

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION *IN VITRO* DE CD3_E COMO UNIDAD
INDEPENDIENTE DE SEÑALIZACION DEL TCR

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
PAULA LICONA LIMON

ASESORA, DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

MEXICO, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soldevila y al Dr. Eduardo García por su paciencia, orientación, confianza y apoyo en estos años juntos.

A los Dres. Edmundo Lamoyi y Vianney Ortiz por tomarse el tiempo para revisar esta tesis.

A mis maestros y amigos que me han apoyado desde el inicio de mi carrera: Fabiola Gutiérrez y Armando, Laura Camarena, Julieta Rubio, Celis, Irma, Clemen, Auro, Gaby y Fabiola.

A mis padres por ser el apoyo incondicional que siempre han sido, porque gracias a ellos estoy aquí y por ser a quienes admiro, respeto y amo profundamente.

A mis hermanos que son muchas veces mi ejemplo y que siempre han estado y estarán cerca.

A mi abuelita y abuelos ausentes, a mis tíos (Adriana, Alfredo, Arcelia, Carlos, Eduardo, Ernesto, Gloria, Hilda, Javier, Luis, Marta, Mónica, Norma, Rosita, Soco, Toño y Yola), primos (Adriana, Agustín, Alfredo, Ari, Claudia, Diego, Ernesto, Gabriel, Gustavo, Héctor, Hilda, Javier, Jessica, Jorge, Lalo, Marco, Mónica, Patricio, Pablo, Ricardo, Roberto, Toño y Yoli) y sobrinos (Adrianita, Alfredo, Aranza, Carlo, Fabiel, Frida, Kiki, Poncho y la o el que viene) por los buenos momentos y el cariño que siempre me han dado.

A mi familia putativa, Marta, Pedro, Perico, Erica y Manuel.

A Roberto por el cariño, la ayuda, comprensión y apoyo constitutivos.

A la familia Risco Flores por las atenciones y el apoyo.

A mis amigos y compañeros de algún momento: los Alejandros, Cei, Clelia, Emiliano, Gisela, Helena, Jess, Juan Ramón, Karen, Karina, Luis, Mario, Miguelito, Naika, Norma, Oscar, Paco, Rudolph y Yoshi; a mis amigos de Villaflores por compartir una parte de su vida conmigo, por las discusiones, por escucharme y dejarme tener ratos de desahogo.

A mis compañeros de laboratorios pasados y presente (Don Carmelo, Carlitos, Emilio, Horacio, Marce, Nancy, Paco, Ramsés, Selma, Silvana) por aguantarme en mis malos ratos y compartir los buenos.

Y a todos los que me faltaron y que de alguna forma aportaron en mi crecimiento personal y profesional.


ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	7
Sistema Inmune	7
Linfocitos T	9
Ontogenia de linfocitos T	11
Activación del linfocito T.....	16
Papel de Rafts en la activación del linfocito T	19
Proteínas adaptadoras	21
PLC γ y Calcio.....	24
Vía de PKC.....	25
Vía de MAPK	26
PI3K y metabolismo de lípidos	27
Vía Vav/Rac	28
El citoesqueleto de actina en la activación del linfocito T	30
Fosfatasa en la regulación negativa de las señales a través del TCR	30
Multiplicidad de ITAMs en el complejo CD3: ¿Redundancia o especificidad?	32
Dimerizadores químicos.....	36
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	42
Objetivos particulares.....	42

MATERIAL Y MÉTODOS	43
Líneas celulares.....	43
Construcción de las moléculas quiméricas.....	43
Plásmidos.....	45
Construcción de vectores de transfección.....	46
Transfecciones estables y transitorias.....	47
Lisados totales e inmunoprecipitaciones.....	48
Western Blot.....	49
Ensayos de fosfatasa alcalina secretada (SEAP).....	50
Activación de linfocitos T <i>in vitro</i>	51
Ensayo de flujo de Calcio.....	51
RESULTADOS	53
Expresión en líneas estables y transitorias.....	53
Fosforilación de las proteínas quiméricas.....	58
Expresión y activación de fosfatasa alcalina.....	60
Flujos de calcio en líneas y clonas estables.....	66
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
APÉNDICE	82
Reactivos para proteínas.....	82
Buffer de lisis:.....	82
SDS-PAGE y electrotransferencia de proteínas.....	82
Western Blot y stripping.....	84

Buffer para blot (TSA): 84
Buffer de stripping: 84
Activación celular..... 84
Buffer de carbonatos: 84
PBS 1X:..... 84
Buffer de stop:..... 85
BIBLIOGRAFÍA..... 86

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

NOMBRE: Paula Licena
Limón
FECHA: 03/12/2002
FIRMA: 

RESUMEN

El TCR o receptor de células T está constituido por las cadenas polimórficas α y β que son las responsables del reconocimiento de antígeno vía MHC expresado en la superficie de la célula presentadora. La capacidad de señalización del TCR es conferida por su unión no covalente al complejo CD3 que está formado de dos cadenas ζ , dos ϵ , una γ y una δ . Cada una de las cadenas del CD3 contiene motivos de fosforilación conocidos como ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) compuestos por pares de tirosinas conservadas con la secuencia consenso: YXXL/IX₆₋₈YXXL/I. Tras la interacción del TCR con el MHC/péptido, las tirosinas contenidas en los ITAMs son fosforiladas por cinasas de tirosina de la familia Src (lck, fyn) reclutando otras moléculas que a su vez activan diversas vías de señalización intracelular dentro de las cuales se encuentran la vía de activación del calcio a través de PLC γ , la vía de Ras-Raf-MAPK-ERK, la activación de PKC, PI3K y de moléculas que participan en el rearrreglo del citoesqueleto entre otras. La existencia de estas secuencias ITAM en cada una de las cadenas del complejo CD3, ha llevado a la postulación de dos diferentes modelos funcionales: uno cualitativo que postula que cada uno de los ITAMs de las cadenas asociadas pueden activar distintas vías de señalización y otro cuantitativo en la que dichas secuencias juegan un papel importante en la amplificación de la señal. Existen evidencias claras que podrían sugerir un papel diferencial y único de CD3 ϵ en el complejo de señalización. Estudios bioquímicos han demostrado que CD3 ϵ puede unir con mayor afinidad que CD3 ζ a la subunidad p85 de PI3K y a la cinasa fyn, también se ha reportado que CD3 ϵ interacciona específicamente con las moléculas CAST y Nck. Por otro lado, estudios funcionales de moléculas

quiméricas de CD3 ϵ y CD3 ζ pueden inducir flujos de calcio diferentes dependiendo del diseño de la quimera que se este activando. Todos estos resultados siguen generando controversia en cuanto al papel individual de CD3 ϵ en señalización.

Con base en el modelo cualitativo, en nuestro laboratorio diseñamos una estrategia para activar específicamente la cadena CD3 ϵ y evaluar si ésta, por si sola es capaz de inducir una respuesta funcional en la célula. La activación condicional de la cadena se logró mediante la generación de proteínas quiméricas distintas de CD3 ϵ silvestre, y ϵ con las dos tirosinas del ITAM sustituidas por fenilalanina, además utilizamos una quimera de CD3 ζ como control positivo de activación. Cada una de las quimeras esta constituida por los dominios extracelular y transmembranal de la molécula CD2 humana seguido por la parte intracelular de la molécula de interés (CD3 ϵ , CD3 ζ ó CD3 ϵ mutante) y varias copias de la molécula FKBP12 que funciona como ligando para la droga dimerizante (AP1510') capaz de inducir oligomerización de dichas quimeras intracelularmente.

Logramos generar líneas y clonas estables para las distintas quimeras en el linfoma humano Jurkat E6-1; nuestros resultados demuestran que es posible inducir la fosforilación específica de nuestras quimeras silvestres (CD3 ϵ y CD3 ζ) con entrecruzamientos intra y extracelulares, con droga dimerizante y anti-hCD2 respectivamente. También fue posible generar flujo de calcio tras entrecruzar con el anticuerpo dirigido a la región extracelular de nuestras quimeras (anti-hCD2) de CD3 ϵ y CD3 ζ , no así al activar la quimera de CD3 ϵ mutante que mostró una ligera inhibición en la generación del flujo de calcio cuando se entrecruzó el receptor endógeno con anti-hCD3. Realizamos ensayos de activación de NFAT mediante el uso de fosfatasa alcalina como reportero en líneas transitorias y estables

en la línea Jurkat Tag y observamos una mayor activación de genes dependientes de NFAT al estimular intra y extracelularmente a las quimeras de CD3 ϵ y CD3 ζ .

Los resultados sugieren que las señales inducidas tras el entrecruzamiento de CD3 ϵ poseen características cualitativamente distintas a las generadas al entrecruzar la quimera de CD3 ζ . Las tirosinas en el ITAM de CD3 ϵ son imprescindibles para la generación de las señales de activación como se observó en los resultados con la quimera de CD3 ϵ mutante. Es necesario disectar las vías de señalización activadas por las distintas quimeras para determinar a qué nivel se dan las diferencias observadas en nuestro trabajo.

INTRODUCCIÓN

Sistema Inmune

El sistema inmune tiene la función de discernir entre lo propio y lo no propio así como inducir una respuesta efectiva que permita al individuo defenderse contra agentes externos o patógenos. La respuesta inmune se ha dividido en innata y adaptativa. La primera incluye las primeras fases de la respuesta del huésped a la infección, se trata de mecanismos de resistencia innatos que reconocen y eliminan patógenos invasores. Las principales células efectoras de la respuesta inmune innata son los macrófagos que actúan en tejidos infectados. Las infecciones en los espacios entre los tejidos y en sangre son eliminadas por el sistema de complemento que consiste en un grupo de proteínas de plasma responsables de la respuesta inmune humoral. La respuesta inmune innata no es antígeno específica, está presente todo el tiempo en el individuo y no se ve incrementada por exposiciones repetidas al mismo patógeno ni discrimina entre grupos de patógenos relacionados.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa es la respuesta antígeno-específica de los linfocitos que lleva al desarrollo de memoria inmunológica. Este tipo de respuesta es generada por la selección clonal de linfocitos B (encargados de la respuesta adaptativa humoral) y linfocitos T (respuesta adaptativa celular). Ambos mecanismos proveen de inmunidad a largo plazo luego de la exposición a algún patógeno o a la administración de una vacuna asegurando una respuesta eficiente y específica en caso de reinfección.

Todas las células del sistema inmune, al igual que otros componentes de la sangre como son los eritrocitos y las plaquetas provienen de un mismo progenitor o célula madre pluripotencial (HSC; Hematopoietic Stem Cell) originada en médula ósea. Esta célula pluripotencial se divide generando células progenitoras para dos distintos linajes celulares: un progenitor común linfoide que lleva a la producción de linfocitos B y T y otro progenitor común mieloide que lleva a la producción de diferentes tipos de leucocitos (células blancas), eritrocitos (células rojas) y megacariocitos que son los responsables de la producción de plaquetas.

Los órganos linfoides son tejidos organizados que contienen grandes cantidades de linfocitos contenidos en una red de células no linfoides. Las interacciones de ambos tipos celulares son importantes tanto para el desarrollo como para la iniciación de la respuesta adaptativa, además son las responsables de que los linfocitos prevalezcan. Estos órganos se dividen en centrales o primarios donde se generan los linfocitos y secundarios o periféricos donde se presentan los antígenos a los linfocitos iniciando la respuesta adaptativa. La médula ósea y el timo son los órganos linfoides centrales. Los órganos linfoides secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos, la mucosa intestinal (Parches de Peyer) y el apéndice [1].

Esta tesis se centra principalmente en el estudio de señales de activación de linfocitos T, los cuales son los responsables de la respuesta inmune adaptativa celular. Existen dos clases de linfocitos T maduros dependiendo del co-receptor que expresen: CD4 o ayudadores ("helper") y CD8 o citotóxicos.

Linfocitos T

Los linfocitos T son seleccionados en timo de manera que el co-receptor que se mantiene ya sea CD4 ó CD8, coincide con la restricción de su TCR (Receptor de células T) por el MHC o complejo principal de histocompatibilidad. En general existen dos clases de linfocitos T maduros dependiendo del co-receptor que expresen: CD4 o ayudadores (“helper”) y CD8 o citotóxicos. Los linfocitos CD4⁺ tienen un TCR que reconoce antígenos presentados por el MHC de clase II que se expresa principalmente en células presentadoras profesionales como células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y células epiteliales del timo. Los linfocitos CD8⁺, reconocen antígenos presentados por el MHC de clase I, cuya expresión no está restringida a ningún tipo celular y se da en todas las células nucleadas del cuerpo. (Fig. 1).

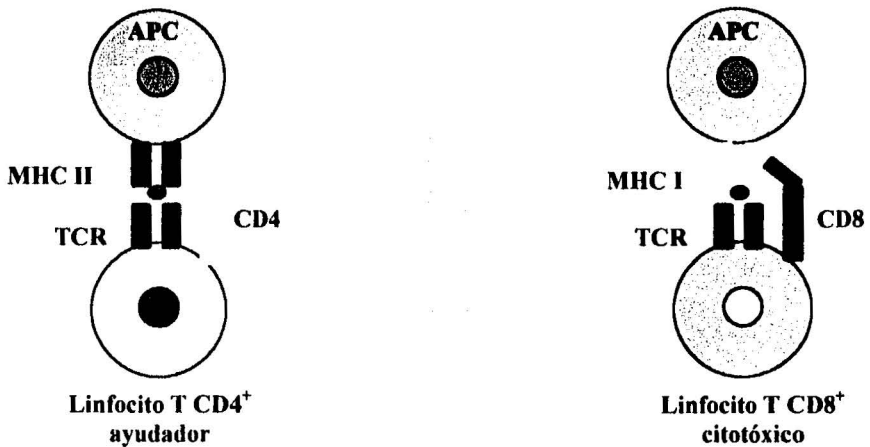


Figura 1. Reconocimiento de antígeno por linfocitos T. El receptor de linfocitos T (TCR) reconoce al antígeno (●) presentado en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) por moléculas del MHC, el co-receptor que expresa el linfocito ya sea CD4 o CD8 ayuda a la estabilización de la interacción y permite ejercer su función en la respuesta celular adaptativa.

La activación del linfocito T por células presentadoras de antígeno lleva a la proliferación y diferenciación del mismo, generando una progenie de células efectoras T y/o de células T de memoria. La proliferación de los linfocitos T depende de la expresión de citocinas, particularmente de la IL-2 (Interleucina-2) que es un factor de crecimiento de células T que se une a su receptor de alta afinidad en la superficie del linfocito T activado. Aquellos linfocitos cuyos receptores (TCR) interactúan con el MHC-péptido en ausencia de señales coestimuladoras (como CD28), no producen IL-2 y se vuelven anérgicos o mueren. Este requerimiento dual, de unión del receptor y de una señal coestimuladora, impide que los linfocitos vírgenes respondan a antígenos propios en células de tejidos que carecen de actividad coestimuladora. La proliferación del linfocito T que lo lleva finalmente a ser célula efectora es el evento crítico en la mayoría de las respuestas inmunes adaptativas. Una vez expandida la clona del linfocito, éste ejerce su función efectora y su progenie puede actuar en cualquier célula blanco que presente al antígeno. Las células T efectoras realizan una gran variedad de funciones, entre las más importantes está la eliminación de células infectadas por virus o transformadas, por medio de linfocitos CD8 citotóxicos y la activación de macrófagos por linfocitos CD4 ayudadores (Th1), las que en conjunto conforman la respuesta inmune celular. Por otro lado, los linfocitos T CD4 ayudadores (Th2) pueden inducir la activación de linfocitos B ayudando a la producción de distintas clases de anticuerpos que son la base de la respuesta inmune humoral.

Ontogenia de linfocitos T

Las células precursoras de los linfocitos T parten del hígado durante la etapa fetal, o de médula ósea en la etapa postnatal y migran al timo donde inician su proceso de diferenciación [2]. El timo es un órgano que se encuentra en la parte superior del tórax, anterior al corazón; está compuesto por tejidos linfoides y estromal que interaccionan estrechamente formando una red muy densa. Se ha demostrado que tanto las interacciones célula-célula como la presencia de factores solubles tienen un papel importante en el desarrollo tímico [3]. El timo se forma de lóbulos con regiones diferenciadas: una región exterior o corteza y una región interior o médula. La corteza contiene timocitos (linfocitos T inmaduros) rodeados de células epiteliales corticales a las que están estrechamente asociados. La médula se forma de timocitos maduros, células epiteliales medulares, células dendríticas y macrófagos (Fig 2).

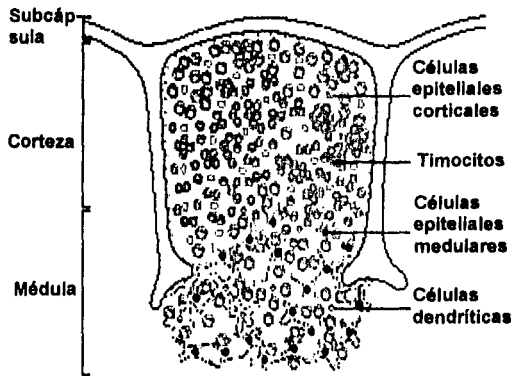
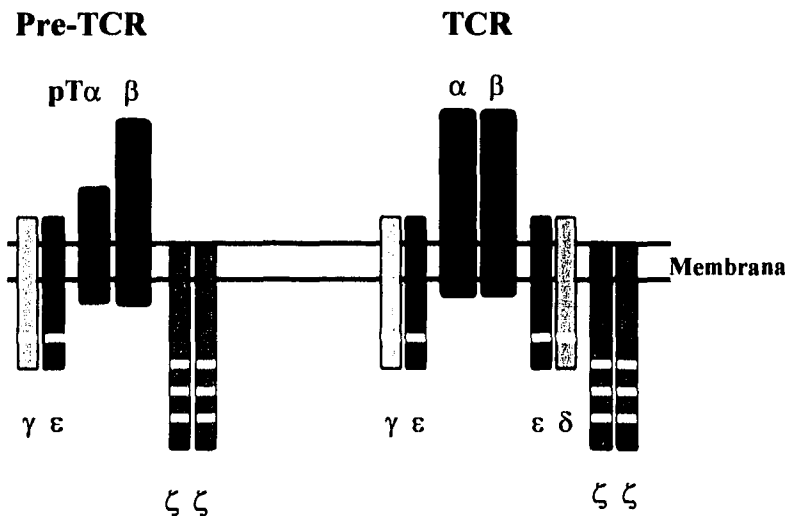


Figura 2. Estructura y composición del timo. Las regiones diferenciadas del timo se marcan a la izquierda y las distintas poblaciones a la derecha. Los timocitos abarcan todo lo largo del timo, aquellos menos diferenciados en la corteza y en la médula los que han adquirido su maduración y pueden salir a periferia. Adaptada de Janeway, 2001.

El proceso de diferenciación de los timocitos viene acompañado de cambios en la expresión de moléculas en su superficie y este hecho ha permitido identificar distintas poblaciones dependiendo del estadio de maduración en que se encuentran. Con base en la expresión de las moléculas co-receptoras CD4 y CD8, se distinguen tres poblaciones principales: la primera se denomina dobles negativas DN ($CD4^- CD8^-$) o triples negativos ($CD3^- CD4^- CD8^-$), en ella se distinguen cuatro distintas subpoblaciones también con base en la expresión de los marcadores de superficie CD25 que es la cadena α del receptor de IL-2 y CD44 que es una molécula de adhesión que interacciona con ácido hialurónico, estas subpoblaciones son: $CD25^- CD44^+$, $CD25^+ CD44^+$, $CD25^+ CD44^-$ y $CD25^- CD44^-$ (Fig 4). Además de éstos, existen otros marcadores que permiten identificar las poblaciones más inmaduras en el timo, como es la expresión del receptor para el factor de crecimiento de células madre o "stem cell factor" denominado c-Kit, que se expresa muy temprano en desarrollo (en células precursoras pluripotenciales) y se pierde al nivel de la última subpoblación de DN ($CD25^- CD44^-$). En el estadio de DN se dan procesos moleculares fundamentales que permitirán al timocito diferenciarse y pasar al siguiente estadio, uno de ellos es el rearreglo de la cadena β del TCR o receptor de linfocitos T a nivel de la tercera subpoblación ($CD25^+ CD44^-$), una vez que se da un rearreglo eficiente, la cadena β sale a superficie acoplada a una cadena no polimórfica p α o preTCR α y a dímeros de TCR ζ y CD3 $\gamma\epsilon$ [4] formando un receptor inmaduro o pre-TCR (comparar con TCR, Fig 3) y permitiendo el paso a la última subpoblación de DN ($CD25^- CD44^-$); a la elección de una cadena β del TCR y su expresión en superficie se le llama selección β . La señalización a través de este receptor inmaduro (preTCR) en células $CD25^- CD44^-$ se considera un punto de control o "checkpoint" puesto que da el paso al segundo estadio de diferenciación o

segunda población de linfocitos que es el de dobles positivas DP ($CD4^+ CD8^+$). A nivel de DP se da el rearreglo de la cadena $TCR\alpha$ y una vez rearreglada los linfocitos cuentan con un receptor maduro compuesto por las cadenas $TCR\alpha\beta$ acopladas a dímeros de $TCR\zeta$, $CD3\gamma\epsilon$ y $CD3\delta\epsilon$ (Fig. 3) [4].



□ **ITAM:** (YXXL/IX₆₋₈ YXXL/I)

Figura 3. Estructura del pre-TCR y TCR. La composición del receptor inmaduro o pre-TCR se compara con la del receptor maduro (TCR), las secuencias ITAM ("Immune-receptor Tyrosine-based Activation Motif") de las distintas cadenas del complejo CD3 se indican y su función se explicara más adelante.

La expresión del complejo TCR/CD3, permite que los timocitos DP sufran los procesos de selección positiva y negativa. La selección positiva rescata de la muerte celular programada a aquellos timocitos cuyo TCR es capaz de reconocer a un péptido endógeno acoplado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentado en la superficie de por células epiteliales corticales. Por otro lado, la selección negativa elimina (por apoptosis) a los timocitos cuyo TCR reconoce péptidos endógenos con alta afinidad, principalmente presentados por células dendríticas de la región córtico-medular, eliminando así la mayoría de las clonas autoreactivas [5]. Luego de ambas selecciones, el nivel de TCR en la membrana aumenta y se da la desregulación de algunos de los co-receptores en los timocitos para finalmente llegar al último estadio de diferenciación denominado como positivo sencillo: SP (single positive), donde los timocitos expresan sólo CD4 o CD8. Los timocitos maduros CD4 o CD8 salen a la periferia como linfocitos T vírgenes donde llevarán a cabo sus funciones efectoras. (Fig 4) [5].

Existe un segundo tipo de receptor de células T o TCR compuesto por las cadenas polimórficas γ y δ ; las células que poseen este receptor TCR $\gamma\delta$ corresponden al 10% de la población total de linfocitos en el adulto y son generadas en el estadio de dobles negativas, al nivel de la segunda subpoblación (CD25⁺ CD44⁺). Los linfocitos $\gamma\delta$ salen a periferia y migran principalmente a tejido epitelial, parecen reconocer antígenos no peptídicos y se cree que son independientes de la restricción por MHC aunque su función no se ha determinado por completo. Además de estos linfocitos $\gamma\delta$, generados a partir del mismo precursor que llevará a la producción de linfocitos T $\alpha\beta$; se sabe que poblaciones de células dendríticas y células T tipo "Natural Killers" o NKTs también son generadas en estadios tempranos del desarrollo tímico a partir del mismo precursor linfoide (Fig.4).

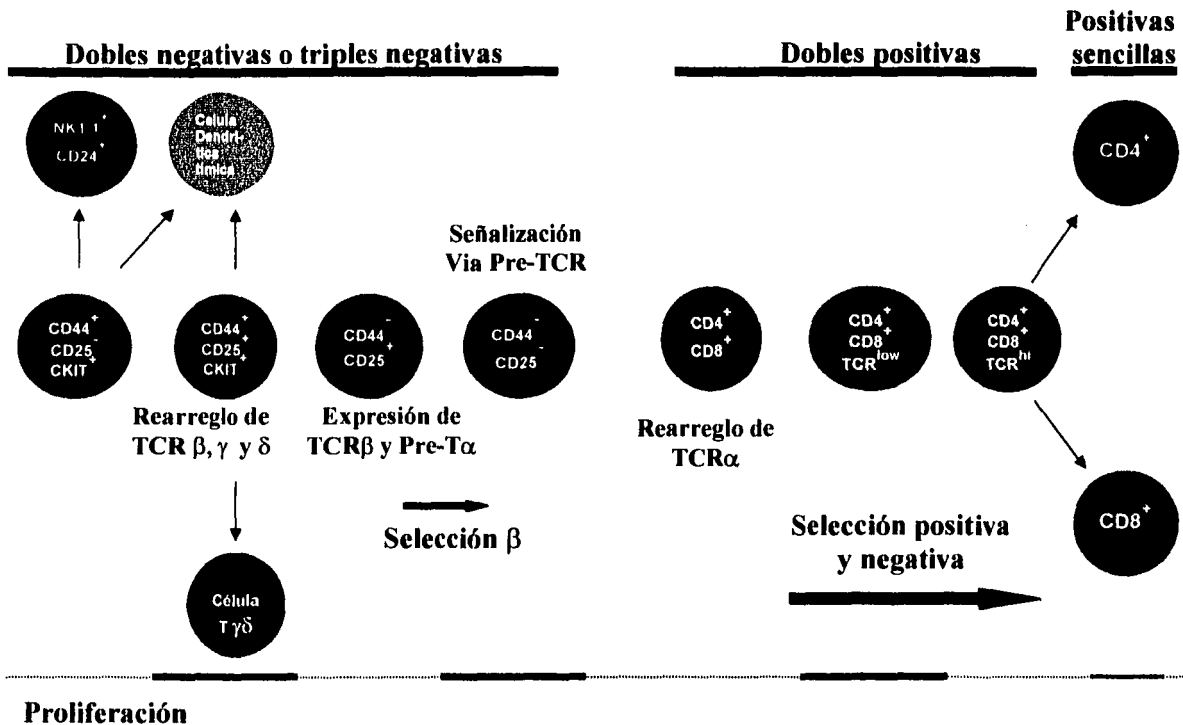


Figura 4. Esquema de maduración de los linfocitos T en timo. En la parte superior se delimitan las poblaciones pertenecientes a los distintos estadios de diferenciación. Las poblaciones generadas y los ciclos de proliferación se marcan con flechas y barras respectivamente.

Activación del linfocito T

Una vez en periferia, los linfocitos T pueden reconocer antígenos presentados por células presentadoras (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas principalmente) que migran del sitio de infección a los órganos linfoides secundarios y expresan al ligando del linfocito T en el contexto de las moléculas de MHC. La interacción del TCR/CD3 con su ligando péptido/MHC, permite su asociación a complejos membranales o microdominios de membrana ("rafts"), constituidos principalmente por esfingolípidos y colesterol, lo cual facilita la interacción del complejo TCR/CD3 con distintas proteínas importantes para la señalización. El reclutamiento de distintas proteínas a los "rafts" permite la formación de un complejo macromolecular que compartimentaliza proteínas de señalización de manera proximal a la membrana [6].

La naturaleza de las secuencias intracitoplásmicas de las moléculas CD3 permite la conexión de las señales extracelulares percibidas a través del TCR con señales internas de activación celular. Cada una de las cadenas del complejo CD3 poseen en su parte intracelular dominios conservados de fosforilación conocidos como ITAMs ("Immune-receptor Tyrosine-based Activation Motif") que consisten en pares de tirosinas con la secuencia consenso: YXXL/I₆₋₈YXXL/I que son fosforiladas luego del reconocimiento del péptido/MHC por el TCR. Las cadenas CD3 γ , δ y ϵ contienen un sólo ITAM mientras que CD3 ζ o TCR ζ posee tres (Fig.3). La relevancia de estas diferencias no se ha caracterizado por completo y las evidencias experimentales son controversiales. Las secuencias ITAM también se encuentran en otros receptores como el BCR o receptor de células B, receptores para Fc y algunas proteínas virales (ver Tabla I), la variabilidad conferida por los residuos

variables entre tirosina y tirosina conservada, podría aumentar la especificidad de unión al ligando de un ITAM con respecto a otro [7].

Hζ1	N Q L Y N E L N L G R R E E	Y D V L
Hζ2	E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I	
Hζ3	D G L Y D G L S T A T K D T	Y D A L
CD3γ	D Q L Y D P L K D R E D D Q	Y S H L
CD3δ	D Q V Y Q P L R D R D D A Q	Y S H L
CD3ε	N P D Y E P I T K G Q R D L	Y S G L
Igα	E N L Y E G L N L D D C S M	Y E D I
Igβ	D H T Y E G L N I D Q T A T	Y E D I
rFcεR1γ	D A V Y T G L N T R N Q E T	Y E T L
rFcεR1β	D R L Y E E L H V W S P I	Y S A L
EBV-LMP2A	P E I Y S H L S P V K P D	Y I N L
BLV gp30	D S D Y Q A L L P S A P E I	Y S H L
Consenso	D X X Y X X L X X X X X X X X Y X X L	
	E	I
		I

Tabla I. ITAMs. Secuencias ITAM presentes en los dominios citoplásmicos de subunidades invariantes de receptores antigénicos y proteínas transformantes virales. EBV (Virus de Eipstein-Barr), BLV (Virus de leucemia bovina), h y r denotan secuencias humanas y de ratón respectivamente. Las primeras tres secuencias corresponden al ITAM 1, 2 y 3 de la molécula CD3ζ.

El primer acontecimiento en la activación del linfocito T es la fosforilación de las tirosinas contenidas en los ITAMs de las distintas moléculas del complejo CD3 (γ, δ, ϵ y ζ) por cinasas de tirosina asociadas al receptor de la familia Src: *lck* y *fyn*. Estas cinasas contienen dominios de interacción SH2 ("Src homology 2") de unión a tirosinas fosforiladas y SH3 ("Src homology 3") de unión a dominios ricos en prolina en el extremo amino terminal, además de un sitio de fosforilación en su extremo carboxilo que sirve para su regulación negativa por la cinasa *Csk* [8]. La asociación de estas cinasas, principalmente de *lck*, con los co-receptores CD4 y CD8, facilita el acercamiento de éstas a los ITAMs del complejo CD3 y por ende la fosforilación en tirosina, luego del entrecruzamiento del TCR, favoreciendo su traslocación a "rafts".

Una vez fosforiladas, las tirosinas de los ITAMs funcionan como sitios de unión para otro grupo de cinasas de tirosina de la familia Syk que son ZAP-70 ("zeta-associated protein of 70 kDa") y Syk a través de sus dominios SH2. ZAP-70 puede entonces ser activada al ser fosforilada por *lck* y a su vez fosforilar a otras moléculas adaptadoras como LAT ("Linker of Activated T cells") y SLP-76 ("SH2 domain containing Leucocyte Protein of 76 kDa"). La gran variedad de moléculas adaptadoras provee de un gran potencial para el reclutamiento de diversos mecanismos efectores iniciados a través del TCR. Cambios sutiles en la abundancia de moléculas adaptadoras, la afinidad relativa por el ligando y el tiempo de reconocimiento del mismo puede afectar la naturaleza de la señal inducida a través del TCR. Dentro de las vías activadas tras la interacción TCR/péptido:MHC se encuentran las vías de PLC γ , PI3K, MAPK, vías de activación de citoesqueleto, entre otras. (Fig 5)

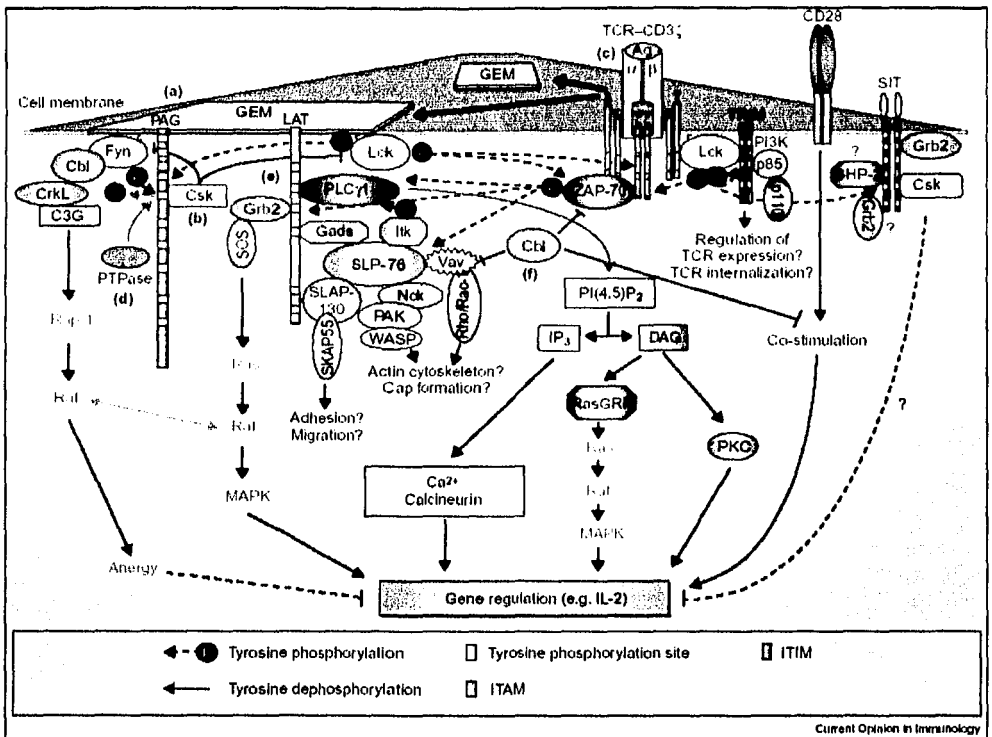


Figura 5. Principales vías de señalización activadas por el reconocimiento del TCR.

Una vez que da el reconocimiento del péptido/MHC por el TCR, diversas cascadas de señalización intracelular son activadas. Todas convergen en núcleo en la activación de genes dependientes de AP-1, NF-AT y NF- κ B como el de IL-2. Tomada de Leo et al, 2001.

Papel de Rafts en la activación del linfocito T

La explicación de cómo los TCRs pueden asociarse a las cinasas de la familia Src para iniciar las cascadas de fosforilación viene de la caracterización de los "rafts". Se postula que las colas saturadas de los esfingolípidos asociados a colesterol existen en una fase líquida ordenada de la membrana celular, separados de la fase líquida desordenada de fosfolípidos. Los "rafts" excluyen a la mayoría de las proteínas membranales pero

concentran proteínas G y proteínas miristiladas como las cinasas de la familia Src, por lo que han sido considerados plataformas para la señalización de receptores celulares. [9, 10]

En células en reposo el TCR se encuentra excluido de los “lipid rafts”; cuando se da el reconocimiento de antígeno por el TCR y se induce oligomerización de receptores, los TCRs se traslocan a los rafts, donde pueden asociarse a las cinasas de la familia Src iniciando las cascadas de señalización intracelular. De manera alternativa, también se ha postulado que la asociación del TCR con moléculas que están constitutivamente asociadas a rafts, como los co-receptores CD4 o CD8, facilitarían la translocación del complejo TCR/CD3 a los “lipid rafts”. [11]

El evento clave en la activación celular es la oligomerización del receptor que le permite adquirir una conformación favorable para su residencia en “rafts” [11]. La oligomerización es dependiente de la afinidad del receptor por el ligando y de la valencia y conformación del ligando; de este modo el inicio de las cascadas de señalización es estrictamente dependiente del ligando. La translocación del TCR a los “rafts” ocurre pocos segundos después del reconocimiento de su ligando.

Los rafts de linfocitos T en reposo concentran selectivamente componentes claves de las vías de activación celular, cuando se da el reconocimiento de antígeno algunos componentes adicionales son reclutados formando el complejo de señalización. (Tabla II). La translocación a “rafts” es selectiva, parece depender de las secuencias transmembranales de las proteínas reclutadas y es independiente de interacciones con el citoesqueleto. Sin embargo, la residencia estable de los receptores en los “rafts” requiere de la iniciación de la señal y la unión del receptor al citoesqueleto de actina [11].

Incluida	Excluida	Reclutada
Lck	CD45	ZAP-70
Fyn		Gads
Itk		SLP-76
Syk		Shc
Ras		Vav
PAG/cbp		Grb-2
Cbl		PLC- γ 1
PI3K (algunas isoformas)		PI3K (algunas isoformas)
LAT		PKC
CD4, CD8		IKK

Tabla II. Proteínas presentes en los “rafts” de linfocitos T en reposo y activados. La tabla muestra las proteínas incluídas en reposo, excluídas y reclutadas al darse el reconocimiento del antígeno por el TCR . (Adaptada de Cherukuri et al, 2001.)

Proteínas adaptadoras

Las moléculas adaptadoras son proteínas con dominios SH2, SH3, PTB de unión a fosfotirosinas (“Phospho-Tyrosine Binding”) y PH (“Pleckstrin Homology”) de unión a lípidos, que carecen de actividad enzimática y sirven como un mecanismo primario para regular el reclutamiento de moléculas efectoras involucradas en las distintas vías de señalización [12].

La función principal de las proteínas adaptadoras es integrar las señales mediadas por el receptor a nivel intracelular, acoplando la transducción de señales del receptor a sistemas efectores intracelulares que organizan la dinámica de unión de las moléculas de señalización. [13]

Las proteínas adaptadoras se pueden clasificar en proteínas citosólicas o membranales. El grupo de proteínas membranales incluye cuatro miembros: LAT, TRIM, SIT y PAG/Cbp; su función es proveer sitios de unión para los dominios SH2 de las moléculas de señalización intracelulares, gracias a la presencia de al menos 32 sitios de tirosina putativos en sus dominios citoplásmicos (6 en LAT, 10 en SIT, 10 en PAG y 6 en TRIM). LAT y PAG residen en los "rafts" y sirven como plataformas para la iniciación de las cascadas de señalización intracelular.

De acuerdo al tipo de regulación que ejerzan, las proteínas adaptadoras se dividen en aquellas con funciones regulatorias positivas como LAT, SLP-76, SLP-65 y Gads entre otras; y aquellas con capacidades regulatorias negativas como PAG, SLAP, Dok y Cbl. Algunas de las proteínas adaptadoras pueden ejercer ambos tipos de regulación dependiendo de su estado de fosforilación, del tipo celular o del compartimento celular en el que se encuentren [12] [14] [15].

La regulación negativa de las adaptadoras es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Existen tres etapas en la regulación negativa que son: el reclutamiento o activación de moléculas regulatorias negativas, la sustitución o reemplazo de otras moléculas regulatorias positivas y la eliminación de componentes esenciales de la maquinaria de señalización.

Las moléculas adaptadoras conocidas a la fecha expresadas en células T, sus posibles interacciones y pesos moleculares se encuentran resumidos en la Tabla III.

Nombre	Peso molecular (kDa)	Interacciones Potenciales	Expresión celular
LAT	36-38	Grb2, Gads, SLP-76, PLC γ 1/2, c-Cbl, PI3K	Células T, NK, células cebadas plaquetas
PAG	75-85	Csk, Fyn	Ubicua
SIT	30-40	SHP-2, Csk	Células B y T
TRIM	29-30	PI3K, CD3 ζ	Células T y NK
3BP2	80	LAT, ZAP-70, Syk, Cbl, Grb2, PLC γ 1	Células B y T
Cbl	120	Grb2, Crk, Syk, ZAP-70 Src-PTKs, Btk, PI3K, Vav	Ubicua
Clnk	54	p92	Células T, NK y células cebadas
CrkL	28, 40, 42	c-Cbl, C3G, Cas	Ubicua
Familia Dok	56, 62	SHIP, RasGAP, SLP-76 LAT, SAP	Ubicua
Familia Gab	97, 115	Grb2, SHP-2, Crkl, p85	Ubicua
Gads	40	LAT, SLP-76, Shc, HPK1	Células T, NK, macrófagos, plaquetas y células cebadas
Grap	28	SOS, LAT, Shc, Sam68	Células B y T
Grb2	28	SOS, LAT, c-Cbl, SLP-76 Shc, Vav, SHP-2, WASP, HPK1	Ubicua
Lnk	75	Lck, CD3 ζ	Células B y T
Nck	47	SLP-76, SLP-65, SOS, PAK, WASP, Cbl	Ubicua
RIBP	45	Itk, Lck, Txk	Células T y NK
SAP	15	SLAM, 2B4, Dok	Células T y NK
Shb	55, 66	Grb2, LAT, PI3K, Eps8, PLC γ 1, CD3 ζ , Src	Ubicua
Shc	46, 52, 66	Grb2, CD3 ζ , Ig α / β , SHIP, ZAP-70, RasGAP	Ubicua
SKAP55	55	SLAP-130, Fyn	Células T y plaquetas

SKAPHOM	55	SLAP-130, Fyn	Ubicua
SLAP	34	ZAP-70, Cbl, SLP-76, Vav, CD3 ζ	Células T y NK
SLAP-130	130	SKAP55, SKAPHOM, Fyn, SLP-76	Células T y mieloides
SLP-76	76	Gads, Itk, SLAP-130, Nck, Vav, c-Cbl	Células T, NK, macrófagos, Plaquetas y células cebadas
TSAd	52	?	Células T

Tabla III. Proteínas adaptadoras en células T. Resumen de las proteínas adaptadoras expresadas en células T, sus blancos de interacción y pesos moleculares. Adaptada de Leo et al, 2001.

PLC γ y Calcio

Como resultado de la activación del TCR, PLC γ es reclutada a la membrana donde es activada por fosforilación en tirosina e inicia el catabolismo de fosfolípidos de membrana y la liberación de segundos mensajeros de fosfoinosítidos que son: inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Mientras que DAG juega un papel importante en la activación de PKC (ver más adelante), IP3 estimula la movilización del calcio de las reservas intracelulares y esto corresponde al incremento de calcio temprano luego de la activación de la célula T. El incremento sostenido de calcio, necesario para inducir la mayoría de las respuestas celulares se mantiene por la entrada capacitativa de calcio extracelular a través de canales específicos de membrana o CRACs (calcium release activated calcium-channels).

El efector mejor caracterizado para la vía de calcio en la activación del linfocito T es la fosfatasa de serina y treonina dependiente de calcio y calmodulina denominada calcineurina. El calcio se une a calmodulina y una vez unidos pueden interactuar con

calcineurina activándola. Los blancos de activación de calcineurina son la familia de factores de transcripción NFAT, compuesta por NFAT1, NFATc, NFAT3 y NFAT4. Todas las isoformas de NFAT se translocan a núcleo en respuesta a señales dependientes de calcio luego de ser defosforiladas por calcineurina y todas comparten la característica de interactuar con el factor de transcripción AP-1, uniéndose cooperativamente al sitio compuesto NFAT/AP-1 que en linfocitos T contiene el promotor del gen de IL-2. Otra enzima activada tras la activación del linfocito T y que también depende de calcio/calmodulina es la cinasa II CaM que parece regular negativamente la transcripción de IL-2, aunque la interacción de esta vía con la de la calmodulina no se ha caracterizado [16].

Vía de PKC

De las 9 isoformas de protein cinasa C o PKC que se expresan en linfocitos T: PKC- α , PKC- β , PKC- γ , PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- μ , PKC- τ/λ , PKC- ζ y PKC- θ ; sólo PKC- θ funciona de una manera específica y esencial en la activación del linfocito T acoplado las cascadas de activación inducidas a través del TCR con la expresión de IL-2. PKC- θ puede regular la actividad del complejo AP-1 independientemente de la vía de JNK, en un paso downstream o abajo de las cascadas de señalización de ERK y JNK/MAPK posiblemente al nivel de la transcripción de c-Fos o c-Jun. También se ha encontrado una relación de PKC- θ con la activación de NF- $\kappa\beta$ a través de la vía del inhibidor de la cinasa de $\kappa\beta$ (IKK) que al fosforilar al regulador negativo de NF- $\kappa\beta$ conocido como I κ B- α y marcarlo para su degradación en proteosoma, libera al factor de transcripción y permite su entrada a núcleo;

esta vía actúa independientemente de la vía clásica de activación de NF- κ B a través de TNFR.

PKC- θ posee varios módulos funcionales que son conservados en las diferentes isoformas de PKC y sirven para su reclutamiento y activación. Estos dominios o módulos incluyen un dominio tipo C2 que interactúa con fosfolípidos de membrana, un dominio de pseudosustrato autoinhibitorio conocido como PS, un dominio C1 de unión a DAG (Diacilglicerol), un cassette de unión a ATP (C3) y un dominio efector de cinasa o C4. Existen otras proteínas regulatorias que pueden asociarse a PKC- θ y regular su localización subcelular, accesibilidad al dominio de cinasa y habilidad de interactuar con proteínas sustrato dentro de las cuales podemos citar a la proteína adaptadora Cbl, al regulador apoptótico BAD, a moesina que conecta con regulación de citoesqueleto y Akt cooperando en la inducción de la activación de NF- κ B y la expresión de IL-2 [17].

Vía de MAPK

MAPKs ("Mitogen-Activated Protein Kinases") son enzimas de transducción de señales específicas de eucariotes que participan en la regulación de diversas respuestas celulares. Las MAPKs funcionan conectando receptores de superficie a proteínas regulatorias; su actividad es regulada por cascadas compuestas de tres moléculas: una MAPK, una MAPK cinasa (MAPKK, MKK o MEK) y una MAPKK cinasa (MAPKKK o MEKK). Estas proteínas pueden activarse por cinasas específicas (tipo STE20) o por pequeñas proteínas de unión a GTP (Ras en linfocitos T) y son inactivadas por fosfatasas de MAPK.

En mamíferos se han descrito por lo menos 4 distintos grupos de MAPKs: ERK-1/2 ("Extracellular Signal-related Kinases"), JNK-1/2/3 ("Jun Amino-terminal Kinases"), p38 α / β / γ / δ y ERK5. Cada tipo de MAPK es activada por MAPKKs específicas, MEK-1/2 activan a ERK-1/2, MKK3/6 a p38, MKK4/7 (JNKK1/2) a JNK1/2 y MEK5 a ERK5. La activación de las MAPKKs puede darse por más de una MAPKKK y cada MAPKKK confiere capacidad de respuesta a diferentes estímulos.

Los sitios fosfoaceptores de todas las MAPKs son serinas o treoninas seguidas por una prolina. La especificidad aumenta tanto por la naturaleza de las secuencias que rodean a los sitios de fosforilación como por la interacción mediada a través de un sitio en la cinasa que reconoce otro distinto en el sustrato. La mayoría de las MAPKs fosforilan factores de transcripción relacionados con la inducción de genes *fos* cuyos productos heterodimerizan con proteínas Jun formando el complejo de activación AP-1. Además de la regulación genética mediada por AP-1, las MAPKs pueden regular la expresión de genes a través de mecanismos post-transcripcionales y al nivel del control traduccional.

Las MAPKs pueden también promover la progresión del ciclo celular, inducir la proliferación, motilidad, muerte y sobrevivencia celular dependiendo del tipo celular y el contexto en el que se activen. Los sustratos que regulan éstos procesos no se han dilucidado por completo y falta definir fisiológicamente aquellos que pudieran ser relevantes en la vía de activación de MAPKs [16] [18].

PI3K y metabolismo de lípidos

PI3K se forma de una subunidad adaptadora p85 y una subunidad catalítica p110; su función es fosforilar el hidroxilo D3 del anillo de inositol generando PI(3)P, PI(3,4)P₂ y/o

PI(3,4,5)P₃. La generación de éstos lípidos activa efectores “dowstream” como Akt/PKB, una proteína que une PIP₃ a través de su dominio de homología a plekstrina PH (de unión a lípidos y regulación de uniones membrana-proteína).

Akt es una cinasa de serina y treonina que fosforila e inactiva el factor proapoptótico BAD, promoviendo así la sobrevivencia celular. La activación mediada de Akt por PI3K, también estimula la activación transcripcional de NF-κβ.

Independientemente de los efectos en Akt, PI3K puede activar a Vav y a miembros de la familia Tec de cinasas de tirosina como Itk, Rlk y Txk, que contienen dominios PH y unen PIP₃. Las cinasas Tec contribuyen a la activación mediada por PI3K de algunas isoformas de PLC-γ, flujo de calcio y activación de MAPKs. [19]

Vía Vav/Rac

Las GTPasas Rho son miembros de la superfamilia de pequeñas proteínas de unión a GTP conocidas como Ras, se activan e inactivan al unir GTP ó GDP respectivamente. Existen tres distintas clases de proteínas que regulan la unión del nucleótido a proteínas de la familia Rho; GEFs (“GTPase Exchanging Factors”) catalizan el intercambio de GDP por GTP en la proteína de unión a GTP activándola. GAPs (“GTPase Activating Proteins”) aceleran la velocidad a la que la GTPasa rompe su GTP a GDP, inactivando a la GTPasa. GDIs (“Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors”) estabilizan la forma unida a GDP de la GTPasa, inhibiendo efectivamente el intercambio de nucleótido y la activación de la GTPasa. La conformación de la GTPasa depende del nucleótido que tenga unido, sólo cuando une GTP la GTPasa puede unir proteínas efectoras y transducir la señal.

Las GTPasas Rho son activadas por receptores de membrana y conectan las señales intracelulares al rearreglo del citoesqueleto; diferentes miembros de la familia Rho ejercen efectos diferentes en la morfología celular. Además de la regulación de citoesqueleto, las proteínas Rho pueden regular otras vías de activación como la de JNK y p38 por Rac y Cdc42; Rac también regula la síntesis de PIP₂ para la producción de IP₃ y DAG durante la transducción de la señal [19].

Vav es un GEF de Rac, es una proteína de 95 kDa que contiene un dominio PH, un dominio de homología con calponina (de unión a actina), un dominio SH2, dos SH3 y un dominio de homología a Dbl conocido como DH que contiene el sitio catalítico de GEF. Vav es fosforilado en tirosina de una manera dependiente de Lck y ZAP-70 luego de una estimulación CD3 y CD28 es translocado al complejo del TCR. SLP-76 y LAT son críticas para el reclutamiento de Vav y a su vez Vav es requerido para el reclutamiento de PKC θ al complejo de señalización del TCR.

WASP ("Wiskott-Aldrich Syndrome Protein") es el principal efector de Cdc42 necesario para la modificación del citoesqueleto de actina. Recientemente se ha demostrado una asociación directa de WASP con el complejo Arp2/3 compuesto por siete subunidades, incluyendo Arp2 ("Actin Related Protein 2") y Arp3. Este complejo es el único mediador conocido que media la nucleación de filamentos de actina, la asociación entre WASP y Arp2/3 provee un mecanismo claro en el que Cdc42 regula la polimerización de actina *de novo* y los cambios morfológicos resultantes [19].

El citoesqueleto de actina en la activación del linfocito T

El citoesqueleto se forma de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios, su función es el mantenimiento de la arquitectura celular. Los filamentos de actina son los responsables del mantenimiento de la forma celular y adhesión, además son requeridos para los cambios morfológicos rápidos en motilidad y juegan un papel importante en división celular.

El citoesqueleto de actina y las moléculas que regula forman parte integral en la transducción de señales a través del TCR. El entrecruzamiento del TCR resulta en un aumento brusco en la polimerización de actina requerida para la señalización intracelular. La polimerización y remodelación de F-actina es necesaria para los cambios en la expresión de receptores de superficie y la organización intracelular de complejos de señalización, como es el reclutamiento de PKC θ por Vav y la recientemente descrita interacción de CD3 ζ con microfilamentos de actina en linfocitos T activados y en reposo.

La capacidad de moléculas como Vav que participan en la señal a través del TCR, es dependiente de su habilidad para la remodelación de actina. Además de regular la formación de los complejos de activación y el reclutamiento de receptores el sitio de contacto entre el linfocito T y la APC, la dinámica de actina regula la transducción de señales al modular la internalización de receptores y el reconocimiento serial de los mismos [19].

Fosfatasa en la regulación negativa de las señales a través del TCR

Dado el papel de las cinasas en la activación del linfocito T, resulta lógico pensar en enzimas que actúen de forma antagónica regulando negativamente dicha activación. Las

fosfatasa pueden actuar en diversos residuos como pueden ser serina/treonina, tirosina e incluso lípidos [20] [21], son tan diversas como las cinasas y pueden servir tanto como elementos de inhibición como de activación de señales de la célula T [16].

Entre las fosfatasa de tirosina (PTPasas) más importantes en la transducción de señales del TCR se encuentran CD45 y SHP-1 (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase). CD45 es un receptor tipo PTPasa altamente expresado en la superficie de células hematopoiéticas. A pesar de posibles diferencias dada la existencia de varias isoformas de CD45 generadas por splicing alternativo de su región extracelular, todas comparten un segmento citoplasmático con dos dominios de PTPasa. A pesar de que no se han identificado ligandos que pudieran ser reconocidos por CD45, se ha demostrado su papel es imprescindible en la activación del linfocito T. La fosfatasa CD45 regula la actividad de las cinasas de la familia Src (fyn, lck) mediante la defosforilación de residuos de tirosina inhibitorios, lo cual permite una conformación activa de la cinasa. Se sabe también que CD45 podría defosforilar los residuos de tirosina presentes en los ITAMs de CD3 ζ en este caso inhibiendo las señales de activación [16] [22].

Por otro lado SHP-1 y su isoforma, SHP-2, funcionan principalmente en la inhibición de señales inducidas por el entrecruzamiento del TCR. Ambas isoformas poseen dos dominios SH2 y un dominio de PTPasa cercanos a su parte amino-terminal. SHP1 es expresada exclusivamente en células hematopoiéticas y se ha demostrado su asociación con Vav, Grb-2 y Sos, además de su capacidad de unir y defosforilar a ZAP-70. SHP-2 se expresa en diversos tipos celulares y en linfocitos T se ha visto que es capaz de asociarse al regulador negativo de la activación de células T, CTLA-4, y ejercer el mismo efecto que SHP1 en ZAP-70 [16] [23].

Multiplicidad de ITAMs en el complejo CD3: ¿Redundancia o especificidad?

El hecho de que existan varias secuencias ITAM en las distintas cadenas del complejo CD3 (Fig.3) ha llevado a la postulación de dos posibles modelos que explicarían la presencia de dichos dominios: uno cuantitativo, en el que la abundancia de ITAMs asegura que la señal iniciada después del entrecruzamiento del receptor sea potenciada ya que, al haber varios ITAMs, la probabilidad de que se puedan activar las diversas vías aumenta. El segundo modelo o cualitativo postula que las diferencias sutiles en las secuencias contenidas en los diferentes ITAMs confieren especificidades únicas a cada cadena que les permiten interactuar exclusivamente con distintas vías de activación. Existen reportes que apoyan ambos modelos como se verá más adelante.

El estudio de la función de las cadenas del complejo CD3 se ha basado en el análisis de ratones deficientes para cada una de estas cadenas, así como mediante la generación de receptores quiméricos que fueron expresados en líneas celulares o bien en ratones transgénicos.

Estudios de ratones deficientes en las distintas cadenas del complejo CD3 indican que éstos participan en los distintos estadios del desarrollo. Los ratones deficientes para CD3 ϵ , CD3 γ , RAG o pT α presentan el mismo fenotipo [4] [24] [25]: el desarrollo de los linfocitos T se detiene al nivel de los timocitos más inmaduros o dobles negativos y este fenotipo puede ser revertido, en el caso de pT α ^{-/-} y RAG^{-/-}, mediante entrecruzamiento con un anticuerpo anti-CD3 ϵ (2C11) [26] o mediante la introducción de una cadena TCR β transgénica rearreglada [27]. Para el caso del ratón deficiente en CD3 ϵ , la reversión puede darse al re-exresar CD3 ϵ según un estudio [24], aunque el nivel de reconstitución varía

dependiendo del TCR que se este analizando [25] [28] [29]. Los fenotipos obtenidos en los ratones deficientes para todas estas moléculas indican que tienen un papel crucial en el “checkpoint” correspondiente a la señalización a través del pre-TCR [4] [30].

Los ratones deficientes para CD3 ζ tienen un bloqueo a nivel de dobles positivas, al igual que los ratones deficientes para CD3 δ , ZAP-70 y lck [4] [25]. El nivel al que ocurre el bloqueo en el desarrollo en estos ratones deficientes depende de la cadena del complejo CD3 que se elimine, lo cual sugiere que cada una de las cadenas tiene una función diferente durante el proceso de maduración y diferenciación del linfocito T en el timo.

El modelo cuantitativo ha sido apoyado principalmente por resultados obtenidos por Love y colaboradores [31] [32]. En estos estudios generaron transgénicos para 0, 1, 2 o 3 ITAMs de la cadena ζ y se utilizaron para reconstituir el fenotipo del ratón CD3 ζ ko. Los resultados demostraron que el número de ITAMs introducido se correlacionaba directamente con el nivel de selección positiva y negativa obtenida en estos ratones, apoyando que el número de ITAMs tiene el papel de amplificar la señal generada a través del TCR. Sin embargo Malissen y colaboradores, utilizando un TCR de mayor afinidad pudieron demostrar que los ITAMs en ζ no son imprescindibles y que el módulo $\delta\gamma\epsilon$ podía en algunos casos sustituir parcialmente la función de ζ [33].

El modelo cualitativo ha sido apoyado por distintos ensayos *in vitro*. Se ha demostrado que las afinidades de los ITAMs de CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ por distintos sustratos varían. Utilizando péptidos formados por los ITAMs bifosforilados, se demostró que todos unen a ZAP-70 con una jerarquía de asociación: $\zeta_1 = \gamma = \delta$ mayor que ζ_3 mayor que $\zeta_2 = \epsilon$. Shc, Grb2 y p85 (PI3K) también se unen a los ITAMs bifosforilados de ζ , γ y δ

[7], aunque estudios recientes indican que CD3 ϵ también puede asociarse a la subunidad p85 de PI3K [34].

Por otro lado, se ha reportado la unión específica de algunas moléculas a las cadenas del complejo CD3 y existen indicios de mecanismos celulares que podrían estar regulados diferencialmente por cada una de ellas. Para el caso de CD3 δ se le ha relacionado con el reclutamiento de ERK al TCR necesario para la selección positiva [35]. En distintos estudios, el módulo CD3 $\gamma\delta\epsilon$ es suficiente para la generación de señales de activación aún en ausencia de CD3 ζ [33] [36]. CD3 γ se ha relacionado con la activación de ERK y la fosforilación de LAT necesarias para la selección positiva de los timocitos [37]. Estudios recientes demuestran que CD3 γ regula la internalización del TCR durante la activación del linfocito T, así como el reciclamiento basal del receptor en la ausencia de estímulos [38] [39] [40] [41]. CD3 ζ se asocia al citoesqueleto como ya se mencionó anteriormente (ver parte de citoesqueleto) y CD3 ϵ se ha descrito como posible regulador de la sobrevivencia celular en un modelo con un TCR transgénico [42]. Entre las proteínas que se sabe puede unir CD3 ϵ se han descrito la molécula adaptadora Nck [43] y CAST [44]. Recientemente se ha demostrado que la interacción de CD3 ϵ con Nck permite un cambio conformacional que es imprescindible para la maduración de la sinapsis inmunológica y la activación del linfocitoT [43].

Los estudios utilizando receptores quiméricos para los distintos componentes del complejo CD3 describieron que las señales generadas al estimular proteínas quiméricas de CD3 ϵ y CD3 ζ son las mismas, puesto que ratones transgénicos para estas dos quimeras fueron capaces de inducir proliferación de linfocitos T maduros, y su entrecruzamiento con anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular (hIL-2r) fue capaz de inducir la

maduración de timocitos DN a DP en un fondo genético deficiente para Rag. Con estos resultados el autor concluyó que tanto CD3 ϵ como CD3 ζ generan señales similares en la activación del TCR [45]. Sin embargo, en otros estudios los patrones de fosforilación generados al estimular quimeras de CD3 ϵ y CD3 ζ fueron cuantitativamente distintos sugiriendo la activación de distintas rutas bioquímicas [46].

Estudios *in vivo* con ratones transgénicos que expresan quimeras de CD3 ζ demuestran que la activación condicional de esta cadena no es suficiente para activar al linfocito T [47] [48] aunque hay datos que indican lo contrario [49] [50]. Las discrepancias entre ambas conclusiones podría deberse a la manera en que fueron construídas las proteínas quiméricas, por lo que falta definir si en realidad estas moléculas participan diferencialmente o no en la diferenciación y activación del linfocito T.

A pesar de que aún existe controversia sobre la función de los ITAMs, estudios recientes de Allen y colaboradores han demostrado que al menos para la cadena ζ , se requiere que todas las tirosinas del ITAM estén fosforiladas para la activación funcional del linfocito T; además, en clonas de linfocitos T se demostró que la fosforilación incompleta de ζ puede inhibir activamente las señales de activación [51]. Por otro lado, estudios recientes indican que la segunda tirosina del ITAM de ϵ es fundamental para las señales generadas a través de esta cadena [52], lo cual sugiere que, al igual que la cadena ζ , podría existir una jerarquía en la fosforilación de las tirosinas de esta cadena, que conllevaría a distintas respuestas funcionales. Sin embargo, la información sobre el papel de los ITAMs de CD3 ϵ es limitada y requiere un estudio mas detallado.

Dimerizadores químicos

El concepto de promover la asociación de proteínas como un mecanismo de regulación ha llevado al diseño de diversos sistemas capaces de inducirla. Muchas proteínas se activan al acercarse o estar en proximidad a la membrana donde interaccionan con proteínas específicas también ahí localizadas.

Algunas moléculas orgánicas de bajo peso molecular que permean las células, han sido utilizadas para inducir la dimerización de dos proteínas blanco; de ahí reciben el nombre de inductores químicos de dimerización o CIDs (Chemical inducer of dimerization). Por analogía a los factores extracelulares de crecimiento o citocinas, los CIDs poseen dos dominios de unión que reconocen módulos de proteínas específicas que han sido fusionados con otras proteínas de interés. La adición de CIDs a células que contienen estas proteínas quiméricas, induce su asociación. La dimerización puede ser rápidamente inhibida al agregar un CID que contenga un solo sitio de unión al ligando y pueda competir con los CIDs de dos dominios de unión. La mayoría de los eventos de regulación dependientes de dimerización pueden ser eficientemente simulados por esta estrategia [53].

El CID más utilizado es FK1012, formado por un dímero de la droga inmunosupresora FK506. FK506 contiene dos dominios de unión, uno de unión a FKBP (FK506 Binding Protein) y otro dominio de unión a calcineurina (a través del cual ejerce su efecto inmunosupresor luego de unirse a FKBP). El dímero FK1012 está formado por dos FK506 fusionados en los dominios de unión a calcineurina por lo que únicamente reconoce a FKBP y no actúa como inmunosupresor [54], [55] (Fig.6). FKBP es una proteína citosólica de 12 kDa muy abundante con actividad de rotamasa (*cis-trans* peptidil

isomerasa) [56], está muy conservada en eucariotes y ha funcionado como blanco de unión a la droga en diversos estudios de dimerización.

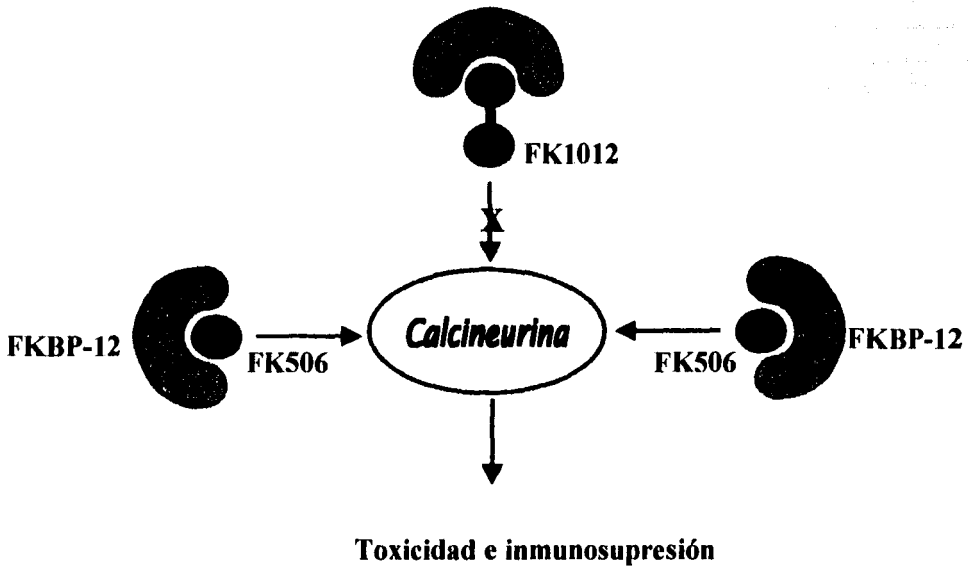


Figura 6. Mecanismo de acción de FK506 y FK1012. Una vez que FK506 ha reconocido a la chaperona FKBP-12 puede unirse e inhibir la acción de calcineurina generando inmunosupresión. El dímero de FK506, FK1012 conserva únicamente los sitios de unión a FKBP-12 por lo que pierde el efecto inmunosupresor.

La primera demostración de la aplicabilidad de FK1012 fue un estudio *in vitro* donde un receptor intracelular artificial que contenía el dominio citoplasmático de la cadena

TCR ζ unido a tres copias de FKBP-12 (expresado en la membrana citoplasmática a través de una señal de miristilación), era activado al adicionar FK1012 iniciando las cascadas de señalización y llevando a la expresión de un gen reportero bajo control de un promotor que contenía sitios de reconocimiento para NFAT [57].

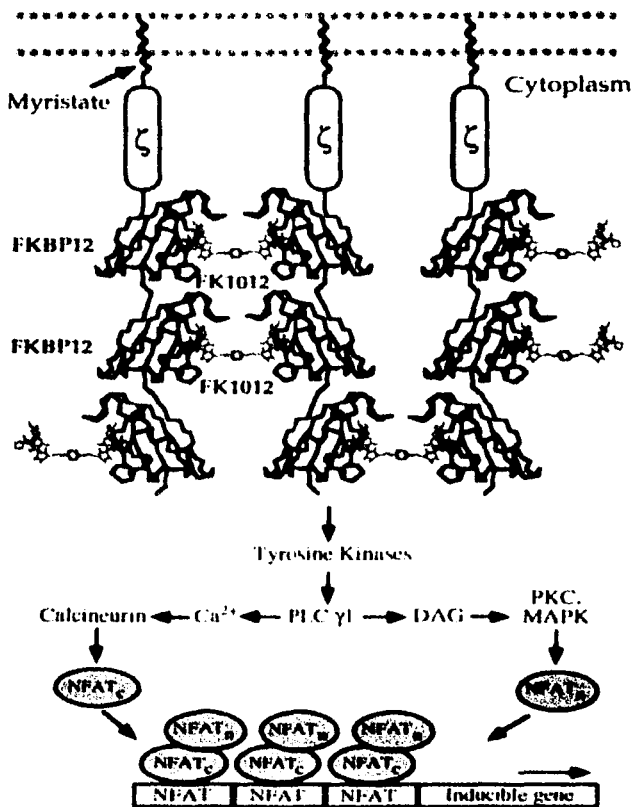
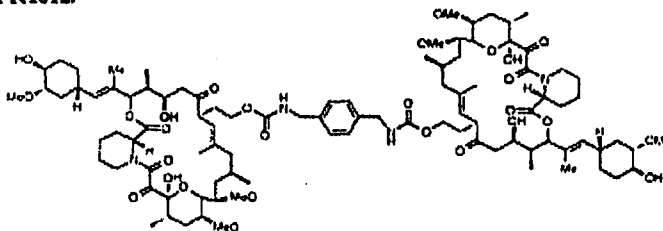


Figura 7. Diseño y actividad de la quimera de CD3 ζ . Primer reporte utilizando el modelo de activación intracelular por CIDs (Spencer, et al, 1993).

El sistema de dimerización del par FK1012-FKBP-12 también ha sido utilizado para investigar el papel de cinasas (familia Src) [58] y moléculas adaptadoras (Sos-Grb2) [59], en la activación linfocitaria, incluyendo la cinasa específica de tirosina ZAP-70 [60]. Recientemente se ha utilizado el sistema de dimerizadores para el estudio de otros receptores *in vitro*, entre los que se encuentran la caspasa Bax [61], el receptor de PDGF [62], el receptor ckit [63] y las beta integrinas [64]. La eficacia de la utilización *in vivo* de dimerizadores químicos para la activación condicional de receptores que transducen señal ha sido recientemente reportada en el estudio de la molécula Fas, cuya activación induce la muerte celular (apoptosis)[65].

En este estudio, utilizamos este sistema de dimerizadores químicos para lograr la activación condicional del receptor quimérico (ver diseño experimental) con un homólogo sintético de FK1012, conocido como AP1510 que presenta mayor actividad [47].. (Ver estructura, Fig 8.)

FK1012:



AP1510:

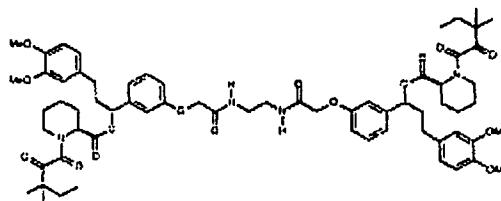


Figura 8. Estructura de las drogas dimerizantes. Estructura del dímero de la droga FK506: FK1012 y su homólogo sintético AP1510.

JUSTIFICACIÓN

Existe gran controversia en cuanto a la contribución individual de cada uno de los componentes del complejo TCR/CD3 en la inducción de las señales de activación y maduración. Nuestros estudios están destinados a investigar si existe una conexión específica de cada una de las cadenas del complejo a distintas vías de señalización intracelular o bien si la multiplicidad de los ITAMs presentes en las distintas cadenas del complejo TCR/CD3 tienen la función de actuar como mecanismo de amplificación de la señal.

En particular estamos interesados en estudiar el papel específico de la cadena CD3 ϵ en la generación de señales de activación del linfocito T mediante un modelo de activación condicional utilizando el sistema de dimerizadores químicos. Estudios previos en nuestro laboratorio analizando el papel de la cadena CD3 ζ con este sistema demostraron que la expresión de la quimera en líneas tumorales de linfocitos T fue capaz de reclutar ZAP-70 a la quimera de ζ así como de inducir la expresión de genes dependientes de NFAT utilizando como gen reportero el gen de la fosfatasa alcalina [47]. Sin embargo, en ratones transgénicos que expresaban la quimera de CD3 ζ en el linaje de linfocitos T, se observó que la señal generada individualmente por CD3 ζ no era capaz de inducir una activación funcional completa de los linfocitos T periféricos ni una diferenciación de timocitos *in vitro*. Los resultados con la quimera de CD3 ζ sugieren que se requiere de otras moléculas del complejo CD3 para una señalización funcional a través de TCR/CD3 *in vivo*. La necesidad de estudiar la señalización a través de otras cadenas del complejo CD3, nos llevó a plantearnos como objetivo la construcción de las quimeras de CD3 ϵ y a su expresión *in vitro*. Los resultados obtenidos aportarán nuevas evidencias del papel individual de la

cadena CD3 ϵ en la inducción de las señales de activación del linfocito T y nos permitirán determinar si existen diferencias con respecto a las generadas por la cadena CD3 ζ . Además, podremos evaluar la importancia de las tirosinas presentes en el ITAM de esta cadena mediante el análisis de las señales de activación generadas al utilizar una cadena CD3 ϵ mutante, donde las tirosinas son substituidas por fenilalaninas.

HIPÓTESIS

La cadena CD3 ϵ tiene un papel diferencial en la transducción de señal durante la activación del linfocito T, por lo que su activación condicional inducirá vías de señalización distintas a las generadas a través de otras cadenas del complejo CD3.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel individual de la cadena CD3 ϵ en la activación del linfocito T.

Objetivos particulares

1. Determinar si la señal inducida al activar condicionalmente la cadena CD3 ϵ es suficiente para activar al linfocito T.
2. Evaluar las señales de activación generadas por la cadena CD3 ϵ y compararlas con las obtenidas por la cadena CD3 ζ .
3. Investigar la importancia de la integridad de las secuencias ITAM presentes en CD3 ϵ en la inducción de señales de activación utilizando una mutante, donde las dos tirosinas están substituidas por fenilalaninas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

Jurkat E6-1. Esta clona fue obtenida de línea celular humana Jurkat-FHCRC, derivada de una leucemia aguda de células T. (ATCC # TIB-152)

Jurkat Tag. Esta línea obtenida mediante transfección de la línea Jurkat E6-1 con el antígeno T grande del virus SV40, fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Stuart Schreiber, Harvard University, MA, USA.

Construcción de las moléculas quiméricas

Todas las quimeras utilizadas en este trabajo conservan las siguientes características (ver Fig.9):

a) El dominio extracelular y transmembranal de hCD2 contenido en las primeras 636 pares de bases del gen de CD2 humano con una mutación puntual que evita el pegado de CD2 con su ligando LFA-3. Proporcionado por la Dra. Barbara Bierer (Dana Farber Cancer Institute, MA, USA).

b) Dominio intracelular de CD3 ϵ silvestre o mutante (con doble substitución de tirosina por fenilalanina en el ITAM) correspondiente a las últimas 165 pb del gen CD3 ϵ murino, o en su caso el dominio intracelular de la molécula CD3 ζ murina contenido en el fragmento de 320pb finales de dicho gen como control positivo [47].

El cDNA para la cadena de CD3 ϵ silvestre o mutante fue donado por la Dra. Marie Malissen (CNRS-INSERM, Université de Marseille-Luminy, France).

- c) Tres copias de la molécula chaperona humana FKBP-12 codificadas en un fragmento de 320pb cada una, unidas al dominio intracelular de CD3 ϵ ó CD3 ζ .
- d) En el extremo carboxilo terminal, el epítoto de hemaglutinina del virus de influenza con la secuencia de aminoácidos: YPYDVPDYA.

Dimerizador: AP1510
Ligando: FKBP-12 ("FK506 binding protein-12")

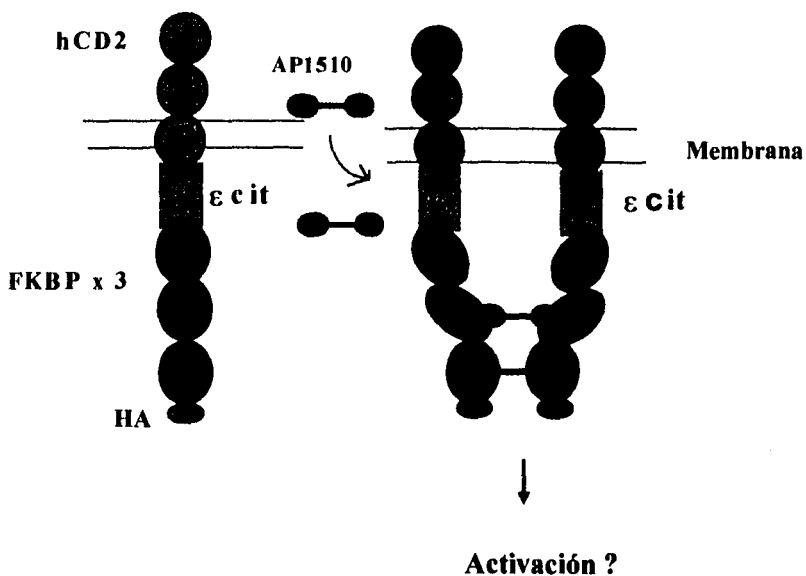


Figura 9. Diseño de las moléculas quiméricas. Todas las quimeras poseen las mismas características, el dominio intracelular varía dependiendo del componente CD3 que contenga. Al añadir la droga, las moléculas que contengan el blanco de unión de la misma (FKBP-12), serán reconocidas y agregadas intracelularmente.

Plásmidos

Los plásmidos que se utilizaron fueron:

-pSK (Bluescript) derivado de pUC19 con 2958 pb usado para clonaciones iniciales.

-pSK: CD3ε con la quimera de CD3ε silvestre insertada en el sitio *EcoRI* del sitio de policlonación, vector de 4686 pb.

-pSK: CD3εYFYF con la quimera de CD3ε mutante (doble sustitución de tirosina por fenilalanina en el ITAM) insertada en el sitio *EcoRI* del sitio de policlonación, vector de 4686 pb.

-pBJ5neo:CD4 derivado de pcD-SRα con 3419 pb conteniendo al gen de resistencia a geneticina en un fragmento de 807 pb y la quimera de CD4(1876 pb) insertada en el sitio *NotI-EcoRI* del sitio de policlonación. Este vector fue utilizado para las construcciones de CD3ε y control.

En los pasos de clonación se utilizó *E.coli* cepa DH5α (Gibco), se usaron 6U/μg de DNA de las enzimas de restricción *EcoRI*, *NotI*, *HindIII*, *SalI*, *XhoI* y *ClaI* (Gibco BRL Grand Island, NY. USA). También se utilizaron 2U, 1U y 1U/μg de DNA de las enzimas DNA polimerasa I fragmento Klenow, T4 DNA ligasa y fosfatasa alcalina de intestino de becerro (CIAP) respectivamente (GIBCO,BRL Grand Island, NY. USA). Del linker *EcoRI* (GIBCO,BRL Grand Island, NY. USA) se utilizaron 2μg/reacción.

Las construcciones se confirmaron al analizar los patrones de digestión generados y por secuenciación utilizando el secuenciador automático (Genetic analyzer, Modelo 310, Applied Biosystems, CA, USA).

Los plásmidos finales que se utilizaron fueron:

- pBJ5neo. Vector de transfección eucarionte que contiene el gen de resistencia a geneticina.
- pBJ5neo:ε. Vector pBJ5neo con el inserto de la quimera de CD3ε silvestre en el sitio *EcoRI* del sitio de policlonación.
- pBJ5neo:εYFYF. Vector pBJ5neo con el fragmento de la quimera de CD3ε con sustituciones puntuales de tirosina por fenilalanina en los nucleótidos 106 y139 del fragmento de 165 pb finales del gen para CD3ε murino; insertado en el sitio *EcoRI* del sitio de policlonación.
- pBJ5neo:ζ. Vector pBJ5neo con la quimera de CD3ζ insertado como fragmento *NotI-EcoRI* en el sitio de policlonación.

Construcción de vectores de transfección

Para la generación de los vectores de transfección en eucariontes de CD3ε y control se digirió el vector pBJ5neo:CD4 con *NotI-EcoRI*, se purificó y se trató con Klenow para hacer los extremos romos, se les insertó un sitio *EcoRI* con el linker *EcoRI*. El nuevo vector se digirió con *EcoRI* para insertar los fragmentos *EcoRI* de 1728 pb (conteniendo a las quimeras) previamente purificados de los vectores pSK: CD3ε y pSK: CD3εYFYF. La construcción control se obtuvo a partir del vector modificado con el linker *EcoRI*, digerido con *EcoRI* y recircularizado.

Transfecciones estables y transitorias

Quince millones de células de la línea tumoral humana Jurkat E6-1 (para transfecciones estables) ó Jurkat Tag (transfecciones transitorias) se resuspendieron en 400µl de RPMI (GIBCO BRL Grand Island, NY. USA) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (SFB, GIBCO BRL Grand Island, NY. USA) y 1% de la solución con glutamina, penicilina y estreptomina (GIBCO BRL Grand Island, NY. USA). Las suspensiones celulares se introdujeron en celdas para electroporación de 4mm (BTX) 5 minutos a temperatura ambiente con 10µg de los plásmidos pBJ5neo:ε, pBJ5neo:εYFYF, pBJ5neo:ζ ó pBJ5neo como control linealizado con la enzima de restricción *Clal* (vectores de CD3ε y control) ó *EcoRI* (en el caso del vector de CD3ζ) para transfecciones estables. En transfecciones transitorias los vectores fueron utilizados en forma circular. Las condiciones de transfección fueron las siguientes; 250 Volts, 800 Ohms y 950µF en el electroporador modelo ECM630 de BTX. Una vez que se dio el pulso en el electroporador, las células se dejaron en recuperación durante 24 horas con 10 ml de RPMI 10% SFB, 1% glutamina, penicilina, estreptavidina y 25mM de Hepes en cajas petri para cultivo celular (Nunc).

Las transfectantes transitorias se utilizaron para experimentos a las 48 h de cultivo y las estables se mantuvieron en medio completo con 1.2mg/ml de geneticina (G-418 GIBCO BRL Grand Island, NY. USA) hasta su uso.

Lisados totales e inmunoprecipitaciones

Diez millones de células fueron lisadas en 100 μ l de buffer de lisis, se incubaron 10 min a 4°C y se centrifugaron 10 min a 13,000 rpm. Se procedió a su análisis por inmunoprecipitación con 30 μ l de proteína G acoplada a agarosa (Invitrogen Corporation, Carlsband, CA, USA) y 2 μ g de anti-CD3 ϵ (M20, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), 2 μ g de anti-CD3 ζ (B610.2 Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), 3 μ g de anti-HA (F7, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) ó 1 μ g anti-HA 12CA5 (ascitis). El inmunoprecipitado se disolvió agregando 200 μ l de buffer de lisis y se incubó toda la noche en agitación a 4°C. Se lavaron 2 veces con 1ml de buffer de lisis y se resuspendieron en 30 μ l del mismo buffer.

Se preparó el gel y se lavaron los pozos con buffer de corrida. Se les agregó a las inmunoprecipitaciones un volumen de buffer de carga y se incubaron 5 min a 100°C. Se cargaron las muestras junto con el marcador de proteínas de alto peso molecular preteñido (p-77085, New England Biolabs, Boston MA, USA); se corrió el gel en cámaras Hoeffler (SE600, Amersham Biosciences, NJ, USA) a 150V hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Se transfirió a membranas de nylon Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) previamente hidratadas (20 seg metanol, 2 min H₂O y 5 min en buffer de transferencia) en cámaras de transferencia semi-seca (Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA) por 1 h a 10 V y se procedió a su análisis por la técnica de western blot.

Western Blot

Para el análisis usando el anticuerpo anti-fosfotirosina, se estimularon 5×10^6 células por condición; las condiciones de estimulación fueron las siguientes: $5 \mu\text{g/ml}$ de anti-hCD2 (TS2.18 proporcionado por la Dra. B. Bierer, Dana Farber Cancer Institute, Boston MA. USA) ó anti-hCD3 (OKT3 donado por el Dr. Saavedra, IIB, UNAM) incubado 10 min a 4°C , mas $10 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón (81-6500 Zymed Laboratories Inc, Sn Fco, CA. USA) 3 min a 37°C , $1 \mu\text{M}$ de AP1510 o FK1012-H2 (Ariad Pharmaceuticals Cambridge, MA. USA) 10 min a 37°C y medio solo como control negativo 10 min a 37°C . Se detuvieron las estimulaciones agregándoles 2 volúmenes de buffer de stop (PBS, 20mM NaF, 1mM Na_3VO_4) a 4°C . Se lisaron como se describió anteriormente y se hizo la electroforesis de proteínas.

Se bloquearon las membranas por aproximadamente 16 h en una solución de TSA, 0.1% Tween y 5% leche ó 5% albúmina (cuando se usó anti-fosfotirosina). Posteriormente estas se incubaron con el anticuerpo primario en TSA, 0.1% Tween 1% leche ó albúmina y $3 \mu\text{g/ml}$ anti-HA 12CA5 (1583816, Roche Alemania), $1 \mu\text{g/ml}$ anti-HA 12CA5 (purificado de ascitis en nuestro laboratorio) ó $1 \mu\text{g/ml}$ anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate Biotechnology) durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Se lavaron 10 min, 5 min y 5 min con TS (sin NaN_3) a TA. Se trató con el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ. USA) a una dilución 1/2000 en TS por 30 min. Se lavó 10, 5, 5 y 5 min con TS y las bandas fueron inmunodetectadas por ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ. USA) y expuestas en placas de quimioluminiscencia Kodak.(Biomax MR, Sigma Aldrich. St. Louis, MO. USA).

Las membranas que fueron analizadas con blot anti-fosfotirosina, se les trató con buffer de stripping 30 min a 65°C y se les hizo blot anti-HA.

Ensayos de fosfatasa alcalina secretada (SEAP)

1.5 x 10⁷ células Jurkat Tag se resuspendieron en 400µl de RPMI suplementado con 10% SFB y 1% de la solución con glutamina, penicilina y estreptomina. Se incubaron 5 min a TA en celdas de electroporación de 4mm (BTX GENETRONICS, INC) con 5µg del vector con la quimera y 5µg del vector reportero con el gen de fosfatasa alcalina precedido por el promotor de NFAT. Se incubaron 24 horas en cajas petri para cultivo celular (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) en 10 ml de RPMI suplementado con 10% SFB inactivado, 1% glutamina, penicilina, estreptavidina y 25mM de Hepes. Se contaron las células y se resuspendieron en el mismo medio suplementado a 6.5 x 10⁵ células/ml, se pasaron a placas de 96 pozos (Costar, Corning incorporated, NY, USA) colocándose 100µl por pozo. A cada pozo con células se les agregaron otros 100µl de medio más el anticuerpo hCD2- biotina (TS218) a 5µg/ml se incubaron 10 min a 4°C y se adicionó el entrecruzante secundario estreptavidina (21122, Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA) a 10µg/ml, medio con droga (FK1012 o AP1510 a 1mM), medio con 10ng/ml PMA (P-148, Sigma St.Louis Missouri, USA) + 1µg/ml de ionomicina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) o medio solo como control negativo de activación. La estimulación con anti-hCD3 (OKT3) se hizo con el anticuerpo previamente pegado a la placa por lo que únicamente se agregó medio solo a los pozos que lo contenían (ver mas adelante), se incubaron a 37°C toda la noche.

Se incubaron las placas 2 h a 70°C para inactivar las fosfatasas endógenas, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm y se tomaron 100µl de cada pozo para pasarlos a placas nuevas. Se les agregaron 100µl de 4-metilumbiferilfosfato (M-3168 Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA) como sustrato para la fosfatasa alcalina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se midió la fluorescencia generada por la degradación del sustrato tras la acción de la enzima (fosfatasa alcalina) en el FluoroScan Ascent (Termo Electron Corp, Waltham, MA. USA) con filtros de 335nm (excitación) y 460 (emisión) y los datos se graficaron como unidades de fluorescencia relativa en Excel.

Activación de linfocitos T *in vitro*

Se resuspendió el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-Ig de ratón) en buffer de carbonatos (ver apéndice) a 5µg/ml. Se colocaron 100µl por pozo y se incubó por 1 h a 37°C. Se recuperó el anticuerpo y los pozos se lavaron con 100µl de PBS estéril 2 veces. Se resuspendió el anticuerpo primario (OKT3) a una concentración de 5µg/ml en PBS, se pusieron 100µl por pozo y se incubaron las placas 1h a 37°C. Se recuperó el anticuerpo y los pozos se lavaron con 200µl de PBS. Se dejaron en 100µl de PBS a 4 °C hasta su uso (hasta 2 semanas).

Ensayo de flujo de Calcio

Se pesaron 0.0250g de ácido plurónico (P-6867 Molecular Probes, Oregon. USA) y se resuspendieron en 5 ml de RPMI 1640, suplementado con 2% SFB, se incubó a 37°C hasta disolverse. Se resuspendieron los viales de 50µg de Fura-Red y Fluo-3 (F-3021 y F-

1242 Molecular Probes, Oregon. USA) en 50µl de DMSO estéril y se guardaron a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se adicionaron los fluoróforos al medio con plurónico para obtener una concentración final de 6µg/ml de Fluo-3 y 10µg/ml de Fura-Red. Se tomaron 1×10^7 células y se resuspendieron en 1 ml de RPMI 2% SFB, se mezclaron 1:1 con la solución de fluoróforos quedando a 5×10^6 células/ml. Se incubaron 45 min a 37°C agitando suavemente cada 10 min. Se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y lavaron 2 veces con 1 ml de RPMI 2% SFB, se resuspendieron en 2 ml para incubar en oscuridad 45 min a temperatura ambiente con agitaciones cada 10 min. Se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se lavaron 2 veces con 1 ml RPMI sin SFB. Se resuspendieron en 2 ml RPMI y se utilizaron 300µl para cada estimulación mas 700µl de RPMI . Las condiciones de estimulación fueron las siguientes: 5µg/ml de anti-hCD2 biotina (TS218) ó anti-hCD3 (OKT3) mas 10 µg/ml estreptavidina para el caso de CD2, 1µM de AP1510 o FK1012 y como control positivo ionomicina (5µg/ml). Las células estimuladas fueron analizadas en un citómetro de flujo FACsCalibur, utilizando el software CellQuest. El flujo de calcio fue calculado y presentado como relación FL17FL3 usando el programa FACsAssistant (Becton and Dickinson), los datos se analizaron y se hicieron las gráficas en Excel.

RESULTADOS

Expresión en líneas estables y transitorias

Inicialmente se transfectaron las quimeras de CD3 ϵ silvestre, CD3 ϵ YFYF, y CD3 ζ transitoriamente utilizando la línea tumoral Jurkat Tag. La expresión se evaluó a las 48 h después de la transfección mediante inmunoprecipitación de los lisados totales con anticuerpos anti HA (F7) seguido de western blot con otro anticuerpo anti-HA (12CA5). Debido a que el nivel de expresión en las líneas transitorias fue muy bajo, se decidió obtener líneas estables. Para ello se transfectaron células Jurkat E6-1 con los diferentes vectores lineales y se mantuvieron en presencia de geneticina (1.2 mg/ml). Los niveles de expresión en líneas estables fue mayor al obtenido en transfectantes transitorias de la línea E6-1 y por esa razón se decidió continuar haciendo los experimentos con ellas (Fig 10).

Debido a que el anticuerpo anti-HA presentó reactividad cruzada con otras moléculas, se decidió utilizar anticuerpos específicos para ϵ y ζ . Las inmunoprecipitaciones de la quimera de CD3 ϵ silvestre con el anticuerpo anti-mCD3 ϵ (M20) seguidas de western blot con el anticuerpo anti-HA 12CA5 permitió detectar esta quimera. Sin embargo no fue posible detectar la expresión de la quimera CD3 ϵ YFYF con este mismo anticuerpo (Fig 11a.). Cuando se utilizó el anticuerpo para CD3 ζ (6B10.2) éste fue capaz de reconocer a la quimera de ζ expresada establemente en una línea celular murina (Clona 2 derivada de By155.18:CD3 ζ) generada en nuestro laboratorio para estudios previos, pero no a la quimera expresada en nuestras nuevas líneas estables. (Fig 11b)

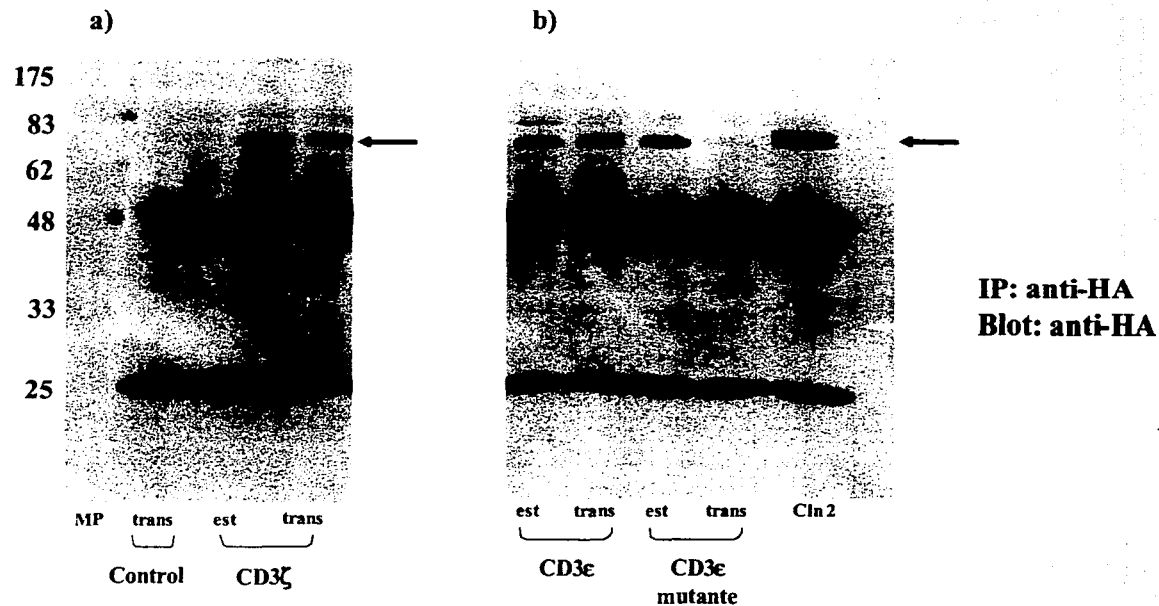


Figura 10. Expresión de quimeras en líneas estables y transitorias. Se hicieron inmunoprecipitaciones con anti-HA (F7) a partir de lisados totales de células Jurkat E6-1 transfectadas estable y transitoriamente con las distintas quimeras. Se hizo un western blot anti-HA (Roche). a) Expresión en la línea E6-1 control y de la quimera de CD3 ζ , b) Expresión de las quimeras de CD3 ϵ , CD3 ϵ mutante en la línea E6-1 y como control positivo la quimera de CD3 ζ expresada establemente en la clona 2 de línea By155.18. MP: Marcador de peso molecular (kDa); trans: líneas transitorias; est: líneas estables. La flecha en ambas figuras indica la posición de las moléculas quiméricas.

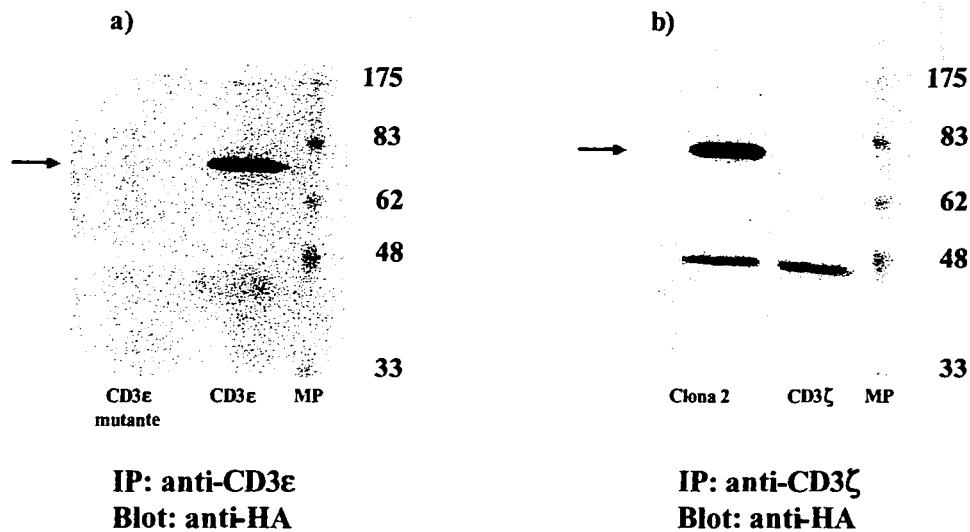


Figura 11. Detección de quimeras con anticuerpos específicos para las secuencias CD3. a) Se hicieron inmunoprecipitaciones con un anticuerpo anti-CD3ε de las líneas Jurkat E6-1 que expresaban establemente a las quimeras de CD3ε silvestre y mutante. b) Inmunoprecipitaciones con anti-CD3ζ de la línea estable en E6-1 para la quimera de CD3ζ, se comparó con la clona estable para CD3ζ en la línea By155.18 (Clona 2). MP: Marcador de peso molecular (KDa), las flechas indican la posición de las quimeras. El western Blot para ambos casos se hizo con el anticuerpo anti-HA.

Una vez que se obtuvo la expresión de las quimeras en líneas estables, se hizo clonación por dilución en placas de 96 pozos con inóculos de 0.3 células/pozo. Se lograron obtener 3 clonas control con el vector vacío, 4 clonas para la quimera de ζ , 3 para la quimera de ϵ silvestre y 19 clonas para la quimera de ϵ mutante. Se analizó la expresión de cada una de ellas y se seleccionó la clona que más expresara de cada una de ellas. Las clonas seleccionadas fueron: C1 (control), Z4 (quimera de ζ), E2 (quimera de ϵ silvestre) y EYF7 (quimera de ϵ mutante) (Fig 12).

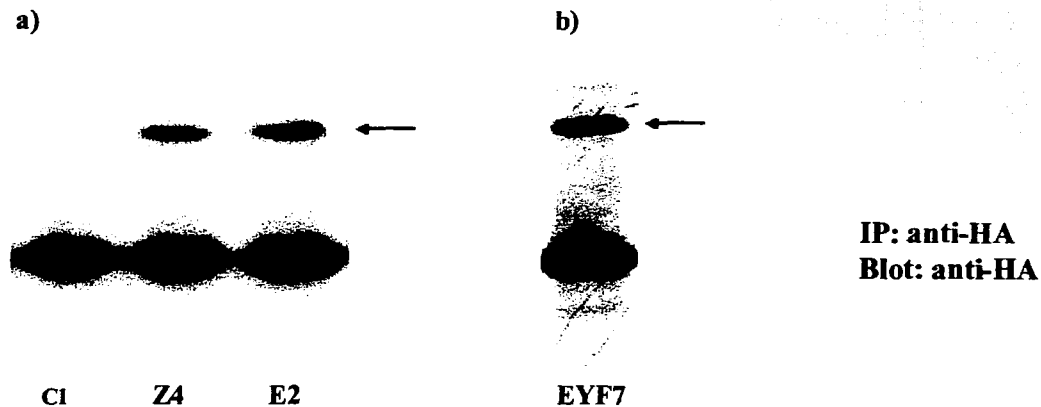


Figura 12. Expresión de las quimeras en clones estables de la línea Jurkat E6-1. Las clones seleccionadas a partir de las líneas estables en E6-1 para cada una de las quimeras fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-HA (F7), posteriormente se hizo un western blot anti-HA (12CA5 Roche). a) Clonas control, CD3 ζ y CD3 ϵ (C1, Z4 y E2 respectivamente). b) Clona CD3 ϵ mutante (EYF7). Las flechas indican la posición de las distintas quimeras.

Fosforilación de las proteínas quiméricas

Se utilizaron las líneas estables en E6-1 en "starving" (24 h en RPMI 0,5% SFB) para disminuir el nivel de fosforilación basal previo a las estimulaciones (ver materiales y métodos). Los lisados totales obtenidos de células sin estimular o estimuladas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA (F7) para posteriormente realizar un western blot con el anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10). Como se observa en la figura 13, las líneas estables para las quimeras de ζ y ϵ silvestre se fosforilaron al estimularlas con anti-CD2 y AP1510. Lo anterior demuestra que es posible generar la fosforilación específica de las quimeras al entrecruzarlas intra y extracelularmente. Como se esperaba, el control con anticuerpos anti-CD3 demostró que el entrecruzamiento del complejo CD3 endógeno no induce fosforilación de nuestra quimera. Por otra parte la quimera de ϵ mutante, como era esperado no se fosforiló bajo ninguna condición de estimulación (Fig 13). Inesperadamente, en las líneas E6 control y CD3 ϵ mutante se detectó una banda que mostró reacción cruzada y que correspondía a una proteína fosforilada que se inmunoprecipita sólo en las estimulaciones de estas líneas con anti-hCD3. Hasta el momento desconocemos la identidad de esta proteína,

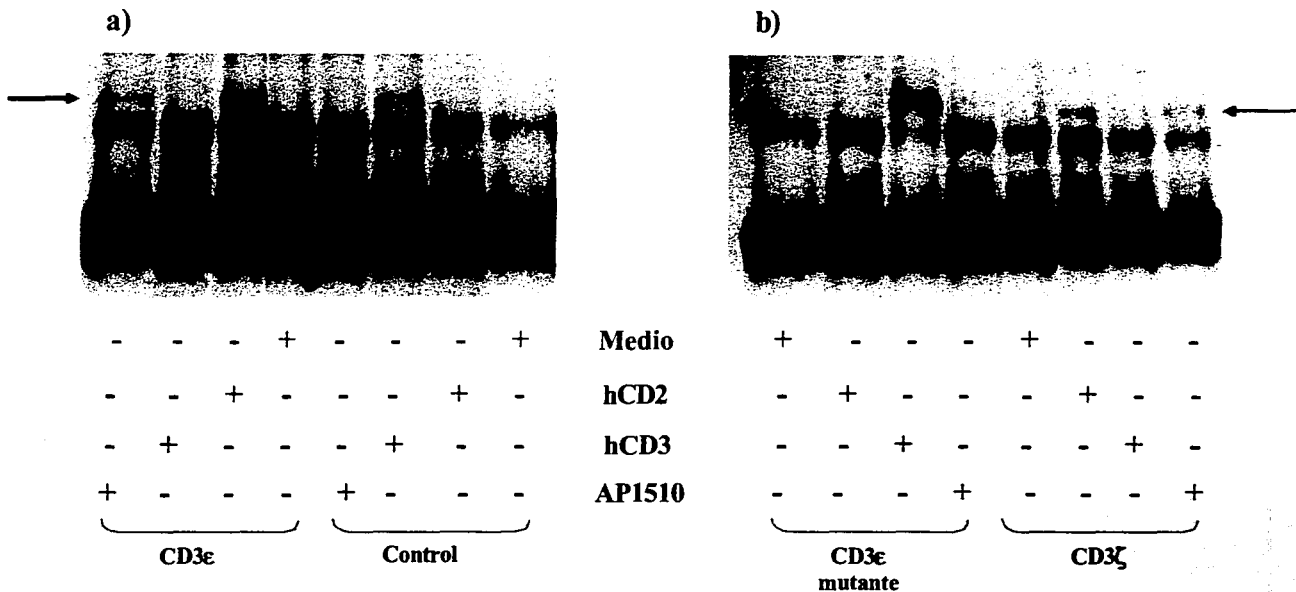


Figura 13. Fosforilación específica de las quimeras de CD3ε y CD3ζ. Estimulaciones con medio solo, h-CD2, h-CD3 y AP1510 de las líneas estables en E6-1 para las diferentes quimeras fueron realizadas. Se hizo la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA (F7) seguido de un blot anti-PY (4G10). a) Estimulaciones de la quimera de CD3ε y control. b) Estimulaciones de la quimera de CD3ε mutante y CD3ζ. Las flechas indican la posición en que se encuentran las quimeras.

Expresión y activación de fosfatasa alcalina

Un ensayo indirecto que permite analizar la activación de vías de señalización que conducen a la inducción de la expresión de genes tempranos, es medir la actividad de NFAT sobre un gen reportero que en nuestro caso se trató de fosfatasa alcalina. El ensayo que llevamos a cabo consistió en cuantificar la actividad de fosfatasa alcalina secretada al medio por las células estimuladas con distintas condiciones.

Se compararon los niveles de actividad de fosfatasa alcalina obtenidos al transfectar 5 μ g del vector reportero en células Jurkat E6-1 y Tag. Los valores obtenidos con E6-1 fueron casi tres veces menores a los obtenidos con Jurkat Tag al estimular las líneas a diferentes concentraciones de PMA + ionomicina (Fig 14); se determinó que la concentración ideal de activación eran 10 ng/ml de PMA y 1 μ g/ml de ionomicina. Lo anterior se explica por la presencia del antígeno T del virus SV40 en las células Jurkat Tag que se puede unir a la región SV40 ori, presente en el vector conteniendo al gen reportero. Una vez que se determinó la línea celular que se iba a utilizar, se probaron distintas concentraciones de DNA. Se detectó un ligero efecto inhibitorio de la actividad del reportero cuando aumentamos la concentración del vector hasta 10 μ g (Fig 15). Cuando se hicieron las co-transfecciones del vector reportero con los vectores que contenían a las quimeras (que también contienen la región SV40 ori), se determinó que la concentración ideal para cada uno de los plásmidos sin que la señal disminuyera eran 5 μ g de cada vector. Se realizaron co-transfecciones del vector reportero con los vectores que contenían a las quimeras. Como se observa en la figura 16, se detectó un ligero aumento en la actividad de fosfatasa alcalina de la línea que co-expresaba la quimera de CD3 ζ después de la estimulación con FK1012 y anti-CD2.

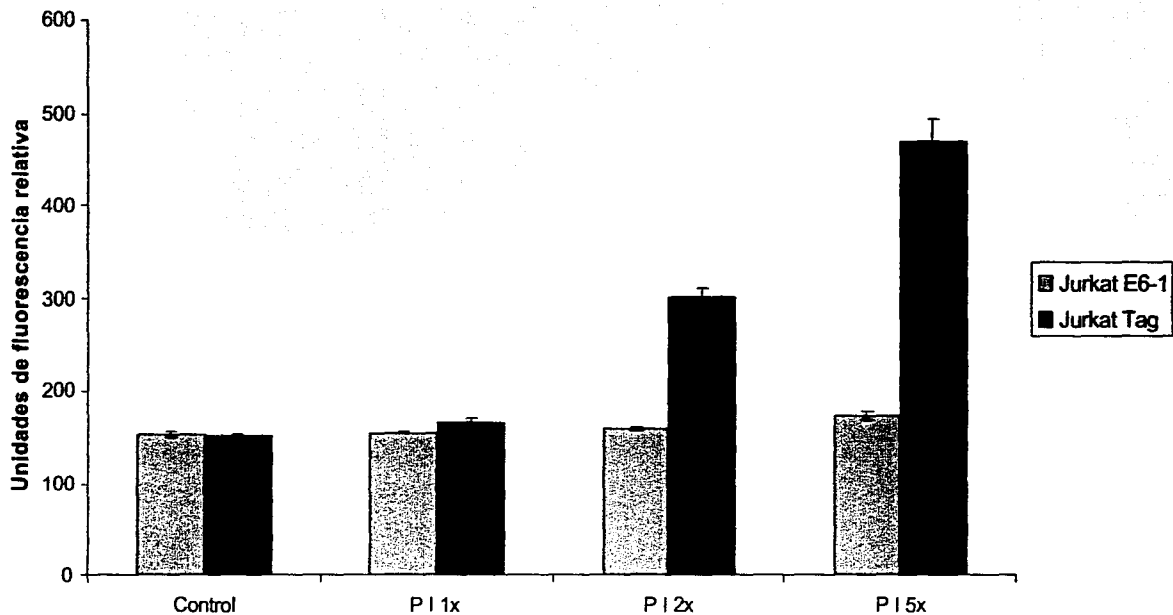


Figura 14. Determinación de la línea celular para el ensayo de fosfatasa alcalina. Se utilizaron las líneas Jurkat Tag y E6-1 para los ensayos de fosfatasa alcalina. Se probaron distintas concentraciones de PMA + ionomicina y un control con medio solo como control negativo_P1 1X (50 ng/ml PMA + 1µg/ml ionomicina), P12X (100 ng/ml PMA + 2 µg/ml ionomicina), P15X (250 ng/ml PMA + 5 µg/ml ionomicina). La actividad de fosfatasa alcalina secretada en el medio se midió en un fluorómetro y se expresa como unidades de fluorescencia relativa obtenida a 335 nm de excitación y 460 nm de emisión. Se grafican los promedios y desviaciones estándar de 6 repeticiones para cada una de las condiciones de estimulación.

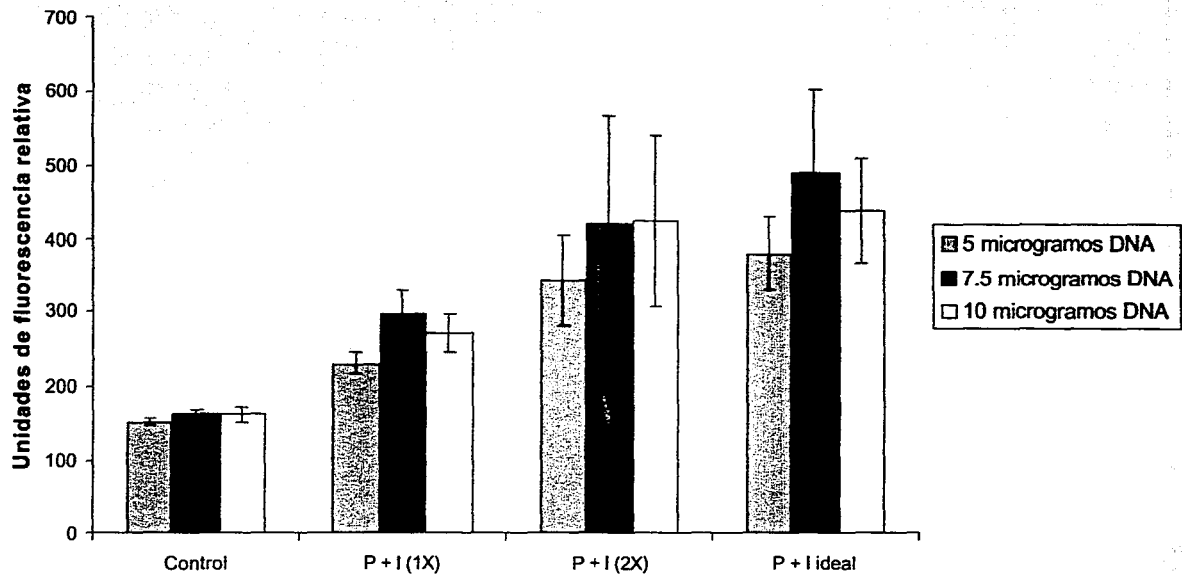


Figura 15. Efecto de la concentración de DNA en la actividad de fosfatasa alcalina. Se transfectaron células Jurkat Tag con distintas concentraciones del vector reportero que contenía a la fosfatasa alcalina. A las 48 h se estimularon con distintas concentraciones de PMA + inomicina (ver figura 14). La concentración ideal corresponde a 50 ng/ml de PMA + 5 μ g/ml de inomicina. Se grafican promedios y desviaciones estándar de 4 repeticiones para cada condición.

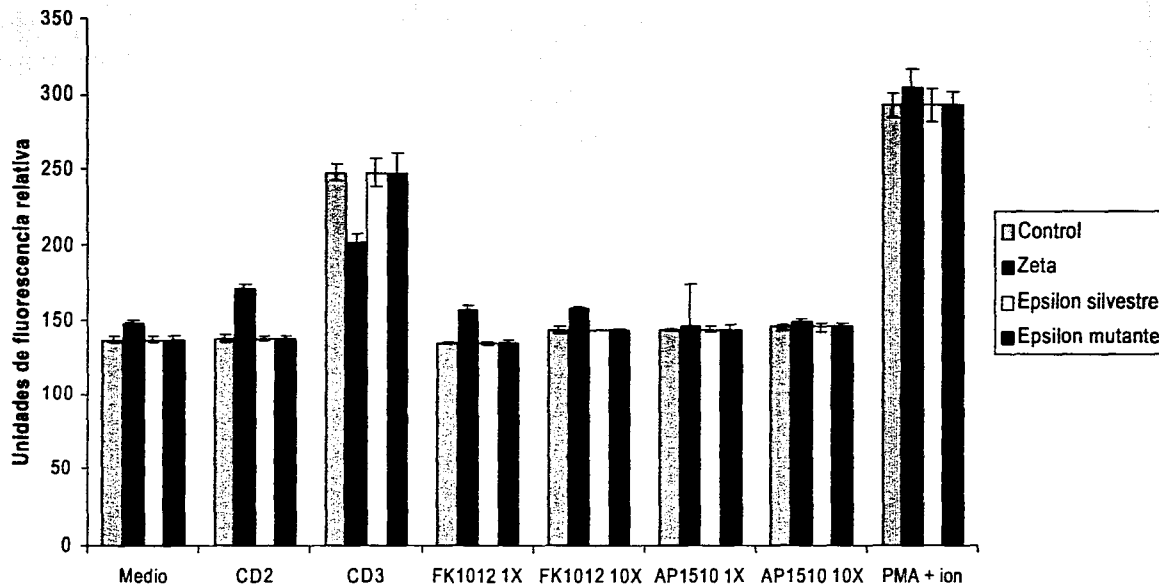


Figura 16. Ensayo de fosfatasa alcalina en líneas transitorias para las distintas quimeras. Se cotransfectaron los vectores que contenían a las quimeras junto con el vector reportero (que contenía el gen de fosfatasa alcalina) y se midió la actividad de fosfatasa alcalina generada luego de distintas condiciones de estimulación. Las concentraciones 1X y 10X de la droga corresponden a 1 y 10 μ M; la concentración de PMA + ionomicina es la que resultó ideal para el ensayo (ver figura 15). Se graficaron promedios y desviaciones estándar de triplicados para cada condición.

Para lograr incrementar la señal de activación se generaron líneas estables de Jurkat Tag conteniendo las quimeras de ζ , ϵ silvestre y ϵ mutante, respectivamente. Los resultados en las líneas estables Jurkat Tag demostraron que, tanto la quimera de ζ como la de ϵ silvestre, inducen una mayor actividad de fosfatasa alcalina al entrecruzarlas extracelular e intracelularmente con anti-hCD2 y con la droga AP1510 respectivamente. Sin embargo, no se logró inducir un incremento en la secreción de fosfatasa alcalina en ningunas de las estimulaciones de las líneas estables para la quimera de ϵ mutante ni en la línea control, transfectada con el plásmido vacío. En estas líneas sólo se logró detectar actividad del gen reportero con los controles de activación anti-hCD3 y PMA + ionomicina. (Fig 17)

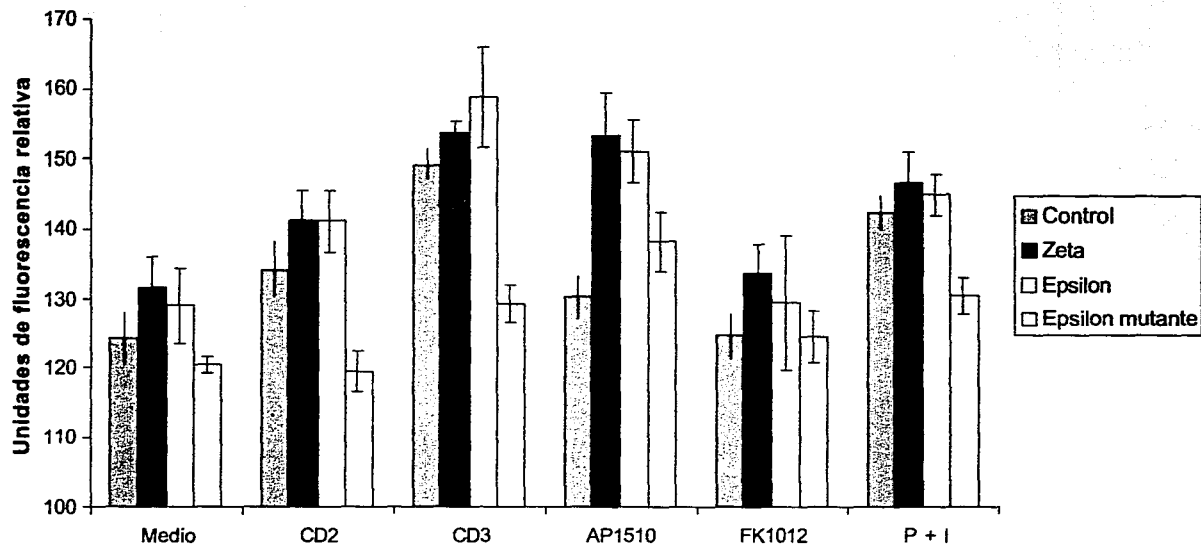


Figura 17. Ensayo de fosfatasa alcalina en líneas estables para las distintas quimeras. Se transfectoron las líneas estables en Jurkat Tag control, CD3 ζ , CD3 ϵ y CD3 ϵ mutante con el vector que contenía la fosfatasa alcalina. Se probaron distintas condiciones de estimulación. Se grafican promedios y desviaciones estándar de triplicados para cada condición.

Flujos de calcio en líneas y clonas estables

Otro de los ensayos que se llevan a cabo para analizar la activación de los linfocitos T es el flujo de calcio intracitoplasmático. La activación de la fosfolipasa C gamma, permite la generación de IP3 y éste induce la apertura de canales en el retículo endoplásmico. Como consecuencia el nivel de calcio intracitoplasmático se eleva, y así mismo se abren canales dependientes de calcio (CRAC) en la membrana plasmática permitiendo un flujo de calcio desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Este incremento de calcio puede detectarse gracias a fluoróforos sensibles a calcio (ver figura 18). Los ensayos de liberación de calcio intracelular se llevaron a cabo mediante la estimulación de células marcadas con Fluo 3 y Fura Red, y estimuladas con dimerizadores o con anticuerpos anti CD2 ó anti CD3. Como se muestra en la figura 19 se observó un flujo de calcio después de la estimulación con anti-hCD2 en las líneas estables para las quimeras de ζ y ϵ silvestre mayores al control (con el vector vacío). La línea que expresaba la quimera de ϵ mutante claramente genera un flujo menor al generado en las líneas de ζ y ϵ silvestre (Fig 20). Posteriormente, cuando analizamos las clonas de dichas líneas, los resultados obtenidos demostraron que el entrecruzamiento extracelular con anti-hCD2 (Figura 21) y en menor grado (intracelular) con AP1510 (Figura 22) de las quimeras de ζ y ϵ silvestre en clonas estables generó flujos de calcio con naturaleza y características distintas entre sí al igual que el entrecruzamiento con anti-CD3 (figura 23), las clonas control y con la quimera de ϵ mutante produjeron flujos al entrecruzarse extracelularmente con anti-hCD2 y anti-hCD3 pero no con AP1510 (comparar flujos inducidos en las figuras 21, 22 y 23). La estimulación de la clona de ζ con anti-CD2 genera un flujo sostenido parecido al del control pero de mayor intensidad, el flujo generado por la misma

estimulación es menos sostenido en la ϵ mutante que en la silvestre y ambos flujos son menos sostenidos comparados con los de la quimera de ζ y el control (Fig 21). El entrecruzamiento de las clonas estables con anti-hCD3 también fue distinto dependiendo de la clona que se estimulara; la clona estable de la quimera de ζ y el control presentaron flujos sostenidos, por otra parte las clonas de ϵ (silvestre y mutante) tenían flujos elevados al principio pero disminuían rápidamente especialmente la clona que expresaba a la quimera de ϵ mutante (Fig 23). Como se observa en las figuras 21 y 23 el entrecruzamiento con anti-CD2 y anti-CD3 de la mutante de ϵ presentó características cualitativamente distintas al control y a las otras quimeras. En todos los casos se hizo el control positivo de liberación de calcio intracelular inducido al adicionar ionomicina (Fig. 24)

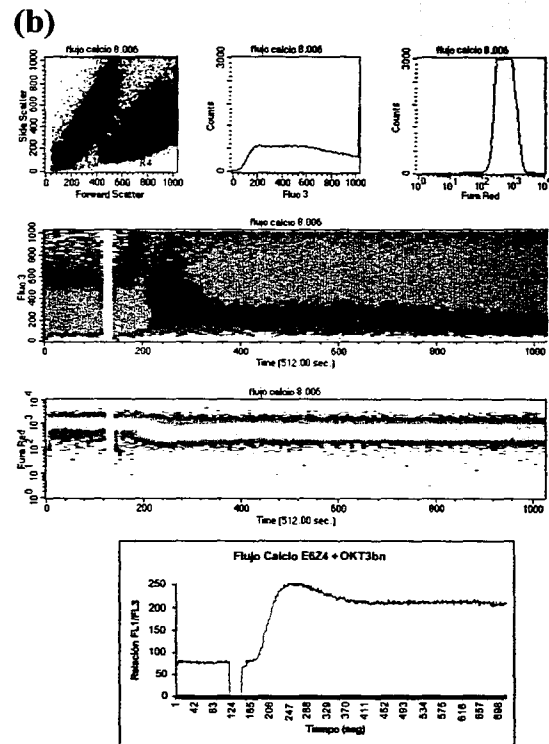
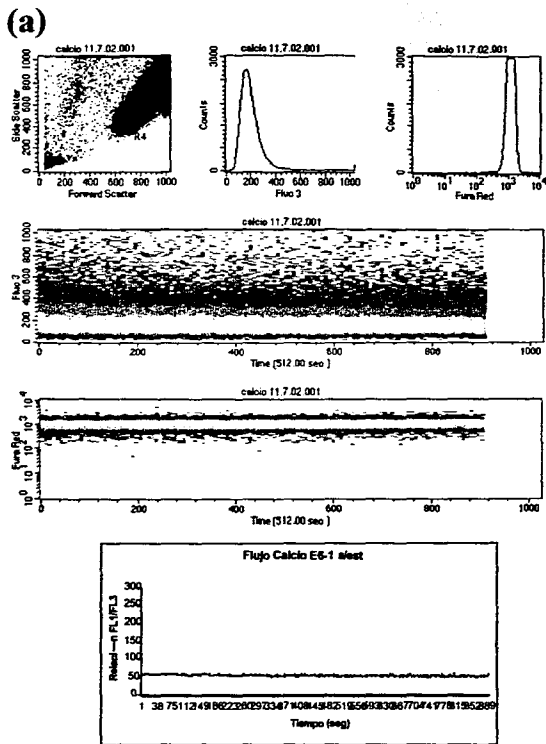


Figura 18. Descripción del análisis del flujo de calcio. Las células son tenidas con dos fluoróforos, Fura Red y FLuo3. Estos colorantes modifican su fluorescencia en presencia de calcio. La variación en la fluorescencia de estas moléculas nos permite identificar la liberación de calcio al citoplasma de las células teñidas como consecuencia de un estímulo. Para generar las gráficas de flujo de calcio (abajo), se utiliza el programa FACS Assistant para transformar los archivos a un formato que pueda ser graficado por Excel. a) Células sin estimular; al no haber estímulo no hay liberación de calcio por lo que la fluorescencia no presenta ningún cambio. b) Células estimuladas con un anticuerpo anti-CD3 que al entrecruzar el complejo CD3, induce la liberación de calcio intracelular y por lo tanto cambios en la fluorescencia de los fluoróforos.

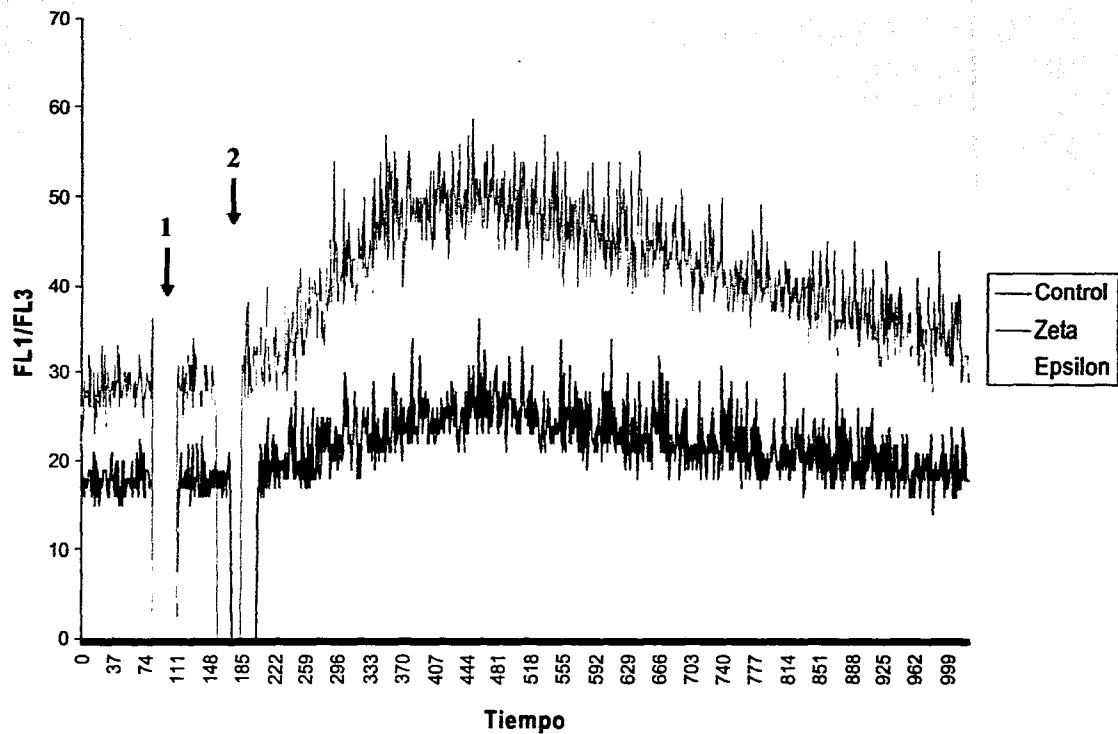


Figura 19. Análisis de la liberación de calcio intracelular en líneas estables en E6-1. Se analizó la inducción de flujos de calcio generados luego del entrecruzamiento de las líneas estables control, CD3 ζ y CD3 ϵ con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el anticuerpo anti-hCD2biotina (1) + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptavidina (2).

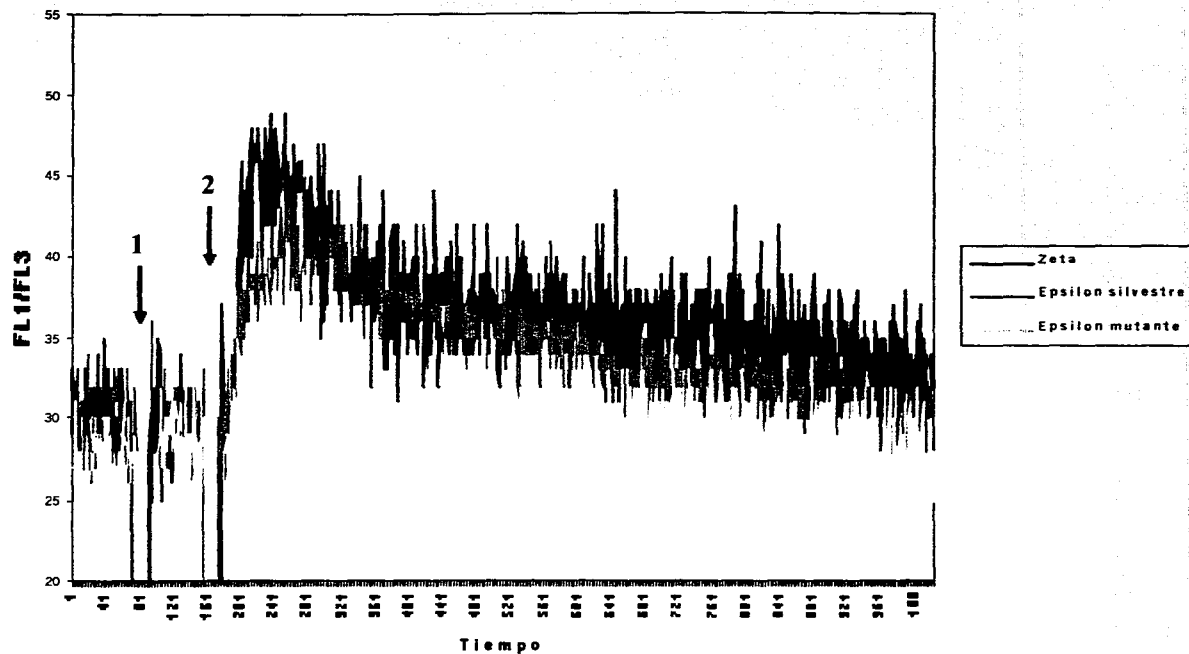


Figura 20. Mobilización de calcio intracelular en las líneas estables en E6-1 para las distintas quimeras. Se realizaron ensayos de liberación de calcio intracelular de las líneas estables para CD3 ζ , CD3 ϵ y CD3 ϵ mutante inducidos luego del entrecruzamiento con anti-hCD2 biotina (1) + estreptavidina (2). Como se observa, la línea que expresa la quimera de CD3 ϵ mutante no responde al entrecruzamiento extracelular por hCD2.

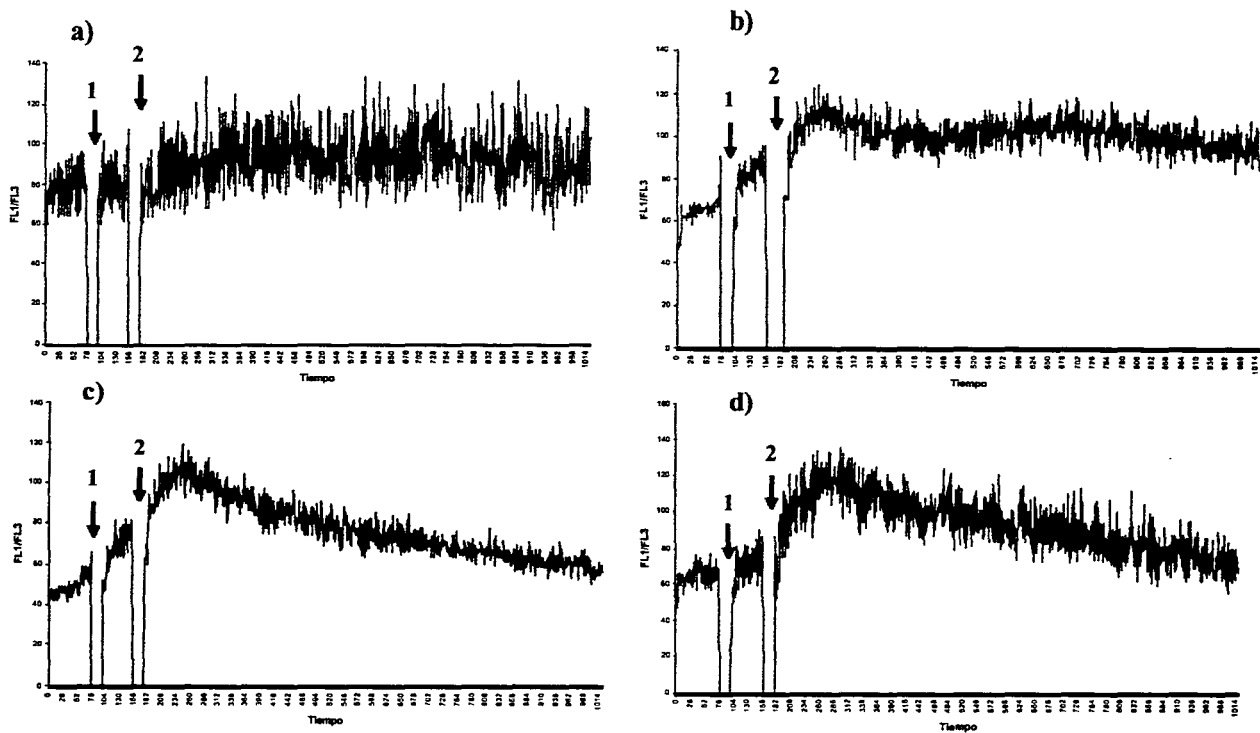


Figura 21. Liberación de flujo de calcio intracelular en clonas estables por entrecruzamiento con anti-CD2. Se estimularon las clonas para las distintas quimeras con el anticuerpo contra hCD2 biotinilado (1) seguido por un entrecruzamiento secundario con estreptavidina (2). a)Clona control, b) Clona estable de CD3 ζ , c)Clona estable de CD3 ϵ y d)Clona estable de CD3 ϵ mutante.

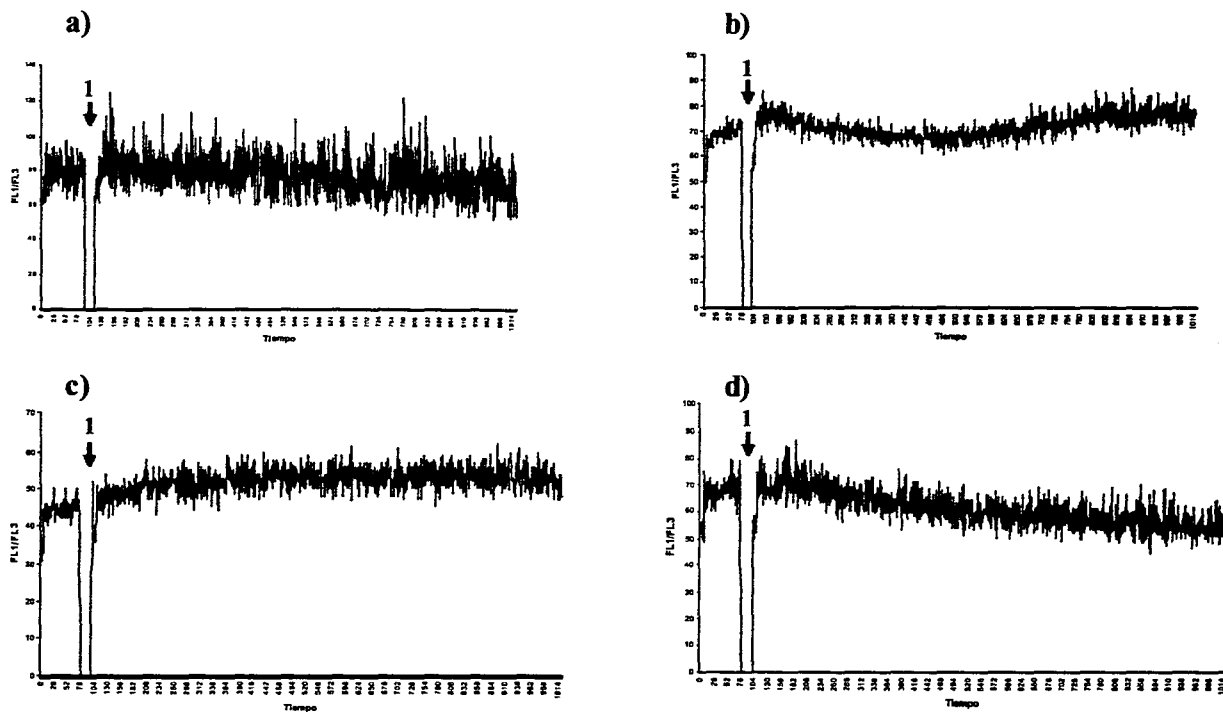


Figura 22. Ensayo de liberación de calcio intracelular en clonas estables por estimulación con droga. Se hicieron estimulaciones con $1\mu\text{M}$ de AP1510 (1) y se evaluó su efecto en la inducción de flujo de calcio. a) Clona control, b) Clona estable de CD3 ζ , c) Clona estable de CD3 ϵ y d) clona estable de CD3 ϵ mutante.

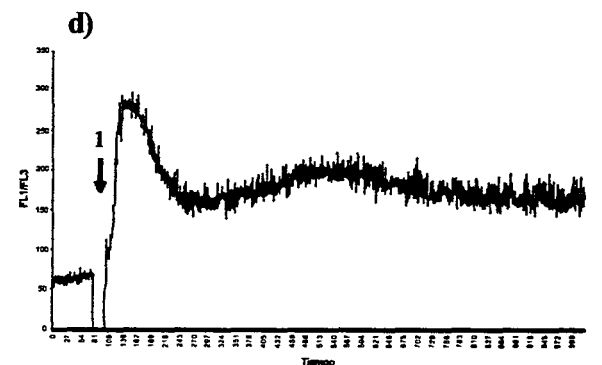
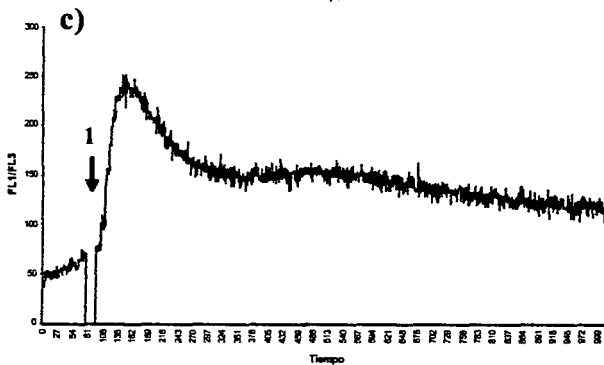
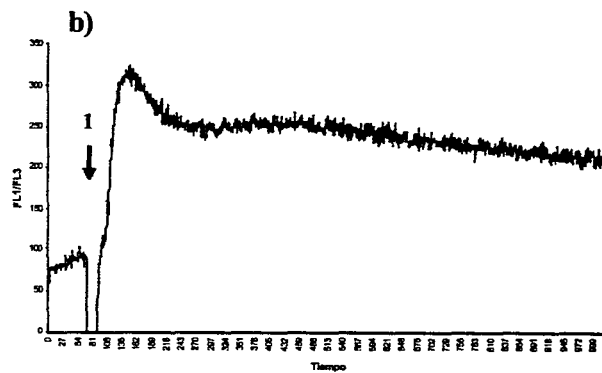
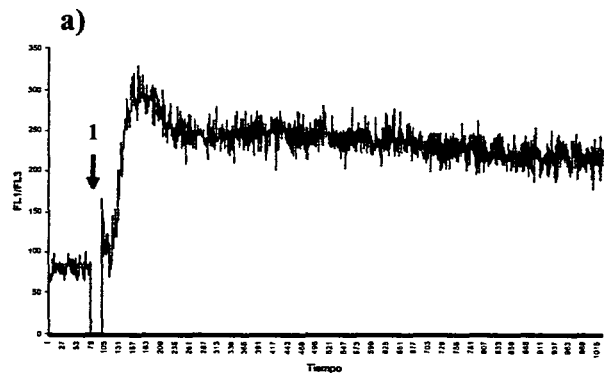


Figura 23. Liberación de calcio intracelular en las clonas estables inducido por anti-CD3. Se estimularon las clonas estables para las distintas quimera con el anticuerpo anti-hCD3 (1) y se evaluo el efecto en la inducción de la liberación de calcio intracelular. a) Clona control, b) Clona estable de CD3 ζ , c) Clona estable de CD3 ϵ y d) Clona estable de CD3 ϵ mutante.

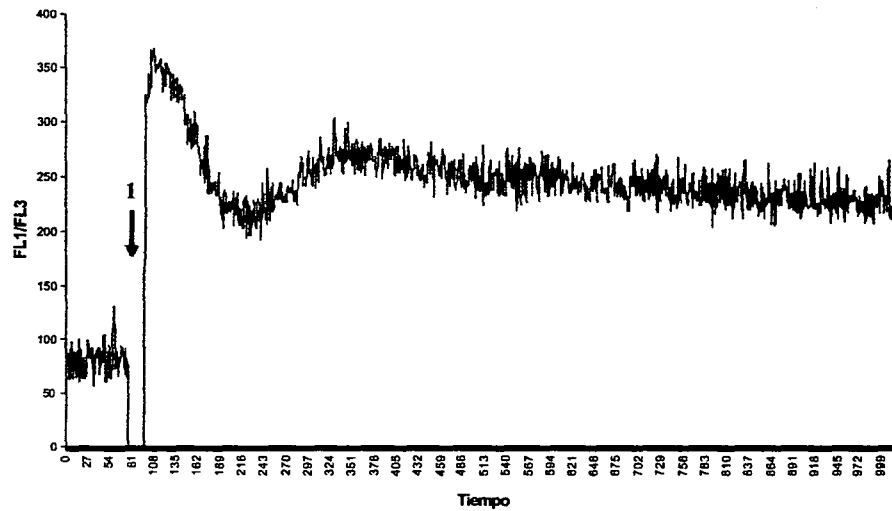


Figura 24. Control positivo de liberación de calcio intracelular. Se utilizó la línea control (sin quimera) y se estimuló con 5 μg totales de ionomicina (I). Los resultados se graficaron como se describió anteriormente.

DISCUSIÓN

En este estudio se describe la señalización mediada a través de la cadena CD3 ϵ de manera independiente de los demás componentes del complejo TCR/CD3 *in vitro*. Se generaron proteínas quiméricas con dominios de entrecruzamiento intracelular (sistema de CIDs) y extracelular (con anticuerpos contra la región extracelular:hCD2) que permitieron la activación específica de las quimeras y su expresión funcional de forma independiente del complejo TCR/CD3 endógeno.

Inicialmente se probaron distintos anticuerpos a fin de determinar el ideal para la detección de nuestras quimeras. El hecho de que el anticuerpo anti-CD3 ϵ fuera capaz de reconocer a la quimera silvestre de CD3 ϵ pero no a la CD3 ϵ mutante sugiere que el ITAM podría ser parte del epítipo de reconocimiento del anticuerpo. Por otro lado, el anticuerpo anti CD3 ζ reconoció la quimera de CD3 ζ en la línea By155.18, pero no en la línea estable Jurkat E6-1, lo que podría indicar que existen diferencias en la composición de las membranas (y en los "rafts") en las distintas líneas, o bien que la conformación de la proteína quimérica puede diferir dependiendo de la línea celular. Finalmente, se decidió trabajar con el anticuerpo dirigido hacia el epítipo intracelular HA de las quimeras, que reconoció las quimeras en todas las líneas celulares, a pesar de que este presenta reactividad cruzada hacia ciertas proteínas endógenas de la célula.

Una vez que se detectó la expresión de las quimeras en líneas estables, se generaron clonas (Fig 12). Se llevó a cabo el entrecruzamiento extracelular, mediante anticuerpos específicos para hCD2, e intracelular, mediante la estimulación con dimerizadores químicos (AP1510 y FK1012) y en ambos casos se obtuvo una fosforilación específica de las quimeras de ϵ y ζ silvestres (Fig 13). Nuestros experimentos no

permitieron distinguir si existen diferencias cuantitativas en el patrón de fosforilación obtenido después de entrecruzar las quimeras de ϵ y ζ respectivamente. Sin embargo, existen estudios que han reportado diferencias en los patrones de fosforilación generados al entrecruzar las quimeras conteniendo dominios citoplasmáticos de ϵ y ζ , con el dominios extracitoplásmicos de la molécula CD8 humana [46].

Los estudios de flujo de calcio realizados en las líneas que expresaban las quimeras de ϵ y ζ sugieren que, al igual que los resultados obtenidos previamente en otros estudios [48] [66] el flujo inducido por entrecruzamiento extracelular de la quimera de CD3 ζ presenta características cualitativa y cuantitativamente distintas al flujo generado al entrecruzar la quimera de CD3 ϵ . Nuestros experimentos demostraron un flujo más pronunciado en las líneas que expresaban la quimera CD3 ζ respecto a las que expresaban la quimera de CD3 ϵ . Sin embargo, el entrecruzamiento intracelular de las quimeras indujo un flujo de calcio muy débil, que solo fue observado en los experimentos realizados con las clonas estables para ambas quimeras. Cuando se realizaron experimentos con la clona estable para la quimera de CD3 ϵ mutante (que no contiene tirosinas en su ITAM), no fue posible generar flujos de calcio sostenidos, ni éstos alcanzaron los niveles obtenidos con la línea Jurkat control o con las clonas que expresaban las quimeras de CD3 ϵ silvestre y CD3 ζ respectivamente. Estos resultados confirman que la integridad del ITAM es imprescindible para generar una señal funcional. De manera interesante, la expresión de la quimera CD3 ϵ indujo una reducción significativa del flujo de calcio obtenido en respuesta al entrecruzamiento con anticuerpos anti-hCD3, que reconocen el complejo CD3 endógeno, lo cual indica que la ausencia de tirosinas en los ITAMs de CD3 ϵ puede generar una señal

negativa de activación, de manera similar a lo que se ha descrito en para la cadena CD3 ζ [51].

Como una medida de la inducción de factores de transcripción involucrados en la activación del linfocito T realizamos experimentos de detección de fosfatasa alcalina inducida tras la activación de NFAT. Inicialmente nuestros resultados demostraron que no fue posible detectar fosfatasa alcalina en las líneas Jurkat Tag transfectadas transitoriamente con las quimeras de CD3 ϵ y CD3 ζ , posiblemente debido a la baja expresión de las quimeras. Sin embargo en experimentos posteriores, utilizando líneas estables Jurkat Tag para ambas se logró alcanzar mayores niveles de fosfatasa alcalina y los resultados indicaron que el entrecruzamiento extracelular e intracelular de las quimeras de CD3 ζ y CD3 ϵ inducen una activación similar de NFAT. Sin embargo, la línea estable para la cadena CD3 ϵ mutante no indujo la secreción de fosfatasa alcalina en ninguna de las condiciones de estimulación utilizadas, confirmando que CD3 ϵ es incapaz de inducir señales de activación en ausencia de las tirosinas del ITAM (Fig 17).

Nuestros resultados apoyan el modelo cualitativo en el que cada uno de los ITAMs del complejo CD3 podría conectar diferencialmente a las rutas bioquímicas activadas luego del reconocimiento del antígeno por el TCR. El hecho de que tuviéramos diferencias notables en las respuestas analizadas como son flujo de calcio y actividad de genes dependientes de NFAT en las distintas quimeras podrían aportar nuevas evidencias del papel individual de cada uno de los componentes del complejo CD3 en la generación de las señales de activación del linfocito T.

La señal obtenida con el sistema de dimerizadores utilizado resultó menor de lo esperado. Una posible explicación sería debido a un bajo nivel de expresión de las quimeras obtenido en las líneas transitorias y estables. Por otro lado, una limitante en el sistema de CIDs empleado en este estudio, es el hecho de que la droga además de reconocer a las quimeras podría estar reconociendo a la molécula chaperona FKBP-12 endógena. Ésta es una proteína altamente conservada y muy abundante en la mayoría de los tipos celulares, por lo que probablemente una parte importante del dimerizador pudiera interactuar con la FKBP-12 endógena, diluyendo el efecto entrecruzador de la droga sobre las quimeras. También es posible que las chaperonas contenidas en nuestras quimeras se encuentren ocupadas por proteínas endógenas y que esta unión evite el reconocimiento de la droga al ligando de entrecruzamiento intracelular de las quimeras. Actualmente se dispone de nuevos sistemas de dimerización más específicos que evitan la interacción de la droga con las moléculas FKBP endógenas, como por ejemplo el dimerizador AP20187, que solo es capaz de interactuar con una molécula FKBP-12 mutante.

Utilicé el modelo de CIDs como método alternativo de entrecruzamiento para nuestras quimeras. Además del entrecruzamiento intracelular obtenido con los dimerizadores, utilizamos el sistema convencional de entrecruzamiento extracelular mediante anticuerpos dirigidos a la región extracelular de nuestras quimeras. Como se demuestra en este trabajo, existen diferencias importantes en las respuestas funcionales obtenidas dependiendo del sistema de entrecruzamiento que se utilizó. Concretamente, los niveles obtenidos en los ensayos de flujo de calcio y de inducción de la transcripción de genes dependientes del factor de transcripción NFAT obtenidos después del entrecruzamiento con anti-CD2, fueron superiores a los generados con el entrecruzamiento con CIDs. Existen varias posibles explicaciones a estas diferencias.

Una posibilidad es que el entrecruzamiento de la quimera con anti-CD2 seguido de estreptavidina, esté generando agregados moleculares de mayor tamaño a los generados a través del dimerizador, induciendo una mayor activación del receptor quimérico.

Por otro lado, es posible que el entrecruzamiento extracelular con hCD2, esté agregando además, otras moléculas que pudieran aumentar la señal generada y el efecto sea la suma del entrecruzamiento de nuestras quimeras más el entrecruzamiento de otras proteínas que quedan atrapadas al momento de hacer la agregación de receptores. Además, sabemos que nuestras líneas celulares expresan CD2 endógeno por lo que el anticuerpo no sólo estaría reconociendo a las quimeras, sino también al receptor endógeno del linfocito T. Esto podría facilitar el reclutamiento de Ick, que interacciona con el dominio intracelular del CD2 [67] y, de esta forma, aumentar la señal inducida a través del receptor quimérico.

Además, debido a la baja expresión de nuestras quimeras en las líneas estables, la capacidad entrecruzante del dimerizador se vea disminuida por una menor accesibilidad a sus ligandos, limitada por sus características intrínsecas como sería su tamaño. Es posible que el entrecruzamiento extracelular con anticuerpos sea menos sensible al nivel de expresión de la quimera puesto que por su tamaño pudiera tener menor dificultad de reconocimiento.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis ha demostrado que es posible analizar el papel individual de las distintas cadenas que componen el complejo CD3, gracias a un sistema de activación condicional basado en dimerizadores químicos. La activación específica de las cadenas ϵ y ζ en líneas de linfocitos T tumorales demuestra que ambas son capaces de inducir respuestas funcionales como son flujo de calcio y activación de la transcripción de genes dependientes de NFAT, aunque es probable que éstas sean cualitativamente distintas. También podemos concluir que es necesaria la integridad del ITAM de CD3 ϵ para la inducción de señales de activación.

Todavía falta dilucidar las distintas vías de señalización activadas a través de cada uno de los receptores quiméricos para así poder entender a nivel molecular las diferencias funcionales observadas.

PERSPECTIVAS

- Obtener una mejor expresión de las proteínas quiméricas en las líneas celulares.
- Investigar las vías de activación "río abajo" inducidas por el entrecruzamiento de la quimera de CD3 ϵ y compararlas con las obtenidas con CD3 ζ .
- Generar quimeras con dominios de entrecruzamiento más específicos, mediante el uso de un FKBP-12 mutante que es reconocido únicamente por la nueva droga entrecruzante AP2087.
- Generar nuevas quimeras mutantes de la cadena CD3 ϵ conteniendo una sola tirosina mutada a fenilalanina (Y1 o Y2), para estudiar el mecanismo por el cual el ITAM de CD3 ϵ funciona en la amplificación y generación de la señal.

APÉNDICE

Reactivos para proteínas

Buffer de lisis:

1 X RCF

20mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

1mM DTT

1 % Triton

300 nM Aprotinina

4 μM Leupeptina

300 nM Pepstatina

300 μM Fluoruro de fenilmetanesulfonato (PMSF)

H_2O

RCF 5X:

100 mM Tris pH 8.0

500 mM NaCl

5 mM EDTA

100 mM NaF

10 mM Na_3VO_4

SDS-PAGE y electrotransferencia de proteínas

Buffer de carga:

20 % SDS

1M Tris pH 6.8

40 % Glicerol

Trazas de azul de bromofenol

H_2O

Buffer de corrida:

25 mM Tris-Base

200 mM Glicina

0.1 % SDS

H_2O

Gel separador:

10 % Acrilamida/Bisacrilamida 37,5:1

374 mM Tris pH 8,8

0.1 % SDS

0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Persulfato de amonio)

0.01 % N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamida (TEMED)

H₂O

Gel concentrador:

3 % Acrilamida/Bisacrilamida 37,5:1

125 mM Tris pH 6.8

0.1 % SDS

0.1% Persulfato de amonio

0.001% TEMED

H₂O

Buffer de transferencia:

25 mM Tris-Base

200 mM Glicina

20% Etanol

H₂O

Western Blot y stripping

Buffer para blot (TSA):

50mM Tris pH 7.6

150mM NaCl

0.2 % NaN₃

Buffer de stripping:

0.1 M Glicina

0.5 % SDS

H₂O

pH 2.5

Activación celular

Buffer de carbonatos:

15 mM Na₂CO₃

35 mM NaHCO₃

H₂O

pH 9.5

PBS 1X:

1.8 mM NaH₂PO₄·H₂O

8.3mM Na₂HPO₄·7H₂O

150 mM NaCl

H₂O

Buffer de stop:

1 mM Na_3VO_4

20 mM NaF

PBS

BIBLIOGRAFÍA

1. Janeway CA, Travers P, Walport M and Shlomchik M. *Immunobiology* . Eds. Garland Publishing, 5th Edition, (2001).
2. Shortman, K. and L. Wu, *Early T lymphocyte progenitors*. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14**: p. 29-47.
3. Anderson, G., et al., *Cellular interactions in thymocyte development*. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14**: p. 73-99.
4. Malissen, B. and M. Malissen, *Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation*. *Curr Opin Immunol*, 1996, **8**(3): p. 383-93.
5. Sebzda, E., et al., *Selection of the T cell repertoire*. *Annu Rev Immunol*, 1999, **17**: p. 829-74.
6. Wange, R.L. and L.E. Samelson, *Complex complexes: signaling at the TCR*. *Immunity*, 1996, **5**(3): p. 197-205.
7. Osman, N., et al., *The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains*. *Eur J Immunol*, 1996, **26**(5): p. 1063-8.
8. Werlen, G. and E. Palmer, *The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity*. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**(3): p. 299-305.
9. van der Merwe, P.A., *Formation and function of the immunological synapse*. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**(3): p. 293-8.

10. Krummel, M.F. and M.M. Davis, *Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 66-74.
11. Cherukuri, A., M. Dykstra, and S.K. Pierce, *Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation*. *Immunity*, 2001. **14**(6): p. 657-60.
12. Leo, A. and B. Schraven, *Adapters in lymphocyte signalling*. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(3): p. 307-16.
13. Burack, W.R., A.M. Cheng, and A.S. Shaw, *Scaffolds, adaptors and linkers of TCR signaling: theory and practice*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 312-6.
14. Tomlinson, M.G., J. Lin, and A. Weiss, *Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling*. *Immunol Today*, 2000. **21**(11): p. 584-91.
15. Koretzky, G.A. and P.S. Myung, *Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(2): p. 95-107.
16. Alberola-Ila, J., et al., *Differential signaling by lymphocyte antigen receptors*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 125-54.
17. Arendt, C.W., et al., *Protein kinase C-theta: signaling from the center of the T-cell synapse*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 323-30.
18. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
19. Morley, S.C. and B.E. Bierer, *The actin cytoskeleton, membrane lipid microdomains, and T cell signal transduction*. *Adv Immunol*, 2001. **77**: p. 1-43.
20. Krystal, G., *Lipid phosphatases in the immune system*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(4): p. 397-403.

21. Neel, B.G., *Introduction: phosphatases in the immune system*. Semin Immunol, 2000. 12(4): p. 347-8.
22. Alexander, D.R., *The CD45 tyrosine phosphatase; a positive and negative regulator of immune cell function*. Semin Immunol, 2000. 12(4): p. 349-59.
23. Zhang, J., A.K. Somani, and K.A. Siminovitch, *Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling*. Semin Immunol, 2000. 12(4): p. 361-78.
24. DeJarnette, J.B., et al., *Specific requirement for CD3epsilon in T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(25): p. 14909-14.
25. Malissen, M., et al., *Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene*. Embo J, 1995. 14(19): p. 4641-53.
26. Fehling, H.J., et al., *Restoration of thymopoiesis in pT alpha-/- mice by anti-CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha*. Immunity, 1997. 6(6): p. 703-14.
27. Love, P.E., et al., *T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex*. Science, 1993. 261(5123): p. 918-21.
28. Wang, B., et al., *A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(20): p. 9402-6.
29. Wang, N., et al., *Expression of a CD3 epsilon transgene in CD3 epsilon(null) mice does not restore CD3 gamma and delta expression but efficiently rescues T cell development from a subpopulation of prothymocytes*. Int Immunol, 1998. 10(12): p. 1777-88.

30. Carleton, M., et al., *Signals transduced by CD3epsilon, but not by surface pre-TCR complexes, are able to induce maturation of an early thymic lymphoma in vitro*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2576-85.
31. Shores, E.W., et al., *Role of TCR zeta chain in T cell development and selection*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1047-50.
32. Kearse, K.P., D.L. Wiest, and A. Singer, *Subcellular localization of T-cell receptor complexes containing tyrosine-phosphorylated zeta proteins in immature CD4+CD8+ thymocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2438-42.
33. Ardouin, L., et al., *The CD3-gammadeltaepsilon and CD3-zeta/eta modules are each essential for allelic exclusion at the T cell receptor beta locus but are both dispensable for the initiation of V to (D)J recombination at the T cell receptor-beta, -gamma, and -delta loci*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 105-16.
34. de Aoz, I., et al., *Tyrosine phosphorylation of the CD3-epsilon subunit of the T cell antigen receptor mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25310-8.
35. Delgado, P., et al., *CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 426-30.
36. Zubiaur, M., et al., *The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20633-42.
37. Haks, M.C., et al., *Contributions of the T cell receptor-associated CD3gamma-ITAM to thymocyte selection*. J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 1-13.

38. Rubin, B., et al., *Dissection of the role of CD3gamma chains in profound but reversible T-cell receptor down-regulation*. Scand J Immunol, 2000. **52**(2): p. 173-83.
39. Lauritsen, J.P., et al., *Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 260-7.
40. Dietrich, J., et al., *Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5434-40.
41. Dietrich, J., et al., *The phosphorylation state of CD3gamma influences T cell responsiveness and controls T cell receptor cycling*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24232-8.
42. Sommers, C.L., et al., *Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development*. J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 913-19.
43. Gil, D., et al., *Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation*. Cell, 2002. **109**(7): p. 901-12.
44. Yamazaki, T., et al., *CAST, a novel CD3epsilon-binding protein transducing activation signal for interleukin-2 production in T cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18173-80.
45. Shinkai, Y., et al., *CD3 epsilon and CD3 zeta cytoplasmic domains can independently generate signals for T cell development and function*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 401-11.
46. Letourneur, F. and R.D. Klausner, *Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon*. Science, 1992. **255**(5040): p. 79-82.

47. Soldevila, G., et al., *Analysis of the individual role of the TCRzeta chain in transgenic mice after conditional activation with chemical inducers of dimerization*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 123-38.
48. Brocker, T. and K. Karjalainen, *Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1653-9.
49. Geiger, T.L., D. Leitenberg, and R.A. Flavell, *The TCR zeta-chain immunoreceptor tyrosine-based activation motifs are sufficient for the activation and differentiation of primary T lymphocytes*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5931-9.
50. Shinkai, Y., et al., *Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes*. Science, 1993. **259**(5096): p. 822-5.
51. Kersh, E.N., G.J. Kersh, and P.M. Allen, *Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1627-36.
52. Guirado, M., et al., *Phosphorylation of the N-terminal and C-terminal CD3-epsilon-ITAM tyrosines is differentially regulated in T cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(3): p. 574-81.
53. Klemm, J.D., S.L. Schreiber, and G.R. Crabtree, *Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 569-92.
54. Schultz, L.W. and J. Clardy, *Chemical inducers of dimerization: the atomic structure of FKBP12-FK1012A-FKBP12*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(1): p. 1-6.
55. Pruschy, M.N., et al., *Mechanistic studies of a signaling pathway activated by the organic dimerizer FK1012*. Chem Biol, 1994. **1**(3): p. 163-72.
56. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.

57. Spencer, D.M., et al., *Controlling signal transduction with synthetic ligands [see comments]*, Science, 1993. **262**(5136): p. 1019-24.
58. Spencer, D.M., et al., *A general strategy for producing conditional alleles of Src-like tyrosine kinases*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9805-9.
59. Holsinger, L.J., et al., *Signal transduction in T lymphocytes using a conditional allele of Sos*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9810-4.
60. Graef, I.A., et al., *Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70*, Embo J, 1997. **16**(18): p. 5618-28.
61. Gross, A., et al., *Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis*, Embo J, 1998. **17**(14): p. 3878-85.
62. Yang, J., et al., *Small-molecule control of insulin and PDGF receptor signaling and the role of membrane attachment*, Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 11-8.
63. Jin, L., H. Asano, and C.A. Blau, *Stimulating cell proliferation through the pharmacologic activation of c-kit*, Blood, 1998. **91**(3): p. 890-7.
64. Hato, T., et al., *Outside-in signaling from integrin alpha IIb beta 3 into platelets in the absence of agonist-induced signaling*, Int J Hematol, 1997. **65**(4): p. 385-95.
65. Spencer, D.M., et al., *Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization*, Curr Biol, 1996. **6**(7): p. 839-47.
66. Jensen, W.A., et al., *Qualitatively distinct signaling through T cell antigen receptor subunits*, Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 707-16.
67. Bell, G.M., et al., *The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2*, J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 169-78.