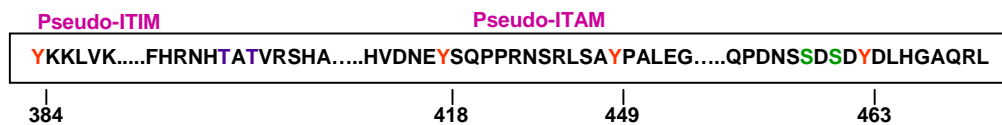


Figura 10. Dominio citoplásmico de CD5. Representaciones esquemáticas de los residuos presentes en la cola citoplásmica de CD5, relevantes para la transducción de señales y asociación con otras moléculas. Modificado de Calvo y Lozano, 1998.

Se ha demostrado que el entrecruzamiento de células Jurkat con anticuerpos anti-CD3 inducen la fosforilación de los residuos 429 y 463, mediada por Lck y Fyn. La falta de fosforilación del residuo 429, (que forma parte de ITAM de CD5), invalida a esta secuencia como un ITAM clásico (182). Sin embargo estudios de co-inmunoprecipitación indican que el dominio citoplásmico de CD5 se asocia con Lck, la unidad monofosforilada de CD3 ζ (p21) (183), ZAP-70, la subunidad p85 α de PI3K, Vav (184) y la proteína activadora GTPasa Ras (Ras-GAP) (185). La unión directa de CD5 a estas moléculas estaría mediada por la secuencias de tirosina fosforiladas presentes en su región citoplásmica.

La fosforilación de residuos de serina y treonina, también participan en la señalización mediada por CD5. Su dominio citoplásmico incluye 4 treoninas y 11 residuos de serina, algunos incluidos en secuencias consenso de fosforilación por cinasas de serina/treonina como la caseína cinasa II (CKII) y la proteína cinasa C (PKC). En linfocitos en reposo CD5 se encuentra fosforilado de manera constitutiva en residuos de serina (186), que se hiperfosforilan tras la estimulación con ésteres de forbol (PMA) (187) o tras el entrecruzamiento con anticuerpos anti CD5 o anti-CD3 (187, 188)

Se ha reportado que la subunidad reguladora β de CKII se encuentra asociada a la región carboxi-terminal citoplásmica de CD5 y es responsable de su fosforilación constitutiva en las serinas S458, S459, S461. Esta fosforilación es crítica para la generación de segundos mensajeros lipídicos (diacilglicerol y ceramidas) iniciada por el ligación de CD5 (189).

Estudios anteriores realizados *in vitro* mostraron que el entrecruzamiento de CD5 en células T periféricas aumenta las señales inducidas por estímulo con anti-CD3 como; la producción de IP3, movilización de calcio intracelular, secreción de IL-2, expresión del receptor para IL-2 y proliferación (190-193). Indicando que CD5 funciona como una molécula co-estimuladora, que potencia las señales inducidas por el TCR en células T maduras y que carece de una vía de señalización independiente del TCR.

Sin embargo, estudios más recientes indican que el entrecruzamiento de CD5 induce; producción de DAG y activación de PKC independientemente de la movilización de calcio intracelular y de recambios de IP3, sugiriendo la activación de una vía independiente a la de PLC- γ 1 inducida de manera clásica por el TCR. El DAG generado es producto de la activación de una fosfolipasa C específica de fosfatil colina (PLC-PC) (194) y está implicado en la activación de la "acidic sphingomyelinase" (A-SMase) (195, 196). La activación de estas moléculas requiere de la integridad de los residuos de serina (S459, S461) de la región C-terminal del dominio citoplásmico de CD5, fosforilados de manera constitutiva por CKII (197).

La A-SMase, genera ceramida, un mediador clave de diversos eventos celulares que incluyen proliferación celular, diferenciación, arresto y apoptosis(198). La ceramida activa de manera específica una isoforma atípica de PKC, PKC ζ (199, 200) involucrada en la

proliferación de las células T y en la organización del citoesqueleto (201).

Por otro lado, CD5 puede activar a miembros de la familia de las MAP cinasas. El entrecruzamiento de CD5 en células Jurkat induce la activación de MEK, y JNK (197). MEK forma parte de la cascada de señalización que incluye a las cinasa de serina/treonina Raf y ERK. La vía Raf/MEK/ERK es activada por Ras e induce a su vez la activación de factores de transcripción y proteínas de ciclo celular (202). La estimulación vía CD5 induce la formación del complejo Grb/Sos, necesario para la activación de Ras (Lozano no publicado). Se propone que la activación de JNK dependiente de CD5 estaría mediada por ceramida (198), un importante mensajero lipídico generado tras su ligación. También se ha reportado que la co-estimulación de timocitos murinos con anti-CD5 aumenta la fosforilación de ERK inducida con anti-CD3 (203). (Figura 11).

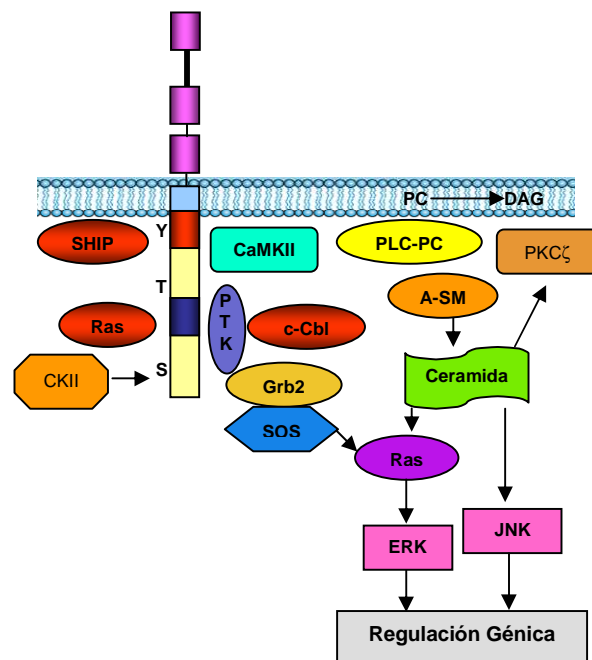


Figura 11. Vías de señalización de CD5. Representación esquemática de los eventos moleculares activados tras el entrecruzamiento de CD5. La señalización inicia con las fosforilación de residuos de tirosina, treonina y serina presentes en el dominio citoplásmico de CD5. Uno de los eventos más importantes es la activación de la PC-PLC que resulta en la generación de los mensajeros lipídicos; ceramida y DAG, estos inducen vías de señalización que culminan en la regulación de genes en el núcleo.

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares a través de los cuales CD5 modula las señales del TCR durante el desarrollo de los timocitos, se postula que el

efecto inhibitorio estaría mediado por el reclutamiento de reguladores negativos a su dominio citoplásmico.

Se ha reportado que (SHP-1) una fosfatasa de tirosina, implicada en la desfosforilación de sustratos activados por el TCR (204), se asocia de manera constitutiva al dominio citoplásmico de CD5. Esta asociación aumenta tras la fosforilación de CD5 (204, 205) y es mediada por el residuo de tirosina Y378, que forma parte del motivo similar al motivo consenso ITIM (205). Sin embargo, la contribución de esta proteína al efecto inhibitorio de CD5 es controversial, dado que células que expresan una molécula mutante de CD5 que posee el residuo Y378 se mantienen hipersensibles al estímulo vía TCR (206).

Otras moléculas señalizadoras implicadas en regular negativamente la señal del TCR son c-Cbl y RasGAP. Cbl es una proteína adaptadora con actividad de ubiquitin-ligasa que regula negativamente la señalización de varias cinasas de tirosina induciendo su degradación a través del proteosoma (207). Por su parte, Ras-GAP una proteína activadora de GTPasas, incrementa la velocidad del intercambio de GTP a GDP, reduciendo la activación de Ras, y consecuentemente la activación de las MAP cinasas (208). Estudios realizados en timocitos de rata indican la asociación directa de RasGAP e indirecta de c-Cbl a péptidos fosforilados que corresponden a la secuencia del pseudo-ITAM de CD5 (185).

Por último, la región proximal del dominio citoplásmico de CD5 se asocia con una cinasa de serina/treonina llamada cinasa II δ dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMK II δ) (209). Una de las consecuencias de la activación de esta cinasa es la inhibición de la transcripción del gen de la IL-2 en las células T (210, 211).

A pesar de estos antecedentes, aún se desconoce si a través de la interacción con estas moléculas CD5 participa en la regulación negativa de la señal del TCR y favorece selección de timocitos que se generan bajo interacciones de alta avidéz.

Ligandos

La identificación de ligandos de CD5 es aún objeto de estudio. El ligando inicialmente descrito para CD5 es CD72. Una glicoproteína tipo II de 42 kDa expresada de manera

constitutiva en toda las células del linaje B, excepto las células plasmáticas, su entrecruzamiento con anticuerpos induce la activación de las células B (212, 213) y se propone que la interacción de CD5 y CD72 tiene un papel importante en la cooperación entre células T y B durante el curso de una respuesta inmune.

El uso de proteínas de fusión (Fc-CD5) y de la forma recombinante soluble del dominio extracelular de CD5, ha permitido la identificación de ligandos adicionales a CD72, en células B y T activadas y otros tipos celulares. Los 2 ligandos inicialmente identificados corresponden a proteínas de 35-37 kDa (214) y de 77-80 kDa (215), ambas son expresadas en células B humanas y murinas y en células T humanas activadas, aunque difieren en la naturaleza de su unión a CD5.

La unión de CD5 al ligando de 35-37 kDa puede ocurrir en ausencia de iones divalentes y es inhibida cuando CD5 es deglicosilado, indicando que la interacción es de tipo lectina o bien que la glicosilación de CD5 es crítica para una conformación adecuada del sitio de unión al ligando (214). Por otro lado, la interacción con el ligando de 77-80 kDa requiere de iones divalentes y juega un rol importante en la activación de las células B. La unión CD5-CD5L no solo induce proliferación de las células B, sino que sinergiza la respuesta proliferativa mediada por CD72. Esto indica que la interacción CD5-CD72 no es el único mecanismo por el cual las células T proporcionan señales co-estimulatorias a las células B (215).

Finalmente, la identificación de otro ligando para CD5, diferente a los ya descritos amplió la posibilidad de su participación en la interacción con otros tipos celulares además de las células B. El nuevo ligando es una proteína de 150 kDa expresada en monocitos, linfocitos y en líneas celulares de origen linfoide mieloide y epitelial. Contrario a los ligandos descritos anteriormente, este ligando es expresado de manera basal en células no activadas, su unión es independiente de iones divalentes, pero es inhibida en presencia de altas concentraciones de algunos monosacáridos. De manera interesante este ligando es altamente expresado por una línea epitelial tímica humana, sugiriendo la presencia de un ligando en timo que podría interactuar con los timocitos en desarrollo (216).

La presencia de ligandos para CD5 en una amplia variedad de tipos celulares indicaría que la interacción CD5-CD5L juega un papel importante no solo en la interacción entre células B y T, sino también en interacciones entre linfocitos y células presentadoras de antígeno e interacciones de los timocitos con el estroma tímico durante el desarrollo de las células T.

CD5 y el reconocimiento antigénico

Además de su papel en la regulación de las señales del TCR estudios recientes demuestran que CD5 puede a través de sus dominios tipo scavenger, reconocer los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que comprenden componentes estructurales de patógenos microbianos que no se encuentran en mamíferos (217).

Estudios realizados con una forma soluble de CD5 humano (218) demostraron que la región extracelular de CD5 puede unirse e inducir agregación de varias especies fúngicas saprofitas y patogénicas a través del reconocimiento de β -glucanos.

Como resultado de la interacción de CD5 asociado a membrana y zymosan (agente experimental enriquecido en β -glucanos) se inducen eventos en la señalización intracelular como la activación de las MAP cinasas y de relevancia biológica como la secreción de IL-8. Por último en un modelo murino de choque séptico inducido por zymosan, la adición de CD5 recombinante soluble disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias, los infiltrados leucocitarios en peritoneo e hígado, aumentando la supervivencia de los ratones retados. Esto sugiere que el CD5 soluble puede ser considerado como un potencial agente terapéutico en la sepsis fúngica (218).

II. JUSTIFICACIÓN

Dado que CD5 es una molécula que modula las señales del TCR, favoreciendo la generación de timocitos que se seleccionan mediante interacciones de alta avidéz, estudiamos su papel en generación de las células T reguladoras, una población celular cuya selección en timo requiere de interacciones de alta avidéz.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La ausencia de CD5 podría dar lugar a dos fenómenos;

La ausencia de CD5 afectara de manera negativa la generación de las células T reguladoras. Sin el efecto modulador de CD5, las señales de alta avidéz que permiten la selección de las células T reguladoras en el timo, aumentarán superando el umbral de selección positiva e induciendo la muerte celular/ selección negativa por exceso de señal.

La generación de las células T reguladoras será favorecida por la ausencia de CD5.

En ausencia de CD5 la avidéz de las señales de selección aumentará permitiendo que los timocitos que establecen interacciones de intermedia o baja avidéz, alcancen los umbrales necesarios para diferenciarse al lineaje de células T reguladoras.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el papel de CD5 en la generación de las células T reguladoras.

Objetivos Específicos

Evaluar si la ausencia de CD5 afecta la generación de las células T reguladoras en timo y nódulos linfoides.

Analizar en las células T reguladoras de los ratones deficientes de CD5, la fosforilación de moléculas implicadas en la señalización del TCR.

Determinar la capacidad supresora de las células T reguladoras deficientes de CD5.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Ratones

Los ratones Balb/c fueron obtenidos de Laboratorios Jackson (Bar Harbour, ME). Los ratones deficientes de CD5 en fondo Balb/c fueron donados por el Doctor Chander Raman de la Universidad de Alabama (Birmingham, AL). Los experimentos de este trabajo se realizaron con animales de 8-10 y de 12-13 semanas de edad, mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo los lineamientos del bioterio.

Anticuerpos

Anticuerpos monoclonales utilizados para las tinciones de superficie: anti-CD4 ficoeritrina (PE), anti-CD4 biotina (biot), anti-CD4 isotiocianato de fluoresceína (FITC) todos de la clona (L3T4), anti-CD4 alofocianina (APC) (RM4-5), anti-CD8 "cychrome" (Cyc) (53-6.7), anti-CD3 ϵ biot (145-2C11), anti-CD5 PE (53-7.3), anti-CD25 FITC (7D4), todos de BD Biosciences (San Jose, CA) y anti-CD5 humano Cris-1 puro y biotinilado, proveído amablemente por el Dr. Francisco Lozano.

Para las tinciones intracelulares se usaron; anti-Foxp3 APC (FJK-16s) de eBioscience Inc. (San Diego, CA), anti-p-Erk (T202/Y204) y anti-pCbl (pY700) acoplados a Alexa-647 y anti-caspasa 3 activa PE todos de BD Biosciences. Anti-pAkt (Ser 473) de Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA) y anti-p-PI3K (Tyr508) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La detección de anticuerpos primarios se realizó con estreptavidina conjugada a APC-Cy7 de BD Biosciences, anti-conejo IgG PE y anti-ratón IgG FITC de Zymed Laboratories Inc. (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)

La estimulación de las células para las tinciones intracelulares se realizó con los siguientes anticuerpos: anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti-CD5 (53.7.3) y anti-CD28 (37.51) acoplados a biotina, de BD Biosciences. Se usó estreptavidina Immunopure[®] de Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL) para entrecruzar los anticuerpos biotinilados.

Por último para los ensayos de proliferación y supresión *in vitro*, las células fueron estimuladas con anti-CD3 ϵ hecho en hamster (145-2C11) de BD Biosciences, que se entrecruzó con anti-IgG de hamster de Pierce, Biotechnology Inc.

Preparaciones celulares y citometria de flujo

Se prepararon suspensiones celulares a partir de timo adulto, timo fetal y nódulos linfoides, disgregados mecánicamente con émbolos de jeringa. Se realizó recuento celular en cámara de Newbauer de las células viables mediante tinción de exclusión con azul de tripano. Las células obtenidas a partir de órganos murinos y células de la línea EL-4 ($1-3 \times 10^6$) fueron teñidas con 50 μ l de una dilución de anticuerpo preparada en buffer de tinción, que consiste en PBS 1X adicionado con SFB al 2% y azida de sodio al 0.02%, para esto se incubaron por 20 min a 4°C, protegidas de la luz. Para las tinciones con anticuerpos biotinilados, se realizó una segunda incubación con estreptavidina acoplada a un fluorocromo. Las células teñidas con hasta 4 fluorocromos fueron capturadas en el citómetro de flujo FACSCalibur y analizadas en el programa CellQuest de BD Biosciences. La captura y análisis de muestras con 5 o más fluorocromos se realizó en el citómetro FACSAria y programa FACSDiva respectivamente, también de BD Biosciences. Al menos 1×10^5 células viables fueron colectadas, bajo criterios de tamaño y granularidad.

Detección de Foxp3

Timocitos y linfocitos T periféricos de ratones silvestres y deficientes de CD5 fueron teñidos con el kit de tinción para células T reguladoras de eBioscience Inc., según las indicaciones de la compañía productora. Las células ($1-3 \times 10^6$) se teñieron con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 y se incubaron con 150 μ l de buffer de fijación/permeabilización durante 2 horas a 4°C. Tras la permeabilización se lavaron dos veces con 150 μ l de buffer de permeabilización e incubaron 30 min a 4°C con 50 μ l de anti-Foxp3 diluido 1/50 en el mismo buffer. Para terminar, las células se lavaron de nuevo dos veces con 150 μ l de buffer de permeabilización.

Ensayos de Apoptosis

Las células apoptóticas se detectaron con anticuerpos anti-anexina V y 7-aminoactinomicina (7-AAD). La anexina es una proteína que reconoce fosfatidilserina, un fofosfolípido que se transloca desde el interior hacia la parte exterior de la membrana en células apoptóticas. El 7-AAD es un colorante específico de DNA, que solo tiñe células muertas.

Los timocitos y linfocitos T fueron teñidos con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-anexina-V (5 μ l) y 7-AAD (10 μ l) durante 20 min a temperatura ambiente en un volumen

final de 100 µl de buffer de unión a anexina 1X. Tras la incubación, las células fueron lavadas con 500 µl de buffer de unión a anexina 1X de BD Biosciences.

Para analizar la apoptosis de las Tregs, las células se tiñeron con anti-CD4, anti-CD8, anti-anexina-V y 7AAD, como se describió anteriormente. Después de ser lavadas con 500 µl de buffer de unión a anexina 1X de BD Biosciences, se tiñeron con anti-Foxp3 siguiendo el protocolo de detección de Foxp3 ya descrito. El análisis de caspasa 3 activa se realizó en timocitos frescos y timocitos estimulados (0.8×10^6) durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 (5 µg/ml) + anti-CD28 (5 µg/ml) en 500 µl de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, en pocillos de una placa de 24 pozos. Las células se recuperaron de la placa y tiñeron con anti-CD4 y anti-CD8. Tras la tinción en superficie, se siguió el mismo protocolo empleado para la detección de Foxp3, los anticuerpos anti-caspasa 3 activa (10 µl) y anti-Foxp3 se incubaron de manera simultánea en buffer de permeabilización durante 30 min a 4°C.

Ensayos de fosforilación

Los timocitos de ratones silvestres y deficientes de CD5 fueron estimulados y teñidos de acuerdo al protocolo de BD Bioscience. Las células (3×10^6) fueron teñidas con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 y estimuladas con pervanadato (100nM), PMA/ionomicina (20 ng/ml y 200 ng/ml respectivamente), anti-CD3 (10 µg/ml), anti-CD5 (10 µg/ml), anti-CD28 (10 µg/ml) todos de BD Bioscience. Las estimulaciones se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 sin SFB a 37°C durante 3 min, salvo el pervanadato que se estimuló durante 5 min. La activación inducida por los estímulos se detuvo por fijación con 300 µl de buffer Lyse/Fix, por 10 min a 37°C. Las células se permeabilizaron 20 min a 4°C con 100 µl de buffer de permeabilización II, después de lo cual se lavaron y tiñeron 30 min a temperatura ambiente con anticuerpos anti-pErk (5 µl) y anti-pCbl (5 µl) acoplados a Alexa 647 o bien con anticuerpos purificados anti-pPI3K (5 µl) y anti-pAkt (1 µl) hechos en conejo. La detección de estos se realizó mediante una incubación adicional de 20 min a temperatura ambiente, con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a PE de Zymed Laboratories Inc. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo® Tree Star.

Cultivos de órgano de timo fetal (FTOC)

Ratonas embarazadas fueron sacrificadas en el día 15 de gestación. Los timos fetales

fueron removidos, dispuestos en membranas de Millipore Corporation (Billerica, MA), ubicadas en placas de 6 pozos y cultivados en 1ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de SFB, 20mM de HEPES, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 2mM de L-Glutamina, 0.05mM de 2-Mercapto etanol y 1% de penicilina, estreptomina y fungizona, todos de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). El medio de cultivo fue remplazado cada 3 días con medio fresco. El día 8 de cultivo, los lóbulos tímicos fueron disgregados y los timocitos obtenidos fueron contados y teñidos. La tinción de Foxp3 se realizó a partir de un conjunto de 3 lóbulos, mientras los ensayos de apoptosis se realizaron en lóbulos individuales, siguiendo la metodología ya descrita.

Separación electrónica

Células aisladas de bazo (depletadas de eritrocitos) fueron combinadas con células derivadas de nódulos linfoides y enriquecidas en células CD4⁺ mediante selección negativa. Para esto, las células son incubadas 30 min a 4°C con sobrenadante de un hibridoma que produce anticuerpos de rata anti-CD8, proveído por la Dra. Laura Bonifaz del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y con anticuerpos anti-B220 (RA3-6B2) y anti-CD19 (ID3) de BD Biosciences hechos en rata. Después las células se incuban en placas de cultivo sensibilizadas con IgG anti-rata de MP Biomedicals Inc. (Solon, OH) por 30 min a 37°C. Las células no adheridas a la placa son recuperadas lavadas y teñidas con anti-CD4 PE y anti-CD25 FITC. Las células CD4⁺CD25⁻ (designadas como células T efectoras) y CD4⁺CD25^{+hi} (designadas como células T reguladoras) son purificadas electrónicamente en un citómetro FACSAria de BD Bioscience. El porcentaje de pureza obtenido de las poblaciones separadas es mayor del 96%.

Ensayos de suppression *in vitro*

Para determinar la proliferación celular, células T (1x10⁵) CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25^{+hi} separadas electrónicamente fueron estimuladas con 10 µg/ml de anti-CD3 soluble de BD Biosciences, entrecruzado con 20 µg/ml de anti-IgG de Pierce, Biotechnology Inc. Como células presentadoras de antígeno se adicionaron al cultivo, (1x10⁵) esplenocitos silvestres irradiados a 3000 rads. El fenotipo anérgico de las células T reguladoras se revirtió mediante adición de 30 u/ml de IL-2 humana recombinante de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN).

Los ensayos de supresión se realizaron mediante co-cultivo de (1×10^5) células $CD4^+CD25^-$ y $CD4^+CD25^{+hi}$ en relación 1:1, en presencia de anti-CD3 y (1×10^5) esplenocitos silvestres irradiados.

Las células fueron cultivadas por triplicado en placa de 96 pozos en un volumen final de 200 μ l de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 10mM de HEPES, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-Glutamina, 0.05mM de 2-Mercapto etanol y 1% de penicilina, estreptavidina y fungizona, todos de (Invitrogen Corporation). Tras 16 horas de cultivo las células fueron pulsadas con 1 μ Ci/por pozo de timidina [H^3]. Las células fueron cosechadas 72 horas después y la incorporación de timidina [H^3] se midió en un Beta-Plate Counter 1205 Wallace de Pegasus Scientific Inc. (Rockville. MD).

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba de t de Student de 2 colas, una prueba estadística que se usa para determinar si existe una diferencia significativa entre las medias de las dos poblaciones independientes con distribución normal (219). Valores de P iguales o inferiores a 0.05 fueron considerados como significativos.

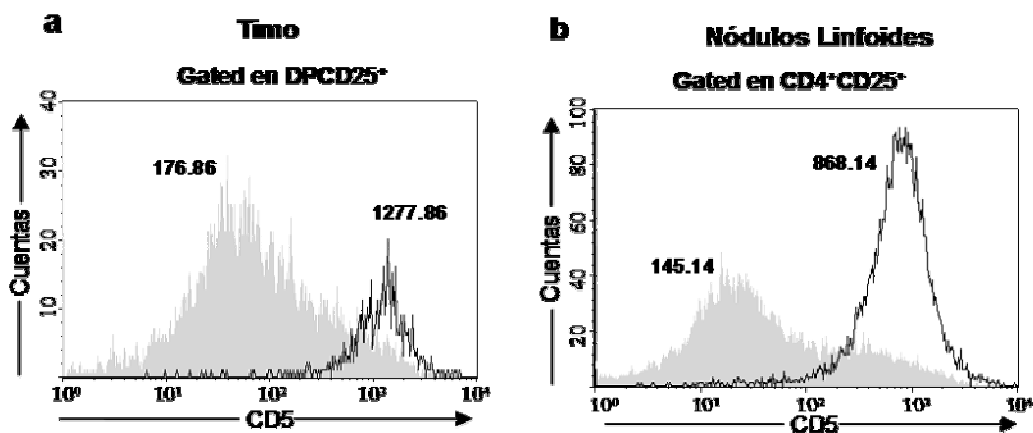
V. RESULTADOS

Para determinar el papel de CD5 en la generación de timocitos que se seleccionan bajo interacciones de alta avidéz, decidimos analizar la generación de células T reguladoras en ratones deficientes de CD5. Evaluamos la presencia de esta población celular en timo y ganglios linfáticos mediante tinción intracelular del factor transcripcional Foxp3, su origen tímico se demostró mediante cultivos de órgano de timo fetal (FTOC) y su funcionalidad se evaluó mediante ensayos de supresión. La apoptosis diferencial de células “naive” y Tregs se evidenció mediante tinción con 7AAD y anticuerpos anti-anexina-V y anti-caspasa 3 activa. Por último el estado de activación de las Tregs se evaluó mediante tinción intracelular de varias moléculas implicadas en la señalización del TCR.

Expresión de CD5 en células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Para analizar de manera más precisa la expresión de CD5, durante el desarrollo de las células reguladoras naturales, se examinó la expresión de CD5 en timocitos CD25⁺ dentro de las subpoblaciones DP y CD4SP, incluyendo en el análisis el marcador Foxp3, considerado como el marcador más específico de las nTregs (114). Los timocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ muestran una mayor expresión de CD5 que los timocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (IMF 1142.61± 38.9 vs 299.46±14.46; p<0.05) (Figura 12a, panel inferior). De manera interesante, los timocitos DPs CD25⁺Foxp3⁺ también expresan mayores niveles de CD5 que los timocitos DPs CD25⁺Foxp3⁻ (IMF 1184.50±31.96 vs 278.98±14.77; p<0.05) (Figura. 12a, panel superior).

Al analizar las células aisladas de los ganglios periféricos también se encontró una mayor expresión de CD5 en células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ que el observado en células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (IMF 867.29±18.89 vs 336.51±1.36; p<0.05) (Figura 12b). En la figura 12c se muestra un resumen de los resultados obtenidos en timo y ganglios linfáticos. Los resultados indican que la alta expresión de CD5 puede considerarse como una característica fenotípica exclusiva de las células reguladoras naturales.



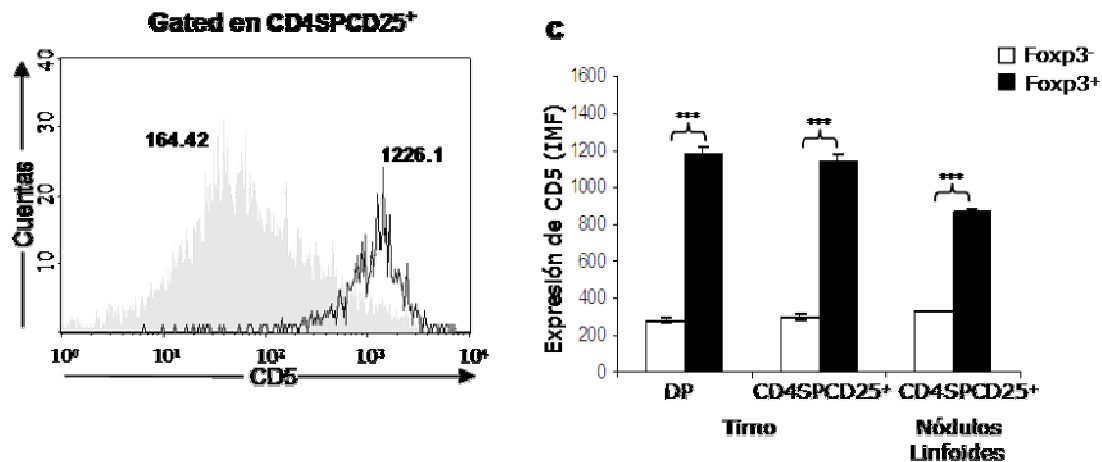


Figura 12. Las células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ expresan mayores niveles CD5, que las células $CD4^+CD25^+Foxp3^-$. (a) Timocitos y (b) linfocitos T de ratones de 10 semanas de edad fueron aislados y teñidos con anti-CD4, CD8, CD25, CD5 y Foxp3. El nivel de CD5 en superficie esta representado con valores de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en las células $CD25^+Foxp3^-$ (sombreado gris) y $CD25^+Foxp3^+$ (línea negra) de las subpoblaciones indicadas. Se muestra un experimento representativo. (d) La gráfica representa el resumen de los datos obtenidos. Las barras indican el error estándar (n=4). *** $p \leq 0.01$.

Análisis de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ en ratones deficientes de CD5

Para determinar el papel de CD5 en la generación de las nTregs, se cuantificó la población de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ aisladas del timo de ratones silvestres y deficientes de CD5 (8-10 semanas). El análisis realizado indica que los ratones $CD5^{-/-}$ tienen un mayor porcentaje de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ comparado con ratones silvestres ($5.01 \pm 0.20\%$ vs $3.68 \pm 0.26\%$; n=8, $p < 0.001$) (Figura 13a-b). Además del porcentaje, el número absoluto de células también se encuentra incrementado en los ratones $CD5^{-/-}$ ($621.09 \pm 87.28 \times 10^3$ vs $404.65 \pm 33.75 \times 10^3$, n=8, $p < 0.05$) (Figura 13c), sugiriendo que las señales de CD5 son relevantes para el desarrollo de las nTregs.

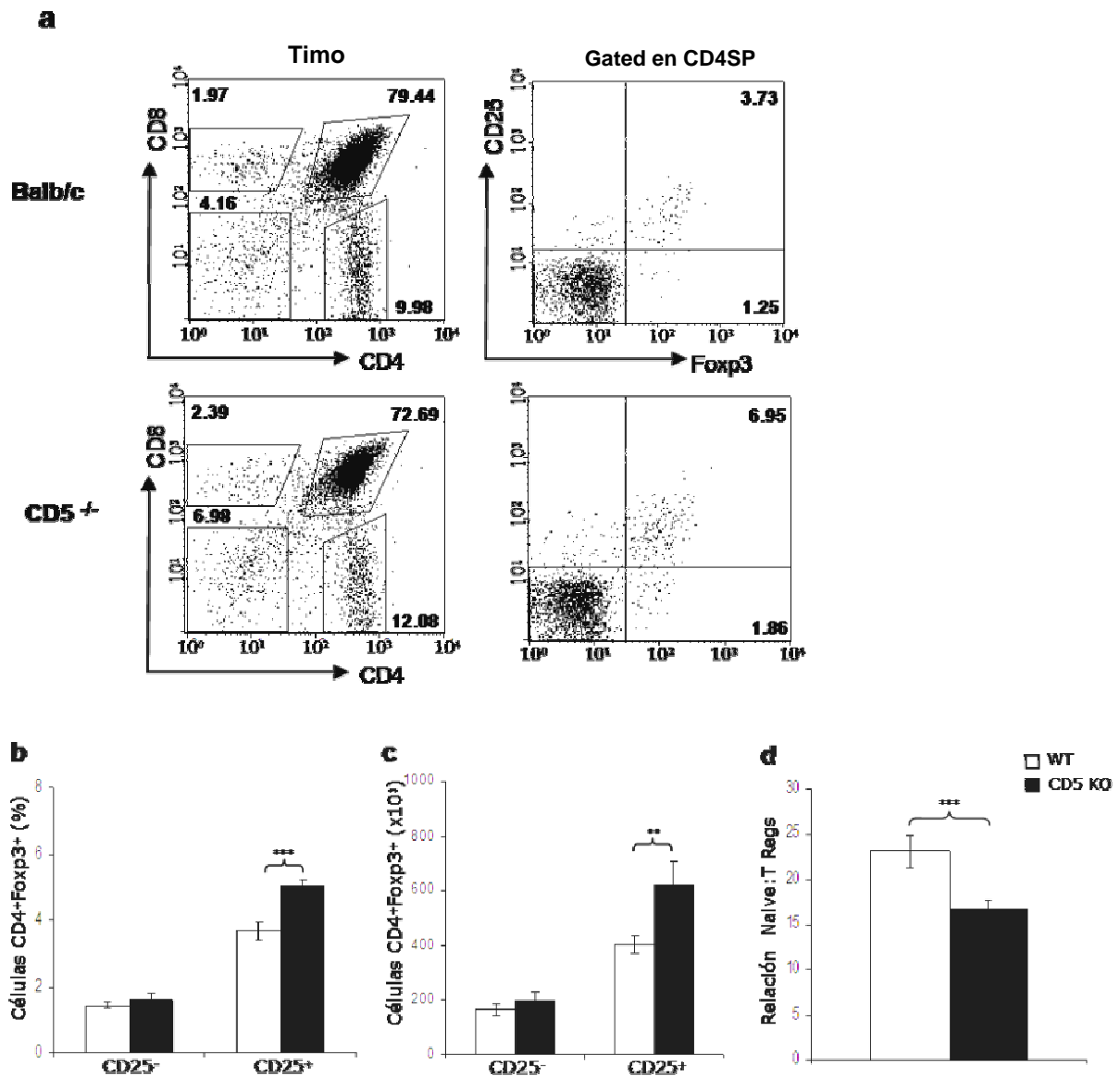


Figura 13. Hay un incremento en la proporción y el número de células CD4⁺CD25⁺Fxp3⁺ en el timo de los ratones deficientes de CD5. (a) Timocitos de ratones wt y CD5^{-/-} de 8-10 semanas fueron aislados, contados y teñidos con anti-CD4, CD8, CD25 y Fxp3. Los dot-plots muestran el porcentaje de células CD25⁻Fxp3⁺ y CD25⁺Fxp3⁺ dentro de la subpoblación CD4. Se muestra un experimento representativo. La gráfica representa (b) el porcentaje y (c) los números absolutos de timocitos Fxp3⁺ dentro de las poblaciones CD25⁻ y CD25⁺. (d) Se muestra la relación de células "naive":Tregs, que se calculo dividiendo el número absoluto de timocitos "naive" entre el número de Tregs. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar (n=8 por grupo). **p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.01.

Determinación de poblaciones tímicas en ratones deficientes de CD5

Al analizar las poblaciones celulares del timo, se observó que los ratones $CD5^{-/-}$ de 12 semanas muestran una disminución significativa en los números absolutos de timocitos comparados con ratones silvestres ($43 \pm 4 \times 10^6$ vs $117 \pm 9 \times 10^6$; $n=4$ $p < 0.01$, no mostrado). El análisis de las subpoblaciones tímicas de estos ratones muestra un alto porcentaje de células dobles negativas ($8.6 \pm 1.7\%$ vs $3.8 \pm 0.52\%$; $n=4$ $p < 0.01$), una reducción en el porcentaje de dobles positivas ($57.5 \pm 5.6\%$ vs $75.7 \pm 2.6\%$; $n=4$, $p < 0.05$) y un ligero incremento de células CD8 simple positivas ($4.7 \pm 0.52\%$ vs $3.1 \pm 0.3\%$; $n=4$, $p < 0.05$), sin cambios significativos en la población de células CD4 simple positivas (Figura 14a).

Los números absolutos de cada subpoblación se encuentran afectados de manera diferencial, mostrando una pérdida importante de células DPs ($25.4 \pm 3.8 \times 10^6$ vs $88.9 \pm 7.8 \times 10^6$; $n=4$, $p < 0.001$) (Figura 14b), que podría explicar la reducción de la celularidad tímica observada en los ratones $CD5^{-/-}$. De manera adicional, los números de timocitos CD4SP y CD8SP también se encuentran reducidos.

Esta importante reducción en la celularidad tímica de ratones $CD5^{ko}$ de 12 semanas de edad, también afecta los números absolutos de nTregs, que no alcanzan a ser significativamente mayores a los observados en ratones silvestres (Figura 14c). Sin embargo cuando se comparan los números de células "naive" ($CD4^+CD25^-Foxp3^-$) y Tregs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) presentes en ratones silvestres y $CD5^{-/-}$, encontramos que la relación de células "naive": Tregs esta disminuida de manera significativa en los ratones $CD5^{-/-}$ respecto a los ratones wt (18.36 ± 1.41 vs 25.99 ± 1.88 , $n=8$, $p \leq 0.05$), indicando que las células "naive" pero no las Tregs se reducen de manera preferencial en ausencia de CD5 (Figura 14d). De manera interesante la relación de células "naive":Tregs también esta disminuida de manera significativa en ratones $CD5^{-/-}$ de 8 semanas de edad (16.76 ± 0.94 vs 23.11 ± 1.74 ; $n=8$, $p \leq 0.01$) (Figura 13d).

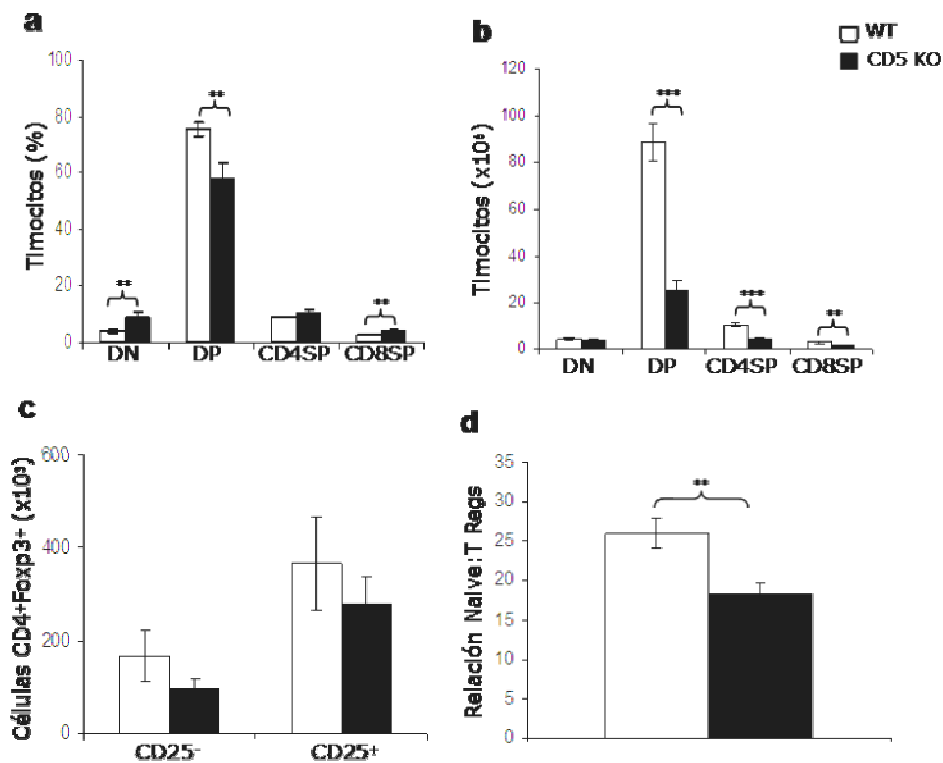


Figura 14. Efecto de la deficiencia de CD5 en las subpoblaciones tímicas. Timocitos de ratones wt y CD5^{-/-} de 12 semanas fueron aislados, contados y teñidos con anti-CD4, CD8, CD25 y Foxp3. La gráfica representa (a) el porcentaje y (b) el número absoluto de timocitos en cada subpoblación. (c) Número absoluto de timocitos Foxp3⁺ en la población CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺. (d) Relación de células “naive”:Tregs calculada como se describió anteriormente. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar (n=8 por grupo). **p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.01.

Análisis de apoptosis celular en timocitos deficientes de CD5

Dado que los timocitos deficientes de CD5 son hiperresponsivos a las señales mediadas por el TCR (161) y es sabido que las interacciones de alta avidéz dan lugar a la muerte de los timocitos (220). Se sugiere la posibilidad de que la reducción del número total de timocitos observada en los ratones CD5^{-/-} (de 12 semanas de edad) se deba a una mayor apoptosis. Para probar esta hipótesis, se realizaron tinciones con anexina-V y 7-AAD en timocitos de ratones silvestres y deficientes de CD5 (Fig. 15a-c). Como se muestra en la

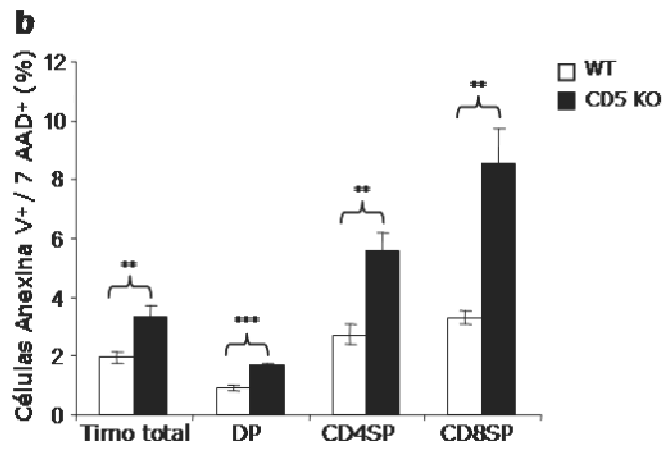
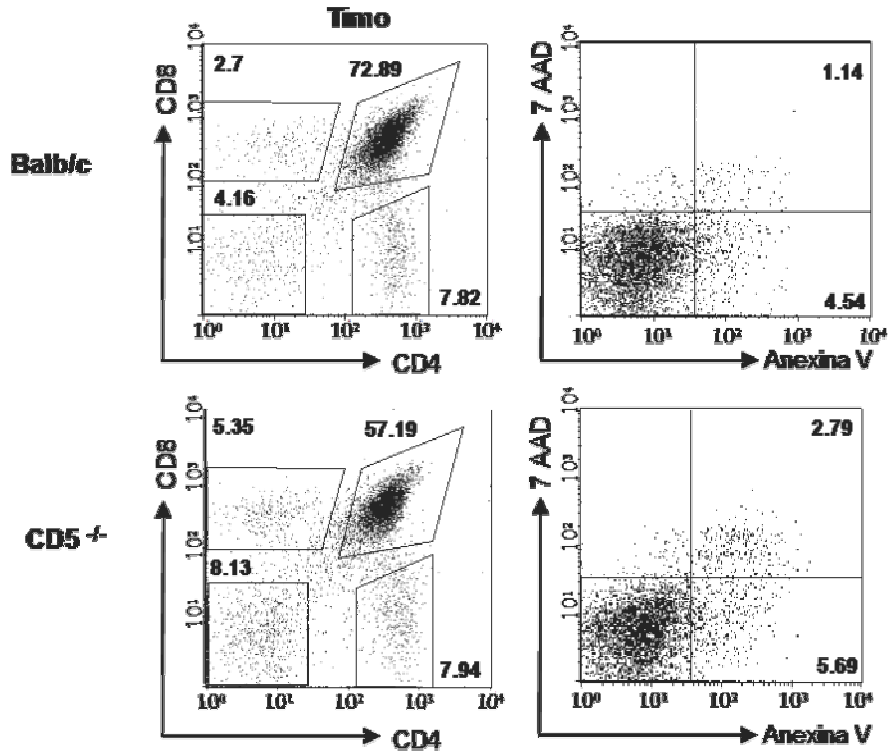
Figura 15b, los ratones CD5^{-/-} tienen un incremento en el porcentaje de los timocitos que se encuentran en apoptosis tardía/necrosis (anexina-V⁺/ 7AAD⁺) comparado con ratones silvestres (3.36 ± 0.36% vrs 1.96 ± 0.16%; n=5, p<0.001).

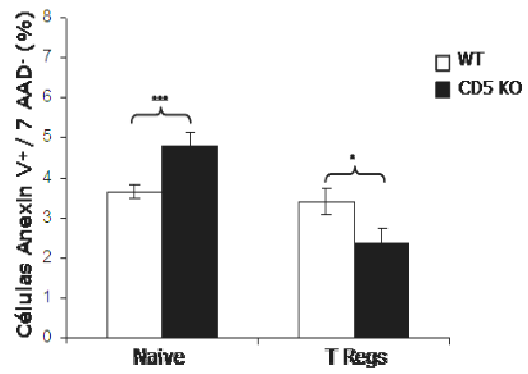
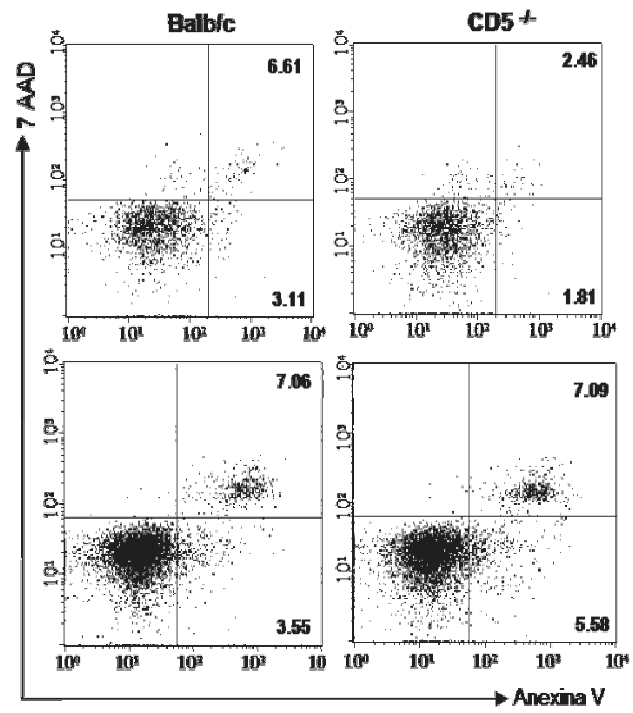
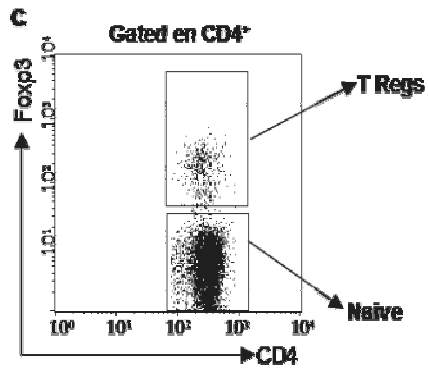
De manera interesante, el análisis de subpoblaciones revela que la apoptosis está aumentada no solo en la subpoblación de células DP (1.7 ± 0.08% vrs 0.9 ± 0.09%; n=5, p<0.001), sino también en la de CD4SP (5.56 ± 0.64% vrs 2.74 ± 0.35%; n=5, p<0.05) y CD8 SP (8.52 ± 1.2% vrs 3.3 ± 0.23%; n=5, p< 0.05) (Figura 15b). También observamos un incremento discreto, aunque no significativo, del porcentaje de timocitos (anexina-V⁺/7AAD⁻) que se encuentran en apoptosis temprana (Figura 15a).

Con el fin de analizar la inducción de apoptosis en nTregs, se realizó tinción con 7AAD y anexina-V después de teñir con anti-CD4, anti-CD8 y Foxp3. La Figura 15c muestra un aumento significativo en el porcentaje de células “naive” deficientes de CD5 que se encuentran en apoptosis temprana (identificadas como anexina-V⁺ 7AAD⁻), respecto al porcentaje observado en células “naive” wt (3.67± 0.17% vrs 4.78± 0.37; n=4, p≤ 0.01). De manera inesperada la apoptosis de las nTregs aparece ligeramente disminuida en ratones CD5^{-/-} en comparación con las nTregs de ratones wt (2.3 ± 0.34 vrs 3.4 ± 0.32%; n=4, p≤0.1).

Los resultados obtenidos por la tinción con 7-AAD y anexina-V, fueron confirmados mediante tinción intracelular de Caspasa 3 activa, una molécula usada como indicador de la inducción de selección negativa en timocitos (221). Como se observa en la Figura 15d, el porcentaje de células “naive” CD5^{-/-} que son positivas para caspasa 3 activa es significativamente mayor que el observado en células “naive” wt (16.59 ± 0.8 vrs 12.45 ± 0.41%; n=4, p≤ 0.01), mientras el porcentaje de nTregs positivas para caspasa 3 es menor en ratones CD5^{-/-} comparado con ratones silvestres (4.01 ± 0.73 vrs 7.24 ± 0.83%; n=4, p ≤ 0.05).

a





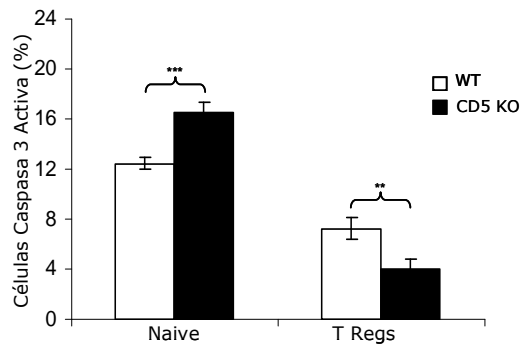
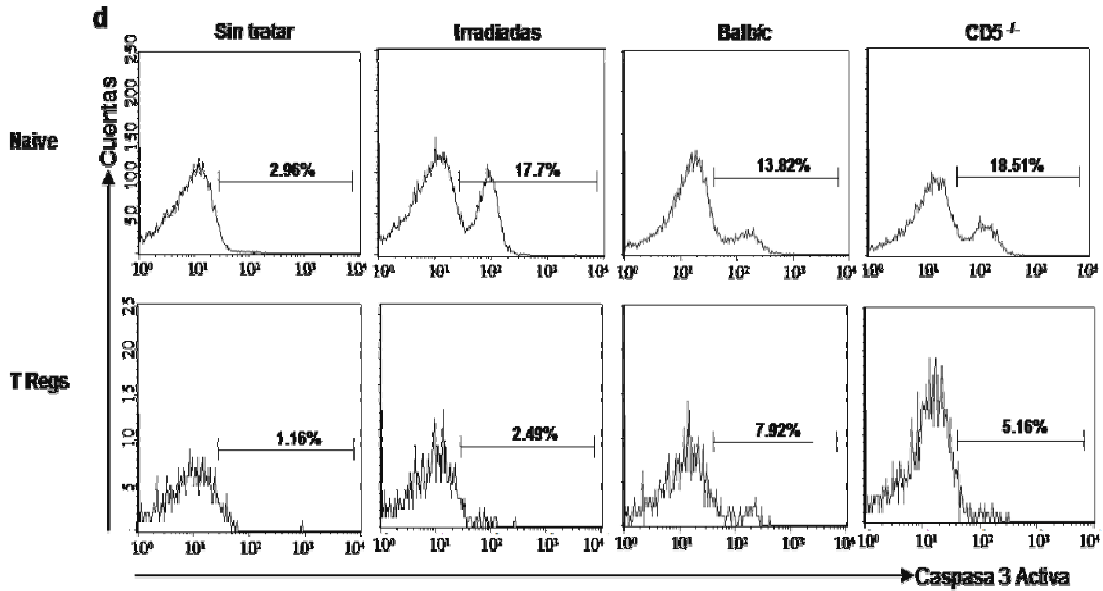


Figura 15. Incremento en la apoptosis de timocitos “naive” de ratones CD5^{-/-}. (a) Timocitos de ratones wt y CD5^{-/-} de 12 semanas fueron aislados, contados y teñidos con anti-CD4, CD8, Anexina V y 7-AAD. Los dot-plots muestran el porcentaje de timocitos totales en el cuadrante correspondiente. Se muestra un experimento representativo. (b) Porcentaje de células anexina V⁺ y 7-AAD⁺ en timo total, y las subpoblaciones DP, CD4 y CD8. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar (n=5 por grupo). Para analizar la apoptosis de células “naive” y Tregs, los timocitos fueron teñidos con anti-CD4, CD8, Foxp3, anexina V y 7-AAD. (c) La tinción de anexina V y 7-AAD se analizó en las poblaciones indicadas. Se muestra un experimento representativo. La gráfica del panel inferior representa el resumen de los datos obtenidos. (d) Niveles de caspasa-3 activa fueron analizados en timocitos “naive” y

Tregs. Los timocitos fueron estimulados toda la noche con anti-CD3+CD28 y teñidos con anti-CD4, CD8, Foxp3 y caspasa-3 activa. Se muestra un experimento representativo. El número en cada histograma representa el porcentaje de células positivas para caspasa-3. La gráfica del panel inferior representa el resumen de los datos obtenidos, representativos de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar (n=8-10 por grupo). * $p \leq 0.1$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$.

Señalización intracelular del TCR en ausencia de CD5

Con el fin de analizar las vías de señalización involucradas en el enriquecimiento de las nTregs y en la apoptosis observada en los ratones deficientes de CD5, se analizó la fosforilación basal y tras estímulo CD3+CD28, de algunas proteínas relevantes en la señalización del TCR. Como se muestra en la Figura 16a, las células CD4⁺CD25^{+hi} (consideradas como Tregs) aisladas de ratones CD5^{-/-} muestran un incremento significativo en los niveles basales de ERK, respecto a las células de ratones silvestres. En contraste, la fosforilación basal de PI3K y Akt se encuentra incrementada en la población CD4⁺CD25⁻ (células “naive”) CD5^{-/-} (Figura 16a, panel inferior).

De manera interesante, la fosforilación de Akt tras el estímulo CD3+CD28 se encuentra reducida en las células CD4⁺CD25⁻ deficientes de CD5 respecto a células CD4⁺CD25⁻ silvestres, mientras la población CD4⁺CD25^{+hi} responde de manera similar a las células silvestres (Figura 16b, panel superior).

Los niveles reducidos de fosfo Akt observados de manera exclusiva en los timocitos “naive” CD4⁺CD25⁻ deficientes de CD5, podrían explicar el incremento en la apoptosis observada de manera preferencial en esta población celular, dado que Akt esta involucrado en la supervivencia celular (222, 223).

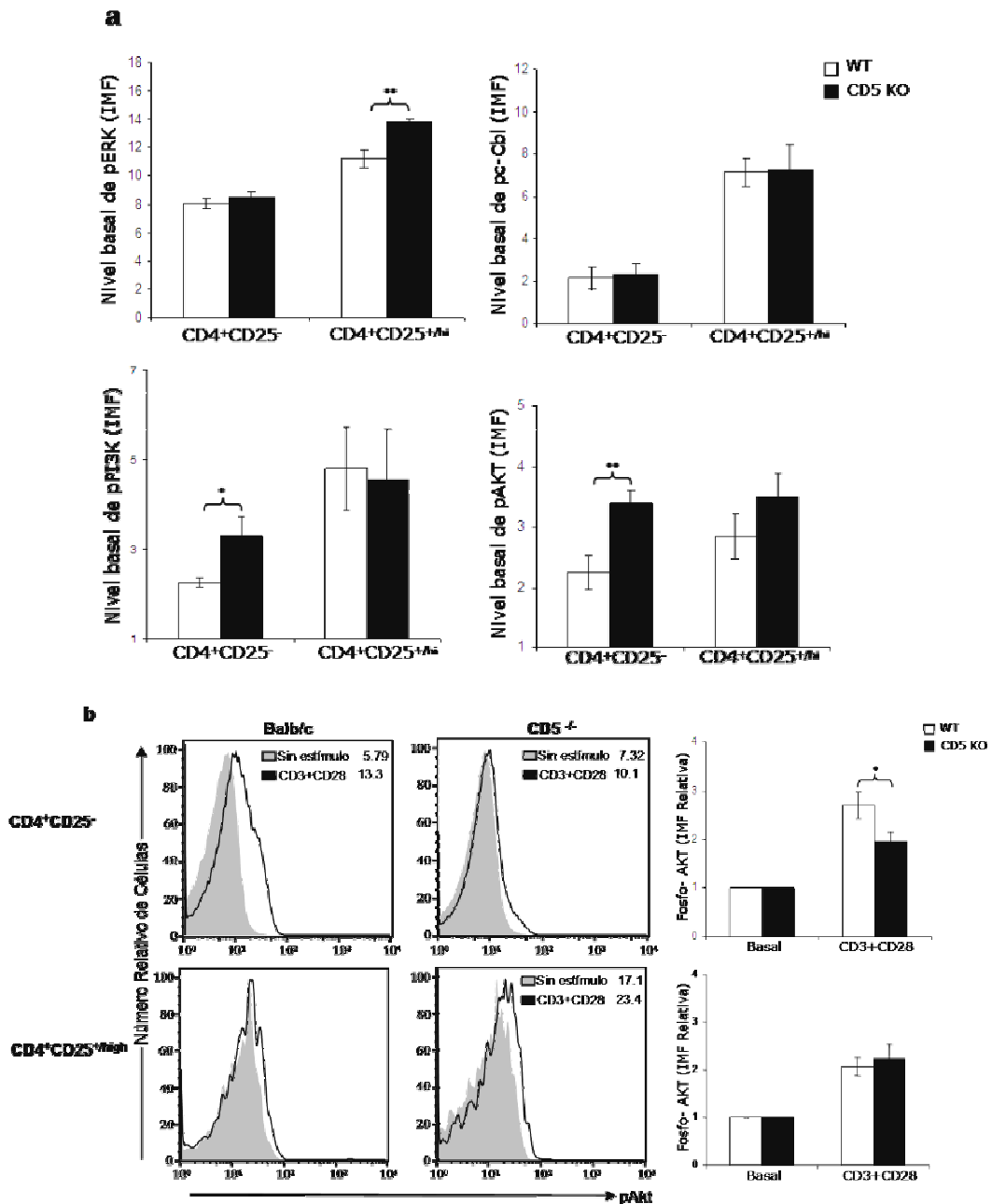


Figura 16. Análisis del nivel de activación de los timocitos aislados de ratones wt y CD5^{-/-}, estimulados con CD3+CD28. (a) Se determinó la fosforilación basal de Erk, c-Cbl, PI3K y Akt en timocitos “naive” y Tregs de ratones wt y CD5^{-/-}. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-

CD4, CD8 y CD25 en combinación con anticuerpos para cada fosfo-proteína. La fosforilación basal se calculó restando la IMF de las muestras no estimuladas-IMF de la misma muestra no teñida. (b) Timocitos “naive” y Tregs de ratones wt y CD5^{-/-} fueron estimulados con CD3+CD28 y se determinó la fosforilación de Akt. Se muestra un experimento representativo. Los paneles de la derecha muestran el incremento de la fosforilación de Akt que se calculó dividiendo IMF de las muestras estimuladas entre la IMF de las muestras no estimuladas. Las barras indican el error estándar (n=3-5 por grupo). *p ≤0.1, **p ≤0.05.

Origen de las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

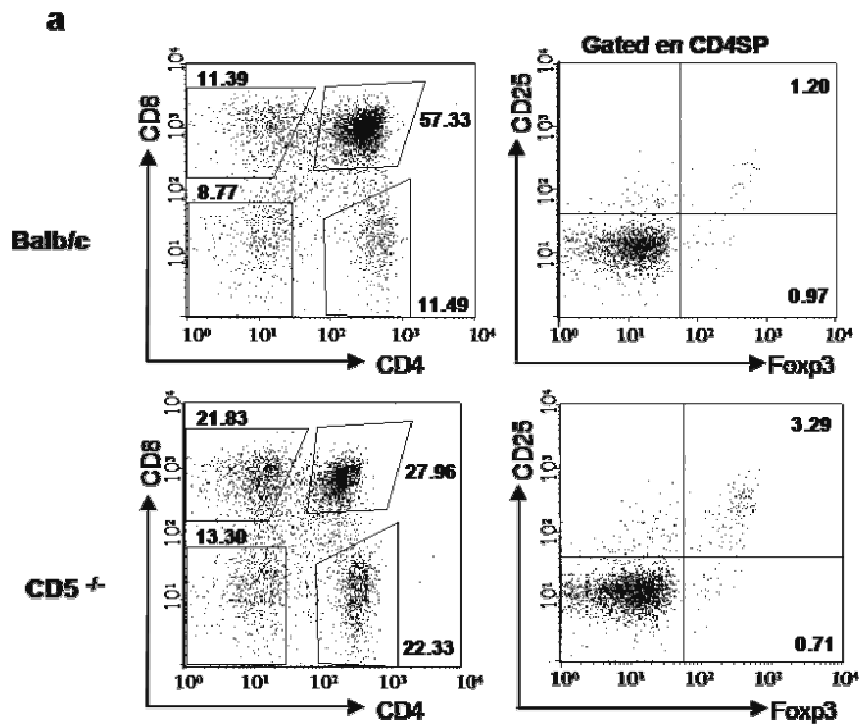
El cultivo de órgano de timo fetal, es un sistema que permite analizar el desarrollo de las células T *in vitro* y consiste en el cultivo de lóbulos tímicos aislados de embriones murinos. Este cultivo permite analizar el efecto de adicionar reagentes como inhibidores farmacológicos, anticuerpos neutralizantes, péptidos antigénicos y citocinas a las poblaciones tímicas en cultivo, sin la influencia de otros tipos celulares ajenos al microambiente tímico(224).

Se emplearon cultivos de timo fetal para determinar el origen de las células reguladoras naturales aumentadas en el ratón deficiente de CD5. Se aislaron y cultivaron timos fetales de embriones de día 15 de gestación. Después de 8 días de cultivo, se observó un incremento en el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los FTOCs deficientes de CD5, en comparación con los FTOCs silvestres (3.54 ± 0.3% vs 2.02 ± 0.32%; n=10, p<0.05) (Figura 17a-b). Esto demuestra que las células reguladoras naturales son derivadas del timo y no representan linfocitos T recirculantes de periferia, que han entrado nuevamente al timo(225). El incremento de las células CD25⁺Foxp3⁺ también se observa en la subpoblación de células DP.

De manera interesante, y similar a lo observado en timo adulto, el número absoluto de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ está incrementado de manera significativa en los FTOCs de los ratones CD5^{-/-} (4.92 ± 0.89 ×10³ vs 2.66 ± 0.62 ×10³; n=10, p<0.05) (Figura 17c), sugiriendo que las células nTregs se están generando *de novo*. Por otro lado el incremento del porcentaje de los timocitos Foxp3⁺, al igual que en timo adulto, se restringe

a la subpoblación positiva para CD25, respaldando la idea de que esta población efectivamente corresponde a células nTregs convencionales derivadas del timo.

Los análisis de subpoblaciones realizadas en los FTOCs revelan una disminución significativa en la proporción de timocitos DP (32.17 ± 2.27% vs 53.65 ± 1.88%; n=10, p <0.001), incremento en los DN (14.2 ± 0.82% vs 9.94 ± 0.29%; p <0.001) y en las CD8SP (22.52 ± 1.43% vs 12.13 ± 0.63%; n=10, p <0.001) (Figura 17d). Los números de timocitos DP se encuentran significativamente reducidos en los FTOCs CD5^{-/-} (198.36 ± 21.98 x10³ vs 376.12 ± 23.38 x10³; n=10, p<0.001), similar a lo observado en el timo CD5^{-/-} adulto (ver Figura 15a-b). De manera interesante, los timocitos CD8SP se encuentran incrementados en los mismos cultivos (142.85 ± 17.57 x10³ vs 84.3 ± 5.3 x10³; n=10, p<0.005) (Figura 17e).



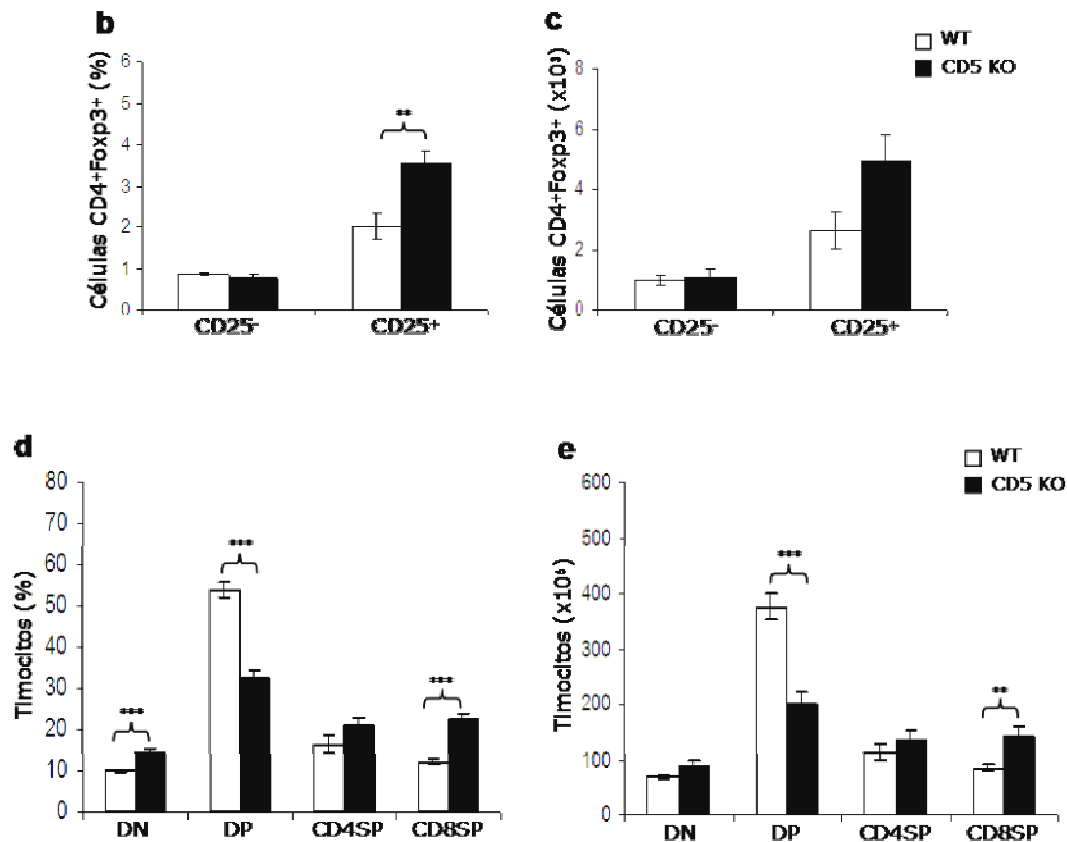


Figura 17. La ausencia de CD5 da lugar a un aumento en la generación de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y afecta de manera diferencial otras subpoblaciones tímicas. Lóbulos tímicos fetales de embriones de d15 de gestación de ratones wt y CD5^{-/-} fueron cultivados durante 8 días en membrana de “millicell”. Los timocitos fueron aislados de los lóbulos tímicos, contados y teñidos con anti-CD4, CD8, CD25 y Foxp3. (a) Los dot-plots muestran el porcentaje de células CD25⁻Foxp3⁺ y CD25⁺Foxp3⁺ dentro de la subpoblación CD4. Se muestra un experimento representativo. La gráfica representa (b) el porcentaje y (c) los números absolutos de timocitos Foxp3⁺ dentro de las poblaciones CD25⁻ y CD25⁺. (d-e) Se muestran las subpoblaciones tímicas de los ratones wt y CD5^{-/-}. Las gráficas representan (d) el porcentaje y (e) el número absoluto de células en cada subpoblación tímica. Los resultados son representativos de lóbulos en “pool” (3 lóbulos/“pool”) (n=10 “pools” por genotipo). Las barras indican el error estándar. **p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.01.

Finalmente, los análisis de apoptosis de los FTOCS CD5^{-/-} también muestran un incremento en el porcentaje de células anexina-V⁺/ 7AAD⁺ (apoptosis tardía/necrosis) en timo total (7.61 ± 0.92% vrs 5.58 ± 0.46%, n=8-11 lóbulos p<0.05) y en la subpoblación de

timocitos DP (4.36± 0.69% vs 2.02 ± 0.18%, n= 8-11 lóbulos, p< 0.001) (Figura 18a-b), de manera similar a lo observado en el timo adulto de los ratones CD5^{-/-}.

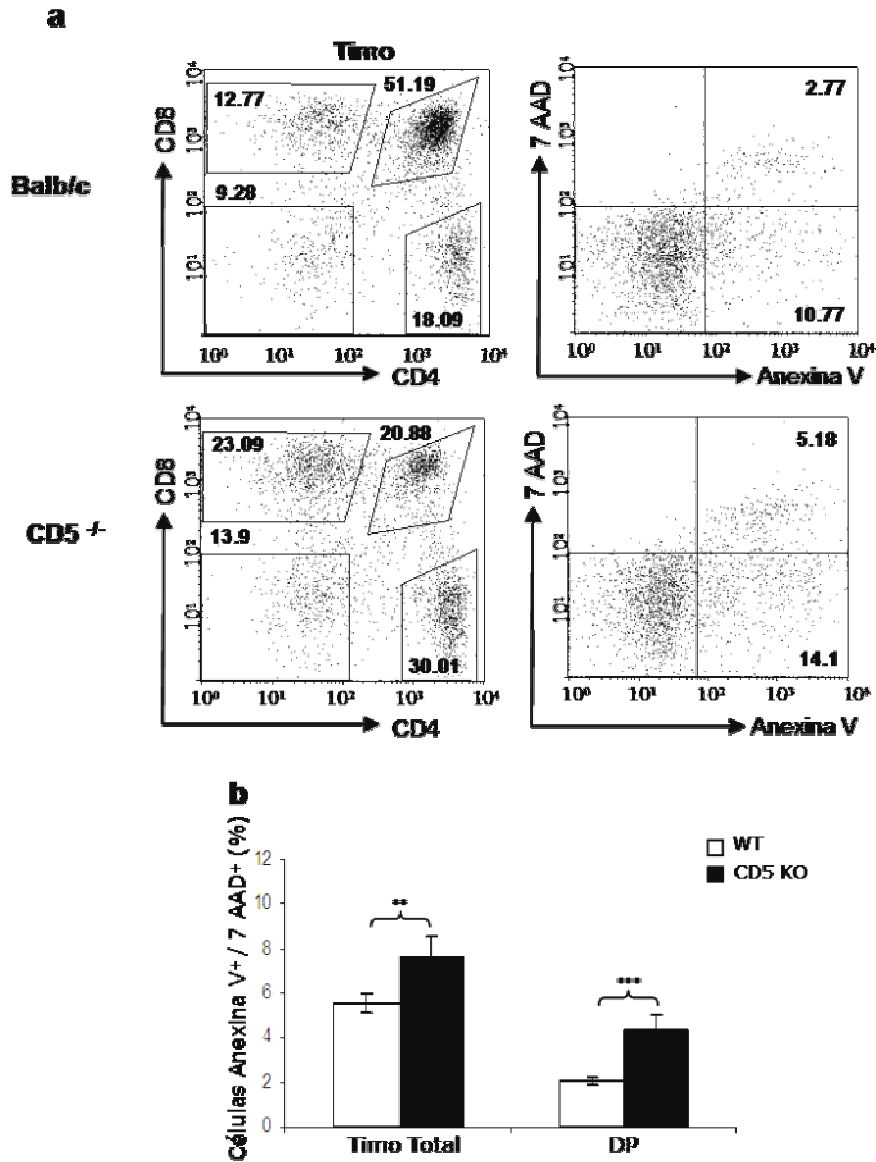
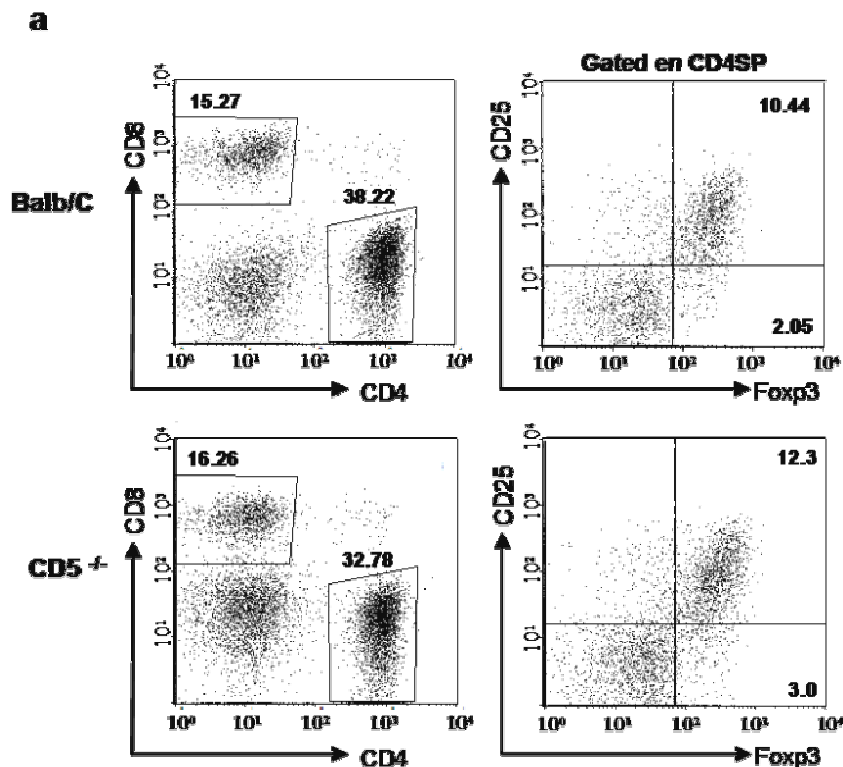


Figura 18. Aumento de la proporción de células apoptóticas en FTOCs de ratones wt y CD5^{-/-}. (a) Timocitos aislados de FTOCs wt y CD5^{-/-} fueron contados y teñidos anti-CD4, CD8, Anexina V y 7-AAD. Los dot-plots muestran el porcentaje de timocitos totales en el cuadrante correspondiente. Se muestra un experimento representativo. (b) Porcentaje de células anexina v+ y 7-AAD+ en timo total y la subpoblación DP. Los datos son representativos de 8-11 lóbulos por grupo. Las barras indican el error estándar. **p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.01.

Análisis de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los nódulos linfoides.

Se analizó la presencia de Tregs en los órganos linfoides periféricos de los ratones CD5^{-/-}. Como se muestra en la figura 19, los nódulos linfoides muestran un incremento significativo en la proporción ($11.97 \pm 0.27\%$ vs $9.84 \pm 0.18\%$; $n=8$, $p<0.001$) (Figuras 19a- b) y el número absoluto de las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ($1.75 \pm 0.1 \times 10^6$ vs $1.48 \pm 0.07 \times 10^6$; $n=8$, $p<0.1$) (Figura 19c).

De manera interesante, las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de ratones deficientes de CD5 se encuentran incrementadas en porcentaje ($3.57 \pm 0.44\%$ vs $1.96 \pm 0.07\%$; $n=8$, $p<0.05$) y en números absolutos ($0.53 \pm 0.08 \times 10^6$ vs $0.29 \pm 0.02 \times 10^6$; $n=8$, $p<0.05$). Estas células Foxp3⁺ podrían ser consideradas como células T reguladoras adaptativas (226), una subpoblación de células reguladoras que pueden ser inducidas en periferia bajo condiciones particulares de exposición antigénica (227) o en presencia de citocinas particulares (137, 158). Sin embargo experimentos adicionales deben ser realizados para comprobar que esta población celular se induce efectivamente en periferia.



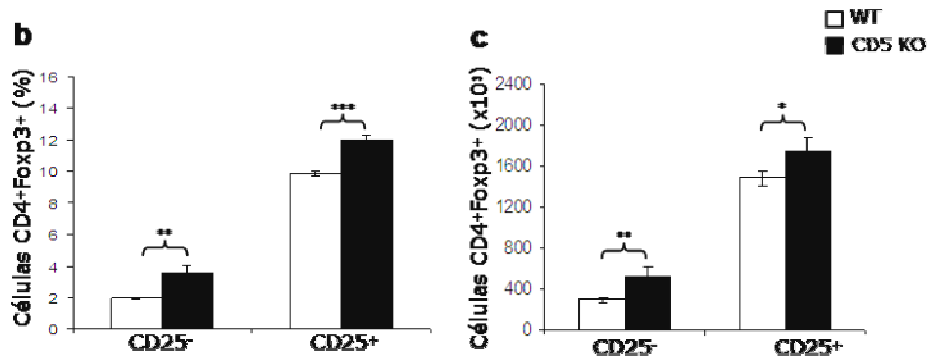


Figura 19. Enriquecimiento de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los nódulos linfoides de ratones deficientes de CD5. (a) Linfocitos T de ratones wt y CD5^{-/-} de 8-10 semanas fueron aislados, contados y teñidos con anti-CD4, CD8, CD25 y Foxp3. Los dot-plots muestran el porcentaje de células CD25⁻Foxp3⁺ y CD25⁺Foxp3⁺ dentro de la subpoblación CD4. Se muestra un experimento representativo. La gráfica representa (b) el porcentaje y (c) los números absolutos de timocitos Foxp3⁺ dentro de las poblaciones CD25⁻ y CD25⁺. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar (n=8 por grupo). **p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.01.

Determinación de la capacidad supresora de las células reguladoras

Para evaluar la función de las células Tregs generadas en ratones deficientes de CD5, se realizaron ensayos de supresión *in vitro*. Células T CD4⁺CD25⁻ (“naive”) aisladas de nódulos linfoides y bazo de ratones silvestres fueron separadas electrónicamente y co-cultivadas con células CD4⁺CD25^{+/hi} (Tregs) silvestres o deficientes de CD5, en relación 1:1, en presencia de células presentadoras de antígeno y CD3 soluble. Tras 96 horas de cultivo, las células fueron pulsadas con timidina tritiada y se determinó la proliferación de las células “naive” cultivadas en presencia o ausencia de las células T reguladoras. Como se muestra en la Figura 20, las células Tregs deficientes de CD5 suprimen la proliferación de las células “naive” silvestres, de manera similar a las células reguladoras silvestres.

Se ha reportado que CD5 está involucrado en la inducción de anergia *in vitro* (58), esto sugiere la posibilidad que la expresión de CD5 podría ser requerida por las células “naive” en el proceso de supresión mediada por células T reguladoras. Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos de supresión en paralelo usando células “naive” deficientes de CD5. Nuestros resultados indican que estas células “naive” son

eficientemente suprimidas por células reguladoras silvestres y deficientes de CD5, indicando que CD5 no es requerido en las células “naive” para la supresión mediada por células T reguladoras.

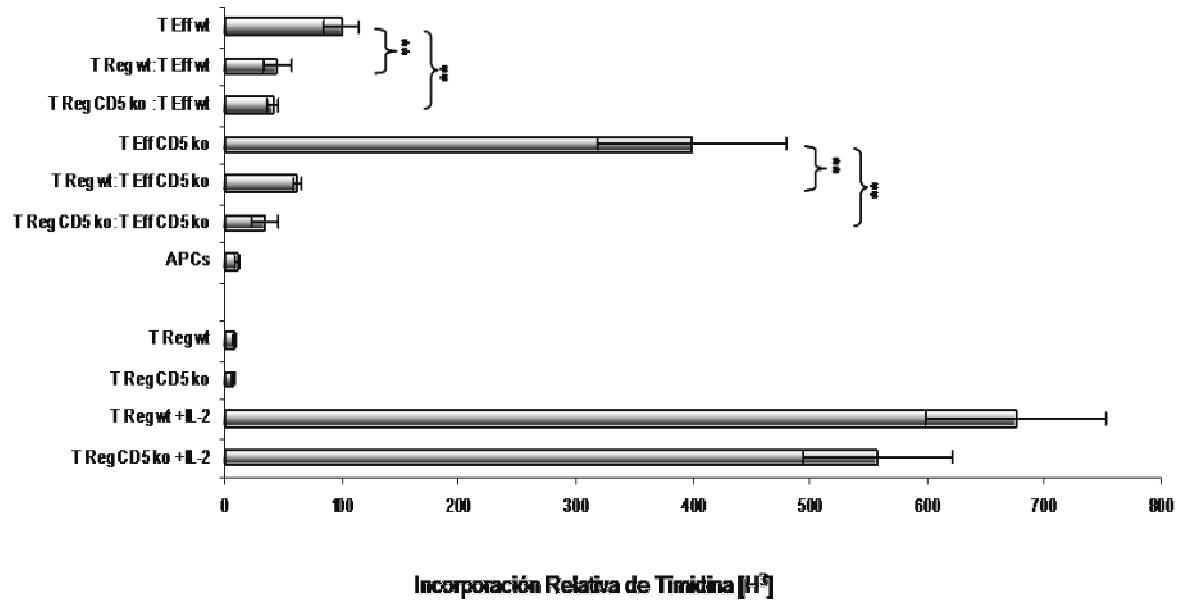


Figura 20. Las células reguladoras de los ratones CD5^{-/-} suprimen a las células “naive” silvestres y deficientes de CD5. Células “naive” separadas electrónicamente de ratones wt o CD5^{-/-} fueron co-cultivadas con células de bazo irradiadas (como APCs), el co-cultivo se estimulo con CD3 soluble (10µg/ml). Para los ensayos de supresión se adicionaron células T reguladoras en relación 1:1 con las células “naive”. La proliferación celular se determinó por incorporación de timidina [H]³. La función supresora se determino comparando la proliferación de las células “naive” solas (100%) y la proliferación obtenida en presencia de las células Tregs. Se adicionó IL-2 para revertir el fenotipo anergico de las células Tregs. Los datos son representativos de 5 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar. **p ≤ 0.05.

VI. DISCUSIÓN

Inicialmente se caracterizó la expresión de CD5 en las nTregs y se demostró que las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de timo y periferia poseen niveles elevados de CD5. Dado que la expresión de CD5 está directamente relacionada con la intensidad de la señal del TCR durante el desarrollo de los timocitos (173), la alta expresión de CD5 en las nTregs es consistente con la noción de que estas células se seleccionan bajo interacciones de alta avidéz. También se observó un incremento en la expresión de CD5 en la subpoblación de timocitos DP_s que expresan Foxp3. Esta subpoblación que había sido identificada anteriormente, también posee niveles incrementados de CD25, CTLA-4 y GITR (145), sugiriendo que podrían tener capacidad supresora.

Resultados obtenidos a partir de modelos TCR transgénicos, en donde la generación de nTregs específicas de antígeno es favorecida por la expresión del ligando agonista en células del estroma tímico, han permitido proponer que las interacciones de alta avidéz son requeridas para la selección de las nTregs (128, 129). De manera contraria, la generación de nTregs se ve reducida (131, 133) o bloqueada (130) en ratones que transducen señales de baja avidéz a través de su TCR.

Por otro lado, el porcentaje de nTregs se ve aumentado, al incrementar las señales del TCR durante la selección, como en los ratones deficientes de SHP-1 (132) o al aumentar la avidéz de la interacción TCR-péptido-MHC, en ratones transgénicos con expresión inducible del péptido agonista en células del estroma tímico (135). En estos estudios se argumenta que el enriquecimiento de las nTregs no es debido a que se estén generando “*de novo*” como consecuencia directa del incremento en la señal del TCR durante la selección, sino debido a una selección selectiva de las células “naive”, debido aparentemente a que éstas son más sensibles a la muerte inducida por ligando, que las células reguladoras naturales.

Como se ha demostrado que CD5 regula de manera negativa las señales del TCR durante la selección de los timocitos, investigamos su contribución durante el desarrollo de las células reguladoras naturales. Nuestros resultados muestran un incremento en el

porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el timo de los ratones deficientes de CD5 respecto al observado en ratones silvestres. Este resultado es similar al enriquecimiento de nTregs reportado en ausencia de SHP-1 otro regulador negativo del TCR (132). Sin embargo y contrario a este reporte, nuestros resultados muestran un incremento no solo en el porcentaje sino también en los números absolutos de nTregs generadas en timo adulto y en cultivos de timo fetal deficientes de CD5. Los datos obtenidos sugieren que en ausencia de CD5, el aumento de la avidéz de las señales trasducidas a través del TCR favorecen la generación de las células T reguladoras, respaldando el rol de las señales de alta avidéz en el desarrollo de las nTregs.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que en ausencia de CD5, el incremento en la proporción de nTregs es acompañado por una reducción de las células “naive” (no reguladoras) que resulta en la alteración de la relación células “naive”: nTregs, similar a lo observado en ratones deficientes de SHP-1, otro regulador negativo de la señal del TCR (132) y en ratones transgénicos condicionales para MCC (135). El análisis de apoptosis realizado en células “naive” y Tregs de ratones silvestres y CD5ko confirma que la ausencia de CD5 mantiene a las células “naive” susceptibles a la muerte celular mientras las células T reguladoras muestran cierta resistencia a la misma. Esto explica la alteración de la relación células “naive”: Tregs que se observa en ratones deficientes de CD5.

La deficiencia de CD5 afecta también afecta otras poblaciones celulares del timo, tal como lo demuestra el alto porcentaje de timocitos en apoptosis tardía/necróticos en estadio DP, CD4 y CD8, observados en el timo adulto y en los FTOCs de los ratones CD5ko.

Además del papel de CD5 como modulador de la señal del TCR, existe evidencia que sugiere su participación en supervivencia celular. En este contexto, la co-ligación de CD3 y CD5 en timocitos DPs resulta en un aumento de la expresión de Bcl-2 (203), una molécula que protege a los timocitos de múltiples estímulos apoptóticos y aumenta la supervivencia de los timocitos DPs en ausencia de señales de selección positiva (228). Experimentos “*in vitro*” demuestran que células CD4⁺ activadas que carecen de la expresión de CD5 son más susceptibles a la muerte celular inducida por activación en un modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune (229). De manera adicional, la expresión de CD5 protege a los linfocitos T citotóxicos de la muerte celular inducida por

células tumorales autólogas a través de la disminución de la expresión de FasL e inhibición de la caspasa 8 (230).

Datos recientes proveen información acerca de los mecanismos moleculares por los cuales CD5 participa en la supervivencia celular, estos podrían involucrar a la cinasa de serina/treonina Caseína Cinasa II (CKII), una molécula que juega un papel crucial en la supervivencia celular y la apoptosis (231). Células T CD4+ deficientes de CD5 así como células T CD4+ que expresan una mutante de CD5 desprovista del sitio de unión para CKII, son más susceptibles a la inducción de apoptosis que células que expresan la molécula silvestre de CD5, en respuesta a estimulación prolongada con anti-CD3 (232). A pesar del efecto protector de apoptosis reportado para CD5 en linfocitos T maduros, no se ha explorado el posible papel de CD5 en prevenir la apoptosis de los timocitos en desarrollo.

Con el fin de determinar las señales moleculares implicadas en la selección de las nTregs en ausencia de CD5, se evaluó bajo condiciones basales y tras estímulo CD3+CD28 la fosforilación, de ERK1/2, c-Cbl, PI3K y Akt, efectores importantes de las señales del TCR. Observamos un incremento en la fosforilación basal de ERK y c-Cbl en las nTregs de ratones silvestres y deficientes de CD5, comparado con las células “naive” propias de cada ratón, lo cual confirma que las nTregs se han seleccionado bajo condiciones de alta avidéz. Al analizar la población de nTregs de los ratones CD5ko observamos que los niveles de p-Erk están aumentados, respecto a las células nTregs de ratones silvestres. De manera, contraria la fosforilación basal de PI3K y Akt se encuentra aumentada en la población de células “naive” de los ratones deficientes de CD5 respecto a las células “naive” de ratones silvestres.

De manera interesante, tras la estimulación CD3+CD28, las células “naive” deficientes de CD5 muestran niveles reducidos de Akt respecto al observado en células silvestres. Esta baja respuesta se restringe a la población CD4⁺CD25⁻, dado que las células CD4⁺CD25^{+/hi} de ratones CD5^{-/-} y silvestres responden de manera similar. Este resultado co-rrelaciona con la disminución de células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ y el incremento en el porcentaje de timocitos en apoptosis tardía/necrosis, observada en ratones CD5^{-/-}. En este contexto, se ha descrito el papel de Akt en la supervivencia de los timocitos (233, 234) a través de la inducción de miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-XL (235) y A1 (236).

Análisis de los FTOCs CD5^{-/-} muestran un incremento en los timocitos CD8SP, sugiriendo un rol potencial de CD5 en el compromiso a lineaje. Esta hipótesis es sugerida por un reporte previo de donde se muestra que la co-ligación de CD3 y CD5 induce la diferenciación de timocitos DP hacia el lineaje CD4 (203).

Finalmente, y dado que se ha reportado la participación de CD5 en la inducción de anergia (237), investigamos la función de las nTregs derivadas de los ratones CD5^{-/-}, demostrando que éstas pueden suprimir la proliferación de células “naive” deficientes de CD5 y silvestres. Esto es de gran importancia, ya que encontramos que las células “naive” CD5^{-/-} proliferan mucho más que las células silvestres, cuando son cultivadas con APCs y anti-CD3. Esta hiperproliferación ya se había observado (206) y apoya el papel de CD5 como regulador negativo de la señal del TCR también en células T maduras.

De manera adicional, este trabajo provee nueva evidencia que propone un rol de CD5 en la supervivencia de los timocitos, a través de un mecanismo, que incluye la fosforilación de Akt.

VII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos con este trabajo podemos concluir que:

La alta expresión de CD5 puede ser considerada como una característica del fenotipo de las células T reguladoras.

CD5 protege de la apoptosis a los timocitos en desarrollo y en particular a las células CD4 "naive", mediante un mecanismo que incluye la activación de Akt.

La deficiencia de CD5 da lugar a un aumento en el porcentaje y el número absoluto de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en timo adulto y en nódulos linfoides, que puede ser atribuido a:

1. Una mayor generación de células T reguladoras *de novo*, en ausencia de CD5 mas timocitos se comprometen al linaje regulador por un aumento en la avidéz de las señales que reciben durante su desarrollo.
2. En ausencia de CD5, las señales de alta avidéz inducen la apoptosis preferencial de células "naive", mientras las Tregs se mantienen resistentes a estas señales, lo que se traduce en una alteración en la relación células "naive":Tregs.

La presencia de CD5 no es requerida para la función supresora de las células T reguladoras, ni en las células efectoras que son blanco de supresión.

VIII. PERSPECTIVAS

Analizar la generación de las células T reguladoras en ratones deficientes de CD5 que expresen un TCR transgénico y que se seleccionen bajo interacciones de alta avidéz.

Determinar los mecanismos a través de los cuales CD5 protege a los timocitos de la apoptosis.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Scollay, R., and D. I. Godfrey. 1995. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunology today* 16:268-273; discussion 273-264.
2. Petrie, H. T., and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 25:649-679.
3. Blackburn, C. C., and N. R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4:278-289.
4. Liu, C., F. Saito, Z. Liu, Y. Lei, S. Uehara, P. Love, M. Lipp, S. Kondo, N. Manley, and Y. Takahama. 2006. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* 108:2531-2539.
5. Blackburn, C. C., C. L. Augustine, R. Li, R. P. Harvey, M. A. Malin, R. L. Boyd, J. F. Miller, and G. Morahan. 1996. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5742-5746.
6. Rossi, S. W., W. E. Jenkinson, G. Anderson, and E. J. Jenkinson. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441:988-991.
7. Bleul, C. C., and T. Boehm. 2000. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *European journal of immunology* 30:3371-3379.
8. Nehls, M., B. Kyewski, M. Messerle, R. Waldschutz, K. Schuddekopf, A. J. Smith, and T. Boehm. 1996. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science (New York, N.Y)* 272:886-889.
9. Su, D. M., S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie, and N. R. Manley. 2003. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nature immunology* 4:1128-1135.
10. Bleul, C. C., T. Corbeaux, A. Reuter, P. Fisch, J. S. Monting, and T. Boehm. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441:992-996.
11. Ritter, M. A., and R. L. Boyd. 1993. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunology today* 14:462-469.
12. Anderson, G., and E. J. Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1:31-40.
13. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127-135.
14. Bowlus, C. L., J. Ahn, T. Chu, and J. R. Gruen. 1999. Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. *Cell Immunol* 196:80-86.
15. Kyewski, B., and J. Derbinski. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4:688-698.
16. Ramsey, C., O. Winqvist, L. Puhakka, M. Halonen, A. Moro, O. Kampe, P. Eskelin, M. Pelto-Huikko, and L. Peltonen. 2002. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11:397-409.
17. Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection

- of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N. Y)* 298:1395-1401.
18. Ramsey, C., A. Bukrinsky, and L. Peltonen. 2002. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum Mol Genet* 11:3299-3308.
 19. Gillard, G. O., J. Dooley, M. Erickson, L. Peltonen, and A. G. Farr. 2007. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol* 178:3007-3015.
 20. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150:4244-4252.
 21. Zuniga-Pflucker, J. C., and M. J. Lenardo. 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Current opinion in immunology* 8:215-224.
 22. Wu, L., R. Scollay, M. Egerton, M. Pearse, G. J. Spangrude, and K. Shortman. 1991. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349:71-74.
 23. Bhandoola, A., H. von Boehmer, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26:678-689.
 24. Godfrey, D. I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa, and A. Zlotnik. 1994. Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J Immunol* 152:4783-4792.
 25. Capone, M., R. D. Hockett, Jr., and A. Zlotnik. 1998. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:12522-12527.
 26. Livak, F., M. Tourigny, D. G. Schatz, and H. T. Petrie. 1999. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 162:2575-2580.
 27. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21:139-176.
 28. Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen, and A. C. Hayday. 1994. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1:83-93.
 29. Ciofani, M., and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annual review of cell and developmental biology* 23:463-493.
 30. Merckenschlager, M., D. Graf, M. Lovatt, U. Bommhardt, R. Zamoyska, and A. G. Fisher. 1997. How many thymocytes audition for selection? *The Journal of experimental medicine* 186:1149-1158.
 31. Zerrahn, J., W. Held, and D. H. Raulet. 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 88:627-636.
 32. Wilkinson, R. W., G. Anderson, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 155:5234-5240.
 33. Nava, K., and Soldevila, G. . 2004. Molecular signals involved in CD4 versus CD8 T cell commitment. *Inmunología* 23:313-327.

34. 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* 59:627-636.
35. 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* 10:1853-1862.
36. 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* 60:755-765.
37. Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274.
38. Kane, L. P., J. Lin, and A. Weiss. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Current opinion in immunology* 12:242-249.
39. 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* 92:83-92.
40. van Oers, N. S., and A. Weiss. 1995. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Seminars in immunology* 7:227-236.
41. Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Current opinion in immunology* 13:339-345.
42. Scharenberg, A. M., and J. P. Kinet. 1998. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* 94:5-8.
43. 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 (New York, N.Y)* 284:638-641.
44. 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* 19:1498-1507.
45. Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual review of immunology* 19:497-521.
46. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology* 15:707-747.
47. Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nature immunology* 1:317-321.
48. Anton van der Merwe, P., S. J. Davis, A. S. Shaw, and M. L. Dustin. 2000. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Seminars in immunology* 12:5-21.
49. Dustin, M. L., and J. A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature immunology* 1:23-29.
50. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877.
51. Haks, M. C., P. Krimpenfort, J. Borst, and A. M. Kruisbeek. 1998. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages. *The EMBO journal* 17:1871-1882.

52. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *The EMBO journal* 14:4641-4653.
53. Liu, C. P., R. Ueda, J. She, J. Sancho, B. Wang, G. Weddell, J. Loring, C. Kurahara, E. C. Dudley, A. Hayday, and et al. 1993. Abnormal T cell development in CD3-zeta^{-/-} mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *The EMBO journal* 12:4863-4875.
54. Malissen, M., A. Gillet, B. Rocha, J. Trucy, E. Vivier, C. Boyer, F. Kontgen, N. Brun, G. Mazza, E. Spanopoulou, and et al. 1993. T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *The EMBO journal* 12:4347-4355.
55. Dave, V. P., Z. Cao, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, A. de la Hera, S. Tonegawa, and D. J. Kappes. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *The EMBO journal* 16:1360-1370.
56. Alam, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson, and N. R. Gascoigne. 1996. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381:616-620.
57. Liu, C. P., F. Crawford, P. Marrack, and J. Kappler. 1998. T cell positive selection by a high density, low affinity ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:4522-4526.
58. Williams, C. B., D. L. Engle, G. J. Kersh, J. Michael White, and P. M. Allen. 1999. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *The Journal of experimental medicine* 189:1531-1544.
59. Sheng, M., S. T. Dougan, G. McFadden, and M. E. Greenberg. 1988. Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 8:2787-2796.
60. Kishimoto, H., C. D. Surh, and J. Sprent. 1998. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine* 187:1427-1438.
61. Zheng, T. S., and R. A. Flavell. 2000. Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Experimental cell research* 256:67-73.
62. Adams, J. M., and S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26:61-66.
63. Punt, J. A., B. A. Osborne, Y. Takahama, S. O. Sharrow, and A. Singer. 1994. Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *The Journal of experimental medicine* 179:709-713.
64. Page, D. M., L. P. Kane, J. P. Allison, and S. M. Hedrick. 1993. Two signals are required for negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *J Immunol* 151:1868-1880.
65. Gao, J. X., H. Zhang, X. F. Bai, J. Wen, X. Zheng, J. Liu, P. Zheng, and Y. Liu. 2002. Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:959-971.
66. Wange, R. L. 2000. LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000:RE1.
67. Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne, and J. Kuby. 2003. *Immunology*, New York.
68. Fung-Leung, W. P., M. W. Schilham, A. Rahemtulla, T. M. Kundig, M. Vollenweider, J. Potter, W. van Ewijk, and T. W. Mak. 1991. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65:443-449.

69. Rahemtulla, A., W. P. Fung-Leung, M. W. Schilham, T. M. Kundig, S. R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C. J. Paige, R. M. Zinkernagel, and et al. 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180-184.
70. Basson, M. A., U. Bommhardt, M. S. Cole, J. Y. Tso, and R. Zamoyska. 1998. CD3 ligation on immature thymocytes generates antagonist-like signals appropriate for CD8 lineage commitment, independently of T cell receptor specificity. *The Journal of experimental medicine* 187:1249-1260.
71. 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. *Immunological reviews* 165:181-194.
72. Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
73. Yasutomo, K., C. Doyle, L. Miele, C. Fuchs, and R. N. Germain. 2000. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 404:506-510.
74. Singer, A. 2002. New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Current opinion in immunology* 14:207-215.
75. Lind, E. F., S. E. Prockop, H. E. Porritt, and H. T. Petrie. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194:127-134.
76. Soldevila, G., García-Zepeda, E.A. 2003. Role of Chemokines in T cell development. *Inmunología* 22:1-12.
77. Campbell, J. J., J. Pan, and E. C. Butcher. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* 163:2353-2357.
78. Kim, C. H., L. M. Pelus, J. R. White, and H. E. Broxmeyer. 1998. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* 91:4434-4443.
79. Norment, A. M., L. Y. Bogatzki, B. N. Gantner, and M. J. Bevan. 2000. Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *J Immunol* 164:639-648.
80. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y)* 272:60-66.
81. Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, and E. C. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y)* 279:381-384.
82. Ward, S. G., and J. Westwick. 1998. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *The Biochemical journal* 333 (Pt 3):457-470.
83. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1997. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology* 15:675-705.
84. Bacon, K. B., and J. J. Oppenheim. 1998. Chemokines in disease models and pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:167-173.
85. Campbell, J. J., and E. C. Butcher. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Current opinion in immunology* 12:336-341.
86. Balkwill, F., and A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.

87. Luther, S. A., and J. G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature immunology* 2:102-107.
88. Coussens, L. M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
89. Wurbel, M. A., J. M. Philippe, C. Nguyen, G. Victorero, T. Freeman, P. Wooding, A. Miazek, M. G. Mattei, M. Malissen, B. R. Jordan, B. Malissen, A. Carrier, and P. Naquet. 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European journal of immunology* 30:262-271.
90. Plotkin, J., S. E. Prockop, A. Lepique, and H. T. Petrie. 2003. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171:4521-4527.
91. Ueno, T., F. Saito, D. H. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 200:493-505.
92. Uehara, S., K. Song, J. M. Farber, and P. E. Love. 2002. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol* 168:134-142.
93. Cyster, J. G. 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual review of immunology* 23:127-159.
94. Feng, C., K. J. Woodside, B. A. Vance, D. El-Khoury, M. Canelles, J. Lee, R. Gress, B. J. Fowlkes, E. W. Shores, and P. E. Love. 2002. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol* 14:535-544.
95. Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N. Y)* 284:770-776.
96. Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-558.
97. Han, H., K. Tanigaki, N. Yamamoto, K. Kuroda, M. Yoshimoto, T. Nakahata, K. Ikuta, and T. Honjo. 2002. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14:637-645.
98. Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, T. Kadesch, R. R. Hardy, J. C. Aster, and W. S. Pear. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11:299-308.
99. Schmitt, T. M., M. Ciofani, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200:469-479.
100. Sambandam, A., I. Maillard, V. P. Zediak, L. Xu, R. M. Gerstein, J. C. Aster, W. S. Pear, and A. Bhandoola. 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature immunology* 6:663-670.
101. Tan, J. B., I. Visan, J. S. Yuan, and C. J. Gidos. 2005. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nature immunology* 6:671-679.
102. Lehar, S. M., J. Dooley, A. G. Farr, and M. J. Bevan. 2005. Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood* 105:1440-1447.

103. Ciofani, M., G. C. Knowles, D. L. Wiest, H. von Boehmer, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2006. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* 25:105-116.
104. Garbe, A. I., A. Krueger, F. Gounari, J. C. Zuniga-Pflucker, and H. von Boehmer. 2006. Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines alphabeta versus gammadelta lineage fate. *The Journal of experimental medicine* 203:1579-1590.
105. Passoni, L., E. S. Hoffman, S. Kim, T. Crompton, W. Pao, M. Q. Dong, M. J. Owen, and A. C. Hayday. 1997. Intrathymic delta selection events in gammadelta cell development. *Immunity* 7:83-95.
106. Kang, J., M. Coles, D. Cado, and D. H. Raulet. 1998. The developmental fate of T cells is critically influenced by TCRgammadelta expression. *Immunity* 8:427-438.
107. Prinz, I., A. Sansoni, A. Kissenpfennig, L. Ardouin, M. Malissen, and B. Malissen. 2006. Visualization of the earliest steps of gammadelta T cell development in the adult thymus. *Nature immunology* 7:995-1003.
108. Hayes, S. M., L. Li, and P. E. Love. 2005. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* 22:583-593.
109. Irving, B. A., F. W. Alt, and N. Killeen. 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science (New York, N. Y)* 280:905-908.
110. Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, K. Ogata, K. Sakata-Sogawa, M. Hiroshima, D. L. Wiest, M. Tokunaga, and T. Saito. 2006. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nature immunology* 7:67-75.
111. Haks, M. C., J. M. Lefebvre, J. P. Lauritsen, M. Carleton, M. Rhodes, T. Miyazaki, D. J. Kappes, and D. L. Wiest. 2005. Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity* 22:595-606.
112. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 6:345-352.
113. Bach, J. F. 2003. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3:189-198.
114. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
115. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology* 4:337-342.
116. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N. Y)* 299:1057-1061.
117. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
118. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
119. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Prohl, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus,

- enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurvy. *Nat Genet* 27:18-20.
120. Papiernik, M., M. L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10:371-378.
 121. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212:8-27.
 122. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
 123. Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thornton. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunological reviews* 212:60-73.
 124. Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2:816-822.
 125. Lund, J. M., L. Hsing, T. T. Pham, and A. Y. Rudensky. 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science (New York, N. Y)* 320:1220-1224.
 126. Belkaid, Y., and B. T. Rouse. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature immunology* 6:353-360.
 127. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326.
 128. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* 3:756-763.
 129. Hori, S., M. Haurly, A. Coutinho, and J. Demengeot. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8213-8218.
 130. Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell development. *The Journal of experimental medicine* 203:119-129.
 131. Willoughby, J. E., P. S. Costello, R. H. Nicolas, N. J. Robinson, G. Stamp, F. Powrie, and R. Treisman. 2007. Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J Immunol* 179:6836-6844.
 132. Carter, J. D., G. M. Calabrese, M. Naganuma, and U. Lorenz. 2005. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 174:6627-6638.
 133. Stephens, G. L., and L. Ignatowicz. 2003. Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4⁺ T cells toward a regulatory (CD4⁺CD25⁺) lineage. *European journal of immunology* 33:1282-1291.
 134. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
 135. van Santen, H. M., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 200:1221-1230.

136. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine* 201:723-735.
137. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological reviews* 212:114-130.
138. Jiang, Q., H. Su, G. Knudsen, W. Helms, and L. Su. 2006. Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol* 7:6.
139. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature immunology* 6:152-162.
140. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
141. Kumanogoh, A., X. Wang, I. Lee, C. Watanabe, M. Kamanaka, W. Shi, K. Yoshida, T. Sato, S. Habu, M. Itoh, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, and H. Kikutani. 2001. Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol* 166:353-360.
142. Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, and P. Santamaria. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 19:877-889.
143. Akiyama, T., S. Maeda, S. Yamane, K. Ogino, M. Kasai, F. Kajiura, M. Matsumoto, and J. Inoue. 2005. Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science (New York, N.Y)* 308:248-251.
144. Kajiura, F., S. Sun, T. Nomura, K. Izumi, T. Ueno, Y. Bando, N. Kuroda, H. Han, Y. Li, A. Matsushima, Y. Takahama, S. Sakaguchi, T. Mitani, and M. Matsumoto. 2004. NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 172:2067-2075.
145. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
146. Liu, Y. J. 2006. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol* 27:215-221.
147. Liston, A., K. M. Nutsch, A. G. Farr, J. M. Lund, J. P. Rasmussen, P. A. Koni, and A. Y. Rudensky. 2008. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11903-11908.
148. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi. 2006. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 18:991-1000.
149. Rudensky, A. Y., and D. J. Campbell. 2006. In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 203:489-492.
150. Sumoza-Toledo, A., A. D. Eaton, and A. Sarukhan. 2006. Regulatory T cells inhibit protein kinase C theta recruitment to the immune synapse of naive T cells with the same antigen specificity. *J Immunol* 176:5779-5787.
151. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.

152. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353-1362.
153. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
154. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews* 182:68-79.
155. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182:207-214.
156. Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunological reviews* 206:232-259.
157. Stassen, M., S. Fondel, T. Bopp, C. Richter, C. Muller, J. Kubach, C. Becker, J. Knop, A. H. Enk, S. Schmitt, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2004. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *European journal of immunology* 34:1303-1311.
158. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2005. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:5126-5131.
159. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
160. Azzam, H. S., J. B. DeJarnette, K. Huang, R. Emmons, C. S. Park, C. L. Sommers, D. El-Khoury, E. W. Shores, and P. E. Love. 2001. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol* 166:5464-5472.
161. Tarakhovskiy, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science (New York, N.Y)* 269:535-537.
162. Alberola-Illa, J., L. Places, D. A. Cantrell, J. Vives, and F. Lozano. 1992. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J Immunol* 148:1287-1293.
163. Vila, J. M., Padilla, O., Arman, M., Gimferrer, I., and Lozano F. 2000. The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF). Structure and function of group B members. *Inmunología* 19:105-121.
164. Calvo, J., O. Padilla, L. Places, E. Vigorito, J. M. Vila, R. Vilella, J. Mila, J. Vives, M. A. Bowen, and F. Lozano. 1999. Relevance of individual CD5 extracellular domains on antibody recognition, glycosylation and co-mitogenic signalling. *Tissue antigens* 54:16-26.
165. Lozano, F., M. Simarro, J. Calvo, J. M. Vila, O. Padilla, M. A. Bowen, and K. S. Campbell. 2000. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Critical reviews in immunology* 20:347-358.
166. Jones, N. H., M. L. Clabby, D. P. Dialynas, H. J. Huang, L. A. Herzenberg, and J. L. Strominger. 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323:346-349.
167. McKenzie, I. F., and T. Potter. 1979. Murine lymphocyte surface antigens. *Advances in immunology* 27:179-338.
168. Padilla, O., J. Calvo, J. M. Vila, M. Arman, I. Gimferrer, L. Places, M. T. Arias, M. A. Pujana, J. Vives, and F. Lozano. 2000. Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 51:993-1001.

169. Weichert, T. R., and R. C. Schwartz. 1995. Cloning of the murine CD5 promoter and its tissue-specific regulation. *J Immunol* 154:4603-4612.
170. Tung, J. W., S. S. Kunnavatana, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. 2001. The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC molecular biology* 2:5.
171. Yang, Y., C. H. Contag, D. Felsher, C. M. Shachaf, Y. Cao, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, and J. W. Tung. 2004. The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3898-3902.
172. Calvo, J., J. Sole, M. Simarro, J. Vives, and F. Lozano. 1996. Evolutionarily conserved transcription regulatory elements within the 5'-flanking region of the human CD5 gene. *Tissue antigens* 47:257-261.
173. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine* 188:2301-2311.
174. Tarakhovsky, A., W. Muller, and K. Rajewsky. 1994. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *European journal of immunology* 24:1678-1684.
175. Kisielow, P., H. Bluthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333:742-746.
176. Pircher, H., K. Burki, R. Lang, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559-561.
177. Pircher, H., P. S. Ohashi, R. L. Boyd, H. Hengartner, and K. Brduscha. 1994. Evidence for a selective and multi-step model of T cell differentiation: CD4+CD8^{low} thymocytes selected by a transgenic T cell receptor on major histocompatibility complex class I molecules. *European journal of immunology* 24:1982-1987.
178. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology* 13:93-126.
179. Burgess, K. E., M. Yamamoto, K. V. Prasad, and C. E. Rudd. 1992. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9311-9315.
180. Davies, A. A., S. C. Ley, and M. J. Crumpton. 1992. CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6368-6372.
181. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383-384.
182. Vila, J. M., I. Gimferrer, O. Padilla, M. Arman, L. Places, M. Simarro, J. Vives, and F. Lozano. 2001. Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. *European journal of immunology* 31:1191-1198.
183. Raab, M., M. Yamamoto, and C. E. Rudd. 1994. The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol Cell Biol* 14:2862-2870.
184. Dennehy, K. M., R. Broszeit, D. Garnett, G. A. Durrheim, L. L. Spruyt, and A. D. Beyers. 1997. Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *European journal of immunology* 27:679-686.
185. Dennehy, K. M., R. Broszeit, W. F. Ferris, and A. D. Beyers. 1998. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *European journal of immunology* 28:1617-1625.

186. Griffith, L. C., H. Schulman, and M. Tagawa. 1989. In vivo and in vitro phosphorylation of murine lymphocyte differentiation antigen CD5. *Biochemical and biophysical research communications* 159:536-541.
187. Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, T. Gallart, and J. Vives. 1990. Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur J Biochem* 193:469-477.
188. Alberola-Ila, J., L. Places, V. Fabregat, J. Vives, and F. Lozano. 1993. Different mechanisms regulate the monoclonal antibody-induced modulation of CD2, CD3, and CD5 in human lymphocytes. *Cell Immunol* 147:247-255.
189. Calvo, J., J. M. Vilda, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K. S. Campbell, C. Aussel, and F. Lozano. 1998. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol* 161:6022-6029.
190. Ledbetter, J. A., P. J. Martin, C. E. Spooner, D. Wofsy, T. T. Tsu, P. G. Beatty, and P. Gladstone. 1985. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J Immunol* 135:2331-2336.
191. Ceuppens, J. L., and M. L. Baroja. 1986. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol* 137:1816-1821.
192. June, C. H., P. S. Rabinovitch, and J. A. Ledbetter. 1987. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol* 138:2782-2792.
193. Imboden, J. B., C. H. June, M. A. McCutcheon, and J. A. Ledbetter. 1990. Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *The Journal of clinical investigation* 85:130-134.
194. Simarro, M., C. Pelassy, J. Calvo, L. Places, C. Aussel, and F. Lozano. 1997. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* 159:4307-4315.
195. Wiegmann, K., S. Schutze, T. Machleidt, D. Witte, and M. Kronke. 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78:1005-1015.
196. Cifone, M. G., P. Roncaioli, R. De Maria, G. Camarda, A. Santoni, G. Ruberti, and R. Testi. 1995. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *The EMBO journal* 14:5859-5868.
197. Simarro, M., J. Calvo, J. M. Vila, L. Places, O. Padilla, J. Alberola-Ila, J. Vives, and F. Lozano. 1999. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 162:5149-5155.
198. Hannun, Y. A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science (New York, N.Y)* 274:1855-1859.
199. Lozano, J., E. Berra, M. M. Municio, M. T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz, and J. Moscat. 1994. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry* 269:19200-19202.
200. Muller, G., M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro, and K. Pfizenmaier. 1995. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *The EMBO journal* 14:1961-1969.
201. Gomez, J., A. Garcia, R. B. L. P. Bonay, A. C. Martinez, A. Silva, M. Fresno, A. C. Carrera, C. Eicher-Streiber, and A. Rebollo. 1997. IL-2 signaling controls actin

- organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J Immunol* 158:1516-1522.
202. Rincon, M., R. A. Flavell, and R. J. Davis. 2001. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20:2490-2497.
 203. Zhou, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, K. Toyo-Oka, C. S. Park, X. G. Tai, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 2000. CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage. *J Immunol* 164:1260-1268.
 204. Pani, G., K. D. Fischer, I. Mlinaric-Rascan, and K. A. Siminovitch. 1996. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *The Journal of experimental medicine* 184:839-852.
 205. Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, M. A. Bowen, D. H. Hewgill, A. A. Aruffo, and S. B. Kanner. 1999. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 19:2903-2912.
 206. Pena-Rossi, C., L. A. Zuckerman, J. Strong, J. Kwan, W. Ferris, S. Chan, A. Tarakhovskiy, A. D. Beyers, and N. Killeen. 1999. Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J Immunol* 163:6494-6501.
 207. Rao, N., I. Dodge, and H. Band. 2002. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 71:753-763.
 208. Olson, M. F., and R. Marais. 2000. Ras protein signalling. *Seminars in immunology* 12:63-73.
 209. Bauch, A., K. S. Campbell, and M. Reth. 1998. Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta. *European journal of immunology* 28:2167-2177.
 210. Nghiem, P., T. Ollick, P. Gardner, and H. Schulman. 1994. Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* 371:347-350.
 211. Hama, N., F. Paliogianni, B. J. Fessler, and D. T. Boumpas. 1995. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *The Journal of experimental medicine* 181:1217-1222.
 212. Kamal, M., A. Katira, and J. Gordon. 1991. Stimulation of B lymphocytes via CD72 (human Lyb-2). *European journal of immunology* 21:1419-1424.
 213. Subbarao, B., and D. E. Mosier. 1983. Induction of B lymphocyte proliferation by monoclonal anti-Lyb 2 antibody. *J Immunol* 130:2033-2037.
 214. Biancone, L., M. A. Bowen, A. Lim, A. Aruffo, G. Andres, and I. Stamenkovic. 1996. Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 184:811-819.
 215. Bikah, G., F. M. Lynd, A. A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and S. Bondada. 1998. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol* 10:1185-1196.
 216. Calvo, J., L. Places, O. Padilla, J. M. Vila, J. Vives, M. A. Bowen, and F. Lozano. 1999. Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *European journal of immunology* 29:2119-2129.
 217. Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews* 173:89-97.
 218. Vera, J., R. Fenutria, O. Canadas, M. Figueras, R. Mota, M. R. Sarrias, D. L. Williams, C. Casals, J. Yelamos, and F. Lozano. 2009. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-

- induced septic shock-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1506-1511.
219. Dawson, B. a. T., R. 2005. *Bioestadística Médica*.
 220. Sprent, J., and H. Kishimoto. 2002. The thymus and negative selection. *Immunological reviews* 185:126-135.
 221. McCaughy, T. M., T. A. Baldwin, M. S. Wilken, and K. A. Hogquist. 2008. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *The Journal of experimental medicine* 205:2575-2584.
 222. Manning, B. D., and L. C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
 223. Kandel, E. S., and N. Hay. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research* 253:210-229.
 224. Hare, K. J., E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 1999. In vitro models of T cell development. *Seminars in immunology* 11:3-12.
 225. Naparstek, Y., J. Holoshitz, S. Eisenstein, T. Reshef, S. Rappaport, J. Chemke, A. Ben-Nun, and I. R. Cohen. 1982. Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. *Nature* 300:262-264.
 226. Ramsdell, F. 2003. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19:165-168.
 227. Lohr, J., B. Knoechel, and A. K. Abbas. 2006. Regulatory T cells in the periphery. *Immunological reviews* 212:149-162.
 228. Chao, D. T., and S. J. Korsmeyer. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology* 16:395-419.
 229. Axtell, R. C., M. S. Webb, S. R. Barnum, and C. Raman. 2004. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J Immunol* 173:2928-2932.
 230. Friedlein, G., F. El Hage, I. Vergnon, C. Richon, P. Saulnier, Y. Lecluse, A. Caignard, L. Boumsell, G. Bismuth, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2007. Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 178:6821-6827.
 231. Ahmed, K., D. A. Gerber, and C. Cochet. 2002. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* 12:226-230.
 232. Axtell, R. C., L. Xu, S. R. Barnum, and C. Raman. 2006. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J Immunol* 177:8542-8549.
 233. Juntilla, M. M., J. A. Wofford, M. J. Birnbaum, J. C. Rathmell, and G. A. Koretzky. 2007. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:12105-12110.
 234. Juntilla, M. M., and G. A. Koretzky. 2008. Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunology letters* 116:104-110.
 235. Veis, D. J., C. L. Sentman, E. A. Bach, and S. J. Korsmeyer. 1993. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 151:2546-2554.
 236. Mandal, M., C. Borowski, T. Palomero, A. A. Ferrando, P. Oberdoerffer, F. Meng, A. Ruiz-Vela, M. Ciofani, J. C. Zuniga-Pflucker, I. Screpanti, A. T. Look, S. J. Korsmeyer, K. Rajewsky, H. von Boehmer, and I. Aifantis. 2005. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *The Journal of experimental medicine* 201:603-614.

237. Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. C. Nussenzweig. 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20:695-705.

Please correct your galley proofs and return them within 48h of receipt.

Note: The editors reserve the right to publish your article without your corrections if the proofs do not arrive in time.

Important

Please note that, due to the size constraints of emailed attachments, the attached proofs are low resolution; however, please be assured that high resolution versions will be used for printing.

Check the enclosed galley proofs very carefully, paying particular attention to the formulae, figures, numerical values, and tabulated data. An author query (AQ) in the border indicates unclear or missing information that requires **your attention**. For the complete query, please consult the list following the proofs in this file. Note that the author is liable for damages arising from incorrect statements including misprints.

Your corrections should be provided as a list (e.g. in Word format), including the page number, column (left or right) and line at which the correction occurs. In addition, we ask that you provide a scanned pdf of the proof with corrections, to reduce the risk of errors.

Please return your corrections by email to the following address:

E-Mail: proofs-eji@macmillansolutions.com

Please limit corrections to printing errors; costs incurred for any further changes or additions will be charged to the author, unless such changes have been accepted by the editor.

Reprints may be ordered by filling out the accompanying form and should be returned to the Editorial Office.

The most important correction marks

Typesetting error	Correction mark in the text	Correction mark in the right-hand margin
<p>Wrong letter, wrong word</p> <p>Missing letter(s)</p> <p>Missing word</p> <p>Wrong word division, missing punctuation mark</p> <p>Defect letter, soiled text (in case of illegibility to be treated as a wrong letter or word)</p>	<p>Metal type was the key to the invention of printing, and assembly into printed page was the only step a printer could take until recently towards obtaining a surface from <u>which</u> impressions can</p>	<p> p H key</p> <p> nr T ting</p> <p>7 its L the</p> <p>7 nt</p> <p>1 y ((2x)) b,</p> <p>○</p> <p>○</p>
<p>Letters/words to be deleted</p> <p>Letters in wrong sequence</p> <p>Two words in wrong sequence</p> <p>Several words in wrong sequence</p> <p>Wrong space, missing space</p> <p>Space between words too large or too small</p>	<p>be made. Printing off from movable type started 1440 around. Since in this of printing account type founding place has no we may dispense with an account of how type comes into being and start with the type itself.</p>	<p>1 y H y</p> <p>7 le U ar</p> <p>┌┐</p> <p>1-9</p> <p>∩</p> <p>((2x))]</p> <p>∅</p> <p>((2x)) λ</p>
<p>Characters not on a straight line</p> <p>Space between lines too narrow</p>	<p><u>Initially we may concentrate on a single process - letterpress - because metal type was once the</u></p>	<p>=====</p> <p>—————></p> <p>—————></p>
<p>Space between lines too wide</p>	<p>only printing surface available to that process.</p>	<p>—————></p> <p> </p>
<p>Wrong typeface</p>	<p>A historical view of printing would <u>have</u> to take into account a period in which type casting and type-setting remained unchanged. But type has</p>	<p>~~~~~ ((italics))</p> <p>————— ((normal typeface))</p> <p> w</p>
<p>Start new paragraph</p>	<p>continuously consolidated and extended the domain of the printed</p>	<p>┌</p>
<p>Undesired new paragraph</p>	<p>word. The most important changes came with:</p>	<p>┌</p>
<p>Undesired indentation</p>	<p>automatic composing,</p>	<p>┌</p>
<p>Missing indentation</p>	<p><u>—</u> automatic composing,</p>	<p>┌</p>
<p>Blockade</p>	<p>¹H-NMR (■-MHz)</p>	<p>/ 300</p>

Increased numbers of thymic and peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells in the absence of CD5 signaling

D. Ordoñez-Rueda¹, F. Lozano², A. Sarukhan³, C. Raman⁴,
E. A. Garcia-Zepeda¹ and Gloria Soldevila¹

¹ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México

² Servei d'Immunologia, Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBABS), Barcelona, Spain

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Centre Hospitalier Universitaire Necker, Paris, France

⁴ Department of Medicine and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, AL, USA

It has been suggested that high affinity/avidity interactions are required for the thymic selection of naturally occurring Treg cells. Here, we investigated the role of CD5, a negative regulator of TCR signaling, in the selection and function of “naturally occurring” CD4⁺ CD25⁺ Treg (nTreg). Analysis of CD5^{-/-} mice showed a significant increase in the percentage and absolute numbers of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ thymocytes and peripheral T lymphocytes, compared with Balb/c mice. Thymi from CD5^{-/-} mice showed reduced cellularity due to increased apoptosis, which preferentially affected naïve T cells. To characterize nTreg selection at the molecular level we investigated the phosphorylation of Erk, c-Cbl, PI3K and Akt. CD5^{-/-} nTreg showed increased basal levels of p-Erk compared with wild-type nTreg. Interestingly, in response to CD3 plus CD28 costimulation, CD5^{-/-} naïve T cells but not CD5^{-/-} nTreg showed lower levels of p-Akt. Finally, CD5^{-/-} nTreg were thymus-derived and fully functional. We conclude that the enrichment of nTreg observed in the absence of CD5 signaling is due to *de novo* generation of nTreg and selective reduction of CD4⁺ CD25⁻ naïve thymocytes. Furthermore, we provide new evidence supporting a potential role of CD5 in thymocyte survival, through a mechanism that may involve the phosphorylation of Akt.

Key words: CD5 · Development · Treg cells · Signaling · Thymocyte

Introduction

The maintenance of immunological self-tolerance is a fundamental property of the immune system besides the clearance of pathogenic agents. Central and peripheral mechanisms exist to ensure the elimination or inactivation of potentially harmful autoreactive T cells. Negative selection in the thymus induces the

deletion of most self-reactive T-cell clones during T-cell development [1]. However, some autoreactive T cells escape from clonal deletion and need to be controlled by peripheral mechanisms including peripheral T-cell deletion by activation-induced cell death [2], T-cell anergy [3] and T-cell-mediated suppression [4].

Recently, non-deletional mechanisms of central tolerance have been re-evaluated, such as the development of thymus-derived Treg cells [5]. These cells are currently known as “naturally occurring” CD4⁺ CD25⁺ Treg (nTreg), which represent a small population (5–10%) of peripheral CD4⁺ T cells and are characterized by high levels of surface CD25 (IL-2 α R) and by the expression of Foxp3, a

Correspondence: Dr. Gloria Soldevila
e-mail: soldevi@servidor.unam.mx

transcription factor identified as a key regulator of nTreg-cell development and function [6]. In addition, nTreg also express activation markers such as CTLA-4, GITR, CD62L, OX40 and CD103 [7, 8].

nTreg were first studied for their role in maintaining self-tolerance [9], preventing autoimmune diseases [10] and the development of harmful immunopathological responses [11]. However, nTreg can also participate in modulating adaptive immunity to viruses, bacteria and parasites affecting favorably or detrimentally the outcome of immune responses to infections [12, 13].

The mechanisms of suppression used by Treg cells include production of immunosuppressive cytokines, such as TGF- β and IL-10, as well as cell–cell contact inhibition, mostly mediated by CTLA-4 [14]. In addition, new mechanisms of suppression have recently been described including cytokine deprivation [15] and regulation of migration of effector T cells to the site of infection [12].

The molecular signals involved in thymic Treg development still remain under controversy. It has been proposed that high avidity interactions are required for Treg selection based on transgenic models showing the generation of antigen-specific Treg, which develop in the presence of the agonist ligand expressed on thymic stromal cells [16, 17]. Furthermore, recent data showed that mice with reduced signaling through LAT/PLC- γ 1 [18] or abrogation of the Raf/Mek/Erk pathway signaling [19], resulted in the absence or reduction of nTreg, respectively. In addition, an enrichment of nTreg is observed in the absence of the negative regulator of TCR signaling, (SH2) domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) [20] and under conditions of decreased GITR-mediated signaling [21]. However, van Santen *et al.* [22] proposed that the enrichment of nTreg observed under conditions of high avidity is a result of preferential deletion of non-Treg, while CD4⁺ CD25⁺ thymocytes appear to be less sensitive to agonist-induced clonal deletion.

Finally, other signals involved in the generation and/or maintenance of nTreg development include costimulatory molecules such as CD28 and B7 [23, 24] and cytokines such as IL-2, IL-7 [25], IL-15 [26] and TSLP [27].

CD5 is a 67kDa type I membrane glycoprotein expressed on thymocytes, mature T cells [28] and a subset of B cells (B1a) [29]. It physically associates with the TCR [30] and the B-cell receptor [31] and functions as positive or negative regulator of antigen receptor signaling, depending on the cell type analyzed and its maturation stage [32]. Upon CD3 ligation, the CD5 cytoplasmic tail becomes phosphorylated leading to the likely recruitment of p56^{lck} [33], PI3K [34], proto-oncoprotein c-Cbl, ras GTPase-activating protein [35] and SHP-1 [36]. In addition, CD5 ligation allows the activation of casein kinase II, which is constitutively associated to its cytoplasmic tail [37–39], as well as activation of protein kinase C by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent pathway [40]. Early *in vitro* studies indicated that CD5 acts as a costimulatory molecule for T-cell activation [41, 42]. In contrast, it has also been proposed that CD5 can negatively regulate TCR-mediated signaling, since thymocytes from CD5^{-/-} mice are hyperresponsive to stimulation through the TCR, leading to increased proliferation, Ca²⁺ mobilization and tyrosine hyperphosphorylation of PLC- γ 1, TCR- ζ , p36/LAT and Vav [43]. Although initial studies on CD5^{-/-} mice did not reveal major defects in T-cell development [44], further analysis using TCR

transgenic mice showed that CD5 can influence the outcome of thymocyte selection depending on the avidity of the TCR-peptide/MHC interaction. Thus, in the absence of CD5, thymocytes with high affinity TCR were negatively selected, likely due to increased TCR-mediated signaling [43, 45].

Since selection of nTreg appear to require high affinity/avidity interactions [46], we hypothesized that CD5 might be involved in their generation. Here, we describe that the absence of CD5 leads to increased numbers of thymic and peripheral nTreg, accompanied by increased cell death of naive thymocytes. In addition, we demonstrate that CD5^{-/-} nTreg are thymus derived and are capable of efficiently suppressing WT and CD5^{-/-} naive T lymphocytes. Finally, we show that in the absence of CD5, phosphorylation of Akt is impaired in CD5^{-/-} naive thymocytes, supporting the role of CD5 in thymocyte survival.

Results

CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells express higher levels of CD5 surface expression than CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ cells

The development of nTreg appears to require high avidity interactions between TCR and self-peptide MHC complexes during thymocyte differentiation [16, 47]. The surface expression of some molecules, such as CD5, are directly related to pre-TCR and TCR signaling intensity during selection events [48]. Previous work has shown the up-regulation of CD5 in CD4⁺ CD25⁺ thymocytes from TCR transgenic [4, 47] and WT mice [49, 50], compared with CD4⁺ CD25⁻ thymocytes. To further characterize the expression of CD5 during development of nTreg in the thymus, we examined CD5 expression in CD25⁺ thymocytes within the double-positive (DP) and CD4 single positive (SP) subpopulations, also including the Foxp3 marker, which is the most specific marker for nTreg [6]. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ thymocytes showed increased levels of CD5 compared with their CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ counterparts (Fig. 1A, lower panel) (MFI 1142.61 \pm 38.9 *versus* 299.46 \pm 14.46; *n* = 4, *p* < 0.01). Interestingly, among DP thymocytes, CD25⁺ Foxp3⁺ also expressed higher levels of CD5 than Foxp3⁻ cells (MFI 1184.50 \pm 31.96 *versus* 278.98 \pm 14.77; *n* = 4, *p* < 0.01) (Fig. 1A, upper panel). When we analyzed peripheral lymph node cells, we also found enhanced CD5 expression in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells compared with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ T lymphocytes (MFI 867.29 \pm 18.89 *versus* 336.51 \pm 1.36; *n* = 4, *p* < 0.01) (Fig. 1B). The data obtained from thymic and peripheral Treg are summarized in Fig. 1C. These results indicate that high levels of CD5 are a characteristic feature of nTreg, as previously reported for CD4⁺ CD25⁺ T cells.

CD5 deficiency leads to an enrichment of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells in the thymus

To investigate the potential role of CD5 expression in the generation of nTreg, we quantified the presence of CD25⁺ Foxp3⁺ thymocytes

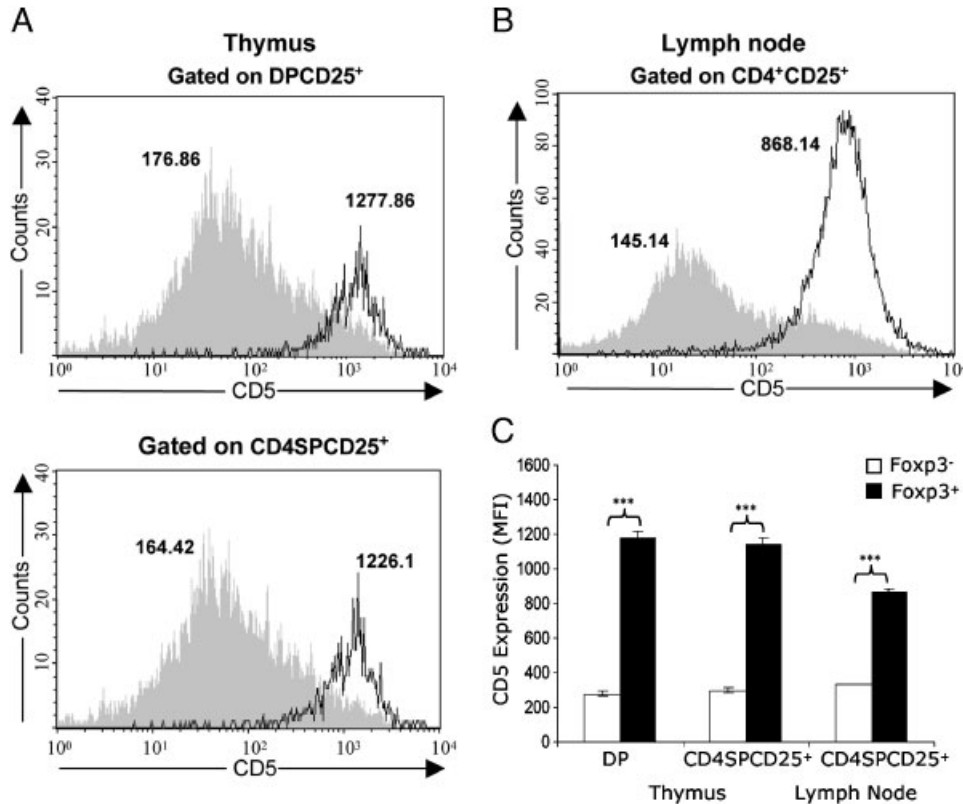


Figure 1. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells express higher levels of CD5 than CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ cells. (A) Thymocytes and (B) lymph node cells from 10-wk-old WT mice were isolated and stained with antibodies to CD4, CD8, CD25, CD5 and Foxp3. CD5 surface levels are represented as MFI values, from gated CD25⁺ Foxp3⁻ (grey shaded) and CD25⁺ Foxp3⁺ cells (open line) in the indicated subpopulation. A representative experiment is shown (C). The graph represents CD5 expression in the indicated subpopulation. Mean values±SEM are shown ($n = 4$). Statistically significant values are marked as $***p < 0.01$.

within the CD4 SP subpopulation (Fig. 2A–C). Interestingly, analysis of nTreg in CD5^{-/-} mice (8–10-wk-old) revealed an increase in the percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in CD5^{-/-} mice compared with WT mice ($5.01 \pm 0.20\%$ versus $3.68 \pm 0.26\%$; $n = 8$, $p < 0.01$) (Fig. 2B). Furthermore, absolute cell numbers of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells were also increased in CD5^{-/-} thymi ($621.09 \pm 87.28 \times 10^3$ versus $404.65 \pm 33.75 \times 10^3$, $n = 8$, $p < 0.05$) (Fig. 2C), suggesting that CD5 signals are relevant to nTreg development.

Thymocyte subpopulations are affected in the absence of CD5

Analysis of 12-wk-old CD5^{-/-} mice showed a significant decrease in thymocyte cell numbers compared with WT mice ($43 \pm 4 \times 10^6$ versus $117 \pm 9 \times 10^6$; $n = 8$, $p < 0.01$, data not shown). Determination of thymocyte subpopulations from these mice showed a higher percentage of double negative cells ($8.6 \pm 1.7\%$ versus $3.8 \pm 0.52\%$, $n = 8$, $p < 0.05$), a reduction in the percentage of DP cells ($57.5 \pm 5.6\%$ versus $75.7 \pm 2.6\%$; $n = 8$, $p < 0.05$) and a slight increase in CD8 SP ($4.7 \pm 0.52\%$ versus $3.1 \pm 0.3\%$; $n = 8$, $p < 0.05$), without significant changes in the proportion of CD4 SP cells (Fig. 3A). Furthermore, absolute cell numbers within each subpopulation were differentially affected, showing a

dramatic loss of DP cells ($25.4 \pm 3.8 \times 10^6$ versus $88.9 \pm 7.8 \times 10^6$; $n = 8$, $p < 0.01$) (Fig. 3B), which may mostly account for the reduced cellularity observed in CD5^{-/-} thymi. In addition, numbers of CD4 SP and CD8 SP thymocytes were also reduced. This significant reduction in thymic cellularity at 12 wk of age also affected the numbers of nTreg, which at this age were not significantly increased in number (Fig. 3C). However, when we compared the numbers of naïve (CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻) and Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) present in WT and CD5^{-/-} mice, we found that the ratio naïve:Treg was significantly decreased in CD5^{-/-} mice compared with WT mice (18.36 ± 1.41 versus 25.99 ± 1.88 , $n = 8$, $p < 0.05$), indicating that naïve T cells, but not Treg, are preferentially reduced in the absence of CD5. Interestingly, the ratio naïve:Treg ratio was already significantly decreased in 8-wk-old CD5^{-/-} mice (16.76 ± 0.94 versus 23.11 ± 1.74 ; $n = 8$, $p < 0.01$) (Fig. 2D).

CD5^{-/-} mice show reduced thymus cellularity due to increased apoptosis

The observation that CD5^{-/-} deficient thymocytes are hyper-responsive to TCR-mediated signaling [43] and the fact that high avidity interactions lead to thymocyte cell death [1] suggested to us the possibility that reduced cell numbers in CD5^{-/-} thymus was due

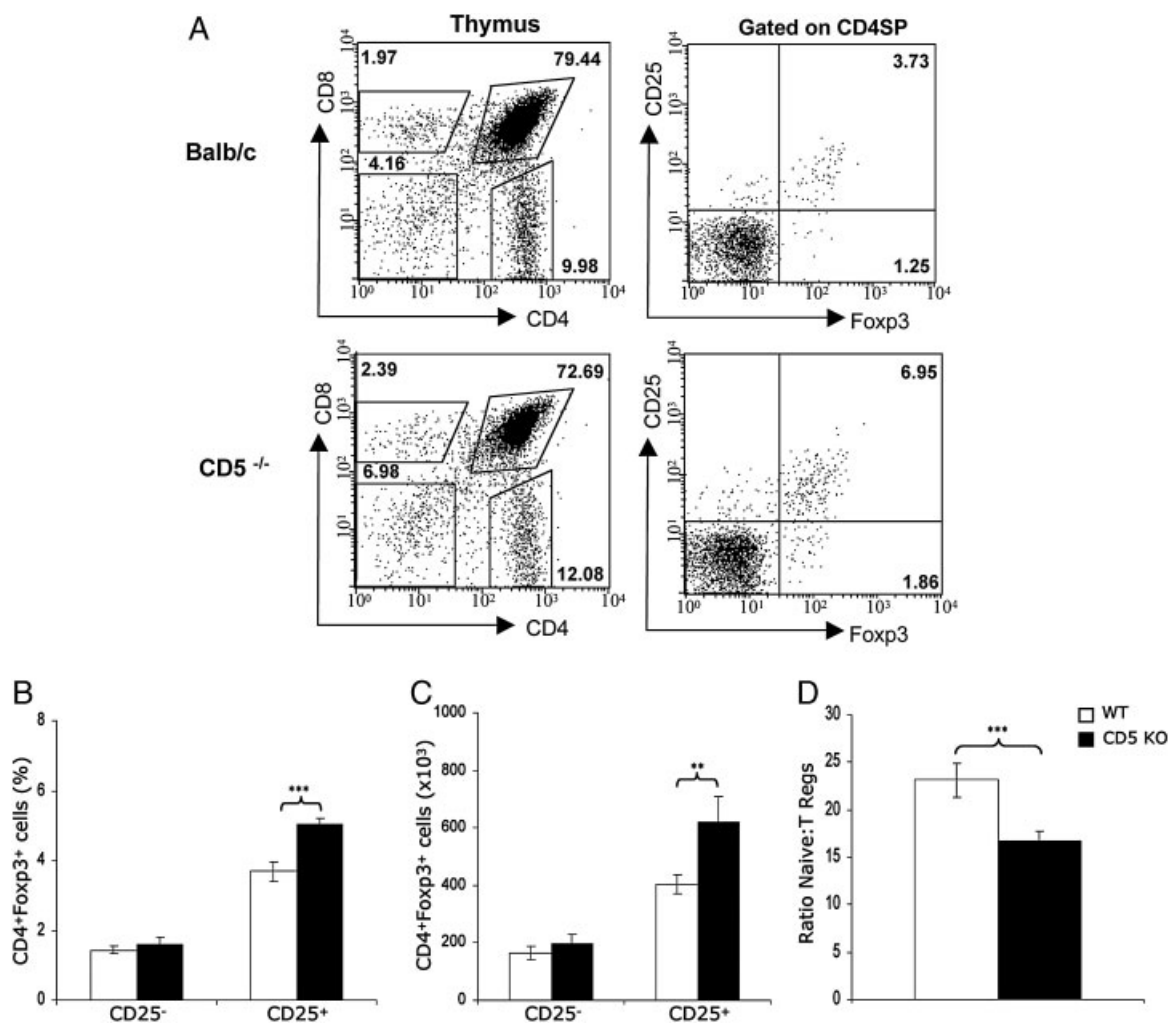


Figure 2. Increased proportion and numbers of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells in the thymus of CD5^{-/-} mice. (A) Thymocytes from 8–10-wk-old WT and CD5^{-/-} mice were isolated, counted and stained with antibodies to CD4, CD8, CD25 and Foxp3. Dot plots show the percentage of CD25⁻ Foxp3⁻ and CD25⁺ Foxp3⁺ cells in gated CD4 SP cells. A representative experiment is shown. Graphs represent (B) the percentages and (C) absolute cell numbers of Foxp3⁺ thymocytes, among CD25⁻ or CD25⁺ cells (D). The ratio of naïve:Treg cells is shown and was calculated by dividing the absolute cell numbers of naïve CD4⁺ Foxp3⁻ thymocytes by CD4⁺ Foxp3⁺ thymocytes. Data presented are representative of four independent experiments. Mean values±SEM are shown ($n = 8$ per group). Statistically significant values are marked as ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$.

to increased apoptosis. To test this hypothesis, we performed apoptosis analysis in WT and CD5^{-/-} thymi using Annexin-V and 7-AAD staining (Fig. 4A–C). Figure 4A shows a representative experiment. As shown in Fig. 4B, an increased percentage of late apoptotic/necrotic (Annexin V⁺/7AAD⁺) thymocytes was observed in CD5^{-/-} mice compared with WT mice ($3.36 \pm 0.36\%$ versus $1.96 \pm 0.16\%$; $n = 5$, $p \leq 0.05$). Interestingly, subpopulation analysis revealed that apoptosis was enhanced not only in DP ($1.7 \pm 0.08\%$ versus $0.9 \pm 0.09\%$; $n = 5$, $p \leq 0.01$) but also in CD4 SP ($5.56 \pm 0.64\%$ versus $2.74 \pm 0.35\%$; $n = 5$, $p \leq 0.05$) and CD8 SP ($8.52 \pm 1.2\%$ versus $3.3 \pm 0.23\%$; $n = 5$, $p \leq 0.05$) thymocytes. We also observed a discrete increase, although not significant, in the percentage of early apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻) in CD5^{-/-} thymocytes (Fig. 4A, representative experiment).

To further investigate the induction of apoptosis in nTreg, we performed similar experiments after staining with anti-CD4, anti-CD8 and anti-Foxp3 specific antibodies. As shown in Fig. 4C,

analysis of CD4⁺ Foxp3⁺ (Treg) and CD4⁺ Foxp3⁻ (naïve) gated subpopulations showed that only naïve T cells ($3.67 \pm 0.17\%$ versus $4.78 \pm 0.37\%$; $n = 4$, $p \leq 0.01$) undergo significantly increased early apoptosis (identified by Annexin V⁺ 7AAD⁺ staining) in the absence of CD5. Unexpectedly, early apoptosis of nTreg appeared slightly diminished in freshly isolated CD5^{-/-} nTreg ($2.3 \pm 0.34\%$ versus $3.4 \pm 0.32\%$; $n = 4$, $p \leq 0.1$), compared with WT nTreg. In addition, a slight decrease in the percentage of late apoptotic (Annexin V⁺ 7AAD⁺) CD5^{-/-} nTreg compared with WT nTreg was also detected (Fig. 4C; representative experiment), although the difference did not reach statistical significance (data not shown).

Moreover, to confirm the Annexin/7AAD results, we also performed analysis of active Caspase 3 in response to CD3 plus CD28 crosslinking, which has been previously used as an indicator of thymocyte cell death induced during negative selection [51]. As shown in Fig. 4D, the percentage of thymocytes with

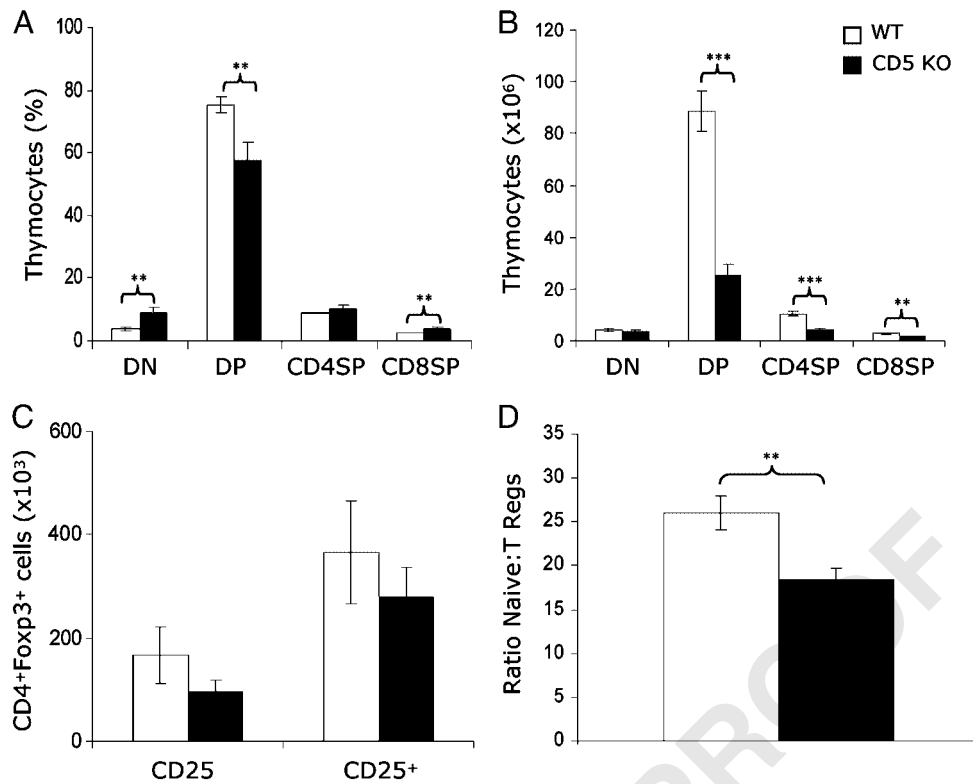


Figure 3. Effect of CD5 deficiency in thymocyte subpopulations. Thymocytes from 12-wk-old WT and CD5^{-/-} mice were isolated, counted and stained with antibodies to CD4, CD8, CD25 and Foxp3. Graphs represent the (A) percentage, (B) absolute cell numbers of each thymocyte subpopulation. (C) Analysis of Foxp3⁺ thymocytes, among CD4 SP CD25⁻ or CD4 SP CD25⁺ cells. (D) The ratio naïve:T Reg cell is shown and was calculated as in Fig. 2. Data presented are representative of three independent experiments. Mean values+SEM are shown (*n* = 8 per group). Statistically significant values are marked as ***p* ≤ 0.05, ****p* ≤ 0.01.

active Caspase 3 was significantly higher in CD5^{-/-} naïve thymocytes compared with WT naïve thymocytes ($16.59 \pm 0.8\%$ versus $12.45 \pm 0.41\%$; *n* = 4, *p* ≤ 0.01), while the percentage of nTreg positive for active Caspase 3 was lower in CD5^{-/-} mice compared with WT mice ($4.01 \pm 0.73\%$ versus $7.24 \pm 0.83\%$; *n* = 4, *p* ≤ 0.05).

Intracellular TCR-mediated signaling in CD5^{-/-} thymocytes

In order to analyze the signaling pathways involved in the enrichment of nTreg and the increased apoptosis observed in naïve CD5^{-/-} thymocytes, we performed phosphorylation analysis of WT and CD5^{-/-} thymocytes under basal conditions or after CD3 plus CD28 crosslinking. As shown in Fig. 5A, under basal conditions CD4⁺ CD25^{+/hi} from CD5^{-/-} mice showed significant increased levels of phosphorylated Erk, compared with WT CD4⁺ CD25^{+/hi} thymocytes (Fig. 5A, upper left panel). In contrast, increased basal phosphorylation of PI3K and Akt was observed in CD5^{-/-} CD4⁺ CD25⁻ thymocytes, compared with WT CD4⁺ CD25⁻ thymocytes (Fig. 5A, lower panels). Interestingly, after CD3 plus CD28 crosslinking, CD4⁺ CD25⁻ thymocytes from CD5^{-/-} mice were impaired in their ability to phosphorylate Akt, compared with CD4⁺ CD25⁻ WT thymocytes (Fig. 5B, upper

panels). In contrast CD4⁺ CD25^{+/hi} thymocytes from CD5^{-/-} mice were able to induce similar phosphorylation of Akt, compared with WT CD4⁺ CD25^{+/hi} thymocytes (Fig. 5B, lower panels), although the level of phosphorylation was always lower than that seen in CD4⁺ CD25⁻ cells. The decreased levels of p-Akt in response to CD3 plus CD28 crosslinking observed in CD4⁺ CD25⁻ thymocytes from CD5^{-/-} mice might explain the increased thymocyte cell death observed CD5^{-/-} naïve thymocytes, as Akt has been shown to be involved in cell survival, reviewed in [52, 53].

CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells from CD5^{-/-} mice are thymus derived

In order to determine the origin of the increased nTreg in CD5^{-/-} mice, we performed fetal thymic organ cultures (FTOC), from day E15 thymi. In the absence of CD5, an increased percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ are generated at day 8 of culture, compared with WT FTOC ($3.54 \pm 0.3\%$ versus $2.02 \pm 0.32\%$; *n* = 10, *p* ≤ 0.05), (Fig. 6A and B), demonstrating that nTreg are thymus derived and do not represent recirculating peripheral T cells homing to the thymus [54, 55]. This increase in CD25⁺ Foxp3⁺ cells was also seen in the DP subpopulation (data not shown). Interestingly, similar to what was observed in

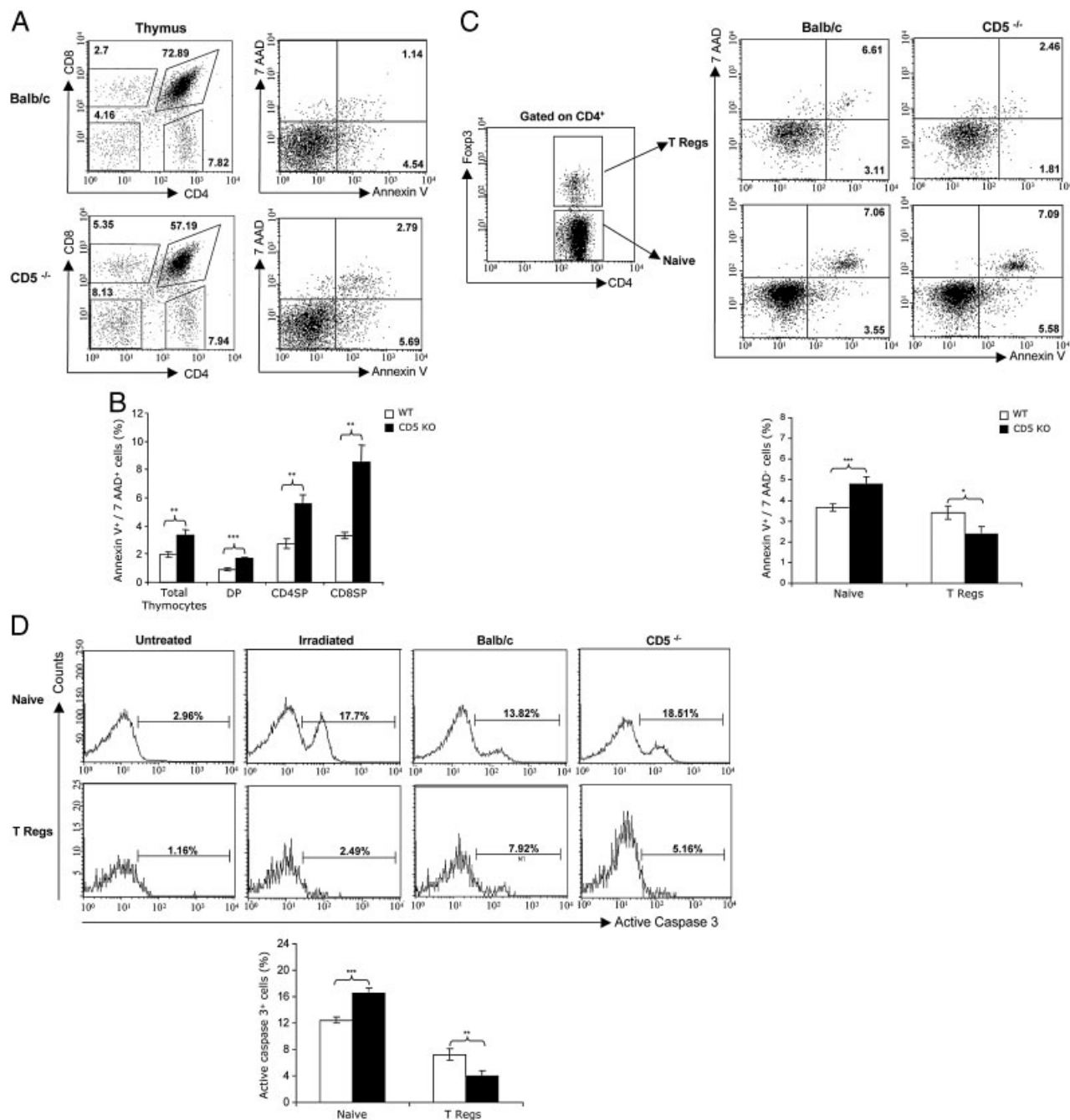


Figure 4. CD5^{-/-} naive thymocytes undergo increased apoptosis. (A) Thymocytes from 12-wk-old WT and CD5^{-/-} mice were isolated, counted and stained with anti-CD4, anti-CD8, Annexin-V and 7-AAD. Dot plots show the percentage of total thymocytes in the corresponding quadrant. A representative experiment is shown. (B) Percentage of Annexin V⁺ and 7-AAD⁺ cells in total thymocytes or in DP, CD4 SP, and CD8 SP subpopulations. Data presented are representative of three independent experiments. Mean values+SEM are shown (n = 5 per group). For naive and Treg cell apoptosis analysis thymocytes were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, Annexin V and 7-AAD. (C) Gated CD4⁺ Foxp3⁻ (naive) and CD4⁺ Foxp3⁺ (Treg) subpopulations were analyzed for Annexin V and 7AAD. The numbers indicate the percentage of cells in the corresponding quadrant. A representative experiment is shown. The graph in the lower panel represents the summary of experiments. (D) Active Caspase 3 was determined in stimulated, naive and Treg from Balb/c or CD5^{-/-} mice. Untreated and irradiated thymocytes from Balb/c mice were used as negative and positive controls for apoptosis, respectively. Thymocytes were stimulated overnight with anti-CD3 plus anti-CD28 and stained with antibodies to CD4, CD8, Foxp3 and anti-active Caspase 3. A representative experiment is shown. The numbers in each histogram represent the percentage of active Caspase 3-positive cells. The graph in the lower panel represents the summary of experiments. Data presented are representative of three independent experiments. Mean values+SEM are shown (n = 8–10 per group). Statistically significant values are marked as *p<0.1, **p<0.05, ***p<0.01.

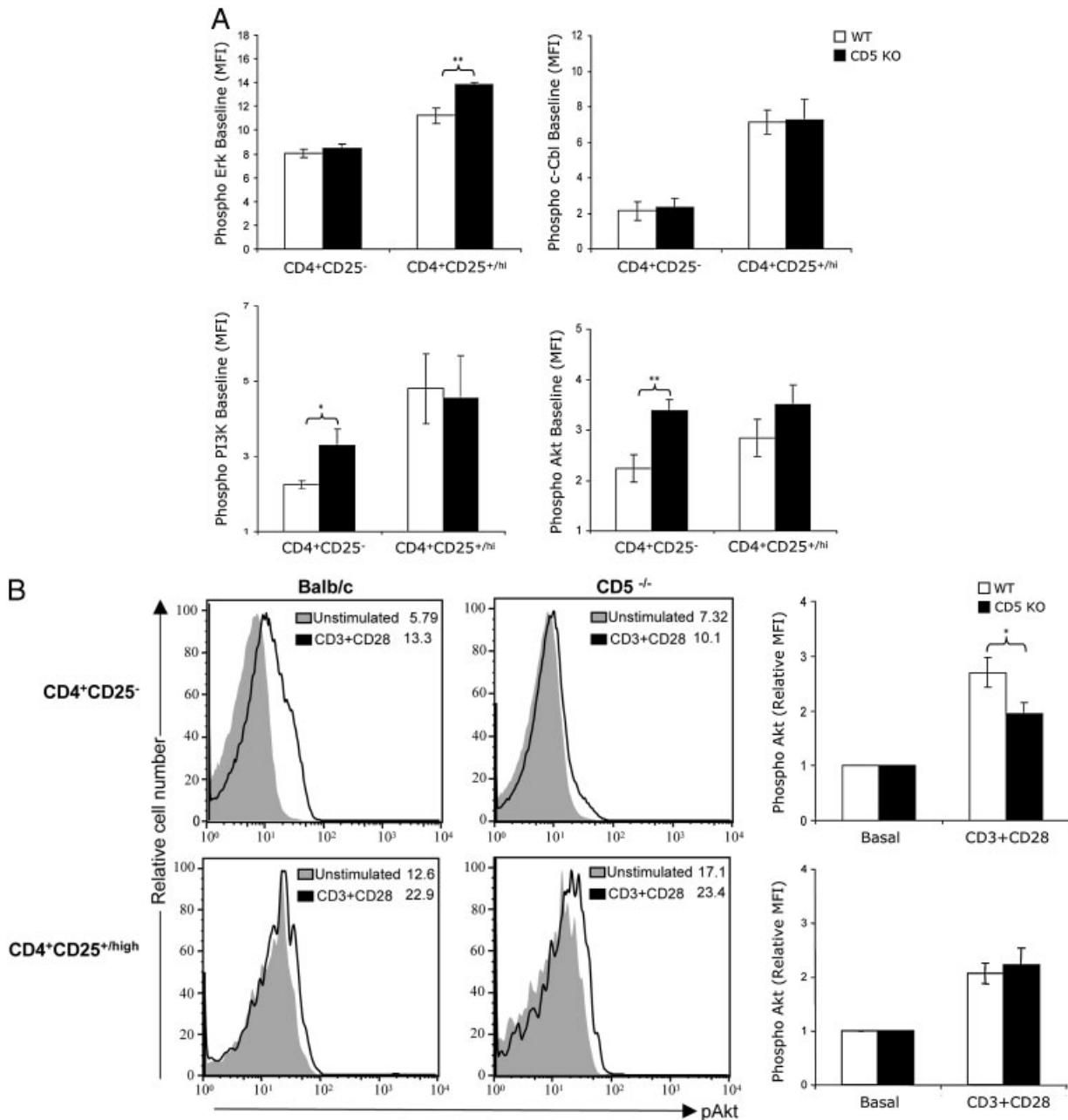


Figure 5. Thymocytes from Balb/c and CD5^{-/-} mice show different phosphorylation profiles in basal state and in response to CD3/CD28 stimulation. (A) Basal phosphorylation of Erk, c-Cbl, PI3K and Akt was determined in CD4⁺ CD25⁻ naïve T cells and CD4⁺ CD25^{+hi} nTreg from WT and CD5^{-/-} mice. Cells were stained with antibodies to CD4, CD8, and CD25 in combination with antibodies to each phospho-protein. Basal phosphorylation was calculated as the MFI from unstimulated stained samples–MFI from the same unstained sample, for each population. (B) CD4⁺ CD25⁻ naïve and CD4⁺ CD25^{+hi} T cells from WT and CD5^{-/-} Balb/c mice were unstimulated or stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. Phosphorylation of Akt was determined as described in the *Materials and methods*. A representative experiment is shown. Right panels show MFI increment of Akt phosphorylation and was calculated as follows: MFI increment = MFI from stimulated samples/MFI from unstimulated stained sample. Mean values+SEM are shown (n = 3–5 per group). Asterisks indicate *p<0.1, **p<0.05.

adult thymus, numbers of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ thymocytes were significantly increased in FTOC from CD5^{-/-} mice ($4.92 \pm 0.89 \times 10^3$ versus $2.66 \pm 0.62 \times 10^3$; n = 10, p<0.05) (Fig. 6C), suggesting *de novo* generation of nTreg. Moreover, similar to what was observed in adult thymus, the increase in the percentage of Foxp3⁺ thymocytes was

restricted to the CD25⁺ subpopulation, supporting the notion that these cells are indeed thymus-derived conventional nTreg.

In addition, subpopulation analysis from day 8 CD5^{-/-} FTOC revealed a significant decrease in the proportion of DP ($32.17 \pm 2.27\%$ versus $53.65 \pm 1.88\%$; n = 10, p<0.01), and an

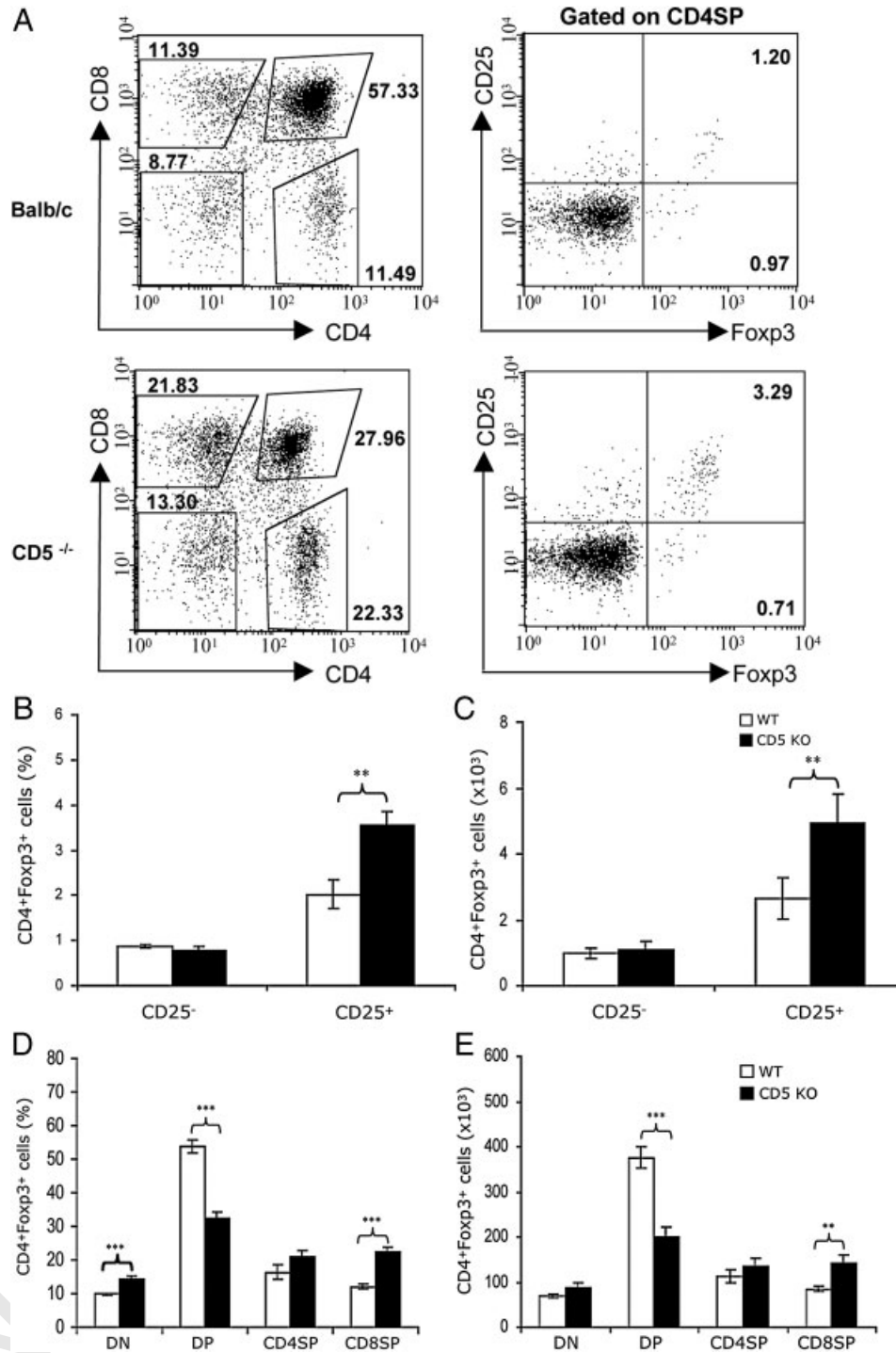


Figure 6. The absence of CD5^{-/-} mice results in increased generation of CD4⁺ CD25⁺ Fxp3⁺ cells and affects differentially other thymocyte subpopulations. Fetal thymic lobes from WT and CD5^{-/-} E15 embryos (day 0) were cultured for 8 days on millicell membranes. Thymic lobes were then removed from the culture; thymocytes were isolated, counted and stained with antibodies to CD4, CD8, CD25 and Fxp3. (A) Dot plots show the percentage of CD25⁻ Fxp3⁺ and CD25⁺ Fxp3⁺ cells in gated CD4 SP cells. A representative experiment is shown. Graphs represent the (B) percentages and (C) absolute cell numbers of Fxp3⁺ thymocytes among CD25⁻ or CD25⁺ cells. (D and E) Thymocyte subpopulations from WT and CD5^{-/-} mice were analyzed. The graphs represent (D) percentage and (E) absolute cell numbers of each thymocyte subpopulation. Results are representative of pooled lobes (3 lobes/pool) (n = 10 pools per genotype). Mean values + SEM are shown. Statistically significant values are marked as **p < 0.05, ***p < 0.01.

increase in double negatives ($14.2 \pm 0.82\%$ versus $9.94 \pm 0.29\%$; $p < 0.01$) and CD8 SP ($22.52 \pm 1.43\%$ versus $12.13 \pm 0.63\%$;

$n = 10$, $p < 0.01$) (Fig. 6D). In addition, numbers of DP thymocytes were significantly reduced in CD5^{-/-} FTOC,

($198.36 \pm 21.98 \times 10^3$ versus $376.12 \pm 23.38 \times 10^3$; $n = 10$, $p \leq 0.01$), similar to what was found in adult $CD5^{-/-}$ thymus (see Fig. 3). Interestingly, CD8 SP thymocytes were increased in the same cultures ($142.85 \pm 17.57 \times 10^3$ versus $84.3 \pm 5.3 \times 10^3$; $n = 10$, $p \leq 0.05$) (Fig. 6E), suggesting a potential role of CD5 in lineage commitment. This possibility was already suggested by a previous report by Zhou *et al.* [56] showing that co-ligation of CD3 and CD5 induced the differentiation of DP thymocytes towards the CD4 lineage [56].

Finally, apoptosis analysis also showed an increased percentage of Annexin V⁺/7AAD⁺ (late apoptotic/necrotic) cells in total thymocytes ($7.61 \pm 0.92\%$ versus $5.58 \pm 0.46\%$, $n = 8-11$ lobes; $p \leq 0.05$) and the DP subpopulation ($4.36 \pm 0.69\%$ versus $2.02 \pm 0.18\%$, $n = 8-11$ lobes, $p \leq 0.01$) in $CD5^{-/-}$ FTOC compared with WT FTOC (Fig. 7A and B). In addition, similar to the adult $CD5^{-/-}$ thymus, early apoptosis was also slightly enhanced in $CD5^{-/-}$ thymocytes (Fig. 7A, representative experiment).

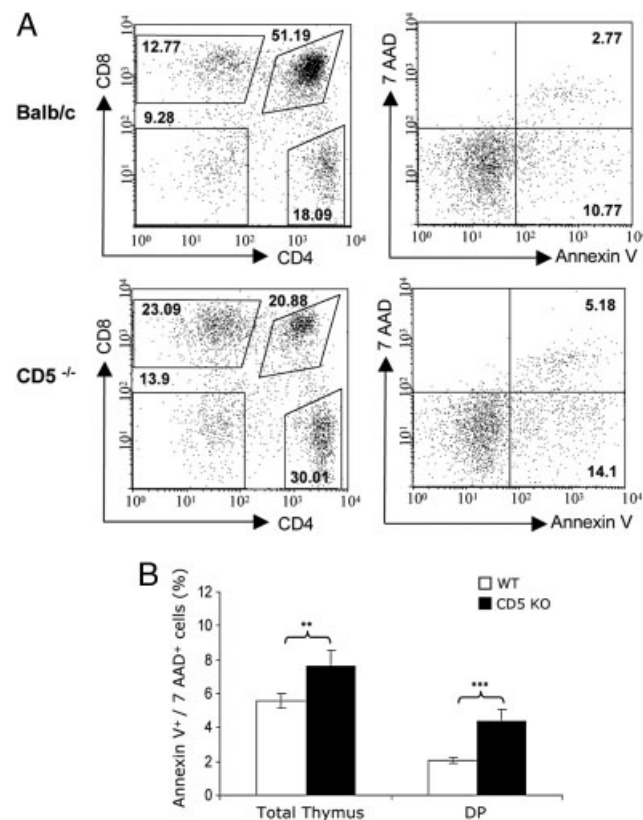


Figure 7. Enhanced proportion of apoptotic cells in thymocytes from $CD5^{-/-}$ FTOC. (A) Thymocytes isolated from WT and $CD5^{-/-}$ FTOC (as described in Fig. 6) were counted and stained with anti-CD4, anti-CD8, Annexin V and 7-AAD. Dot plots show the percentage of total thymocytes in the corresponding quadrant. A representative experiment is shown. (B) The graph shows the percentage of Annexin V⁺/7-AAD⁺ (late apoptotic/necrotic) cells within total thymocytes and the DP subpopulation. Results are representative of 8–11 lobes per group. Data represent mean values+SEM. Statistically significant values are marked as ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$.

$CD5^{-/-}$ mice show an increase in $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ lymph node T lymphocytes

We also analyzed the presence of nTreg in the periphery of $CD5^{-/-}$ mice. As shown in Fig. 8, analysis of lymph node cells showed a significant increase in the proportion ($11.97 \pm 0.27\%$ versus $9.84 \pm 0.18\%$; $n = 8$, $p \leq 0.01$) (Fig. 8B) and cell numbers ($1.75 \pm 0.1 \times 10^6$ versus $1.48 \pm 0.07 \times 10^6$; $n = 8$, $p \leq 0.1$) (Fig. 8C) of $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ nTreg. Similar results were observed in T lymphocytes isolated from spleen (data not shown). Interestingly, $CD4^+ CD25^- Foxp3^+$ T cells were also increased in $CD5^{-/-}$ mice both in percentage ($3.57 \pm 0.44\%$ versus $1.96 \pm 0.07\%$; $n = 8$, $p \leq 0.05$) and absolute cell numbers ($0.53 \pm 0.08 \times 10^6$ versus $0.29 \pm 0.02 \times 10^6$; $n = 8$, $p \leq 0.05$) (Fig. 8B and C).

$CD4^+ CD25^{+hi}$ cells from $CD5^{-/-}$ mice suppress $CD4^+ CD25^-$ T-cell responses

Next, to assess the function of nTreg from $CD5^{-/-}$ mice, we performed standard “*in vitro*” suppression assays. Briefly, electronically sorted $CD4^+$

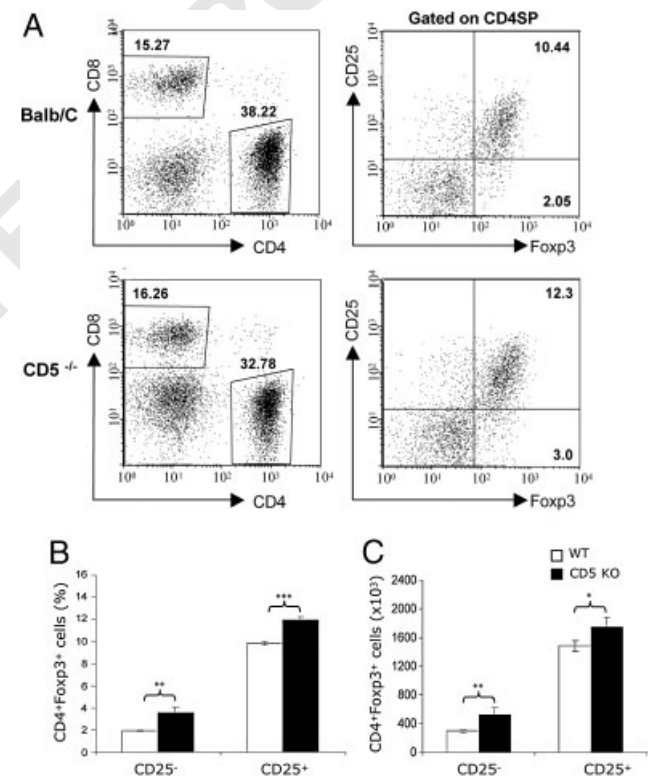


Figure 8. Enrichment of $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ cells in peripheral lymph nodes of $CD5^{-/-}$ mice. (A) Lymphocytes from 8–10-wk-old WT and $CD5^{-/-}$ mice were isolated, counted and stained with antibodies to CD4, CD8, CD25 and Foxp3. Dot plots show the percentage of $CD25^- Foxp3^+$ and $CD25^+ Foxp3^+$ cells in gated $CD4^+$ SP cells. A representative experiment is shown. The graphs represent the (B) percentages and (C) absolute cell numbers of $Foxp3^+$ thymocytes among $CD25^-$ or $CD25^+$ cells. Data presented are representative of four independent experiments. Mean values+SEM are shown ($n = 8$ per group). Statistically significant values are marked as * $p \leq 0.1$, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$.

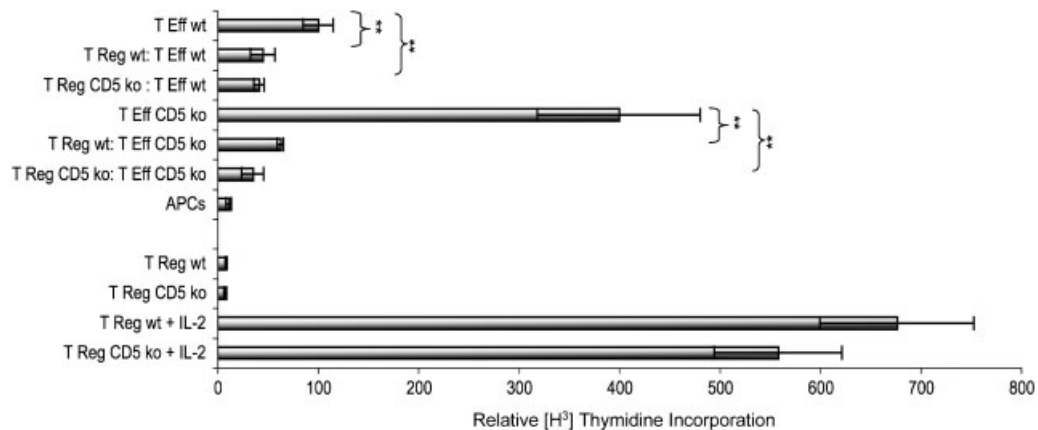


Figure 9. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells from CD5^{-/-} mice suppress CD4⁺ CD25⁻ naïve T-cell responses from WT and CD5^{-/-} mice. Electronically sorted CD4⁺ CD25⁻ naïve T cells (1 × 10⁵) from WT or CD5^{-/-} mice were co-cultured with syngeneic irradiated splenocytes (1 × 10⁵) and stimulated with soluble anti-CD3 (10 µg/mL). For suppression assays, CD4⁺ CD25^{+/hi} (Treg) and CD4⁺ CD25⁻ naïve T cells (T effectors, Teff) (1 × 10⁵) were incubated at 1:1 ratio in the presence of irradiated splenocytes and stimulated with anti-CD3 antibody. T-cell proliferation was measured by [³H] thymidine incorporation. Suppressor function was determined by comparing the proliferation of naïve T cells alone (set as 100%) to the proliferation of CD5^{-/-} naïve T cells. As shown, CD25^{+/hi} CD4⁺ CD5^{-/-} Treg (CD5^{-/-} Treg) showed similar suppressive activity on the proliferation of CD5^{-/-} naïve T cells. In the experiment shown, 30 U/mL of recombinant IL-2 was added, showing that proliferation of anergic Treg can be restored after addition of exogenous IL-2. Data are representative of five independent experiments. Mean values + SEM are shown. Statistically significant values are marked as ***p* ≤ 0.05.

CD4⁺ CD25⁻ (naïve) T cells from WT or CD5^{-/-} mice were co-cultured with CD4⁺ CD25^{+/hi} T cells from WT or CD5^{-/-} mice (1:1 ratio) and T-cell proliferation of naïve T cells was measured in response to CD3 crosslinking. As shown in Fig. 9, Treg cells from CD5^{-/-} mice suppressed the proliferation of WT naïve T cells, similar to WT nTreg.

The observation that CD5 is involved in induction of T-cell unresponsiveness “*in vitro*” [57] suggested the possibility that CD5 expression would be required in naïve cells for Treg-mediated suppression. Therefore, we performed parallel suppression assays using naïve CD5^{-/-} T cells. Both WT and CD5^{-/-} CD4⁺ CD25^{+/hi} T cells efficiently inhibited proliferation of naïve CD4⁺ CD25⁻ CD5^{-/-} T lymphocytes, indicating that CD5 is not required for Treg-induced suppression.

Discussion

It has been postulated that nTreg development requires conditions of high avidity signaling, with a selection threshold that may be placed close to that required for negative selection [11]. Here we investigated the contribution of CD5, which participates in the fine-tuning of TCR-mediated signaling, in nTreg development. Interestingly, expression of CD5 was significantly enhanced in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells both in the thymus and in the periphery, as it was previously reported for CD4⁺ CD25^{+/hi} T cells [47, 49, 50]. Since CD5 expression is quantitatively influenced by the intensity of TCR signaling during thymocyte development [48], increased expression of CD5 in nTreg is consistent with the notion that these cells are selected under high avidity interactions.

As CD5 negatively regulates TCR signaling during thymocyte selection, we investigated its contribution during nTreg development. Our results show an increase in the percentage of CD4⁺ CD25⁺

Foxp3⁺ T cells in the thymus of CD5^{-/-} mice compared with WT mice. This result is similar to the Treg enrichment reported in the absence of other negative regulators of TCR signaling such as SHP-1 [20]. However, in contrast to these reports, we also found a significant increase in nTreg cell numbers, both in CD5^{-/-} adult thymus and in nTreg derived from CD5^{-/-} FTOC. Particularly, numbers of nTreg generated *in vitro* from CD5^{-/-} FTOC were doubled when compared with those generated from WT FTOC, suggesting that new generation of nTreg is occurring in the absence of CD5. It is worth noting that in our study, numbers of nTreg were calculated based on the expression of Foxp3⁺ cells among CD4⁺ CD25⁺ cells, rather than only CD4⁺ CD25⁺ alone [20, 22]. Accordingly, increased nTreg numbers were also observed under conditions of decreased GITR signaling [21]. Altogether, these data support a model in which high avidity signals favors the selection of nTreg in the thymus.

On the other hand, our results show that in the absence of CD5, the increase in the numbers of nTreg was accompanied by a reduction of non-nTreg, which results in an altered naïve:Treg ratio, similar to that reported in SHP-1^{-/-} mice [20] and in conditional MCC transgenic mice [22]. In those reports, it was argued that the enrichment of nTreg was not due to newly generated nTreg, as a direct consequence of increased TCR-mediated signaling during selection, but rather, to selective deletion of non-nTreg, which appeared to be less sensitive to agonist-induced clonal deletion. In this context, our data clearly demonstrate that in CD5^{-/-} mice, CD4⁺ Foxp3⁻ naïve thymocytes but not CD4⁺ Foxp3⁺ nTreg undergo increased apoptosis, as demonstrated by Annexin/7AAD staining and intracellular detection of active Caspase 3, which results in preferential cell death of naïve thymocytes.

Besides the role of CD5 as a modulator of TCR signaling, accumulating evidence suggests its participation in cell survival. In this context, co-ligation of CD3 and CD5 in DP thymocytes induces

upregulation of Bcl-2 [56], a molecule that has been shown to protect thymocytes from multiple apoptotic stimuli [58]. On the other hand, *in vitro* experiments demonstrated that activated CD4⁺ T cells that lack CD5 expression are more susceptible to activation-induced cell death in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis [59]. Moreover, CD5 expression protects cytotoxic T lymphocytes from autologous tumor-induced cell death through downregulation of FasL expression and subsequent inhibition of Caspase 8 [60].

Recent data have provided information about the molecular basis for CD5-mediated survival. More specifically, Casein Kinase 2, a serine/threonine kinase that associates with CD5 in thymocytes [37], was shown to play a crucial role in cell survival and apoptosis [61]. In this context, CD5^{-/-} CD4⁺ T cells, as well as CD4⁺ T lymphocytes that express a Casein Kinase 2 binding/activation-deficient CD5, are more susceptible to apoptosis induction than WT CD4⁺ T cells [62]. However, the molecular mechanism by which CD5 may prevent thymocyte apoptosis had not yet been explored.

In an attempt to investigate the molecular signals involved in nTreg selection in the absence of CD5, we evaluated the phosphorylation state of Erk1/2, c-Cbl, PI3K and Akt, important effectors of TCR-mediated signaling, under basal conditions and after TCR crosslinking. We observed increased basal phosphorylation of Erk1/2 and c-Cbl in nTreg from WT and CD5^{-/-} mice, compared with naïve T cells, respectively, confirming the fact that nTreg must have been selected under conditions of high avidity [46]. When we compared WT to CD5^{-/-} mice (in which TCR-mediated signals are presumably further enhanced), we detected increased levels of p-Erk in CD5^{-/-} Treg, compared with WT Treg, while phosphorylation of PI3K and Akt was only enhanced in naïve CD5^{-/-} thymocytes compared with naïve WT thymocytes. Interestingly, after anti-CD3 plus anti-CD28 crosslinking, CD5^{-/-} naïve thymocytes showed reduced levels of p-Akt, compared with WT. This result correlates with the increased susceptibility of CD4⁺ Foxp3⁻ CD5^{-/-} thymocytes to apoptosis. In this context, Akt was shown to play a role in thymocyte survival [63, 64], through the induction of Bcl-2 family members, such as Bcl-XL [65] and A1 [66].

In contrast to naïve thymocytes, the absence of CD5 did not affect Akt phosphorylation in Treg, in response to TCR crosslinking. Interestingly, Bensinger *et al.* [67] recently showed that peripheral Treg, stimulated in the presence of IL-2, show increased survival in the absence of Akt phosphorylation, suggesting that Akt activation is dispensable for Treg survival.

On the other hand, it has been suggested that survival of nTreg may be mediated by the upregulation of genes encoding TNFR-NGFR superfamily members, such as GITR [68] which, upon crosslinking by its ligand, promotes the activation of the NFB pathway, leading to protection from apoptosis [69]. Recently, it has been described that P38 may have a role in thymocyte survival by promoting the inactivation of GSK3 β through an Akt-independent mechanism [70]. In this context, recent data from our group (Nava *et al.* unpublished results) indicate that thymus-derived antigen-specific Treg show increased phosphorylation of P38 in response to CD3 crosslinking, compared with naïve antigen-specific T cells. Therefore, we could hypothesize that P38 may be involved in the resistance of nTreg from cell death induced under high-avidity conditions.

Finally, analysis of peripheral Treg cells showed that the absence of CD5 leads to an increase of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ as well as CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ Treg. This subpopulation was not increased in adult or fetal thymus from CD5^{-/-} mice, raising the possibility that they might be “adaptive” Treg cells [71], a subpopulation of Treg that can be induced in the periphery under particular conditions of antigen exposure [72] or driven in the presence of particular cytokines [25, 73]. However, additional experiments should be performed to prove this possibility.

In addition, since CD5 has been involved in T-cell anergy induction [57], we investigated the function of Treg in CD5^{-/-} mice. We demonstrated the role of Treg in suppressing naïve T-cell proliferation from both WT and CD5^{-/-} mice. This is especially relevant since we found that naïve T cells from CD5^{-/-} mice proliferate vigorously compared with WT naïve T cells when they were cultured with APC and anti-CD3 crosslinking. This hyperproliferation was already reported [74] and argues in favor of a role of CD5 as a negative regulator of TCR signaling in mature T cells. Our results showed efficient suppressive activity of CD5^{-/-} Treg; however, a more detailed study recently showed that Treg obtained from CD5^{-/-} mice are even more potent than WT Treg in suppressing the *in vitro* cell proliferation of anti-CD3 stimulated CD4⁺ CD25⁻ responder T cells [75].

In conclusion, our data demonstrate that the enrichment of nTreg observed in the absence of CD5 signaling, under conditions of enhanced TCR-mediated signaling is due both to increased nTreg selection and to preferential cell death of naïve thymocytes, while nTreg appear to be less sensitive to conditions of high avidity. The reduced Akt phosphorylation observed CD4⁺ CD25⁻ naïve CD5^{-/-} thymocytes in response to TCR crosslinking might explain the increased cell death of these cells, suggesting a new potential mechanism for CD5-mediated thymocyte survival.

Materials and methods

Mice

Balb/c mice were purchased from Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME. CD5^{-/-} mice, bred on the Balb/c background, were obtained from University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL. Animals were used at 8–10 wk and 12–13 wk of age, and were maintained in our animal facility in accordance to institutional guidelines.

Antibodies

The monoclonal antibodies used in the experiments included: PE-coupled anti-CD4 (L3T4), biotin-conjugated anti-CD4 (L3T4), APC-coupled anti-mouse CD4 (RM4-5) Cy5-coupled anti-CD8 (53-6.7), FITC-coupled anti-CD25 (7D4), PE-coupled anti-CD5 (53-7.3), Alexa 647-coupled p-Erk (T202/Y204) and p-c-Cbl (pY700), PE conjugated rabbit anti-active Caspase 3, all from BD Biosciences

(San Jose, CA). Anti-p-Akt (Ser 473, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-p-PI3K (Tyr508, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), APC-coupled anti-Foxp3 (Clone FJK-16s from eBioscience, San Diego, CA). For primary antibody detection: APC Cy7-conjugated streptavidin (BD Biosciences) and PE-coupled goat anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA) were used. For phosphorylation assays: biotin-conjugated hamster anti-mouse CD3 ϵ (145-2C11) and biotin-conjugated hamster anti-mouse CD28 (37.51, BD Biosciences) were used. Immunopure[®] streptavidin (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) was used for biotinylated antibody crosslinking. For *in vitro* proliferation and suppression assays cells were stimulated with purified hamster anti-mouse CD3 ϵ (145-2C11) (BD Biosciences) and were crosslinked with goat anti-hamster IgG (Pierce Biotechnology).

Cell preparation and flow cytometry

Thymi, fetal thymi and lymph nodes were excised from mice and single-cell suspensions ($1-3 \times 10^6$) were stained with the indicated antibodies. Four-color staining analysis was performed on the flow cytometer FACSCalibur with standard CellQuest Software (BD Biosciences). Five-color stained samples were collected using the FACS Aria cytometer and analyzed using FACSDiva Software (BD Biosciences). At least 1×10^5 viable cells were collected from live gate, determined by forward and side light scatter.

Foxp3 expression

Thymocytes and peripheral T lymphocytes from Balb/c or CD5^{-/-} mice were stained with Treg Staining Kit (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD25 antibodies and incubated with Fixation/Permeabilization Solution. After a 2 h incubation, cells were washed twice with Permeabilization Buffer and incubated with anti-Foxp3 (Clone FJK-16s) for 30 min at 4°C.

Apoptosis assays

Thymocytes and T lymphocytes were initially stained with CD4/CD8 antibodies, Apoptotic thymocytes and T cells was detected after staining with Annexin-V-FITC and 7-AAD staining solution (BD Biosciences), in Annexin-V binding buffer for 20 min at room temperature.

For apoptosis analysis in Treg, following the staining with anti-CD4, anti-CD8, Annexin V and 7AAD, cells were permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (eBioscience) and incubated with anti-Foxp3 antibody, as before. For the analysis of active Caspase 3 in Treg, freshly isolated or CD3 plus CD28 stimulated thymocytes were stained with anti-CD4, anti-CD8 antibodies, permeabilized with the same Fixation/Permeabilization Solution and then incubated with anti-active Caspase 3 and anti-Foxp3 antibodies.

Phosphorylation assays

Thymocytes from Balb/c and CD5^{-/-} were stimulated and stained according to phospho-flow protocols (BD Bioscience). Briefly, cells (3×10^6) were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD25 and stimulated with pervanadate (100 nM), PMA plus ionomycin (20 and 200 ng/mL respectively), anti-CD3 (10 μ g/mL) and anti-CD28 (10 μ g/mL) (BD Bioscience). Stimulations were carried on RPMI 1640 medium supplemented with 0.2% SFB at 37°C for 3 min. Activation was arrested by fixation with 300 μ L of Lyse/Fix buffer for 10 min at 37°C. To permeabilize, cells were incubated with 100 μ L Perm buffer II for 20 min at 4°C, then washed and stained with Alexa 647-coupled anti-pErk, c-Cbl or purified pPI3K and pAkt specific antibodies. Non-conjugated antibodies were detected by addition of PE-coupled goat anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories). Flow cytometric analysis was performed, as described above. All data were analyzed with FlowJo[®] Tree Star software.

Fetal thymic organ cultures

Pregnant female mice were sacrificed on day 15 of gestation. Fetal thymi were removed and cultured onto Millicell membranes (Millipore, Billerica, MA), placed in six-well plates in the presence of 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 20 mM HEPES, 0.1 mM MEM non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 1% penicillin/streptomycin, all from (Invitrogen). Culture media was replaced (2/3) with fresh media every 3 days. On day 8 of culture, thymic lobes were disaggregated, and thymocytes were counted and stained. For Foxp3 expression, three thymic lobes were pooled and stained, for apoptosis assays individual thymic lobes were analyzed. Flow cytometric analysis was performed, as described above.

Cell sorting

For cell sorting, splenocytes, depleted of red blood cells, were combined with lymph node cell suspensions and enriched for CD4⁺ cells by negative selection. Briefly, cells were incubated for 30 min at 4°C with rat anti-mouse CD8 hybridoma supernatant (kindly provided by Dra. Laura Bonifaz, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS), anti-B220 (clone RA3-6B2) and anti-CD19 (clone ID3) monoclonal antibodies (BD Biosciences), followed by incubation on plate-bound goat anti-rat IgG (MP Biomedicals, Solon, OH) tissue culture plates, 30 min at 37°C. Non-adherent cells were recovered, washed and stained with anti-CD4 PE and anti-CD25 FITC. CD4⁺ CD25⁻ (designated as "effector" T cells) and CD4⁺ CD25^{+/hi} (designated as "regulatory" T cells) were electronically purified using a FACS Aria cell sorter (Becton & Dickinson). Purity of the sorted populations was greater than 96%.

In vitro suppression assays

CD4⁺ CD25⁻ or CD4⁺ CD25^{+/hi} sorted T cells (1×10^5) were cultured in the presence of irradiated (3000 rad) BALB/c splenocytes (1×10^5), as APC, and were stimulated with soluble purified anti-CD3 monoclonal antibody (145-2C11) from (BD Biosciences) at 10 µg/mL. For CD3 crosslinking goat anti-hamster IgG (Pierce Biotechnology) at 20 µg/mL was used. In some cases, 30 µg/mL of recombinant hIL-2 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) was added. For suppression assays indicated numbers of CD4⁺ CD25⁻ and CD4⁺ CD25^{+/hi} were mixed in 1:1 ratio and stimulated under the same conditions. Cells were cultured in triplicate with 200 µL of Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 0.1 mM MEM non-essential amino acids, 1 mM Sodium Pyruvate, 2 mM L-glutamine, 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 1% penicillin/streptavidin, all from (Invitrogen) in 96-well round-bottomed plates and 16 h later, pulsed with 1 µCi/well of [³H]thymidine. Cells were harvested at 72 h and [³H]thymidine incorporation was measured using a beta-plate counter.

Statistical analysis

An unpaired two-tailed Student's *t* test was used to calculate statistical significance. *p*-Values below 0.05 were considered significant.

Acknowledgements: We thank Biol. Ramsés Chávez and Biol. Germán Alemán for technical assistance and M. C. Carlos Castellanos and Lourdes Arriaga for technical support in cell sorting experiments. We also want to thank MVZ Georgina Díaz and MVZ Jorge Omar Garcia Rebollar for animal care assistance. The work was supported by Grant 42797-Q from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. D.O. was supported by a fellowship from DGEF UNAM, México.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Sprent, J. and Kishimoto, H., The thymus and negative selection. *Immunol. Rev.* 2002. **185**: 126–135.
- 2 Green, D. R., Droin, N. and Pinkoski, M., Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* 2003. **193**: 70–81.
- 3 Appleman, L. J. and Boussiotis, V. A., T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* 2003. **192**: 161–180.
- 4 Shevach, E. M., Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 423–449.

- 5 Liu, Y. J., A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol.* 2006. **27**: 215–221.
- 6 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 330–336.
- 7 Sakaguchi, S., Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005. **6**: 345–352.
- 8 Bach, J. F., Regulatory T cells under scrutiny. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. **3**: 189–198.
- 9 Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J. et al., Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006. **212**: 8–27.
- 10 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. **155**: 1151–1164.
- 11 Maloy, K. J. and Powrie, F., Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 816–822.
- 12 Lund, J. M., Hsing, L., Pham, T. T. and Rudensky, A. Y., Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 2008.
- 13 Belkaid, Y., Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. **7**: 875–888.
- 14 Wing, K., Fehervari, Z. and Sakaguchi, S., Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2006. **18**: 991–1000.
- 15 Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J., CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 1353–1362.
- 16 Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H., Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 756–763.
- 17 Hori, S., Haurly, M., Coutinho, A. and Demengeot, J., Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺4⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. **99**: 8213–8218.
- 18 Koonpaew, S., Shen, S., Flowers, L. and Zhang, W., LAT-mediated signaling in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 2006. **203**: 119–129.
- 19 Willoughby, J. E., Costello, P. S., Nicolas, R. H., Robinson, N. J., Stamp, G., Powrie, F. and Treisman, R., Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J. Immunol.* 2007. **179**: 6836–6844.
- 20 Carter, J. D., Calabrese, G. M., Naganuma, M. and Lorenz, U., Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2005. **174**: 6627–6638.
- 21 Stephens, G. L. and Ignatowicz, L., Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4⁺ T cells toward a regulatory (CD4⁺CD25⁺) lineage. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33**: 1282–1291.
- 22 van Santen, H. M., Benoist, C. and Mathis, D., Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J. Exp. Med.* 2004. **200**: 1221–1230.

- 1 23 Salomon, B. and Bluestone, J. A., Complexities of CD28/B7: CTLA-4
2 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev.*
3 *Immunol.* 2001. **19**: 225–252.
- 4 24 Sansom, D. M. and Walker, L. S., The role of CD28 and cytotoxic
5 T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol.*
6 *Rev.* 2006. **212**: 131–148.
- 7 25 Wan, Y. Y. and Flavell, R. A., The roles for cytokines in the generation and
8 maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 2006. **212**: 114–130.
- 9 26 Lio, C. W. and Hsieh, C. S., A two-step process for thymic regulatory T cell
10 development. *Immunity* 2008. **28**: 100–111.
- 11 27 Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W. and Su, L., Delayed functional
12 maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal
13 thymus: role of TSLP. *BMC Immunol.* 2006. **7**: 6.
- 14 28 Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S. and Herzenberg, L. A., T cell
15 subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens.
16 Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with
17 monoclonal antibodies modifies current views. *J. Exp. Med.* 1980. **152**:
18 280–295.
- 19 29 Hardy, R. R., Carmack, C. E., Li, Y. S. and Hayakawa, K., Distinctive
20 developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunol.*
21 *Rev.* 1994. **137**: 91–118.
- 22 30 Osman, N., Lazarovits, A. I. and Crumpton, M. J., Physical association of
23 CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of
24 human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 1173–1176.
- 25 31 Lankester, A. C., van Schijndel, G. M., Cordell, J. L., van Noesel, C. J. and
26 van Lier, R. A., CD5 is associated with the human B cell antigen receptor
27 complex. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 812–816.
- 28 32 Lozano, F., Simarro, M., Calvo, J., Vila, J. M., Padilla, O., Bowen, M. A. and
29 Campbell, K. S., CD5 signal transduction: positive or negative modulation
30 of antigen receptor signaling. *Crit. Rev. Immunol.* 2000. **20**: 347–358.
- 31 33 Raab, M., Yamamoto, M. and Rudd, C. E., The T-cell antigen CD5 acts as a
32 receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol. Cell.*
33 *Biol.* 1994. **14**: 2862–2870.
- 34 34 Dennehy, K. M., Broszeit, R., Garnett, D., Durrheim, G. A., Spruyt, L. L.
35 and Beyers, A. D., Thymocyte activation induces the association of
36 phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur. J. Immunol.* 1997.
37 **27**: 679–686.
- 38 35 Dennehy, K. M., Broszeit, R., Ferris, W. F. and Beyers, A. D., Thymocyte
39 activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras
40 GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 1617–1625.
- 41 36 Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A.
42 and Kanner, S. B., CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor
43 signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phospho-
44 tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 1999. **19**: 2903–2912.
- 45 37 Raman, C. and Kimberly, R. P., Differential CD5-dependent regulation of
46 CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication
47 on TCR/CD3-mediated activation. *J. Immunol.* 1998. **161**: 5817–5820.
- 48 38 Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W. and Kimberly, R. P.,
49 Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface
50 receptor CD5. *J. Biol. Chem.* 1998. **273**: 19183–19189.
- 51 39 Calvo, J., Vilda, J. M., Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D.,
52 Campbell, K. S. et al., Human CD5 signaling and constitutive phosphor-
53 ylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J. Immunol.* 1998.
54 **161**: 6022–6029.
- 55 40 Simarro, M., Pelassy, C., Calvo, J., Places, L., Aussel, C. and Lozano, F.,
The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent
and -independent diacylglycerol production. *J. Immunol.* 1997. **159**:
4307–4315.
- 41 Ledbetter, J. A., Martin, P. J., Spooner, C. E., Wofsy, D., Tsu, T. T., Beatty,
P. G. and Gladstone, P., Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain
proliferative responses of activated T cells. *J. Immunol.* 1985. **135**:
2331–2336.
- 42 June, C. H., Rabinovitch, P. S. and Ledbetter, J. A., CD5 antibodies increase
intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J. Immunol.* 1987.
138: 2782–2792.
- 43 Tarakhovskiy, A., Kanner, S. B., Hombach, J., Ledbetter, J. A., Muller, W.,
Killeen, N. and Rajewsky, K., A role for CD5 in TCR-mediated signal
transduction and thymocyte selection. *Science* 1995. **269**: 535–537.
- 44 Tarakhovskiy, A., Muller, W. and Rajewsky, K., Lymphocyte populations
and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**:
1678–1684.
- 45 Azzam, H. S., DeJarnette, J. B., Huang, K., Emmons, R., Park, C. S.,
Sommers, C. L., El-Khoury, D. et al., Fine tuning of TCR signaling by CD5.
J. Immunol. 2001. **166**: 5464–5472.
- 46 Kim, J. M. and Rudensky, A., The role of the transcription factor Foxp3 in
the development of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 2006. **212**: 86–98.
- 47 Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E.,
Lerman, M. A., Naji, A. and Caton, A. J., Thymic selection of CD4+CD25+
regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001.
2: 301–306.
- 48 Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W. and Love, P. E.,
CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR)
signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 2301–2311.
- 49 Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka,
F. and Sakaguchi, S., Thymus and autoimmunity: production of CD25+
CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the
thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 1999. **162**:
5317–5326.
- 50 Kozłowska, E., Biernacka, M., Ciechomska, M. and Dreła, N., Age-related
changes in the occurrence and characteristics of thymic CD4(+) CD25(+) T
cells in mice. *Immunology* 2007. **122**: 445–453.
- 51 McCaughy, T. M., Baldwin, T. A., Wilken, M. S. and Hogquist, K. A.,
Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no
involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* 2008. **205**: 2575–2584.
- 52 Manning, B. D. and Cantley, L. C., AKT/PKB signaling: navigating
downstream. *Cell* 2007. **129**: 1261–1274.
- 53 Kandel, E. S. and Hay, N., The regulation and activities of the multi-
functional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* 1999. **253**:
210–229.
- 54 Naparstek, Y., Holoshitz, J., Eisenstein, S., Reshef, T., Rappaport, S.,
Chemke, J., Ben-Nun, A. and Cohen, I. R., Effector T lymphocyte line cells
migrate to the thymus and persist there. *Nature* 1982. **300**: 262–264.
- 55 Agus, D. B., Surh, C. D. and Sprent, J., Reentry of T cells to the
adult thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* 1991. **173**:
1039–1046.
- 56 Zhou, X. Y., Yashiro-Ohtani, Y., Toyo-Oka, K., Park, C. S., Tai, X. G.,
Hamaoka, T. and Fujiwara, H., CD5 costimulation up-regulates the
signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8
+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage.
J. Immunol. 2000. **164**: 1260–1268.
- 57 Hawiger, D., Masilamani, R. F., Bettelli, E., Kuchroo, V. K. and Nussenz-
weig, M. C., Immunological unresponsiveness characterized by increased
expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells *in vivo*.
Immunity 2004. **20**: 695–705.
- 58 Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J., BCL-2 family: regulators of cell death.
Annu. Rev. Immunol. 1998. **16**: 395–419.

- 59 Axtell, R. C., Webb, M. S., Barnum, S. R. and Raman, C., Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J. Immunol.* 2004. **173**: 2928–2932.
- 60 Friedlein, G., El Hage, F., Vergnon, I., Richon, C., Saulnier, P., Lecluse, Y., Caignard, A. et al., Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *J. Immunol.* 2007. **178**: 6821–6827.
- 61 Ahmed, K., Gerber, D. A. and Cochet, C., Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 2002. **12**: 226–230.
- 62 Axtell, R. C., Xu, L., Barnum, S. R. and Raman, C., CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J. Immunol.* 2006. **177**: 8542–8549.
- 63 Juntilla, M. M., Wofford, J. A., Birnbaum, M. J., Rathmell, J. C. and Koretzky, G. A., Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007. **104**: 12105–12110.
- 64 Juntilla, M. M. and Koretzky, G. A., Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunol. Lett.* 2008. **116**: 104–110.
- 65 Veis, D. J., Sentman, C. L., Bach, E. A. and Korsmeyer, S. J., Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 1993. **151**: 2546–2554.
- 66 Mandal, M., Borowski, C., Palomero, T., Ferrando, A. A., Oberdoerffer, P., Meng, F., Ruiz-Vela, A. et al., The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 603–614.
- 67 Bensing, S. J., Walsh, P. T., Zhang, J., Carroll, M., Parsons, R., Rathmell, J. C., Thompson, C. B. et al., Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5287–5296.
- 68 McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M. and Byrne, M. C., CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002. **16**: 311–323.
- 69 Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G. and Riccardi, C., A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 6216–6221.
- 70 Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C. D., Aronshtam, A., Clements, J. L., Sabio, G. et al., Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 2008. **320**: 667–670.
- 71 Ramsdell, F., Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003. **19**: 165–168.
- 72 Lohr, J., Knoechel, B. and Abbas, A. K., Regulatory T cells in the periphery. *Immunol. Rev.* 2006. **212**: 149–162.
- 73 Wan, Y. Y. and Flavell, R. A., Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. **102**: 5126–5131.
- 74 Pena-Rossi, C., Zuckerman, L. A., Strong, J., Kwan, J., Ferris, W., Chan, S., Tarakhovskiy, A. et al., Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J. Immunol.* 1999. **163**: 6494–6501.
- 75 Dasu, T., Qualls, J. E., Tuna, H., Raman, C., Cohen, D. A. and Bondada, S., CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+)CD25(+) T(reg) cells. *Immunol. Lett.* 2008. **119**: 103–113.

Abbreviations: DP: double positive · FTOC: fetal thymic organ culture · nTreg: “naturally occurring” CD4⁺ CD25⁺ Treg · SHP-1: (SH2) domain-containing phosphatase-1 · SP: single positive

Full correspondence: Dr. Gloria Soldevila, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70228, Circuito Escolar s/n, Mexico City, Distrito Federal CP-04510, Mexico
Fax: +5255555503982
e-mail: soldevi@servidor.unam.mx

Current address: A. Sarukhan, Istituto Clinico Humanitas. Centro Cascina Perseghetto. Direzione Scientifica-Ricerca. Rozzano, MI 20089, Italy

Received: 4/11/2008

Revised: 26/3/2009

Accepted: 7/5/2009

AQ10

QUERY FORM

Wiley-VCH Germany

Journal Title: **EJI**

Article No: **39053**

Queries and / or remarks

Query No.	Details Required	Author's Response
Q1	Please check whether the expansion for "nTreg" that has been included in the abbreviation list is correct.	
Q2	Please provide the expansions for "Akt", "TSLP", "MCC", "TNFR", "NGFR", "GITR" and "SFB".	
Q3	Please check whether the expansion introduced for "SP" is correct. It has also been introduced in the abbreviation list.	
Q4	Please check whether the change of "DNs" to "double negatives" is correct.	
Q5	Please specify the source and e-mail permission to use these data if applicable.	
Q6	Please check whether "determinated" can be replaced with "determined" here.	
Q7	Please check the unit " μ /mL".	
Q8	Please provide the volume number and page range for ref. [12].	
Q9	Please provide the end page number of ref. [27] if applicable.	
Q10	Please provide title for A.Sarukhan.	