

03021
9



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**"ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA
QUIMIOCINA CCL13/MCP-4"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER MARTINEZ BECERRA

ASESOR: DR. EDUARDO GARCIA ZEPEDA

MEXICO, D. F.

2003

A



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.

"ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA QUIMIOCINA CCL13 / MCP-4"

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Francisco Javier Martínez Becerra
Asesor: Dr. Eduardo García Zepeda
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"All we have to decide is what to do with the time that is given to us."

J.R.R. Tolkien.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo esta dedicado a mis padres, dado que todo se basa en el apoyo que me dan para solo llegar a dormir o a jugar cartas. No sé como se puede tener tanta paciencia con alguien. Gracias.

A mis hermanos Rodrigo y Guillermo, ya que, a pesar de que no los veo ya tanto, seria dificil convivir sin esas peleas de fin de semana.

A mi abuela Guille, por su apoyo y por estar siempre aqui, y a Felicitas, Daniel y Porfirio; nunca dejaron de estar aquí.

A todos mis tíos y primos. A pesar de que a algunos no los veo seguido (o de plano ya no los veo), todo lo que esta alrededor cuando creces es parte importante de lo que finalmente llegas a ser.

A los doce biomédicos de la luz: Karen, Liv, Maria Luisa, Naima, Yuriria, Héctor, Daniel, David, Luis y Álvaro. Es increíble como se puede divertirse uno en tan poco tiempo.

A mis compañeros de laboratorio: Ileana, Ana, Selma, Silvana, Sandra, Nancy y Emilio. Y a los ahora vecinos Gloria, Ramses, Horacio, Paula y Abigail, por tantos ratos de sana convivencia y de muy sana discusión y conflicto.

A Marcela Ramírez por su apoyo como Técnico Académico.

A mis tutores: Dr. Luis Padilla, Dr. Manuel Soriano Y Dr. Eduardo García. Todos en su momento tuvieron la paciencia para permitirme estar en sus laboratorios. No rompí casi nada. Casi.

A los doctores Eduardo García, Gloria Soldevila, Leopoldo Santos, Enrique Ortega y Manuel Soriano, por leer y revisar este trabajo de manera completa y en tiempo récord.

A los pepinos y a los del fron, por no distraerme lo suficiente. Eso me dio tiempo de acabar este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. ÍNDICE

I. Índice.....	4
II. Resumen.....	6
III. Introducción.....	7
a. Las quimiocinas.....	7
i. Estructura de las Quimiocinas.....	9
ii. Receptores de Quimiocinas.....	11
iii. Vías de Señalización.....	12
1. Migración.....	14
2. Flujo de calcio.....	18
iv. Quimiocina CCL13.....	18
b. Funciones de las Quimiocinas.....	21
i. Desarrollo embrionario.....	21
ii. Migración homeostática.....	21
iii. Polarización de linfocitos T.....	22
iv. Angiogénesis y angiostasis.....	22
v. Defensa inmune.	23
1. Quimiocinas y VIH.....	23
2. Mimetismo viral.....	24
3. Defensa contra parásitos.....	25
vi. Ateroesclerosis	25
vii. Asma.....	26
IV. Antecedentes.....	27
V. Justificación.....	36
VI. Hipótesis.....	38
VII. Objetivos.....	38
VIII. Materiales y Métodos.....	39
a. Materiales	39
i. Péptidos sintéticos.....	39

ii. Células.....	39
iii. Quimiocinas.....	40
iv. Toxina pertussis.....	40
b. Métodos.....	40
i. Quimiotaxis	40
ii. Flujo de calcio.....	41
IX. Resultados.....	43
X. Discusión.....	58
XI. Conclusiones.....	62
XII. Bibliografía.....	63

II. RESUMEN

Las quimiocinas son citocinas quimioatrayentes que actúan a través de la activación de receptores de siete dominios transmembranales que se encuentran en la superficie de las células. Las quimiocinas participan en procesos del sistema inmune mediante el reclutamiento selectivo de leucocitos a sitios de activación y diferenciación. Las quimiocinas presentan una estructura conservada que consiste de un extremo amino terminal flexible, seguido de 3 hojas β plegadas y una hélice α en el extremo carboxilo.

La quimiocina CCL13 (MCP-4) es una quimiocina de la subfamilia MCP y actúa a través de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3. Esta quimiocina atrae monocitos, linfocitos T, eosinófilos, basófilos y células dendríticas.

Las regiones de esta quimiocina involucradas en la unión y activación de cada uno de sus receptores no han sido descritas. Para abordar este problema se sintetizaron péptidos basados en la secuencia primaria de CCL13. Estos péptidos fueron usados para determinar si las secuencias que contienen son suficientes para inducir respuestas funcionales en una línea de monocitos. Adicionalmente, estos péptidos fueron usados en ensayos de inhibición para determinar si son capaces de inhibir la actividad de la quimiocina CCL13.

Los resultados obtenidos muestran que el péptido 8, correspondiente a los residuos de aminoácido 9-29 en la quimiocina completa; es capaz de inducir quimioaxis en las células THP-1. Por otro lado, el péptido 1, correspondiente a los residuos de aminoácido 1-18, inhibe la quimiotaxis mediada por la quimiocina CCL13.

Estos resultados definen al extremo amino terminal (9-29) como candidato para participar en la actividad agonista, mientras que los aminoácidos 1-18 pueden tener actividad antagonista.

III. INTRODUCCIÓN

a. Las Quimiocinas.

El sistema inmune se especializa en la defensa del organismo contra patógenos y sustancias foráneas, mediante la actividad de diversos tipos celulares y proteínas secretadas.

Para ejercer su función efectora, dichas células deben dirigirse a los sitios de presentación de los antígenos encontrados por el organismo, ya que para montar una respuesta inmune eficiente se requiere la interacción de estos componentes celulares y su presencia en los sitios de infección y de inflamación. Asimismo, las células progenitoras que dan lugar a varios tipos celulares requieren un ambiente de maduración específico, por lo que estas células requieren posicionamientos específicos según sea el tipo de célula que dará lugar.

Dentro de las proteínas mediadoras que sintetizan y secretan las células se encuentran las citocinas. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que estimulan diversas respuestas de células del sistema inmune. Las citocinas actúan al unirse a receptores en células blanco, y su expresión es regulada por señales externas.

Las quimiocinas son citocinas descritas originalmente por su capacidad de inducir migración de células del sistema inmune a sitios de inflamación. En la actualidad se han descrito otras funciones en las cuales participan, tales como desarrollo embrionario, desgranulación de eosinófilos, neutrófilos y basófilos, migración de células progenitoras a sitios de diferenciación y activación celular e inhibidores de la entrada y replicación del virus de inmunodeficiencia humano (revisado en [1-3]).

Una característica importante de las quimiocinas es que, a diferencia de otros quimioatrayentes como C5a (componente del complemento) o fMLP (péptido formilado de bacterias), cuyos receptores se encuentran expresados de manera uniforme en los diferentes tipos celulares; la activación celular depende de la

quimiocina secretada y del tipo celular que expresa el receptor. Esto permite una migración selectiva de estas células a diferentes sitios dentro del organismo dependiendo de los receptores de quimiocinas que expresan.

Las quimiocinas actúan a través de la unión a receptores celulares de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GCPR), los cuales activan diferentes vías de señalización intracelulares.

Las quimiocinas se clasifican en las familias CC, CXC, XC y CX3C según el número de aminoácidos que separan a los 2 primeros residuos de cisteína conservados. La familia CC no tiene ningún aminoácido intermedio, la familia CXC tiene un aminoácido variable, la familia XC (XCL1, linfotactina) solo tiene una de las cisteínas y la familia CX3C (CX3CL1, fractalcina) tiene 3 aminoácidos intermedios. Las quimiocinas se denominan usando el nombre de la familia a la que pertenecen, seguido de una L por ligando, y un número (ej. CXCL8, CCL10) [4].

Las quimiocinas son sintetizadas como proteínas inmaduras con una secuencia señal de tamaño variable. Esta secuencia es cortada posteriormente por proteinasas en los residuos 20-25 para generar una proteína madura de un tamaño aproximado de 75 residuos de aminoácido.

Algunas quimiocinas, como CCL11 (eotaxina) son glicosiladas en aminoácidos específicos, esta modificación puede alterar la actividad de la proteína madura. Otra modificación post-traducciona que sufren estas proteínas es el corte de su extremo amino terminal por la actividad de metaloproteasas. Este corte tiene diferentes efectos según la quimiocina. Las variantes truncadas de CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3) y CCL8 (MCP-2) pierden su capacidad de inducir quimiotaxis[5, 6], mientras que CXCL8 (IL-8) aumenta su actividad 10 veces[7].

i. Estructura de las Quimiocinas.

Las quimiocinas presentan una estructura terciaria conservada, con un extremo amino-terminal desordenado, seguido de 3 hojas β plegadas antiparalelas interconectadas con asas, y una hélice α en el extremo carboxilo-terminal. Esta

estructura básica ha sido determinada por difracción de rayos X y por estudios de resonancia magnética nuclear[8-10] (Figura 1). Las quimiocinas forman dímeros y otros multímeros en solución a altas concentraciones (mayores a 1 mg/ml). Esta dimerización forma una interfase cargada positivamente que le permite interactuar con proteoglicanos como el heparán sulfato[11]. Los residuos de aminoácido que forman estas interfases varían en las diferentes quimiocinas.



Figura 1. Estructura de la quimiocina CCL13 (MCP-4). Este modelo fue generado a partir de la estructura determinada por cristalografía de rayos X de CCL2 (MCP-1). En amarillo se señalan las hojas β y en rojo la hélice α del extremo carboxilo.

ii. Receptores de Quimiocinas

Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs) del tipo A, con homología con el fotorreceptor rodopsina de bacterias[2] (Figura 2). Estos receptores son similares a los de quimioatrayentes como C5a y péptidos formilados de bacterias y presentan una estructura caracterizada por siete hélices α transmembranales, con un tamaño que varía alrededor de 370 aminoácidos. La estructura terciaria de estos receptores no ha sido determinada. Los receptores de quimiocinas son modificados post-traduccionalmente mediante procesos de glicosilación y sulfatación de tirosinas[12]. La presencia de cisteínas en el extremo amino terminal y en las 3 primeras asas extracelulares le permite formar puentes disulfuro entre estas regiones para formar el posible sitio de unión con la quimiocina.

Los receptores de quimiocinas utilizan para su nomenclatura la de la familia de quimiocinas que unen, seguido de una R, que denota receptor; por ejemplo CCR y CXCR. Un solo receptor puede ser activado por varias quimiocinas, y una quimiocina puede unirse a más de un solo receptor.

iii. Vías de señalización.

Los receptores de quimiocinas se encuentran acoplados en su región intracitoplasmática a proteínas G heterotriméricas, conformadas por las subunidades α , β y γ . Al interactuar el receptor con la quimiocina la subunidad α inhibitoria (α_i) se une a GTP, esta unión la disocia de las otras 2 subunidades. La liberación de la subunidad $G\beta\gamma$ permite la activación de varias vías de señalización [13, 14]. La subunidad α_i es inactivada por la toxina pertussis, de la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina actúa mediante la ADP-ribosilación de α_i , previniendo que la proteína G libere GDP y se una a GTP [15].

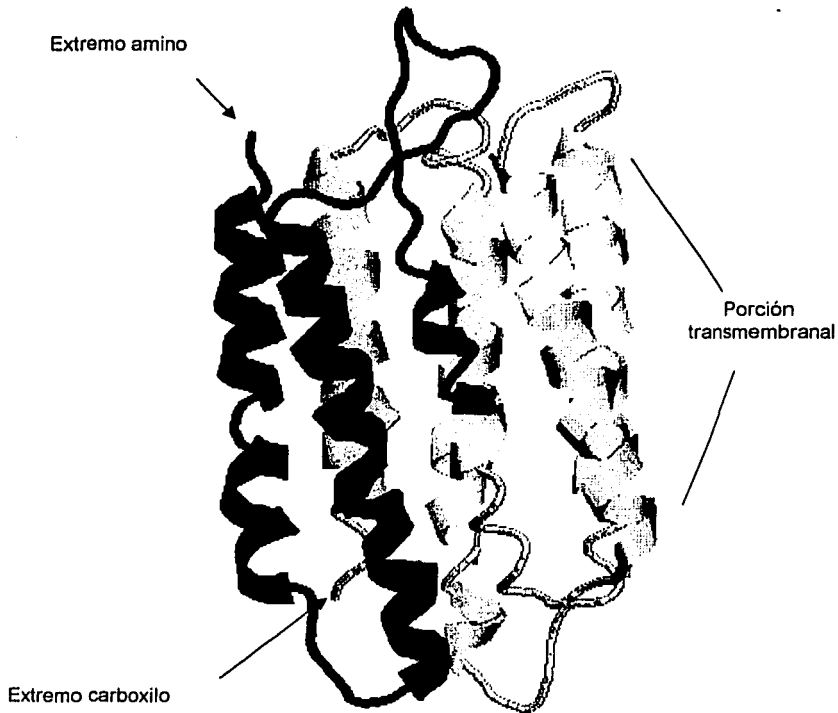


Figura 2. Estructura de la bacteriorodopsina, un receptor para luz de bacterias de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G. Estructura tomada del PDB. Acceso: 1AP9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

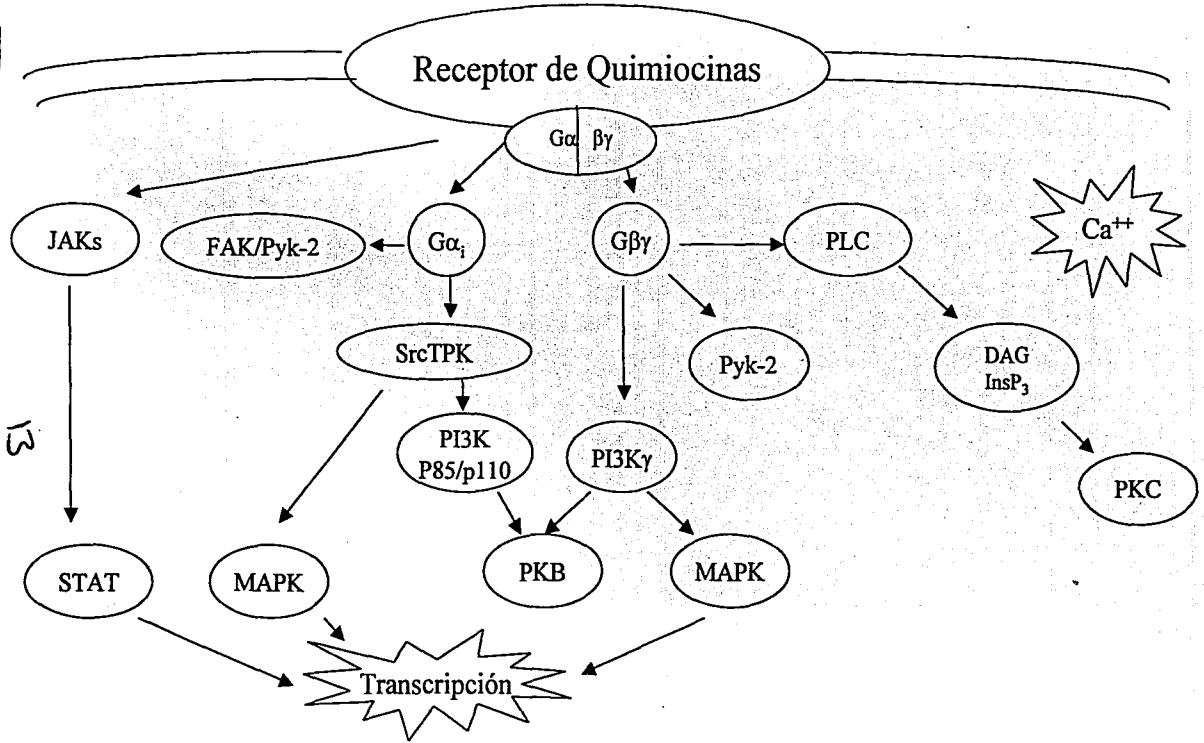


Figura 3. Señalización mediada por receptores de quimiocinas. El receptor de quimiocinas activa a las proteínas G disociando sus subunidades. Las subunidades activan proteínas que promueven diferentes vías de señalización. Entre las respuestas funcionales activadas se encuentran la transcripción de genes, el flujo de calcio y el rearrreglo de citoesqueleto.

13

La subunidad $\beta\gamma$ activa a la fosfolipasa $C\beta$, que genera diacilglicerol e inositol trifosfato, los cuales promueven respuestas como la liberación de calcio intracitoplásmico y la activación de la proteína-quinasa C.

Otras proteínas activadas incluyen a las cinasas Pyk-2 y FAK, involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto [16].

Por otro lado, los receptores de quimiocinas son capaces de activar vías de transcripción de genes por medio de la activación de la familia de proteínas-quinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), como la quinasa ERK. Esta activación está mediada por cinasas de la familia src y por la fosfatidil-inositol 3 quinasa gamma (PI3K γ).

También se ha descrito la participación de cinasas de la familia JAK (Janus Associated Kinase) en la activación de receptores de quimiocinas [17]. Estas cinasas activan factores de transcripción STAT, que al ser fosforiladas se translocan al núcleo donde promueven la transcripción de varios genes (Figura 3).

1. Migración.

El citoesqueleto es un organelo dinámico en la célula que rige los movimientos y la forma de la membrana. Los cambios en los patrones de polimerización y la formación de fibras de estrés permiten movilizar y orientar a las células.

Las moléculas encargadas de la señalización que regula este proceso incluyen a la GTPasa Rho, que activa proteínas de la familia WASp. La activación de estas proteínas activa al complejo Arp2/3, que finalmente permite la polimerización de proteínas estructurales que forman parte del citoesqueleto, como las subunidades de actina [18].

Estas vías son importantes en procesos celulares como la fagocitosis, la migración y extravasación leucocitaria y la polarización de la célula, así como para mantener la morfología celular.

Los receptores de quimioatrayentes son expresados de manera uniforme en la superficie de los leucocitos [19]. Al encontrar un gradiente de quimioatrayente las células se polarizan formando un borde que se mueve activamente y una parte

posterior. La distribución de receptores de quimioatrayente parece no cambiar al estimular la célula, es decir, el borde activo no recluta de manera activa receptores para detectar el gradiente quimiotáctico, por lo que otro mecanismo debe ser empleado para el movimiento selectivo ya que el quimioatrayente se encuentra alrededor de toda la célula.

Al analizar otras moléculas de señalización para determinar estos mecanismos, un estudio comparativo usando al hongo *Dictyostelium discoideum* demostró que la distribución de algunas de las moléculas encargadas de la transducción de señales mediadas por estos receptores cambia, como la proteína cinasa B (PKB) [20, 21]. Esta distribución desigual en moléculas de señalización permitiría a la célula determinar hacia dónde se encuentra la mayor concentración de quimioatrayente. La distribución homogénea de los receptores de quimioatrayente le permitiría a las células cambiar de dirección si el gradiente de quimioatrayente cambia de orientación.

La migración de leucocitos a sitios de infección e inflamación es un proceso selectivo que permite a las células del sistema inmune encontrar patógenos y antígenos dentro del organismo [22]. En este proceso participan tanto moléculas de adhesión como quimiocinas (Figura 4). Los leucocitos en el torrente circulatorio mantienen interacciones con la pared del endotelio vascular mediante la unión de moléculas de adhesión en su superficie llamadas selectinas con los ligandos expresados en las células endoteliales (Paso 1). Estas interacciones tienen baja afinidad, por lo que el leucocito "rueda" mientras avanza por la pared del endotelio. Las quimiocinas poseen dentro de su estructura dominios de interacción con proteínas de matriz extracelular. Las quimiocinas son secretadas por células endoteliales en respuesta a citocinas pro-inflamatorias y se asocian a proteoglicanos como el heparán sulfato. Esta asociación es necesaria para la formación de un gradiente de concentración que los leucocitos son capaces de detectar.

Posteriormente, el receptor de quimiocinas promueve un cambio en el estado de activación de las integrinas del leucocito (Paso 2). La afinidad de las integrinas activadas por los ligandos es muy alta, lo que lleva a la adhesión firme y el arresto del leucocito (Paso 3). Una vez adherido, el leucocito secreta proteasas que le permiten modificar la matriz extracelular y realizar el proceso de extravasación, en el cual atraviesa la pared del endotelio pasando por las uniones estrechas de las células endoteliales para llegar a los sitios de inflamación y realizar sus funciones efectoras (Paso 4). En este proceso participan metaloproteasas secretadas por el leucocito que le permiten degradar componentes de matriz extracelular, así como moléculas de adhesión con ligandos en las células endoteliales.

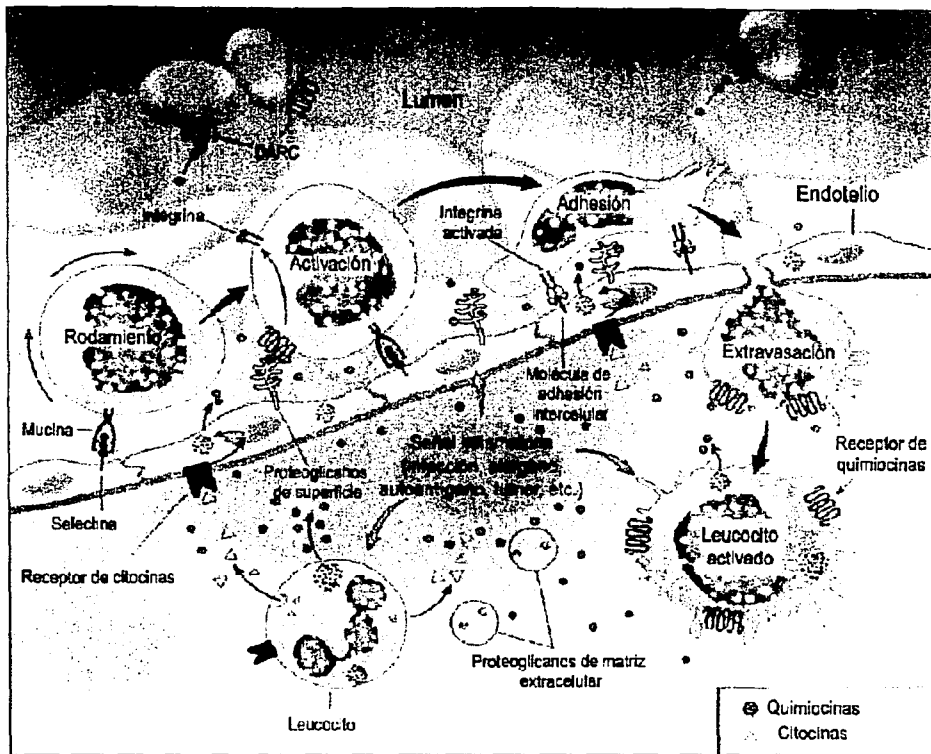


Figura 4. Modelo de extravasación leucocitaria en 4 pasos. Los leucocitos en circulación interactúan con el endotelio mediante las selectinas (1). Estas células son reclutadas a los sitios de inflamación por medio de la interacción de quimiocinas con sus receptores en los leucocitos (2). Esta interacción activa a las integrinas del leucocito, lo que le permite adherirse a la pared del endotelio (3) y realizar el proceso de extravasación (4). (Modificado de Luster 1998)

2. Flujo de calcio.

Las concentraciones de calcio libre en el interior de la célula son menores a 10^{-7} M, mientras que en el exterior de la célula y en el retículo endoplásmico son relativamente altas (10^{-3} M). Cuando una señal exterior abre los canales de calcio hay un aumento significativo en la concentración intracelular de calcio, lo que activa proteínas dependientes de calcio.

Para el caso de las quimiocinas, esta respuesta es activada por la subunidad $G\beta\gamma$ de la proteína G. Esta subunidad activa a las fosfolipasas $C\beta_2$ y $C\beta_3$. Estas enzimas se encargan de cortar el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato que se encuentra en la membrana celular. El corte de este lípido genera 2 productos que contribuyen a la transducción de la señal: inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato se encarga de liberar las reservas de calcio del retículo endoplásmico al unirse a canales de calcio en este organelo.

La activación de la proteína cinasa C (PKC) por el diacilglicerol se requiere para desensibilizar al receptor de quimiocina, así como para algunas respuestas como la liberación de gránulos contenedores de enzimas en neutrófilos [14].

Los flujos de calcio estimulados por quimiocinas son rápidos (alrededor de 40 segundos) y poco sostenidos. La estimulación de células por una quimiocina las desensibiliza a una segunda estimulación mediada por la misma quimiocina. Las concentraciones de quimiocina requeridas para inducir esta respuesta varían según el tipo celular y la quimiocina que lo activa.

iv. Quimiocina CCL13.

Dentro de la familia de quimiocinas CC se encuentra la subfamilia de quimiocinas MCP y la subfamilia de eotaxinas, con 7 miembros en humanos y 6 en ratón [23] (Tabla 1). Estas quimiocinas son agrupadas en familias por su alto porcentaje de identidad en sus secuencias de aminoácidos (60%) y baja identidad con las otras quimiocinas CC (menos del 40%) (Tabla 2).

Nomenclatura	Quimiocina	Receptores
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL8	MCP-2	CCR1,2,5
CCL7	MCP-3	CCR1,2,3
CCL13	MCP-4	CCR1,2,3
CCL11	Eotaxina	CCR3
CCL24	Eotaxina 2	CCR3
CCL26	Eotaxina 3	CCR3

Tabla 1. Miembros de las subfamilias de quimiocinas MCP/eotaxina en humanos.

	hCCL2	hCCL8	hCCL7	hCCL13	hCCL11	hCCL24	hCCL26
hCCL2	100	62	71	61	66	42	36
hCCL8		100	58	56	66	43	44
hCCL7			100	59	65	46	40
hCCL13				100	63	48	44
hCCL11					100	38	40
hCCL24						100	40
hCCL26							100

Tabla 2. Porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos entre las quimiocinas humanas de las subfamilias MCP/eotaxina.

Uno de los miembros de la subfamilia MCP es la quimiocina CCL13. Esta quimiocina fue clonada originalmente usando una sonda derivada de la quimiocina CCL11 (eotaxina) [26]. La quimiocina CCL13 actúa a través de la activación de los receptores CCR1, 2 y 3. Esta quimiocina promueve migración de eosinófilos, linfocitos T, células dendríticas, monocitos y macrófagos, células efectoras que participan en procesos inmunes en respuesta a patógenos, alérgenos y otros antígenos. Dentro de las respuestas que induce esta quimiocina se encuentran la inducción de estallido respiratorio y expresión de CD11b en eosinófilos, liberación de histamina en basófilos y adhesión de monocitos [24].

El homólogo en ratón de la quimiocina CCL13 (MCP-4) no se ha encontrado aún, mientras que la quimiocina murina CCL12 (MCP-5) no tiene homólogo humano. A pesar de que CCL13 es la quimiocina con la que MCP5 tiene más porcentaje de identidad, se nombró a esta quimiocina CCL12 y no CCL13 murina. El gen humano se encuentra localizado en el cromosoma 17q11.2-12 [25].

Esta quimiocina se expresa constitutivamente en tejidos como pulmón, intestino delgado y colon, (órganos con alta migración de eosinófilos). Su expresión se puede detectar en timo, placenta y corazón [26, 27].

Para determinar qué tipo de células expresan CCL13 y bajo qué estímulos, se han realizado ensayos en líneas celulares para detectar su expresión. Las células endoteliales HUVECs no expresan esta quimiocina de manera constitutiva. Las citocinas IL1- α (interleucina 1 alfa) y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) estimulan la expresión de CCL13 en estas células. La citocina IFN- γ (interferón gamma) aumenta moderadamente la expresión esta quimiocina y actúa sinérgicamente con TNF- α aumentando los niveles de expresión [26].

Las línea celular de epitelio alveolar A549 y la línea BEAS-2B de epitelio bronquial secretan CCL13 en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL1- β , IFN- γ e IL-4 (interleucina 4) [26].

Se ha demostrado que existe una subpoblación de células dendríticas presentadoras de antígeno que responden a CCL13. Esta quimiocina se expresa en la pared del endotelio vascular, donde promueve la migración de las células para encontrar antígenos [28].

CCL13 está asociada a enfermedades de tipo inflamatorias, ya que se ha detectado un aumento en la expresión de esta quimiocina en pacientes con rechazo a transplante de riñón y glomerulonefritis [29], así como en lesiones de placas ateroscleróticas, en pacientes con asma y sinusitis alérgica [30-32], lo que indica que esta quimiocina puede participar en el desarrollo de dichos procesos inflamatorios.

b. Funciones de las quimiocinas.

i. Desarrollo embrionario.

El estudio de ratones deficientes en quimiocinas y sus receptores ha ayudado a identificar su papel en el desarrollo y en la respuesta inmune. Por ejemplo, una quimiocina de la familia CXC, CXCL12 (SDF-1), tiene un papel importante en el desarrollo embrionario. Esta quimiocina está altamente conservada en los organismos en los que se ha descrito: entre las secuencias de SDF-1 humana y de ratón sólo hay un residuo de aminoácido diferente. Ratones deficientes en esta quimiocina o en su único receptor CXCR4 tienen varios defectos durante el desarrollo de órganos como el corazón y el cerebro, por lo que estos ratones mueren antes de nacer [33, 34].

ii. Migración homeostática.

La presentación de antígenos a linfocitos T es el paso inicial de la inmunidad adaptativa. Las células T que expresen receptores con afinidad a antígenos procesados y expuestos por células presentadoras de antígeno son seleccionadas, permitiendo su proliferación y activación. La expresión de quimiocinas y sus receptores durante este proceso permite el encuentro entre las células presentadoras y los antígenos, así como entre las células T y las células presentadoras.

Las células dendríticas inmaduras son células presentadoras que migran constantemente a sitios de encuentro antigénico, como la piel y el intestino. Al captar antígenos y procesarlos las células dendríticas maduran y expresan el receptor CCR7. Este receptor les permite migrar en respuesta a las quimiocinas CCL21 (SLC) y CCL19 (ELC), expresadas por células endoteliales en los ganglios linfáticos [35].

Las células T que salen del timo migran a los ganglios linfáticos donde se encuentran con células dendríticas (debido a que expresan CCR7). Al llegar a los ganglios las células T interactúan con células dendríticas por medio del receptor TCR (Receptor de Células T), que reconoce al complejo péptido-MHC (Complejo

principal de histocompatibilidad) en células dendríticas. Una vez activados, los linfocitos T migran a la periferia respondiendo a quimiocinas secretadas en los sitios de inflamación para realizar sus funciones efectoras.

iii. Polarización de linfocitos T.

Los linfocitos T se clasifican en linfocitos CD4 y CD8, dependiendo del tipo de correceptor que expresan. Este correceptor les permite reconocer moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II. Los linfocitos que reconocen moléculas MHC clase II tienen el correceptor CD4 y se denominan linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores se han clasificado según el patrón de citocinas que secretan. Los linfocitos TH1 secretan citocinas como IL-2, IFN γ , IL-12 y TNF- α , mientras que los linfocitos TH2 secretan IL-4, 5, 6 y 10. Las moléculas encargadas de dirigir esta polarización incluyen a las citocinas IL-12 e IFN- γ para la inducción de TH-1, mientras que las citocinas IL-4 e IL-13 son importantes para la respuesta TH-2.

Los receptores de quimiocinas que expresan estas subclases de linfocitos son diferentes. Las células TH1 expresan preferencialmente los receptores CCR5 y CXCR3. Los linfocitos TH2 expresan los receptores CCR3, CCR4 y CCR8. Esta diferencia en los receptores de quimiocinas que expresan los 2 subtipos de linfocitos sugiere que las quimiocinas pueden participar tanto en la diferenciación y activación de estas células, como en el reclutamiento de subtipos específicos de linfocitos T a sitios de infección e inflamación [2, 36].

iv. Angiogénesis y angiostasis.

Las quimiocinas de la familia CXC participan en los procesos de formación de vasos sanguíneos durante la curación de heridas. Este proceso es dirigido por factores angiogénicos, promotores de la formación de vasos, y angiostáticos que lo inhiben. Estos factores son altamente regulados; un desbalance se observa en enfermedades como psoriasis, artritis reumatoide y crecimiento de tumores. Las quimiocinas CXC se subdividen en quimiocinas ELR (Glutamina, Leucina, Arginina) y no-ELR, dependiendo de la presencia de esos aminoácidos en el

extremo amino. Las quimiocinas ELR son factores angiogénicos capaces de inducir la quimiotaxis de células endoteliales, mientras que las quimiocinas no-ELR son factores angiostáticos, inhiben la quimiotaxis y activación de estas células. En los procesos inflamatorios y enfermedades crónicas mencionados, se ha observado un desbalance en la expresión de estos 2 tipos de quimiocinas. Asimismo, en los procesos de formación y crecimiento de tumores se ven aumentadas las quimiocinas ELR [2].

v. Defensa inmune.

1. Quimiocinas y VIH.

El virus del VIH, causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); es capaz de infectar varios tipos celulares como macrófagos, neuronas y linfocitos T. Existen cepas del virus conocidas originalmente como M trópicas cuya célula hospedera son los macrófagos y las cepas T trópicas, que infectan linfocitos T. Los mecanismos de restricción de cada cepa por la célula hospedera no se conocían. En 1996 se descubrió que los receptores de quimiocinas participaban en la entrada del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) a las células [37, 38]. El virus, por medio de la glicoproteína de superficie viral gp120 interacciona con varios receptores de quimiocinas, entre ellos CCR5 y CXCR4, facilitando la activación de gp41, una proteína que promueve la fusión de las membranas del VIH y de la célula hospedera. La importancia de esta interacción se enfatizó al encontrar una delección en el receptor CCR5 ($\Delta 32$) [39]. Los individuos infectados con VIH heterocigos para este alelo tienen disminuida la progresión de la enfermedad. Si el portador es homocigo tiene protección contra infecciones por algunas cepas del virus. La expresión de CCR5 por los macrófagos y la de CXCR4 por linfocitos T explica el tropismo del virus, por lo que la nomenclatura de las cepas fue cambiada de M y T a R5 y XR4 respectivamente, para indicar el tipo de receptor de quimiocinas al que se une el virus.

Dado que tanto los ligandos naturales como gp120 se unen a estos receptores, la unión de uno bloquea la interacción del otro. Se sintetizó una

variante de RANTES (CCL5), denominada aop-RANTES (aminooxipentano); que se une al receptor CCR5 sin activarlo[40]. Al preincubar células que expresan CCR5 con esta variante se bloquea la fusión del VIH. Adicionalmente se han sintetizado varios compuestos que se unen a los receptores de quimiocinas e inhiben la entrada viral. La ausencia de CCR5 no se ha asociado hasta ahora de manera clara con problemas de salud en los individuos $\Delta 32$, por lo que CCR5 es un blanco ideal para el tratamiento del SIDA. La inhibición o el bloqueo de la interacción entre gp120 y los receptores de quimiocinas se ha vuelto una estrategia recurrente en la búsqueda de fármacos o grupos de fármacos para el tratamiento de el SIDA.

2. Mimetismo viral.

Los virus han evolucionado para inhibir o modular la respuesta inmune mediada por quimiocinas. Dentro de los mecanismos que los virus emplean para modificar la respuesta de las quimiocinas se encuentran el secuestro de las quimiocinas y la síntesis de variantes de quimiocinas y receptores [41].

El citomegalovirus humano tiene un gen que codifica para un receptor de quimiocinas. Este receptor, US28, es capaz de unirse a la quimiocina CCL5 (RANTES) y al ser expresado en las células infectadas, secuestra a las quimiocinas evitando la migración de células efectoras, lo que previene una respuesta inflamatoria.

Por otro lado, el γ -herpes virus sintetiza una proteína soluble capaz de unir varias quimiocinas de diferentes familias. Esta unión inactiva las quimiocinas y evita que se unan a sus receptores.

El citomegalovirus humano y murino, el *Herpesvirus saimiri* y algunos poxvirus sintetizan variantes de quimiocinas. Estas quimiocinas bloquean los receptores inhibiendo la activación mediada por sus ligandos endógenos. Todos estos mecanismos le permiten al virus evadir la respuesta inmune mediada por las quimiocinas y les permite establecerse en el organismo.

3. Defensa contra parásitos.

Las quimiocinas participan en la defensa inmune contra diversos parásitos. Esta participación incluye el reclutamiento de células del sistema inmune a sitios de infección, los procesos de diferenciación TH1/TH2, efectos directos de las quimiocinas sobre los parásitos y la penetración celular mediada por los receptores de quimiocinas [42].

En enfermedades causadas por parásitos como *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* y otros, las quimiocinas participan mediante el reclutamiento de leucocitos y su activación. Algunas células del hospedero secretan quimiocinas en respuesta a la infección de estos patógenos, lo que permite la migración de células a los sitios de infección para desarrollar una respuesta inmune eficiente.

Por otro lado, la secreción de quimiocinas en algunas infecciones (como la causada por *Leishmania donovani*) promueve la polarización de linfocitos T en TH1 o TH2. Esta polarización se requiere para eliminar de manera eficiente a los patógenos.

Los receptores de quimiocinas participan en la entrada de algunos patógenos al interior de la célula. El receptor de quimiocinas DARC, conocido como antígeno Duffy; permite la entrada de *Plasmodium vivax*, causante de la malaria. Existen individuos que carecen de este receptor de quimiocinas y son resistentes a la infección por este parásito.

vi. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial caracterizada por la formación de placas o ateromas en los vasos sanguíneos. Un modelo generado para explicar este proceso sugiere que estas placas son formadas en respuesta a daños arteriales debidos a hipercolesterolemia o a estrés de hipertensión. Las células endoteliales o de músculo liso; en respuesta a estas lesiones en la arteria, liberan quimiocinas que atraen monocitos circulantes. Estos monocitos migran a través del endotelio vascular y se diferencian en el espacio subendotelial en macrófagos por la presencia de citocinas inflamatorias tipo TH1, como IFN- γ y

TNF- α . Estos macrófagos internalizan lípidos que encuentran en el espacio subendotelial y dan lugar a las células "foam". Estudios clínicos han demostrado que hay un aumento en la expresión de la quimocina CCL13 (MCP-4), junto con quimiocinas como CCL2 (MCP-1) y CXCL10 (IP-10), que atraen monocitos y células de músculo liso, presentes en estas lesiones. Ratones que sobreexpresan la lipoproteína B desarrollan aterosomas si consumen dietas ricas en lípidos. La eliminación del gen para CCL2 (MCP-1) disminuye las lesiones ateroscleróticas en estos ratones [43]. La eliminación del gen de el receptor CCR2 tiene un efecto similar [44].

vii. Asma.

El asma es una enfermedad crónica de tipo inflamatorio de las vías respiratorias; caracterizada por un infiltrado de células mononucleares, eosinófilos y células cebadas en la submucosa; así como hiperplasia y fibrosis subepitelial[45].

La respuesta asmática puede dividirse en fase temprana y tardía. La fase temprana es una respuesta inmediata a un estímulo antigénico o ambiental que activa a las células cebadas promoviendo la liberación de mediadores pro-inflamatorios. La fase tardía se caracteriza por infiltración de varios tipos celulares al pulmón y dura tiempos largos. Los macrófagos alveolares y las células epiteliales secretan quimiocinas en respuesta a estímulos. Dentro de las quimiocinas secretadas se encuentran CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-2), CCL11 (Eotaxina) y CCL13 (MCP-4) [31, 32, 46, 47]. Estas quimiocinas pueden reclutar eosinófilos mediante su interacción con el receptor CCR3. Durante la fase tardía del proceso asmático participan linfocitos T CD4 cooperadores. Estos linfocitos secretan citocinas que activan otras células y amplifican la respuesta inmune. Los linfocitos que participan en el asma tienen un perfil de citocinas tipo TH2; como IL-4, IL-6 e IL-10 entre otras. Estas citocinas tienen varias funciones; como activación celular, factores de crecimiento para células cebadas, etc.

IV. ANTECEDENTES

La participación de las quimiocinas en las enfermedades y procesos inflamatorios llevaron a estudiar los mecanismos por los cuales actúan estos quimioatrayentes. El objetivo de estos estudios es determinar el mecanismo molecular de la interacción quimiocina-receptor. Una de estas interrogantes es el cómo la quimiocina se une y activa a su receptor. La modulación de la actividad y expresión de las quimiocinas y sus receptores es un objetivo claro para el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorio, cáncer y SIDA. La síntesis racional de compuestos de alta afinidad que bloquean la unión de la quimiocina con su receptor requiere la determinación a alta resolución de la estructura de estas proteínas.

Las quimiocinas son capaces de formar dímeros y otros multímeros en solución a altas concentraciones. Para determinar si las quimiocinas requieren actuar en forma dimérica o si los monómeros de las quimiocinas son capaces de activar a los receptores se generaron varias mutantes en la interfase del dímero de la quimiocina CCL2 (MCP-1). Una de estas mutantes, en la cual se sustituyó el aminoácido prolina de la posición 8 por alanina (P8A) no formó dímeros en solución, y fue capaz de inducir todas las respuestas funcionales de CCL2 silvestre, lo que indica que la dimerización no es necesaria para la actividad de esta quimiocina [48]. Resultados similares se observaron al usar una proteína de fusión (CCL2 fusionada a fosfatasa alcalina) incapaz de formar dímeros [49]. En la quimiocina CCL4 (MIP-1 β) se probaron mutantes con sustituciones similares, como P8A, las cuales no forman dímeros. Estas mutantes tienen una afinidad por el receptor similar a la quimiocina normal.

Sin embargo, en estudios estructurales se ha determinado que el sitio de unión a proteoglicanos se forma en la interfase de los dímeros de varias quimiocinas (CXCL11, CCL2,) lo que indica que la dimerización es necesaria para esta interacción. La presentación de quimiocinas en forma dimérica por proteoglicanos en la superficie de las células puede ser importante para la

formación de un gradiente estable que las células son capaces de detectar [50]. Esta presentación puede activar al receptor de otra manera, induciendo respuestas que la quimiocina en forma soluble y monomérica no es capaz de inducir.

Asimismo, existe controversia en cuanto a la relevancia de la dimerización de receptores de quimiocinas en su activación. Un grupo de investigación demostró que los receptores de quimiocinas son capaces de formar dímeros después de ser estimulados con quimiocina [51]. Varios receptores de siete dominios transmembranales al activarse se dimerizan, por lo que el mecanismo ya se ha descrito para este tipo de receptores. Asimismo, se ha implicado la activación de la vía de señalización de JAK/STAT en la respuesta a quimiocinas [17]. Esta cinasa requiere que el receptor al que se acopla se encuentre en forma dimérica para poder activarse. La participación de esta vía parece ser crítica para la función de los receptores de quimiocinas, ya que la inhibición de cinasas de la familia JAK afecta la respuesta a varias quimiocinas [52]. Por otro lado, en estudios de transferencia de energía usando quimeras del receptor CCR2 acopladas a proteína verde fluorescente se demostró que este receptor se encuentra formando constitutivamente dímeros u oligómeros. Al adicionar quimiocina no se observó cambio alguno en el estado de dimerización [53].

En un estudio con las quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) y CCL3 (MIP-1 α) [54] se encontró que el extremo amino del receptor de MCP-1 es encargado de unir a esta quimiocina, sin embargo se requiere la presencia de las asas intracelulares de su receptor para la activación, lo que llevó a postular un modelo de activación del receptor en 2 pasos, en el cual la quimiocina se une primero al extremo amino-terminal del receptor. Esta unión por sí sola no es capaz de activar el receptor, sino que tiene por objeto aproximar regiones de la quimiocina al receptor, en particular el extremo amino terminal. Posteriormente el extremo amino flexible de la quimiocina interacciona con el centro del receptor formado por las asas extracelulares, lo que activa al receptor (Figura 5).

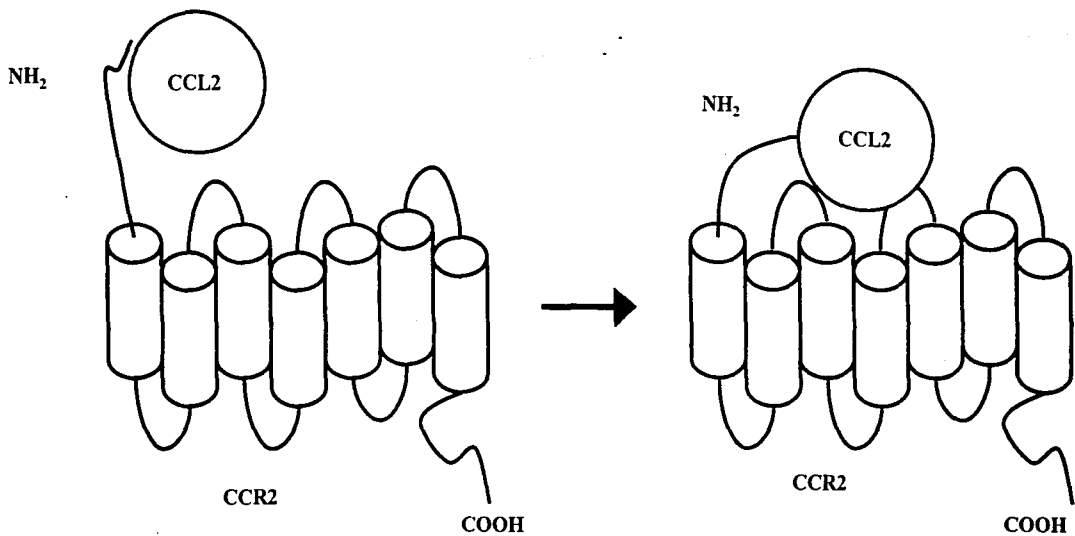


Figura 5. Activación de los receptores de quimiocinas. Modelo propuesto para la activación de CCR2 mediada por CCL2 (MCP-1). La quimiocina se une al extremo amino del receptor sin activarlo. Posteriormente la quimiocina interacciona con la región central del receptor activándolo. (Adaptado de Charo et al. 1996)

Este modelo fue confirmado posteriormente al estudiar la interacción de la quimiocina CXCL12 con su receptor CXCR4 usando mutantes que podían unirse al receptor CXCR4 sin poder activarlo [55].

Además, al analizar el extremo amino-terminal de las quimiocinas, se determinó que es necesario para la activación del receptor. La quimiocina CXCL8 (IL-8) fue la primera en ser estudiada estructuralmente usando mutantes y proteínas truncadas. En estos estudios se encontró que modificaciones en su extremo amino terminal tenían efectos en su capacidad de activar a sus receptores CXCR1 y 2, ya que variantes de esta quimiocina sin los 4 o 6 primeros aminoácidos pierden la capacidad de inducir quimiotaxis y estallido respiratorio [56, 57].

In vivo, uno de los mecanismos que pudiera estar participando en la generación de proteínas inactivas sería a través de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs). Estas proteasas son capaces de cortar a las quimiocinas de varias maneras. Por ejemplo, la quimiocina CCL13 es cortada en el residuo de aminoácido no. 8, generando una proteína truncada que es capaz de unirse a su receptor CCR2 sin activarlo, por lo que esta proteína truncada actúa como un antagonista [6]. Esta inactivación puede funcionar como un mecanismo de regulación de la actividad de esta quimiocina.

Durante la caracterización inicial de la quimiocina CCL13 se generó una proteína recombinante que contenía una cola de histidinas en el extremo amino terminal para su purificación con columnas de afinidad. La proteína con la cola de histidinas mostró muy poca actividad comparada con la quimiocina silvestre. El corte de esta cola utilizando el factor Xa restituyó la actividad de CCL13. Esto indica que la adición o la eliminación de residuos de aminoácido en el extremo amino tiene un efecto pronunciado en la actividad de las quimiocinas [26]. Sin embargo, como se mencionó antes, no todas las modificaciones abaten la actividad de estos quimioatrayentes, ya que la eliminación de 7 residuos aminoácido de CXCL8 (IL-8) da lugar a una quimiocina 10 veces más potente [7].

Estas diferencias sugieren que la actividad de las metaloproteasas es un proceso selectivo, con efectos variados de modulación de la actividad de las quimiocinas.

En estudios de la quimiocina CXCL12 (SDF-1) se demostró que péptidos sintéticos correspondientes a los 9 primeros residuos de aminoácido tenían la actividad de la quimiocina completa (quimiotaxis y flujo de calcio), aunque 100 veces menos potente. Dichos péptidos competían con CXCL12 por el receptor CXCR4 y lograban activar a las células T utilizadas [58]. La dimerización química de estos péptidos aumentaba la afinidad por el receptor. Por otro lado, la sustitución de un sólo aminoácido (P2G) abría por completo la actividad del péptido (Figura 6).

Los péptidos generados a partir de quimiocinas no son siempre agonistas. Estudios realizados con péptidos basados en la quimiocina CCL2 identificaron un péptido con actividad antagonista. Este péptido, cuya secuencia corresponde a los aminoácidos 51-62 de CCL2; es capaz de bloquear la actividad de varias quimiocinas, compitiendo por sus receptores [59].

Para determinar los aminoácidos de la quimiocina encargados de unirse y activar al receptor se realizó un estudio sobre la quimiocina CCL2 (MCP-1) donde se demostró que las mutaciones puntuales en los aminoácidos Y13, R24, K35, K49 y H66 cambiados por alanina disminuyen la unión a su receptor CCR2 [60]. La posición de estos residuos de aminoácido sugiere que la región de la quimiocina encargada de unirse al receptor está distribuida a lo largo de la proteína, y consiste principalmente de aminoácidos básicos. El arreglo espacial de estos aminoácidos forma un surco básico en la proteína, que contacta al extremo amino-terminal del receptor CCR2 (Figura 7).

Adicionalmente, varias mutaciones tienen efecto sobre la quimiotaxis y el flujo de calcio mediados por CCL2 [61]. La eliminación del extremo amino terminal elimina la actividad de la quimiocina. La sustitución de la tirosina Y13 por una alanina genera una quimiocina incapaz de formar dímeros y una afinidad muy baja por su receptor CCR2. La capacidad de CCL2 para inducir flujo de calcio disminuye 43 veces en la mutación Y13A. Esta disminución en flujo de calcio se explica por la baja afinidad que tiene esta variante por el receptor. Sin embargo, la

mutante no es capaz de inducir quimiotaxis a concentraciones de hasta 100 μ M, lo cual no es explicable por la afinidad de la mutante por CCR2, lo que implica que Y13 es más importante para la activación de quimiotaxis que para flujo de calcio (Figura 8).

Se han comparado las estructuras tridimensionales de las quimiocinas CCL11(Eotaxina), CCL7 (MCP-3) y CCL5 (RANTES) buscando los residuos de aminoácido conservados entre estas quimiocinas que les permiten unirse y activar al receptor CCR3 [62]. En este estudio se identificaron 3 residuos conservados, un aminoácido hidrofóbico grande (F o Y) en la posición 11, 12 o 13, un aminoácido básico (K o H) en la posición 33 o 35 y una prolina en la posición 2, que podrían conferir la capacidad de unirse y activar a CCR3

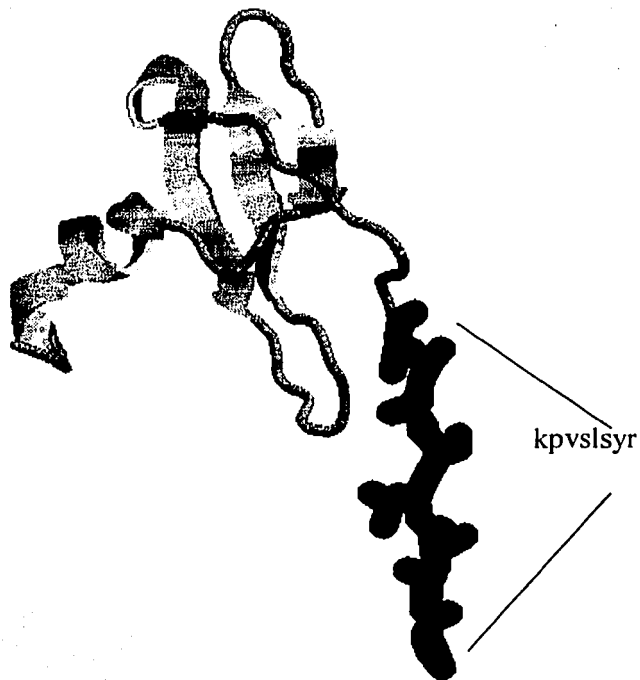


Figura 6. Localización del péptido agonista de CXCL12 en la estructura de la quimiocina. La posición del péptido se señala en color rojo, con su secuencia a un lado. En azul se señala el aminoácido prolina 2, esencial para la actividad de este péptido.

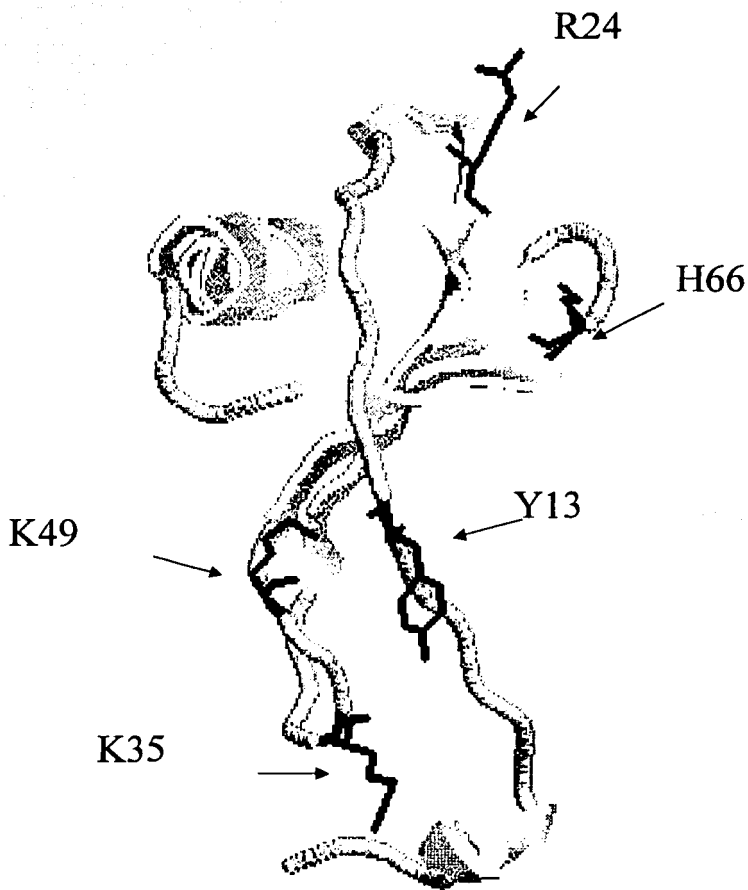


Figura 7. Localización de los aminoácidos de la quimiocina CCL2 que participan en la unión con su receptor CCR2. Los aminoácidos se señalan en rojo.

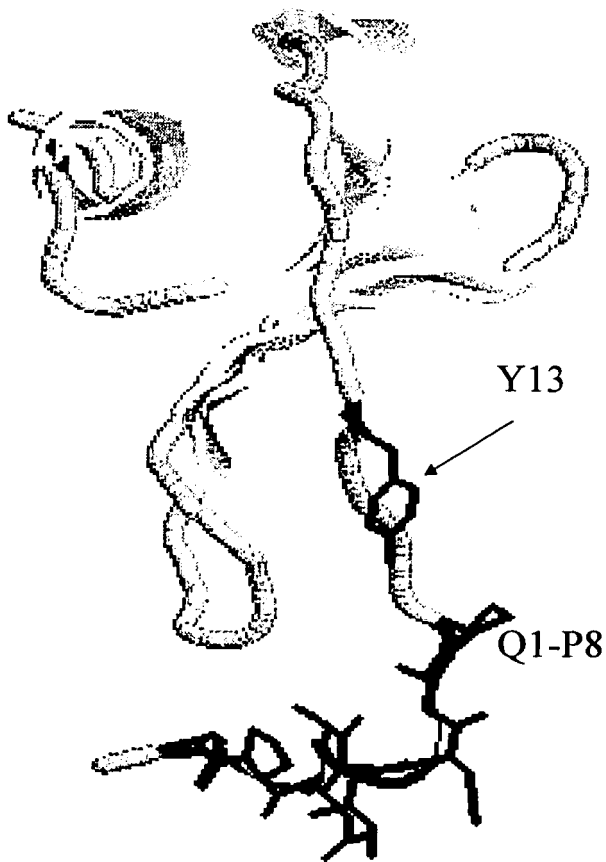


Figura 8. Localización de los aminoácidos de la quimiocina CCL2 que participan en la activación de CCR2. Los aminoácidos se señalan en rojo.

V. JUSTIFICACIÓN.

El mecanismo de unión de las quimiocinas con sus receptores aún no se ha entendido por completo. El extremo amino terminal de las quimiocinas ha sido implicado en los procesos de activación del receptor, y en al menos un caso (CXCL12) se ha demostrado que es suficiente para inducir quimotaxis. Sin embargo, las diferentes regiones de las quimiocinas implicadas en la unión de cada uno de los receptores y en la activación de cada vía de señalización no se conocen.

Aún no se ha explorado la posibilidad de que, en el caso de quimiocinas con múltiples receptores; la quimiocina interactúe con cada uno de sus receptores de manera diferente, activando vías de señalización dependiendo del receptor.

La quimiocina CCL13 actúa a través de los receptores CCR1, CCR2 Y CCR3. Las regiones de CCL13 involucradas en la unión y activación de dichos receptores no han sido determinadas. La identificación de los aminoácidos involucrados en cada uno de estos procesos nos ayudaría a entender mejor el mecanismo de interacción de esta quimiocina con sus receptores, determinaría las regiones que confieren especificidad por dichos receptores, e identificaría regiones blanco para la síntesis de agonistas y antagonistas peptídicos y no-peptídicos.

La identificación de los aminoácidos involucrados en la activación de los diferentes receptores y la determinación de diferencias entre la unión y la activación de cada receptor por CCL13 nos permitirá explicar en parte la aparente redundancia del sistema de funcionamiento de CCL13 sobre sus diferentes receptores.

Adicionalmente, el hallazgo de la expresión de la quimiocina CCL13 en enfermedades inflamatorias como asma y aterosclerosis nos sugiere la importancia de esta quimiocina como efectora, dado el papel central que juegan las células atraídas en estos procesos inflamatorios. El conocimiento generado a partir de estudios sobre el mecanismo de acción de esta quimiocina permitiría

diseñar terapias antiinflamatorias alternativas, que serían importantes para el tratamiento de estas enfermedades.

VI. HIPÓTESIS

La quimiocina CCL13 presenta regiones que pueden participar en diferentes respuestas funcionales tales como quimiotaxis, flujo de calcio y desgranulación. Las secuencias contenidas en estas regiones pueden activar de manera independiente a los receptores.

Esto permitiría inducir o inhibir diferencialmente las respuestas generadas por esta quimiocina.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar los aminoácidos de CCL13 involucrados en la activación diferencial de receptores a través del uso de péptidos sintéticos derivados de su secuencia primaria

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinación de actividad agonista:

Determinar si péptidos sintéticos derivados de CCL13 son capaces de inducir respuestas funcionales, tales como quimiotaxis y flujo de calcio en células monocíticas

2) Determinación de actividad antagonista:

Determinar si los péptidos son capaces bloquear la actividad de CCL13 a través de la ocupación de sus receptores.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Materiales.

i. Péptidos sintéticos

Se usaron péptidos sintetizados en fase sólida con secuencia basada en CCL13 (Peptide Synthesis Unit. MGH, Boston) (Tabla 3).

Los péptidos se resuspendieron en PBS a una concentración de 50 mg/ml y se guardaron a -20° . Se preparó una alícuota con una concentración de 200 ng/ μ l en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2mM, pH 7) y se guardó a 4° para su uso.

Péptido	Aminoácidos	Secuencia	Punto isoeléctrico/P.M.
1	1-18	QPDALNVPSTCCFTFSSK	5.82 / 1945.19
2	19-38	KISLQRLKSYVITTSRCPQK	10.46 / 2349.82
3	39-57	AVIFRTKLGKEICADPKEK	9.12 / 2146.58
4	58-75	WVQNYMKHLGRKAHTLKT	10.46 / 2211.62
8	9-29	STCCFTFSSKISLQRLKSYV	9.70 / 2426.87
9	24-43	RLKSYVITTSRCPQKAVIFR	11.01 / 2366.85
10	48-67	KEICADPKEKWVQNYMKHLG	8.15 / 2417.83

Tabla 3. Secuencia de los péptidos sintéticos. Se muestra el número de aminoácidos correspondientes a la quimlocina CCL13, su secuencia, peso molecular (P.M.) y punto isoeléctrico determinado teóricamente.

ii. Células

Se usó una línea celular de monocitos humanos THP-1(ATCC; TIB-202). Esta línea se mantuvo en cultivo usando medio RPMI (Gibco #31800-022) suplementado con suero fetal bovino al 10%, suplementado con piruvato de sodio 1mM, 2mM penicilina/streptomcina, aminoácidos no-esenciales (0.1 mM), y β -2

mercaptoetanol (0.05 mM). Estas células se mantuvieron a una densidad de 0.2 a 0.8 millones por mililitro a 37°C con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

iii. Quimiocinas

La quimiocina liofilizada (Peprotech #300-24) se disuelve en agua desionizada estéril a una concentración de 1 miligramo por mililitro. A partir de esta solución se hacen diluciones en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (GIBCO # 14170-112) sin calcio ni magnesio; suplementando con albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA# A-1933) libre de endotoxinas a una concentración final de 0.5 gramos por litro. Se prepararon concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 nanogramos por mililitro de quimiocina. Antes de los ensayos la quimiocina se incubó 15 minutos a una temperatura de 37°C para desgasificar.

iv. Toxina Pertussis

La toxina pertussis (SIGMA# P-7208) se disuelve en agua desionizada estéril a una concentración de 200 ng/μl y se mantiene a 4°C. Para inhibir las respuestas mediadas por proteínas G, las células se incuban durante 2 horas a 37°C con la toxina a una concentración de 200 ng/ml.

b. Métodos

i. Quimiotaxis

Para determinar el efecto de la quimiocina y los péptidos sobre la migración de células se usan ensayos de quimiotaxis. Células cultivadas a una concentración de 5 millones por mililitro son marcadas incubando 15 minutos a 37°C con el fluoróforo calceína-AM a una concentración de 0.5 μM. Las células se lavan 2 veces centrifugando a 1000 rpm por 4 minutos en una minicentrífuga Beckman y descartando el medio. En los ensayos de inhibición las células son preincubadas con la molécula a probar durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Los quimioatrayentes se cargan en la parte inferior de una cámara modificada de Boyden (Neuroprobe AP48). En la parte intermedia se utilizó una

membrana de policarbonato con poros de 5 micras (Neuroprobe PFD5). Las células marcadas resuspendidas en HBSS con calcio y magnesio (GIBCO# 14025076) se cargan en la parte superior de la cámara y se deja a una temperatura de 37°C durante 1 ½ horas.

Después del tiempo de incubación se desarma la cámara y se raspan las células que no migraron con un scrapper (Neuroprobe# P48AP) lavando con PBS. La membrana se deja secar al aire y se fija con una solución de metanol. Para cuantificar las células que migraron se usó un detector de fluorescencia (FX, Biorad)

ii. Flujo de Calcio

Espectrofluorómetro

En los ensayos de flujo de calcio las células son resuspendidas a una densidad de 10 millones por mililitro en RPMI con suero al 2%. Para marcar las células se utiliza el fluoróforo Fura 2-AM (Molecular Probes# F-1221) a una concentración de 5 μ M. Las células son incubadas durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente las células se lavan centrifugando 5 minutos a 1000 rpm en una minicentrífuga Beckman y descartando el medio. Las células se resuspenden en buffer de flujo de calcio (KCl 4mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.8 mM, Glucosa al 0.39%, NaPO₄ 0.13% y 25 mM de HEPES) y se mantienen en hielo antes de usarse. Para las mediciones se usa un espectrofluorómetro AB2 de Thermo Spectronic, usando excitaciones a una longitud de onda de 340 y 380 nm y midiendo su emisión a 510 nm, con lecturas cada 0.5 segundos. La relación entre estas 2 lecturas es graficada como respuesta de liberación de calcio. Durante los experimentos se mantienen las células en agitación con un agitador magnético a una temperatura de 37°.

Citómetro de flujo

Las células a una densidad de 10 millones por mililitro son incubadas con una solución con 6 μ g/ml Fura-Red (Molecular Probes# F-3021), 10 μ g/ml Fluo-3 (Molecular Probes# F-1242), ácido plurónico (Molecular Probes# P-6867) al 0.1%

en RPMI libre de suero durante 45 min a 37°C en oscuridad. Posteriormente las células son lavadas con RPMI dos veces centrifugando a 1,500 rpm durante 5 min. Las células se incuban 45 min en RPMI sin suero a temperatura ambiente para equilibrar. Posteriormente se lavan 2 veces centrifugando a 1,500 rpm durante 5 min. Las células se conservan a 4°C en RPMI hasta que son utilizadas en el citómetro (Becton and Dickinson). Para adquirir las células en el citómetro se diluyen en 1 ml de RPMI sin suero a una densidad final de 1.6×10^6 células por ml. Las células se mantienen a 37°C usando un baño. Los resultados se grafican calculando la relación entre las 2 fluorescencias con respecto al tiempo utilizando el software Facsassistant (Becton and Dickinson).

IX. RESULTADOS

Actividad agonista de los péptidos sintéticos.

Inducción de quimiotaxis.

Para identificar los residuos de CCL13 involucrados en su actividad se sintetizaron péptidos con un tamaño de entre 18 y 20 residuos de aminoácido con la secuencia de CCL13.

Para determinar la funcionalidad de los péptidos sintéticos 1-4 en quimiotaxis, se usaron diferentes concentraciones de péptido como quimioatrayente de células THP-1. Estas células expresan 2 de los receptores de CCL13: CCR1 y CCR2. Se comparó su actividad con la quimiocina CCL13 y como blanco se empleó HBSS con 0.05% BSA (Figura 9).

La quimiocina CCL13 indujo quimiotaxis con un pico de actividad a los 100 ng/ml. En esta concentración se ha reportado el pico de actividad de CCL13 en células mononucleares [26].

Los resultados muestran que los péptidos 1 (1-18), 2 (19-38), 3 (39-57) y 4 (58-75) no fueron capaces de inducir quimiotaxis en las células THP-1, aún usando concentraciones 100 veces mayores a las que la quimiocina completa tiene su pico de actividad (10,000 ng/ml vs 100 ng/ml).

Para excluir la posibilidad de que el péptido 1 (1-18) (correspondiente al extremo amino terminal de la quimiocina) tuviera una afinidad baja por los receptores de CCL13 y por lo tanto requiera más concentración para inducir quimiotaxis, se usaron concentraciones mayores de este péptido, desde 50 hasta 500,000 ng/ml (Figura 10). Sin embargo, el péptido 1 no fue capaz de inducir quimiotaxis de las células THP-1 a ninguna de estas concentraciones.

Cabe mencionar que, tanto en este experimento como en los siguientes, se obtuvieron variaciones en la actividad quimioatrayente de CCL13. Estas variaciones se atribuyen al estado de los cultivos celulares y al tiempo de vida de la quimiocina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

44

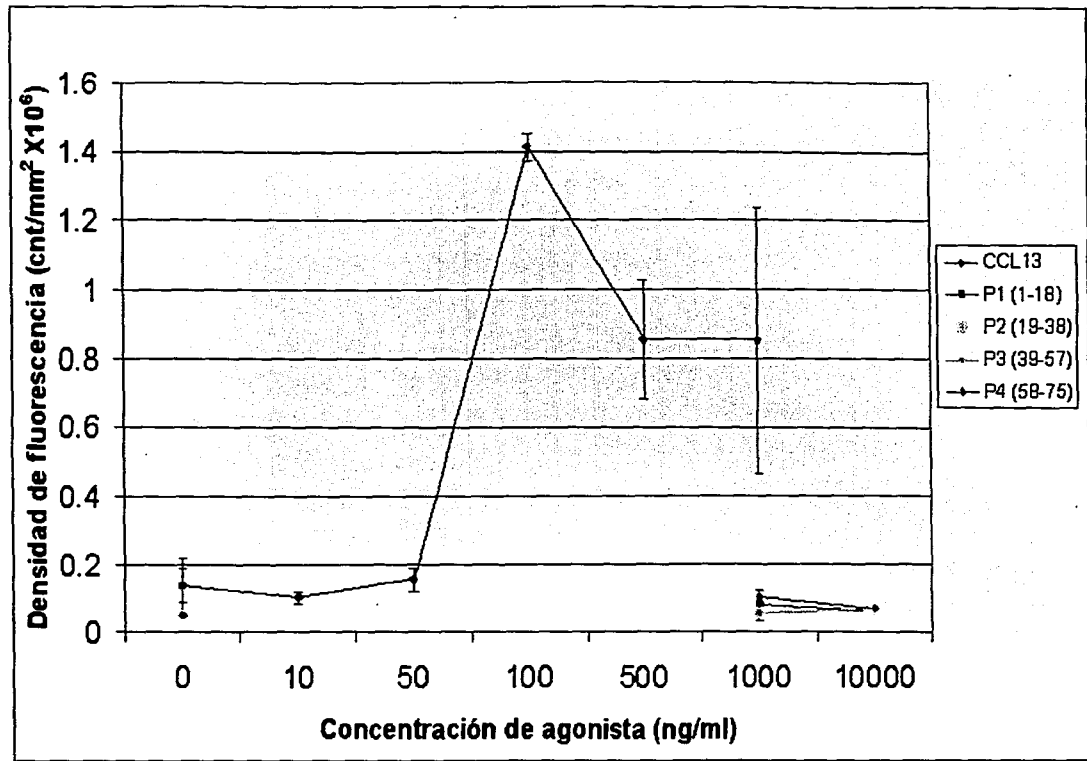


Figura 9. Actividad quimiotáctica de los péptidos sintéticos 1-4 de CCL13 en células THP-1. Para comparar se usó la quimiocina completa. Los resultados se muestran como promedio de duplicados +/- error estandar, de la fluoescencia medida en el FX. Este resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
4/5

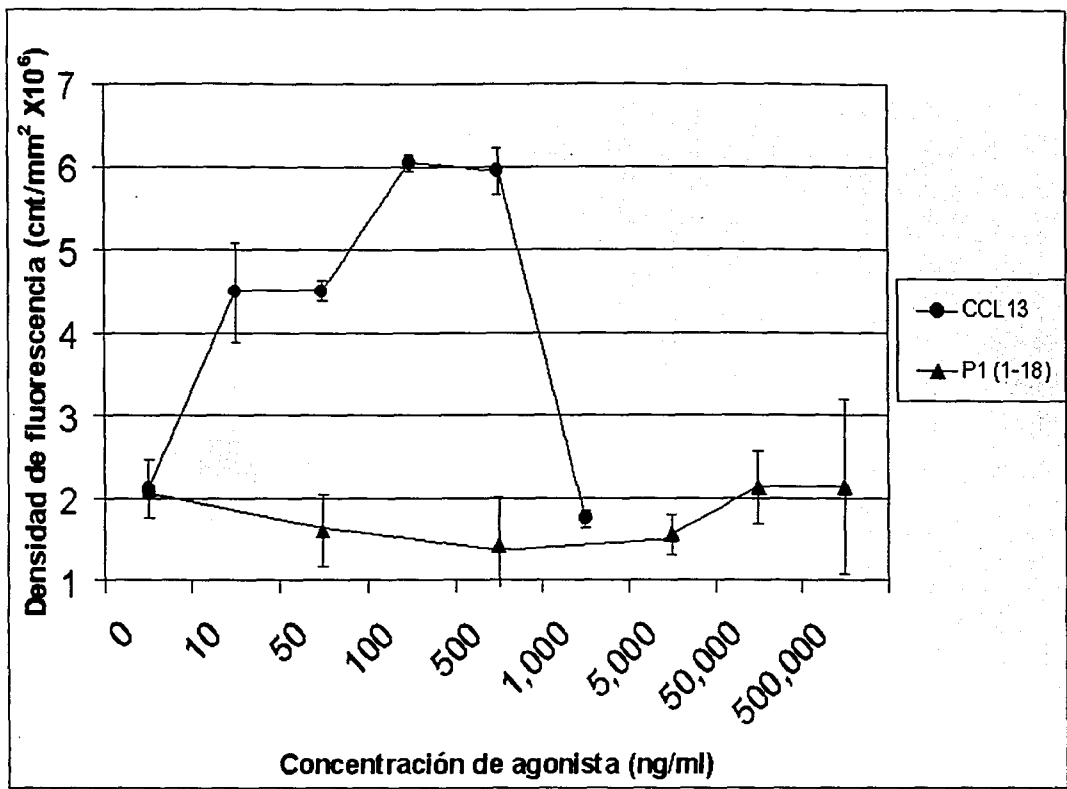


Figura 10. Quimiotaxis de células THP-1 contra el péptido 1. Se usaron concentraciones crecientes del péptido 1 y de la quimiocina CCL13 para comparar. Los resultados se muestran como promedio de duplicados +/- error estandar, de la fluorescencia medida en el FX. Este resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

Para determinar si los péptidos 8-10 (que sobrelapan la secuencia de los péptidos 1-4) tienen actividad quimioatrayente, se probaron en ensayos de quimiotaxis con las condiciones empleadas anteriormente. El péptido 8 (9-29) tuvo una discreta actividad quimioatrayente sobre estas células (150,000 unidades de densidad sobre el blanco, contra 500,000 usando CCL13), mientras que los péptidos 9 (24-43) y 10 (48-67) no mostraron actividad (Figura 11).

Al comparar las actividades quimioatrayentes de los péptidos 1 (1-18) y 8 (9-29) en ensayos de quimiotaxis, se observó que el péptido 8 (9-29) generó una respuesta quimiotáctica (500,000 arriba del blanco, contra 2,100,000 usando CCL13), mientras que el péptido 1 (1-18) no (Figura 12).

El mecanismo de acción del péptido 8 (9-29) puede ser mediante la activación de receptores de quimiocinas, o mediante un aumento general de la movilidad celular (quimioinesis). Para determinar si la migración inducida por el péptido 8 (9-29) es inducida a través de un receptor acoplado a proteínas G_{ai} se incubaron células THP-1 con toxina pertussis durante 2 horas antes del ensayo (Figura 13). La migración inducida tanto por CCL13 como por el péptido 8 (9-29) fue inhibida con la toxina. Esto demuestra que la respuesta quimiotáctica observada en respuesta a el péptido 8 (9-29) es inducida a través de la activación de receptores acoplados a proteína G ya que fue sensible a inactivación por la toxina pertussis

Inducción de Flujo de Calcio

Estos ensayos se realizaron utilizando el citómetro de flujo (FACS). El flujo de calcio se calculó usando la relación entre la fluorescencia emitida por el Fura red y el Fluo 3. En estos experimentos se adicionaron los péptidos 1 (1-18), 2 (19-38), 3 (39-57) y 4(58-75) a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ a las células THP-1. Para comparar el flujo de calcio se empleó la quimiocina CCL13 a una concentración de 1000 ng/ml . Los péptidos no indujeron un flujo de calcio detectable a estas concentraciones. En este ensayo la quimiocina mostró una inducción de flujo de calcio moderada (Figura 14).

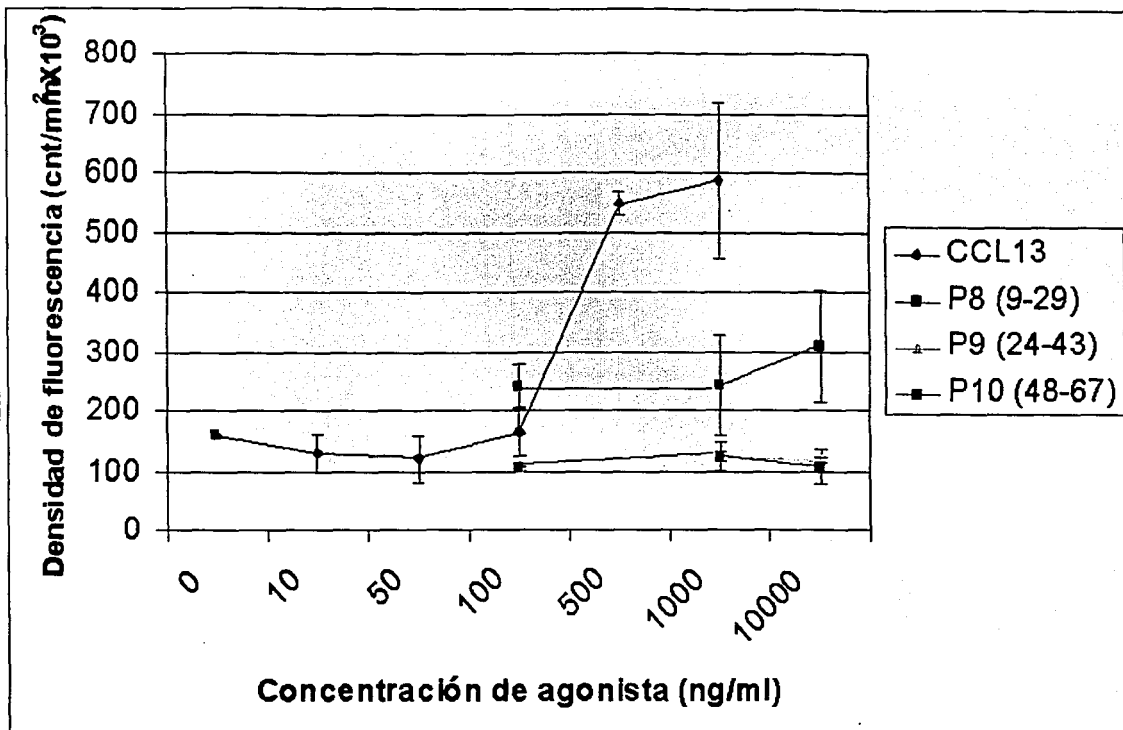
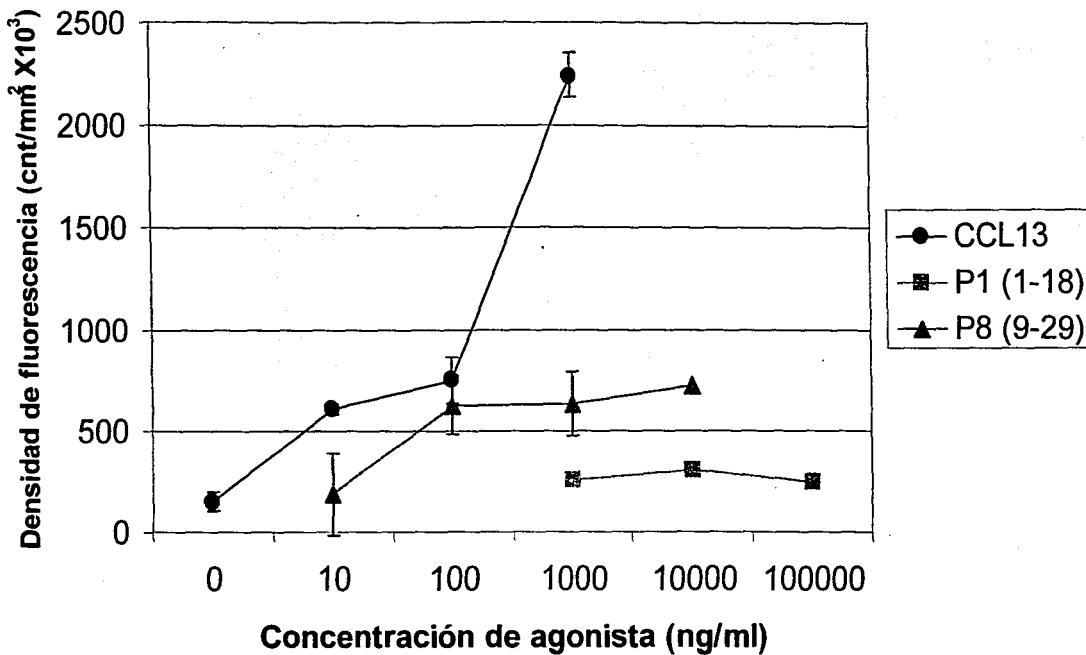


Figura 11. Actividad quimiotáctica de los péptidos 8-10 de CCL13 en células THP-1. Para comparar se usó la quimiocina completa. Los resultados se muestran como promedio de duplicados +/- error estándar, de la fluorescencia medida en el FX. Este resultado es representativo de 3 experimentos independientes.



TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

48

Figura 12. Capacidad de los péptidos 1 y 8 de CCL13 para inducir quimiotaxis en células THP-1. Los resultados se muestran como promedio de duplicados +/- error estandar, de la fluorescencia medida en el FX. Este resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

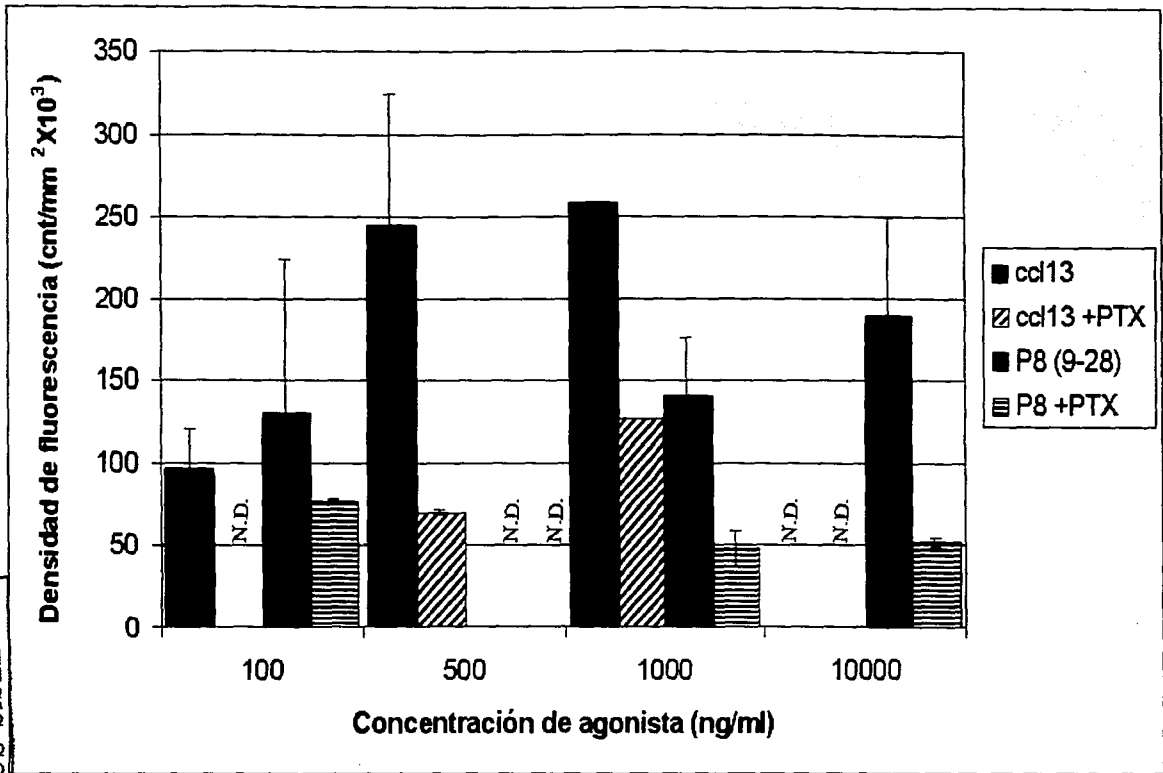


Figura 13. Inhibición de quimiotaxis. Las células THP-1 fueron preincubadas con toxina pertussis (200 ng/ml) durante 2 horas antes de usarlas en los ensayos de quimiotaxis con el péptido 8 y la quimiocina CCL13. N.D.= No determinado.

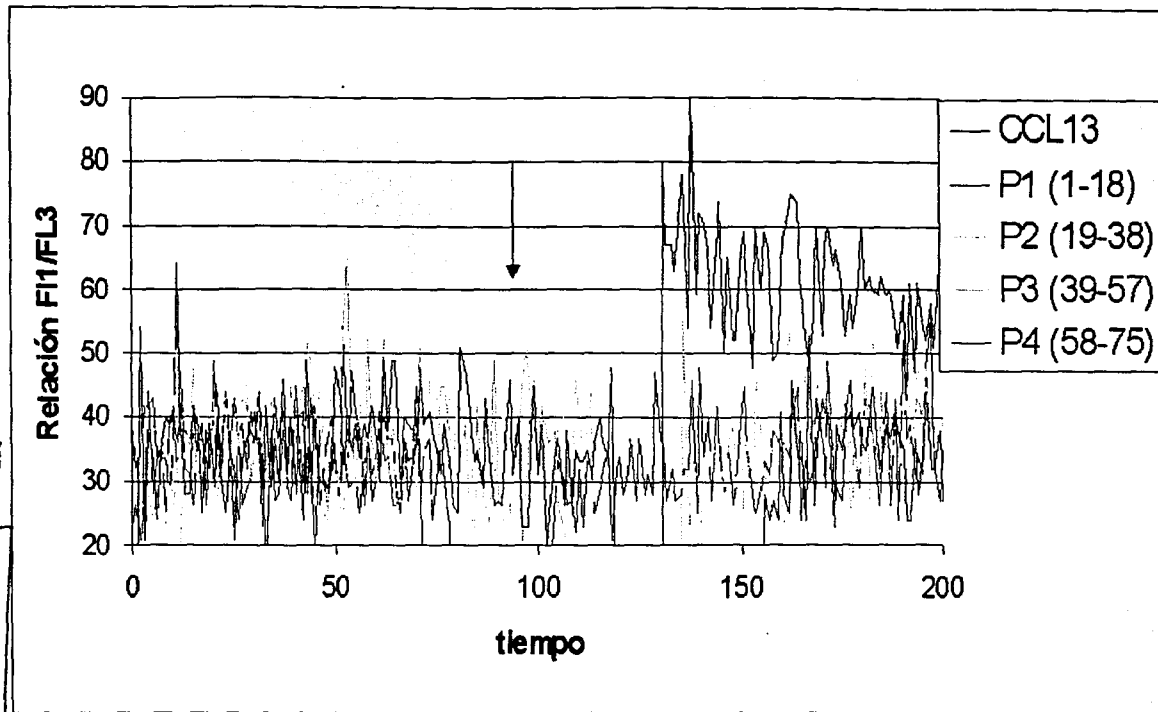


Figura 14. Inducción de flujo de calcio. Las células THP-1 fueron estimuladas con los péptidos 1-4 ($2 \mu\text{g/ml}$) o con la quimiocina completa ($1 \mu\text{g/ml}$) en el tiempo indicado por la flecha. El flujo de calcio es medido con el citómetro (FACS) Este resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Actividad antagonista.

Inhibición de quimiotaxis en células THP-1

Para determinar si el péptido 1 es capaz de unirse al receptor sin activarlo, ocupando el receptor y antagonizando con la actividad de la quimiocina completa, se realizaron ensayos de inhibición de quimiotaxis preincubando las células con los péptidos y con la quimiocina CCL13. Posteriormente estas células se analizaron en ensayos de quimiotaxis, usando una sola concentración de CCL13 (500 ng/ml).

Para determinar el tiempo óptimo de incubación con estos péptidos se hizo una cinética, en la cual se usó una sola concentración (2 $\mu\text{g/ml}$) del péptido 1 (1-18) variando el tiempo (10-60 min) en el que las células fueron incubadas a una temperatura de 37°C (Figura 15).

La quimiocina CCL13, al ser capaz de unirse a los receptores CCR1 y CCR2, inhibió la migración de las células hacia sí misma.

Los resultados mostraron que a tiempos cortos (10 min), el péptido 1 (1-18) fue capaz de disminuir la quimiotaxis inducida por CCL13, sin embargo a tiempos más largos no se observó este efecto. Esto se puede deber a que la unión del péptido con los receptores y su posterior internalización permitiría el reciclamiento de los mismos.

Estos resultados implican que los tiempos de incubación son críticos para observar los efectos que estos péptidos puedan tener, por lo que se decidió realizar los ensayos de inhibición usando una temperatura de 4°C para incubar los péptidos con las células para evitar variaciones. Esta temperatura permitiría la unión pero no la internalización de los péptidos. Asimismo, se decidió usar un tiempo de incubación de 15 min.

Para determinar si el efecto inhibitorio del péptido 1 (1-18) es dependiente de concentración, y si otros péptidos de la quimiocina son capaces de inhibir la quimiotaxis mediada por CCL13, se usaron diferentes concentraciones del péptido 1 y el péptido 4 (58-75). Adicionalmente se empleó un péptido irrelevante (de lisozima, 11 aminoácidos. Peso molecular 1254.) como control negativo (Figura

16). El péptido 1 (1-18) fue capaz de disminuir la quimiotaxis contra CCL13 después de ser incubado con las células THP-1. Este efecto aumenta al aumentar la concentración del péptido. No se observó este efecto inhibitorio al utilizar el péptido 4 (58-75) ni con el péptido irrelevante (px).

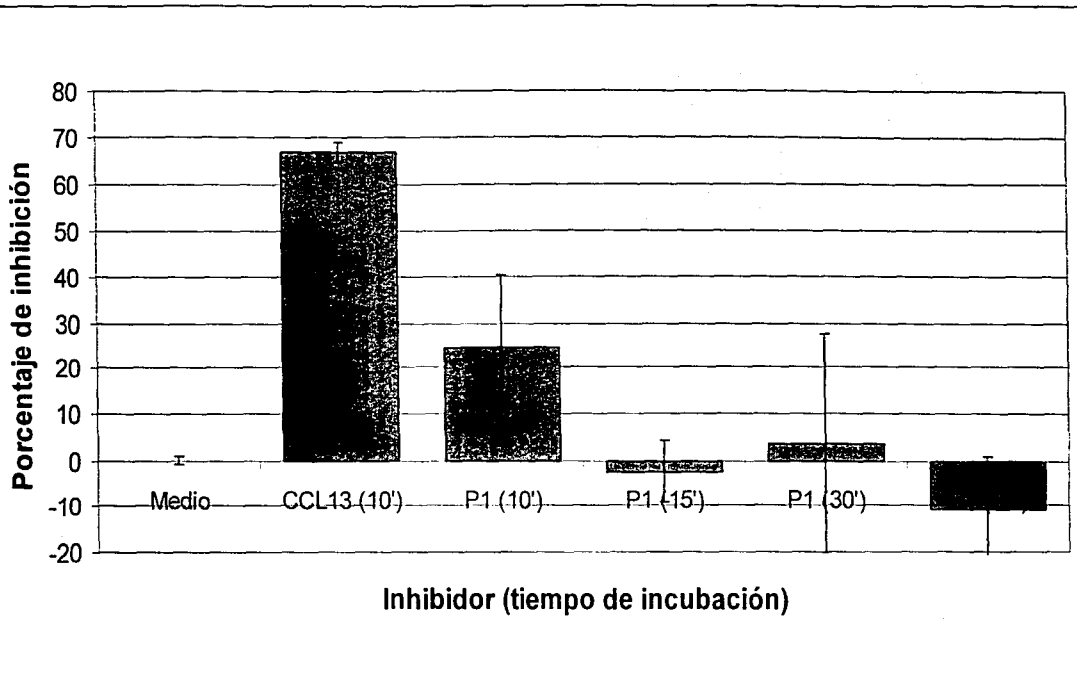


Figura 15. Inhibición de quimiotaxis. Las células THP-1 fueron preincubadas con CCL13 (1 $\mu\text{g/ml}$) y el péptido 1 (2 $\mu\text{g/ml}$) durante diferentes tiempos antes de usarlas en un ensayo de quimiotaxis con la quimiocina CCL13 (500 ng/ml). Los resultados se grafican como el porcentaje de inhibición de la quimiotaxis inducida por CCL13 \pm error estándar. Este resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

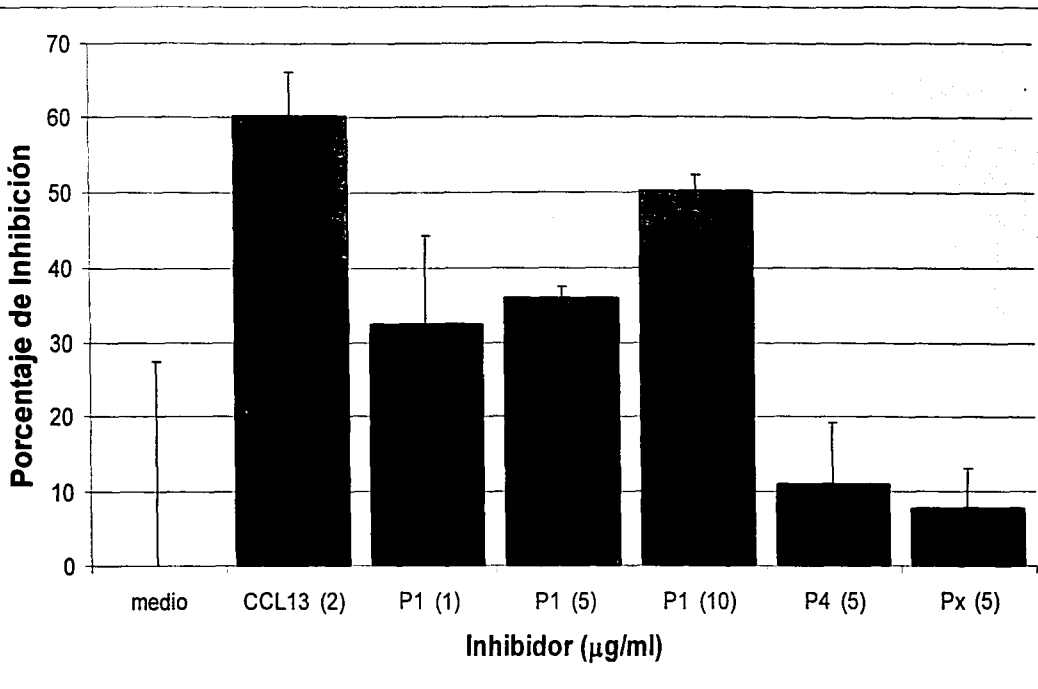


Figura 16. Inhibición de quimiotaxis. Las células THP-1 fueron preincubadas durante 15 minutos a 4° con CCL13, el péptido irrelevante de lisozima (px), el péptido 4 y el péptido 1 a diferentes concentraciones, antes de usarlas en un ensayo de quimiotaxis con la quimiocina CCL13 (500 ng/ml). Los resultados se grafican como el porcentaje de inhibición de la quimiotaxis inducida por CCL13 +/- error estandar. Este resultado es representativo de 5 experimentos independientes.

Inhibición de flujo de calcio.

La capacidad del péptido 1 para bloquear la quimiotaxis no necesariamente implica que otras respuestas mediadas por CCL13 se bloquean [61].

Para determinar si los péptidos 1 (1-18), 2 (19-38), 3 (39-57) y 4 (58-75) eran capaces de bloquear el flujo de calcio inducido por CCL13, se midió la respuesta de flujo de calcio en el espectrofluorómetro. Se agregaron los péptidos a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ a las células THP-1. La quimiocina fue adicionada a una concentración de 1000 ng/ml 60 segundos después de la adición de los péptidos. Ninguno de los péptidos logró inhibir de manera detectable el flujo de calcio en respuesta a CCL13 (Figura 17).

Para confirmar que el péptido 1 (1-18) y el 4 (58-75) no pueden bloquear el flujo de calcio inducido por CCL13, se repitió el ensayo anterior utilizando ahora el FACS para medir flujo de calcio. Se adicionó el péptido a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se agregó la quimiocina CCL13 a una concentración de 1000 ng/ml. Finalmente, para comparar la respuesta con otra quimiocina de la subfamilia MCP, se adicionó CCL2 (MCP-1) a una concentración de 100 ng/ml. Los péptidos 1 (1-18) y 4 (58-75) aumentaron ligeramente la respuesta de flujo de calcio inducida por CCL13. Estos péptidos no tuvieron efecto sobre el flujo de calcio inducido por la quimiocina CCL2 (Figura 18).

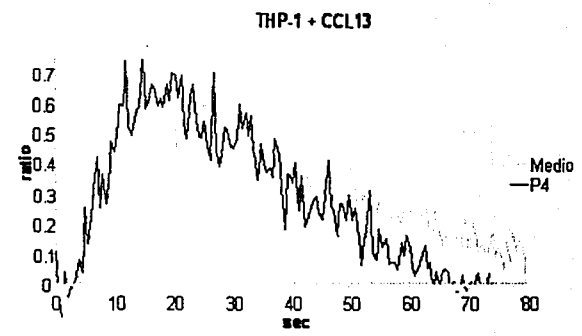
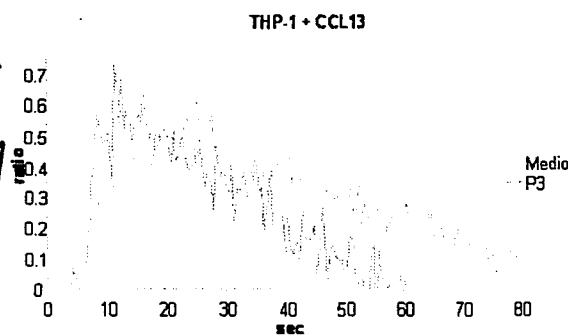
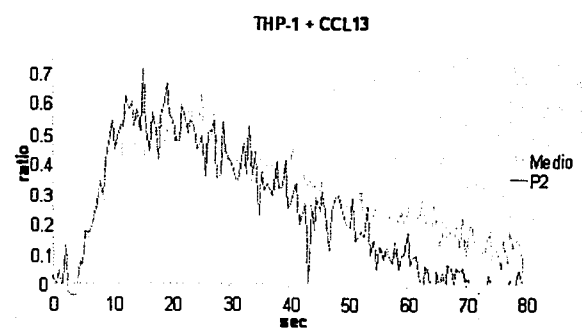
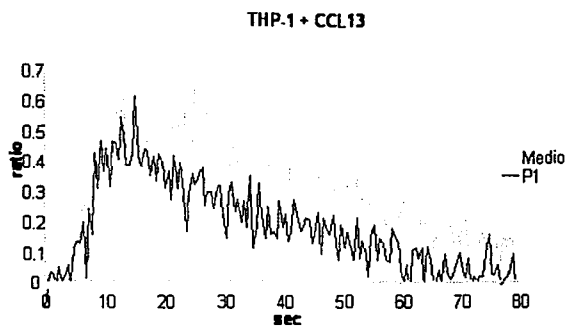


Figura 17. Inhibición del flujo de calcio. La respuesta de flujo de calcio de las células THP-1 fue determinada en el espectrofluorómetro. Los péptidos ($2 \mu\text{g/ml}$) fueron adicionados a las células antes de ponerlas en el lector. La quimiocina CCL13 ($1 \mu\text{g/ml}$) fue adicionada en el tiempo 0. Este resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

56

TESIS CON

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

57

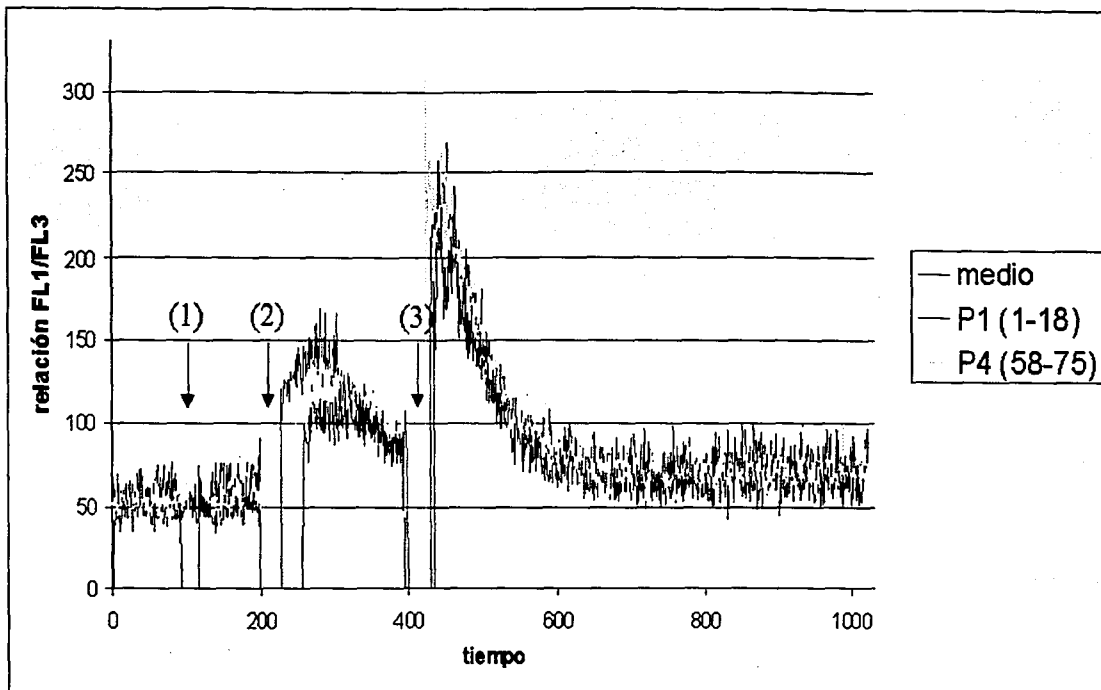


Figura 18. Inhibición del flujo de calcio. La respuesta de flujo de calcio de las células THP-1 fue determinada en el citómetro (FACS). Los péptidos (2 µg/ml) fueron adicionados a las células en el tiempo indicado por (1). La quimiocina CCL13 (1 µg/ml) fue adicionada en (2). Posteriormente se adicionó la quimiocina CCL2 (0.1 µg/ml) en (3). Este resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

X. DISCUSIÓN.

Las regiones de CCL13 requeridas para unirse y activar a cada uno de sus receptores (CCR 1, 2 y 3) no han sido descritas claramente. Se ha reportado que el extremo amino terminal de esta quimiocina se requiere para activar a sus receptores [6]. Como una aproximación inicial se sintetizaron una serie de péptidos con la secuencia de la quimiocina CCL13. Estos péptidos fueron empleados en ensayos funcionales de quimiotaxis y flujo de calcio para determinar si los aminoácidos incluidos en su secuencia son suficientes para unirse y activar a los receptores de CCL13.

Nuestros resultados muestran que el péptido 1 (1-18), correspondiente al extremo amino terminal de la quimiocina CCL13, no tiene actividad agonista ya que no induce quimiotaxis o liberación de flujo de calcio incluso a altas concentraciones. Esta falta de respuesta no se debe a que el péptido tenga una afinidad baja para unirse a los receptores CCR1 y CCR2, ya que a altas concentraciones no se observa actividad.

En este punto cabe mencionar que a pesar de haberse usado concentraciones altas (500 $\mu\text{g/ml}$) del péptido, si los aminoácidos encargados de conferir alta afinidad por los receptores no se encuentran en este péptido; no se detectaría una unión con los receptores, ni una inducción de la actividad.

Para el caso de CCL2 (MCP-1) y su receptor CCR2, se han identificado los residuos Y13, R24, K35, K49 y H66 como aminoácidos requeridos para una unión de alta afinidad. De estos aminoácidos sólo se encuentra en el péptido 1 (1-18) el residuo hidrofóbico F13 (funcionalmente se ha demostrado que Y13 y F13 son intercambiables). Este aminoácido es necesario para la dimerización de la quimiocina, así como para dar una alta afinidad por CCR2. Adicionalmente, la mutación de este aminoácido abate la respuesta quimioatrayente [60,61].

Este antecedente sugiere que el péptido 1 (1-18) no es capaz de unirse con suficiente afinidad para activar a CCR1 o CCR2. Esto implica que se requiere la presencia de aminoácidos que se encuentran distribuidos en el resto de la

quimiocina. Por otro lado es posible que en la proteína completa estos péptidos adopten estructuras secundarias que por separado no sean capaces de obtener y se requieran para la actividad de CCL13.

La falta de respuesta de las células al péptido 1 en los ensayos de quimiotaxis marca una diferencia importante entre esta quimiocina y CXCL12 (SDF-1), donde un péptido de menor tamaño del extremo amino se une al receptor CXCR4 e induce quimiotaxis [58]. Esto implica que en la quimiocina CXCL12, el extremo amino contiene tanto los aminoácidos requeridos para activar a su receptor, como los requeridos para unirse con suficiente afinidad.

La falta de actividad de los otros péptidos (2-4 y 9-10) se debe probablemente a que carecen de los residuos presentes en el extremo amino terminal, necesarios para la actividad de las quimiocinas. Los aminoácidos contenidos en estos péptidos pueden estar involucrados en otras actividades de la quimiocina, como unión a proteoglicanos o dimerización.

El péptido 8 (9-29) induce una respuesta quimiotáctica pequeña, pero reproducible, por lo que es capaz de activar los receptores a pesar de que este péptido no contiene en su secuencia los 8 primeros aminoácidos de CCL13. Estos 8 primeros aminoácidos se han descrito como necesarios para la actividad de esta quimiocina [6]. En este estudio, la quimiocina CCL13 es digerida por metaloproteasas y los productos de esta proteólisis son entre otras, una quimiocina que carece de los 8 primeros aminoácidos sin actividad quimioatrayente pero capaz de bloquear la unión de CCL13 con sus receptores.

La actividad del péptido 8 (9-29) es inhibida por toxina pertussis, lo que indica que la actividad de este péptido es mediada por receptores acoplados a proteínas G, y no es un aumento de movilidad celular (quimioquinesis).

Para confirmar que el péptido 8 actúa a través de los receptores de CCL13, es necesario usar otro tipo de ensayos, como el bloqueo de los receptores CCR1 y 2 mediante el uso de la quimiocina completa, o por medio de anticuerpos dirigidos contra estos receptores.

Al analizar la inducción de flujo de calcio, los péptidos 1 (1-18), 2 (19-38), 3 (39-57) y 4 (58-75) no fueron capaces de inducir movilización de calcio en las

células THP-1. Este resultado es consistente con la falta de actividad quimiotáctica de estos péptidos.

Falta determinar si el péptido 8 (9-29) es capaz de inducir esta respuesta en las células THP-1, ya que el hecho de que se observe actividad quimiotáctica no necesariamente se correlaciona con la inducción de flujo de calcio.

Para clarificar la actividad agonista de estos péptidos también puede analizarse la activación de las diferentes vías de señalización en la célula, para determinar si la falta de quimiotaxis o de flujo de calcio se debe a una activación parcial o incompleta de las proteínas involucradas en estas respuestas.

En los ensayos de inhibición, se encontró que el péptido 1 (1-18) puede inhibir la quimiotaxis hacia la quimiocina CCL13 al ser preincubado con las células THP-1. Este efecto no se observa al preincubar las células con el péptido 4 (58-75).

Este resultado sugiere que el péptido 1 (1-18) es capaz de unirse por sí solo a al menos uno de los receptores de CCL13 (CCR1 o CCR2), evitando la unión de la quimiocina. Por otro lado es posible que este péptido active de manera parcial a los receptores desensibilizándolos; lo que evitaría que CCL13 active completamente las vías de señalización requeridas para la quimiotaxis, como rearreglo de citoesqueleto.

Estos datos indican que la falta de actividad quimioatrayente de este péptido no se debe a que no pueda unirse a los receptores, sin embargo para comprobar esto, es necesario determinar la capacidad de unión de este péptido con los receptores de CCL13 por medio del marcaje radiactivo o fluorescente.

El efecto inhibitorio de este péptido no se observa en los ensayos de flujo de calcio, por lo que es posible que la quimiocina se una de diferente manera al receptor al activar las respuestas de quimiotaxis y flujo de calcio.

Para probar que la quimiocina no esté activando la señalización requerida para inducir quimiotaxis, pero si la de flujo de calcio, se pueden determinar que vías se activan en estas células bloqueadas con el péptido 1 (1-18) al ser estimuladas con CCL13.

Ya que CCL13 se une a CCR1 y CCR2, la expresión de estos 2 receptores en las células THP-1 dificulta determinar por medio de cuál receptor actúan estos péptidos. Asimismo, no se realizaron ensayos con células que expresen el receptor CCR3, al cual CCL13 también se une.

Para resolver esto, se pueden probar los péptidos en células transfectadas que expresen solamente uno de los receptores que puede usar CCL13. De esta manera se puede determinar por medio de qué receptor actúan estos péptidos, ya sea por medio de su activación o por medio de la unión y bloqueo de actividad.

El análisis de los péptidos 2-3 y 8-10 en sus respuestas agonistas o antagonistas nos ayudará a definir mejor las secuencias de CCL13 requeridas para su función. Hemos definido a la región amino terminal (9-29) como probable candidato para participar en la actividad agonista, mientras que los aminoácidos 1-18 pueden tener actividad antagonista.

La identificación de los péptidos involucrados en estas funciones permitirá sintetizar nuevos péptidos con modificaciones en su secuencia, lo que servirá para determinar los aminoácidos puntuales que se requieren para la inducción de las respuestas de CCL13.

Otra aproximación que puede emplearse es el uso de CCL13 modificada, ya sea con mutaciones puntuales o con la eliminación de varios residuos.

Finalmente, se pueden emplear estos péptidos en ensayos *in vivo*, usando modelos de inflamación bien caracterizados para determinar si estos péptidos tienen efecto sobre el reclutamiento de células que participan en procesos inflamatorios.

XI. CONCLUSIONES

- 1) El péptido sintético 1 (1-18) no tiene actividad agonista al no ser capaz de inducir quimiotaxis o flujo de calcio en células THP-1.
- 2) El péptido 8 (9-29) induce quimiotaxis en las células THP-1. Esta actividad es bloqueada por la toxina pertussis.
- 3) El péptido 1 (1-18) tiene actividad antagonista ya que bloquea la actividad quimiotáctica de CCL13 al ser preincubado con las células THP-1.
- 4) Ninguno de los péptidos probados (1-4) son capaces de bloquear el flujo de calcio inducido por CCL13.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
2. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 217-42.
3. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
4. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
5. McQuibban, G.A., et al., *Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3*. Science, 2000. **289**(5482): p. 1202-6.
6. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1160-7.
7. Van den Steen, P.E., et al., *Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2673-81.
8. Clore, G.M., et al., *Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution*. Biochemistry, 1990. **29**(7): p. 1689-96.
9. Dealwis, C., et al., *Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 α , a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6941-6.
10. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.
11. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty, *Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1229-34.

12. Farzan, M., et al., *Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry*. Cell, 1999. **96**(5): p. 667-76.
13. Maghazachi, A.A., *Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(9): p. 931-43.
14. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
15. Bokoch, G.M., et al., *Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein*. J Biol Chem, 1983. **258**(4): p. 2072-5.
16. Yamasaki, M., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 3): p. 751-6.
17. Vila-Coro, A.J., et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1699-710.
18. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, *Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 649-76.
19. Servant, G., et al., *Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 1163-78.
20. Parent, C.A., et al., *G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells*. Cell, 1998. **95**(1): p. 81-91.
21. Servant, G., et al., *Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1037-40.
22. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
23. Van Coillie, E., J. Van Damme, and G. Opendakker, *The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 1999. **10**(1): p. 61-86.
24. Tenschler, K., et al., *The monocyte chemotactic protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a*

- pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 240(1): p. 32-5.*
25. Garcia-Zepeda, *Unpublished results. 1997.*
 26. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. J Immunol, 1996. 157(12): p. 5613-26.*
 27. Ugucconi, M., et al., *Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. J Exp Med, 1996. 183(5): p. 2379-84.*
 28. Vanbervliet, B., et al., *Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. Eur J Immunol, 2002. 32(1): p. 231-42.*
 29. Chakravorty, S.J., et al., *Potential role for monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. J Pathol, 2001. 194(2): p. 239-46.*
 30. Nakamura, H., et al., *IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 281(5): p. L1288-302.*
 31. Lamkhioued, B., et al., *Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(2 Pt 1): p. 723-32.*
 32. Stellato, C., et al., *Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. J Clin Invest, 1997. 99(5): p. 926-36.*
 33. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(16): p. 9448-53.*

34. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
35. Kellermann, S.A., et al., *The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo- derived dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 3859-64.
36. Kim, C.H., et al., *Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1331-9.
37. Endres, M.J., et al., *CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 745-56.
38. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. *Nature*, 1996. **384**(6605): p. 179-83.
39. Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 722-5.
40. Simmons, G., et al., *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist*. *Science*, 1997. **276**(5310): p. 276-9.
41. Murphy, P.M., *Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 116-22.
42. Brenier-Pinchart, M.P., et al., *Chemokines in host-protozoan-parasite interactions*. *Trends Parasitol*, 2001. **17**(6): p. 292-6.
43. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(6): p. 773-8.
44. Harrington, J.R., *The role of MCP-1 in atherosclerosis*. *Stem Cells*, 2000. **18**(1): p. 65-6.
45. Muro, S., E.M. Minshall, and Q.A. Hamid, *The pathology of chronic asthma*. *Clin Chest Med*, 2000. **21**(2): p. 225-44.

46. Taha, R.A., et al., *Eotaxin and monocyte chemotactic protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(3 Pt 1): p. 476-83.
47. Ying, S., et al., *Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6321-9.
48. Paavola, C.D., et al., *Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33157-65.
49. Ali, S., et al., *Multimerization of monocyte chemoattractant protein-1 is not required for glycosaminoglycan-dependent transendothelial chemotaxis*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 3): p. 737-45.
50. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
51. Rodriguez-Frade, J.M., et al., *The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3628-33.
52. Stein, J.V., et al., *CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway*. Blood, 2003. **101**(1): p. 38-44.
53. Babcock, G.J., M. Farzan, and J. Sodroski, *Ligand-independent Dimerization of CXCR4, a Principal HIV-1 Coreceptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3378-3385.
54. Monteclaro, F.S. and I.F. Charo, *The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19084-92.
55. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell- derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. Embo J, 1997. **16**(23): p. 6996-7007.

56. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities.* J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23128-34.
57. Moser, B., et al., *Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification.* J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7125-8.
58. Loetscher, P., et al., *N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22279-83.
59. Kaji, M., et al., *Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity.* J Biochem (Tokyo), 2001. **129**(4): p. 577-83.
60. Hemmerich, S., et al., *Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2.* Biochemistry, 1999. **38**(40): p. 13013-25.
61. Jarnagin, K., et al., *Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2.* Biochemistry, 1999. **38**(49): p. 16167-77.
62. Fernandez, E.J., et al., *Comparison of the structure of vMIP-II with eotaxin-1, RANTES, and MCP- 3 suggests a unique mechanism for CCR3 activation.* Biochemistry, 2000. **39**(42): p. 12837-44.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN