



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"DIFERENCIAS FUNCIONALES EN QUIMIOTAXIS A TRAVES
DEL RECEPTOR PARA QUIMIOCINAS CCR4 UTILIZANDO
AGONISTAS NATURALES Y DIMERIZADORES QUIMICOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
PEDRO ALEJANDRO PEREZ GRANADOS



DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO ALBERTO GARCIA ZEPEDA
CODIRECTORA: DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Pedro Alejandro Pérez Granados

FECHA: 30.01.04
FIRMA: [Firma]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a Usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Diferencias Funcionales en Quimiotaxis a través del Receptor para Quimiocinas CCR4 utilizando Agonistas Naturales y Dimerizadores Químicos"

realizado por Pedro Alejandro Pérez Granados con número de cuenta 9201654-7

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

[Firma]

Propietario

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Propietario

Dr. Guillermo Laguna Hernández

[Firma]

Suplente

Dr. Jesús Martínez Barnetche

[Firma]

Suplente

Dra. Laura Vargas Parada

[Firma]

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

In Memoriam

A mi Padre Catarino Pérez Rodríguez

Te extraño mucho

A mi mamá, Teresa Granados, me sigue sorprendiendo la forma en la que nos quieres, a mis hermanos Sylvia, Laura, Nelly, Nacho y Miguel gracias por estar siempre conmigo y soportarme siempre y a mis sobrinitos Marco, Omar y Sebastián.

A Salvador, hay pocas personas en mi vida que han significado tanto como tú; gracias por comprenderme, por aceptarme, por estar... por ser.

A mis compañeros de la facultad que me enseñaron el verdadero significado de la camaradería, Mónica Salas, Héctor, Mónica y Javier, Sara, David, Bob, Polo, Alari (nunca olvidaré los momentos que pasamos juntos "maicitos"). A Emilia, gracias por brindarme tu confianza y tu cariño, no podré platicar con nadie como lo hice contigo. A Jimena, eres la mujer perfecta; Monica Adriana, gracias por tus consejos en esta nueva etapa de mi vida.

A todo el equipo del CFC, gracias por confiar en mi siempre. A Juan Antonio y Samuel gracias por estar en los momentos en los que más los necesito, espero responder de la misma forma.

A mis amigos, Karlita, Ernesto y Ernesto, Silvia, Adela, Rafael, Isidro, Lorena y Rodrigo he aprendido muchas cosas de ustedes... enséñenme más.

A Yectli e Ismael he pasado muy buenos momentos con ustedes, gracias por depositar su confianza en mí.

A Ileana, Paty, Petus y Poncho, el laboratorio sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

Agradecimientos

A los directores de esta tesis:

Dr. Eduardo García, gracias por su apoyo, su paciencia y por darme la oportunidad de pertenecer a este proyecto. Verdaderamente mil gracias.

Dra. Gloria Soldevila, gracias por su apoyo, sus consejos y por guiarme en este proyecto; me faltó tiempo para aprender más de usted. Realmente te admiro.

A mis sinodales:

Dra. Laura Vargas, gracias por tu confianza, por orientarme y por compartir conmigo tu pasión al enseñar e investigar. Eres muy importante para mi.

Dr. Jesús Martínez, gracias por tus comentarios y tus inteligentes aportaciones a este proyecto. No conozco a nadie con una visión tan integral de la biología como tú.

Dr. Guillermo Laguna, gracias por las acotaciones que hizo a la tesis y por su interés. Su ayuda fue fundamental.

Gracias al estupendo equipo técnico que me ayudo a llevar a cabo esta tesis: Pavel Petrossian, Carlos Castellanos y Marcela Ramírez; sin ustedes nunca hubiese terminado. A Don Carmelo por su incansable labor en el laboratorio y por darme ánimo siempre.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
<i>i.</i> Quimiocinas	8
<i>ii.</i> Funciones biológicas de las quimiocinas	10
a. Quimiotaxis	10
b. Migración dirigida a órganos	11
c. Desarrollo de linfocitos	12
d. Angiogénesis y angiostasis	13
e. Polarización de linfocitos T (Th1/Th2)	15
<i>iii.</i> Receptores para quimiocinas	15
<i>iv.</i> Transducción de señales a través de receptores para quimiocinas	19
<i>v.</i> Agregación de receptores	21
<i>vi.</i> Receptor para quimiocinas CCR4	26
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
<i>i.</i> Clonación del receptor CCR4 en los vectores pC4Fv1E, pC4MFv2E y pC4Fv3E	30
<i>ii.</i> Sistema de dimerización	31
a. Información general de los plásmidos	33
b. Agente dimerizador	34
<i>iii.</i> Secuenciación directa para determinar orientación	35
<i>iv.</i> Aislamiento y estimulación de linfocitos humanos de sangre periférica	36
<i>v.</i> Transfección transitoria de CCR4-FKBP12(n) en células Jurkat T Ag	37
<i>vi.</i> Extracción de RNA y RT – PCR	38
<i>vii.</i> Quimiotaxis	39

RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura sistemática actual de las quimiocinas.	9
Tabla 2. Clasificación y nomenclatura actual de los receptores para quimiocinas	17
Tabla 3. Receptores para Quimiocinas expresados en distintos tipos de células humanas	18
Tabla 4. Estrategias implicadas en la dimerización de Proteínas	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de las quimiocinas	14
Figura 2. Señalización a través de receptores para quimiocinas	22
Figura 3. CCR4 en el plásmido original pREP 9	23
Figura 4. Patrón general de restricción para los plásmidos pC4Fv con CCR4	32
Figura 5. Estructura del plásmido pC4M-Fv2E	34
Figura 6. Estructura química del agente dimerizador AP20187	35
Figura 7. Separación de células mononucleares por el método descrito de Boyum (1968)	37
Figura 8. Cámara de Borden	41
Figura 9. Patrón general de restricción para los plásmidos pC4Fv con CCR4	43
Figura 10. Detección de las moléculas pC4Fv con CCR4 por RT-PCR	44
Figura 11. Detección de células transfectadas con CCR4 (pREP9/CCR4)	45
Figura 12. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos activados en presencia de CCL17 (TARC)	48
Figura 13. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos no activados en presencia de CCL17 (TARC)	48
Figura 14. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos activados en presencia de CCL22 (MDC)	49
Figura 15. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos no activados en presencia de CCL22 (MDC)	49
Figura 16. Comparación de quimiotaxis de linfocitos humanos no activados y activados con CCL17	50
Figura 17. Quimiotaxis de la línea celular Jurkat T Ag con/sin transfectar en presencia de CCL17	51
Figura 18. Actividad quimiotáctica de Jurkat T CCR4-FKBP12(1) ⁺ y CCR4-FKBP12(2) ⁺ con CCL17	52
Figura 19. Actividad quimiotáctica de Jurkat T CCR4-FKBP12(1) ⁺ y CCR4-FKBP12(3) ⁺ con CCL17	53
Figura 20. Actividad quimiotáctica de Jurkat T CCR4-FKBP12(2) ⁺ y CCR4-FKBP12(3) ⁺ con CCL17	54
Figura 21. Comparación de la actividad quimiotáctica de células CCR4(pREP9) ⁺ y CCR4-FKBP12(2) con CCL17	55
Figura 22. Señalización regulada por el estado de agregación de los receptores	68

I. RESUMEN

Los receptores para quimiocinas están acoplados a proteínas G; para su activación requieren de la interacción con su ligando a través de mecanismos no bien definidos; se ha demostrado que la dimerización es capaz de inducir respuestas como incremento en el flujo de Ca^{2+} y quimiotaxis. Uno de estos receptores, el Receptor para Quimiocinas CC 4 (CCR4) se expresa en plaquetas, monocitos, células dendríticas inmaduras, células Natural Killer (NK) y en linfocitos CD4^+ tipo Th_2 y tiene como ligandos de alta afinidad a CCL17 (Thymus and Activation-regulated Chemokine: TARC) y CCL22 (Macrophage-derived Chemokine: MDC). Para evaluar el papel de la agregación en la activación celular mediada por CCR4 se generaron proteínas fusionadas de este receptor con 1, 2 y 3 moléculas de la inmunofilina FKBP12, estas proteínas pueden agregarse intracitoplasmáticamente en presencia de dimerizadores específicos. La agregación de CCR4 en distintos grados se llevó a cabo en presencia de un agente dimerizador sintético (AP20187).

Los resultados de esta investigación muestran mayores niveles de inducción de quimiotaxis en células transfectadas con proteínas quiméricas consistentes de CCR4 y 2 copias de FKBP12 en comparación con las transfectantes con CCR4 y 1 o 3 copias.

II. INTRODUCCIÓN

El primer miembro de las quimiocinas en ser descubierto fue el factor de plaquetas 4(PF4), ahora llamado CXCL4. Sin embargo las quimiocinas no fueron reconocidas como moléculas quimiotácticas hasta la caracterización de la Interleucina 8 (IL-8/CXCL18) en 1987. Las primeras quimiocinas fueron descubiertas, por su asociación con respuestas inflamatorias, aunque recientemente, la secuenciación genómica y análisis funcionales han agregado a otros miembros con funciones adicionales.

El sistema de las quimiocinas y sus receptores regula el tráfico de leucocitos del torrente sanguíneo a tejidos y a órganos linfoides. Esta migración, es un prerequisite para desarrollar una eficiente inmunocompetencia y por lo tanto mantener la homeostasis en el organismo. Con el descubrimiento del papel que los receptores de quimiocinas tienen como cofactores de entrada a las células por algunas cepas de VIH, se ha incrementado el estudio de la biología de las quimiocinas y sus receptores.

i. **Quimiocinas**

Las quimiocinas son una superfamilia de citocinas de bajo peso molecular involucradas en el tráfico de leucocitos y en la activación y reclutamiento de poblaciones celulares específicas a los sitios de inflamación e infección (1). Se han identificado más de 50 quimiocinas humanas y murinas como miembros de esta superfamilia. Se ha demostrado que las quimiocinas inducen la migración direccional de tipos celulares específicos, incluyendo neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, basófilos, eosinófilos, fibroblastos y también plaquetas.

Basados en la presencia o ausencia de motivos (motifs) específicos de residuos de cisteína conservados en la secuencia primaria, la superfamilia de quimiocinas puede ser clasificada en 4 subfamilias: Las subfamilias principales son las quimiocinas CXC y CC se distinguen de acuerdo a la posición de las dos primeras cisteínas conservadas, las cuales pueden estar adyacentes (CC), o bien, separadas por un aminoácido (CXC). Además de estos dos grupos de quimiocinas, se han descrito a las subfamilias de quimiocinas tipo C y CX3C, las cuales presentan un solo miembro; la linfotactina (XCL1) y la fractalcina (CX3CL1), respectivamente (ver Tabla 1). Estructuralmente, presentan, una región amino terminal corta precediendo a la primera cisteína, un esqueleto formado por hojas β y en el extremo carboxilo terminal una α hélice de 20 a 30 aminoácidos (2).

INTRODUCCION

Tabla 1. Clasificación y Nomenclatura sistemática actual de las Quimiocinas. (Modificado de A. Zlotnik y A. Yoshie)

<i>Quimiocinas</i>	Nombre Oficial Genes	Cromosoma	Otros Nombres
CXC (α)			
CXCL1	GRO1	4q21	GRO α , MGSA; (ratón) N51/KC ^a ; (ratón) MIP-2 α
CXCL2	GRO2	4q21	Gro β ; MIP-2 α
CXCL3	GRO3	4q21	Gro γ ; MIP-2 β
CXCL4	PF4	4q12-q13	Factor de Plaquetas-4
CXCL5	SCYB5	4q13-21	ENA-78
CXCL6	SCYB6	4q21	GCP-2
CXCL7	PPBP	4q12-q13	PBP; CTAP-III; β -TG; NAP-2 ^b
CXCL8	IL8	4q12-q13	IL-8
CXCL9	MIG	4q21	Mig
CXCL10	INP10	4q21	γ IP-10; (ratón) CRG-2
CXCL11	N. D.	4q21.2	I-TAC; β R1 ^c , IP-9, H174
CXCL12	SDF-1	10q11.2	SDF-1 α , SDF-1 β^d ; PBSF
CXCL13	N. D.	4q21	BCA-1; BLC
CXCL14	N. D.	5q31	BRAK; bolequine
CC (β)			
CCL1	SCYA1	17	I-309; (ratón) TCA-3
CCL2	SCYA2	17q11.2-q12	MCP-1; MCAF, (ratón) JE
CCL3	SCYA3	17q11-q21	MIP-1 α ; MIP-1 α s; LD78 α^e
N. D.	SCYA3L1	17q11-q21	LD78 β MIP-1 α p
CCL4	SCYA 4	17q11-q21	MIP-1 β
CCL5	SCYA5	17q11.2-q12	RANTES
CCL6 (reservado)	SCYA6		(ratón) C10; (ratón) MRP-1
CCL7	SCYA7	17q11.2-q12	MCP-3
CCL8	SCYA8	17q11.2	MCP-2
CCL9 (reservado)	SCYA9		(ratón) MRP-2, (ratón) MIP-1 γ
CCL10 (reservado)	SCYA10		
CCL11	SCYA11	17q21.1-q21.2	Eotaxina
CCL12 (reservado)	SCYA12		(ratón) MCP-5
CCL13	SCYA13	17q11.2	MCP-4
CCL14	SCYA14	17q11.2	CC-1; HCC-1; NCC-2; CCK-1; Ck β 1, MCIF
CCL15	SCYA15	17q11.2	HCC-2, Leucotactina-1 (Lkn-1); MIP-5; CC-2; NCC-3; MIP-1 δ
CCL16	SCYA16	17q11.2	HCC-4, LEC, NCC-4; LMC; Monotactina-
CCL17	SCYA17	16q13	TARC
CCL18	SCYA18	17q11.2	DC-CK-1; PARC; MIP-4; AMAC-1; ck β 7
CCL19	SCYA19	9p13	MIP-3 β ; ELC; Exodus-3; ck β 11
CCL20	SCYA20	2q33-q37	MIP-3 α ; LARC; exodus -1; (ratón) ST 38
CCL21	SCYA21	9p13	6Ckine; SLC; exodus-2; TCA4; ck β 9
CCL22	SCYA22	16q13	MDC; (ratón)dc/ β -ck; (ratón) abcd-1
CCL23	SCYA23	17q11.2	MPIF-1; MIP-3; ck β 8-1
CCL24	SCYA24	7q11.23	MPIF-2, eotaxina-2; ck β 6
CCL25	SCYA25		TECK, ck β 15
CCL26	SCYA26	7q11.23	Eotaxina-3; MIP-4 α
CCL27	SCYA27	9p13	ES kine, CTACK, ILC (ratón) ALP; Skinkine
C(γ)			
XCL1	SCYC1	1q23	Linfotactina α , SCM-1 α , ATAC
XCL2	SCYC2	1q23-q25	Linfotactina β ; SCM-1 β , ATAC
CX₃C (δ)			
CX ₃ CL1	SCYD1	16q13	Fractalcina; (ratón) Neurotactina

INTRODUCCION

1. ^a KC y MIP-2 son proteínas de ratón con una secuencia similar relacionada a proteínas Gro humanas. ^b La ruptura secuencial N-terminal de PBP produce la quimiocina señalada. Solo NAP-2 tiene actividad leucocítica quimioatrayente, específicamente para neutrófilos. ^c β -R1 es 87% idéntica en la secuencia de aminoácidos a I-TAC. La relación genómica de las dos no está aun definida. ^d SDF-1 α y SDF-1 β son variantes de edición (splicing) del mismo gene humano, pero aparentemente son equivalentes en función. ^e LD78 α y LD78 β son productos de dos genes estrechamente relacionados que se originaron por duplicación después de la separación entre humanos y roedores. Así, solo un producto relacionado a este gen, conocido como MIP-1 α se ha encontrado en ratones.

Inicialmente, las quimiocinas se distinguieron en grupos biológicos por su aparente preferencia en mediar la migración de distintos tipos celulares. Los primeros criterios proponían que las quimiocinas CXC (en particular aquellas que presentan la secuencia ELR en su secuencia amino terminal) inducían la migración de neutrófilos pero no de monocitos, mientras que las quimiocinas CC, predominantemente actuaban en monocitos y no así en neutrófilos. Sin embargo el análisis de subgrupos de leucocitos y el descubrimiento de miembros adicionales de quimiocinas, mostraron que esta clasificación de grupos basada en la especificidad celular no es la más adecuada. Hoy, se sabe que los miembros tanto de CC y CXC pueden actuar en distintos tipos celulares como basófilos, eosinófilos, linfocitos, células endoteliales, células epiteliales, melanocitos, células de músculo liso, queratinocitos, así como en hepatocitos cumpliendo funciones diversas (3).

ii. Funciones biológicas de las quimiocinas

a. Quimiotaxis

La quimiotaxis es una respuesta funcional de las células, que en presencia de factores quimioatrayentes que interactúan con sus receptores específicos inducen una migración dirigida. La quimiotaxis como evento en el organismo se traduce en procesos regulatorios que mantienen la homeostasis del organismo y definen la rutas de acción en diferentes etapas de fenómenos inflamatorios como el rodamiento (rolling) de las células por los vasos sanguíneos, arresto de células en el endotelio y el tráfico celular a distintos órganos linfoides (ver Fig 1a)(4).

INTRODUCCION

La quimiotaxis es la capacidad de las células para migrar en respuesta a la presencia de un gradiente de concentración de algún factor quimiotáctico (5), esta puede ser medida tanto *in vivo* como *in vitro*. Varios ensayos han sido desarrollados para medir la migración celular *in vitro*: Migración en capa (matriz de agarosa) (6), ensayos de orientación celular (7 y 8) y migración a través de filtros. Este último método, inicialmente descrito por Boyden (1962), se retomó y modificó por Martinet et al (5) y se distribuyó ampliamente para realizar ensayos de quimiotaxis como hoy la conocemos. En general, consiste en utilizar un filtro que haga una separación entre dos cámaras, una superior y una inferior, en la superior se carga el tipo celular a estudiar y en la inferior diferentes concentraciones del factor quimiotáctico, para inducir la migración a través del filtro.

Los primeros intentos de medir la migración celular *in vivo*, se llevaron a cabo inyectando a animales con quimioatrayentes en sitios específicos (la cámara anterior del ojo, rodillas, pulmón, cavidad pleural, etc) y cuantificando la acumulación de células. La quimiotaxis *in vivo* también ha sido caracterizada y cuantificada en animales por inyección subcutánea de factores quimiotácticos observando los efectos en las biopsias después de tiempos definidos. En algunos experimentos, el factor quimiotáctico es impregnado en una "esponja" utilizada como substrato y es implantada por debajo de la piel del animal y el factor quimiotáctico es progresivamente liberado (9).

b. **Migración dirigida a órganos**

La migración de las células dendríticas hacia los tejidos y a partir de ellos hacia los nódulos linfáticos juega un papel predominante en la vigilancia inmune y la tolerancia. Los monocitos y las células dendríticas "inmaduras" salen de sangre periférica y entran a tejido para enfrentar a patógenos. Estas células expresan receptores para quimiocinas del tipo, "inflamatorio" CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2 y

INTRODUCCION

CCR6, así como receptores para quimioatrayentes clásicos como C5a. Las células dendríticas capturan y procesan al antígeno, pero es hasta la exposición a mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-1 lipopolisacárido (LPS) u otras señales liberadas por el sistema inmune innato que las células dendríticas adquieren la capacidad de liberar señales coestimuladoras que tienen como blanco a las células T "naive". (ver Fig 1b) (10).

Dentro de los tejidos linfoides, las complejas interacciones celulares que ocurren entre las células dendríticas y los linfocitos T "naive" o entre células T y B son controladas también, por las quimiocinas. El papel fundamental de las quimiocinas o sus receptores en las interacciones linfocíticas en los nódulos, se hace patente en ratones con ciertas deficiencias de quimiocinas, el ejemplo más claro, es que la arquitectura de los tejidos linfoides puede afectarse severamente.

c. **Desarrollo de linfocitos**

Las quimiocinas son producidas principalmente por las células hematopoyéticas como respuesta a una gran variedad de factores incluyendo virus, productos bacterianos, citocinas, moléculas del complemento, etc. La acción de estas moléculas inducen una gran diversidad de respuestas funcionales, de las más importantes es la de reclutar células específicas a sitios de infección en los hospederos promoviendo fenómenos inflamatorios como mecanismo de defensa (ver Fig 1c) y la regulación del desarrollo de linfocitos B y T. En las células B hay receptores que determinan el tráfico de las células desde la médula ósea hacia el bazo y posteriormente a los nódulos linfáticos. Se postula que las quimiocinas también regulan el desarrollo de timocitos, ya que las células precursoras de linfocitos T expresan receptores para quimiocinas que participan en la inducción de la migración al timo y la expresión de diferentes receptores para quimiocinas específicos permiten la entrada de estas células al timo. Las células se diferencian a timocitos y expresan un patrón diferencial de receptores en cada

INTRODUCCION

estadio de su desarrollo, lo cual les permite desplazarse de la corteza a la médula. Los timocitos medulares, pero no los corticales, responden a CCL19 y CCL21 (ELC Y SLC, ligandos para CCR7). En contraste la mayoría de timocitos inmaduros migran en presencia de CCL25 pero pierden esta función durante las etapas finales de la maduración antes de dejar el timo. En la periferia, los receptores para quimiocinas son regulados después de la activación de las células T, de la diferenciación a células efectoras y el desarrollo de células de memoria.

d. **Angiogénesis y angiostasis**

La angiogénesis es un proceso biológico en el cual nuevos vasos sanguíneos son generados a partir de vasos preexistentes; es un evento transitorio que ocurre durante el restablecimiento de heridas. Sin embargo, también está asociado a enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis, artritis reumatoide, fibrosis pulmonar idiopática (11) así como desarrollo de tumores y metástasis (12), donde la neovascularización se lleva a cabo como un proceso de crecimiento fuera de control. El crecimiento de tumores requiere la presencia de esta vascularización para garantizar la distribución necesaria de oxígeno y nutrientes (13). Se ha establecido que las quimiocinas ELR-CXC son potentes factores angiogénicos y son capaces de estimular la quimiotaxis de células endoteliales, mientras que las quimiocinas sin el motivo ELR-CXC son potentes factores angiostáticos los cuales inhiben la quimiotaxis de células endoteliales inducida por las quimiocinas ELR-CXC (14, 15) (ver Fig. 1d).

INTRODUCCION

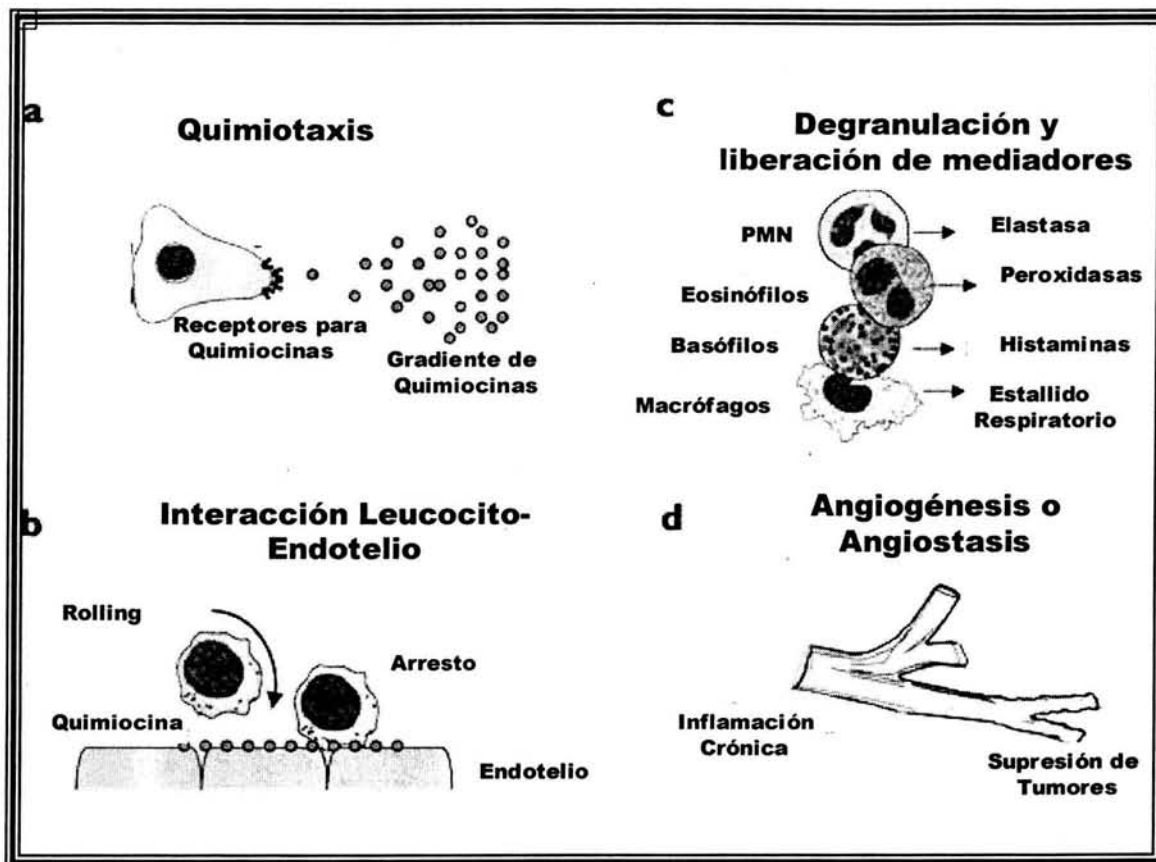


Figura 1. Algunas funciones de las quimiocinas. a) Las quimiocinas proveen direccionalidad a los leucocitos a través de la formación de gradientes. Las células efectúan una transformación que resulta en la redistribución de los receptores para quimiocinas, integrinas, proteínas de citoesqueleto y moléculas intracelulares regulatorias. La señalización del movimiento celular involucra proteínas cinasas de tirosina, lipid cinasas, segundos mensajeros y miembros de la familia Rho de GTPasas. b) La señalización activa integrinas durante el proceso de interacciones leucocito-endotelio para llevar a cabo procesos como el "rolling" y el arresto. c) Las quimiocinas estimulan la degranulación de los leucocitos o la liberación de mediadores inflamatorios. Por ejemplo, CCL2 (MCP-1) es un potente estimulador de la liberación de histaminas por basófilos y CXCL8 estimula la excitosis de gránulos en neutrófilos. Las quimiocinas también estimulan el estallido respiratorio, la cual tiene como resultado la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno. d) Algunas quimiocinas también estimulan la angiogénesis o la angiostasis. El motivo ELR y CCL2 poseen propiedades angiogénicas, mientras que los ligandos de CXCR3 como CXCL10 y CCL21 (SLC) poseen propiedades angiostáticas. La relevancia biológica de la angiogénesis o la angiostasis provocada por las quimiocinas se relaciona estrechamente con la supresión de tumores o respuestas inflamatorias donde la angiogénesis es un requerimiento importante (Modificado de Mackay, C. R. 2001).

e. **Polarización de linfocitos T (Th1/Th2)**

La activación y polarización de células T efectoras está controlada, entre otros factores, por quimiocinas y receptores que definen, así mismo, una respuesta específica. Las respuestas involucran interacciones de quimiocinas, citocinas y grupos de leucocitos. Las citocinas involucradas en el tipo de respuesta Th2 son: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13; estas citocinas actúan estimulando a células epiteliales y endoteliales para que generen quimiocinas. Una de las quimiocinas asociada con respuestas Th2 es CCL11 (eotaxina-1), aunque IL-4 estimula la producción de otras quimiocinas como CCL24 (eotaxina-2), CCL26 (eotaxina-3) y CCL13 (MCP-4) (15).

En cambio para la población de células polarizadas hacia el fenotipo Th1 las quimiocinas involucradas son CCL3 (MIP1-), CCL4 (MIP1-), CXCL19 (Mig) y CCL5 (RANTES) con sus respectivos receptores CCR1, CCR5 y CXCR3. Se ha observado que el IFN- γ es una de las citocinas que participan mas activamente en la regulación de la expresión de este fenotipo.

iii. Receptores para quimiocinas

Los receptores para quimiocinas se caracterizan por tener siete dominios transmembranales y su funcionamiento está asociado a una gran variedad de subunidades de proteínas G. Las secuencias de aminoácidos de los receptores para quimiocinas muestran un 25 a 80 % de identidad en aminoácidos entre ellos. Se han encontrado entre ellos características conservadas como la longitud de 340 a 370 aminoácidos, un segmento ácido N terminal, la secuencia DRY en el segundo dominio intracelular que está involucrado en el funcionamiento del receptor y un tercer dominio intracelular básico (16). Comúnmente se encuentra un motivo Tirosina-sulfato en el extremo amino de los receptores y se ha demostrado,

INTRODUCCION

que es crítico en CCR5 para actuar como correceptor para VIH (17). La estructura tridimensional de los receptores para quimiocinas no ha sido determinada, pero algunos modelos de los dominios transmembranales han sido propuestos basados en la homología que presentan los receptores con Rhodopsina (18). Se han propuesto modelos para los dominios intra y extracelulares, y en algunos casos, utilizando anticuerpos específicos anti-dominio han verificado la localización general.

Los receptores para quimiocinas poseen la capacidad de unir distintos ligandos con diferentes niveles de afinidad en distintos tipos celulares. Por mutagénesis se ha demostrado que el sitio de unión de los receptores es extremadamente complejo, compuesto por dominios múltiples no adyacentes y al menos un par de distintos subsitios: uno para acoplamiento (docking site) y el otro para activación (triggering site) (19-22). Estos dos sitios están relacionados con la redundancia entre los ligandos y sus receptores y se involucran con la regulación de la señal de activación y la respuesta celular. Hay otros motivos en los dominios involucrados en la funcionalidad del receptor, para CCR5 y CXCR4, los dos primeros dominios transmembranales (TMDs) y los loops asociados, no son indispensables para la expresión y función del receptor (23), parecen tener papeles regulatorios importantes (Tablas 2 y 3). En cambio el segmento terminal tiene un papel fundamental en la señalización a través de estos receptores.

Distintos receptores específicos para una quimiocina se coexpresan en la misma célula(24), distintas quimiocinas actuando por separado en receptores coexpresados en la misma célula pueden inducir la misma respuesta celular (25) y el mismo receptor puede responder hacia distintas rutas por diferentes ligandos (26), generando así una gran cantidad de mecanismos regulatorios que regulan las respuestas celulares. Además, la expresión de los receptores para quimiocinas no está limitada a leucocitos, sino que pueden expresarse también en células endoteliales, neuronas, células epiteliales y células de la microglía en el cerebro.

INTRODUCCION

Tabla 2. Clasificación y Nomenclatura actual de los Receptores para Quimiocinas (modificado de Murphy et al, 2000.)

Nomenclatura		Ligandos	Biología
Nombre Actual	Gene/ Cromosoma		Fenotipos de ratones/ humanos deficientes
Receptores CXC			
CXCR1	IL8RA, 2q34-q35	NINGUNA	N.D.
CXCR2	IL8RB; 2q34-q35	GRO α NAP-2, ENA-78	Ratón: Tráfico y distribución de neutrófilos y distribución de células B deficiente; resistencia aterogénesis
CXCR3	Gpr9; Xq13	IP-10, I-TAC, Mig	N.D.
CXCR4	CXCR4; 2pter-qter	SDF-1	Ratón: Deficiente desarrollo de corazón, cerebelo, vascularización del estómago, linfopoyesis de células B y mielopoyesis de médula ósea. Letal para el embrión
CXCR5	BLR1; 11	BCA-1	Ratón: Tráfico y desarrollo de células B en nódulos inguinales, placas de Peyer y centros germinales deficiente
Receptores CC			
CCR1	CCR1; 3p21	HCC-1	Ratón: susceptible a <i>A. fumigatus</i> resistencia a inflamación inducida en pacaes y alveolos. Quimiotaxis de neutrófilos, balance de Th1/Th2, hematopoyesis y formación de granulomas deficientes.
CCR2	CCR2; 3p21	MCP-1	Ratón: susceptible a <i>Listeria</i> , resistecnia aterogénesis, deficiente en tráfico de monócitos, balance de Th1/Th2 y formación de granulomas
CCR3	CCR3; 3p21	EOTAXINA 1, 2	N. D.
CCR4	CCR4; 3p22	TARC, MDC	N. D.
CCR5	CCR5; 3p21	MIP-1 β	Ratón: susceptible a <i>Listeria</i> y 1ps y reacción de Th. Humanos: Resistencia a VIH
CCR6	CCR6;6q27	LARC	N. D.
CCR7	CCR7; 17q12-q21.2	ELC, SLC	N. D.
CCR8	CCR8; 3p22-p23	I-309	N. D.
CCR9	N.D. 3p21.3-22	TECK	N. D.
CCR10	GPR2, 17q21.1-q21.3	ES-KINE	N. D.
CCR11	3p22	TBA	N. D.
Receptores C			
XCR1	GPR5; 3p21	LINFOTACTINA	N. D.
Receptores CX3C			
CX3CR1	CX3CR1; 3pter-p21	FRACTALCINA	N. D.
Proteínas que unen quimiocinas			
Duffy	Fy, 1q21-q22	NINGUNA	Humano: Resistencia a malaria por <i>Plasmodium vivax</i>
D6	CMKBR9, 3p21	NINGUNA	N. D.

INTRODUCCION

Tabla 3. Receptores para Quimiocinas expresados en distintos tipos de células humanas (modificado de Murphy et al, 2000.)

	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	XCR1	CX ₃ CR1
Timocitos				*					*	*			*	*		
Células CD34 ⁺				*							*					
Células NK						*	*		*						*	*
Linfocitos B		*	*	*	*				*	*	*	*	*			
Linfocitos T		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC Inmaduras			*			*			*	*	*	*				
DC maduras			*						*							
Eritrocitos																
Macrófagos	*	*		*		*	*		*				*			*
Basófilos						*		*								
Eosinófilos		*				*		*								
Neutrófilos	*	*		*		*	*									
Plaquetas				*												
CXCL1		***														
CXCL2		***														
CXCL3		***														
CXCL4																
CXCL5	*	***														
CXCL6	**															
CXCL7		***														
CXCL8	***	***														
CXCL9			***													
CXCL10			***													
CXCL11			***													
CXCL12				***												
CXCL13					***											
CXCL14																
CCL1													***			
CCL2						*	***									
CCL3						***				***						
CCL4						*				***			*			
CCL5						***		**		***						
CCL7						***	***	**		*						
CCL8						**	***	**		***						
CCL11			*					***		*						
CCL13						***	***	***		*						
CCL14						***										
CCL15						***		***								
CCL16																
CCL17									***				*			
CCL18																
CCL19												***				
CCL20											***		***			
CCL21			*										***			
CCL22									***							
CCL23						***										
CCL24								***								
CCL25														***		
CCL26								**								
XCL1															***	
XCL2															***	
CX3CL1																***

***iv.* Transducción de señales a través de receptores para quimiocinas**

Cada una de las respuestas promovidas por quimiocinas dependen del receptor para quimiocinas al que se unen. El enlace de la quimiocina a su receptor lleva a una cascada de activación intracelular que, en general, incluye la generación de inositol trifosfato, liberación de calcio y la activación de la proteína cinasa C. Todas las respuestas funcionales de las células son la consecuencia de la señalización intracelular inducida por la unión del ligando al receptor. En el caso de las quimiocinas hay diversas vías de señalización que modulan respuestas diferentes y en distinta intensidad.

Los receptores para quimiocinas están asociados a proteínas G heterotriméricas, conformadas por una subunidad α y un heterodímero de $\beta\gamma$. La interacción de la quimiocina con su receptor induce un intercambio de GTP por GDP y la disociación de la subunidad α de la subunidad $\beta\gamma$. Las subunidades disociadas activan distintas rutas de señalización, incluyendo la ruta cAMP/ PKA, la ruta de las MAPK, la ruta de fosfatidil inositol/ calcio/ PKC y la ruta JNK (27-29). Se ha demostrado que el tipo de proteína G involucrado en la activación celular por receptores de quimiocinas es $G_{\alpha i1}$ porque sus funciones biológicas son inhibidas con toxina pertussis (ver Fig 2).

En los receptores CXCR1 y CXCR2 se mostró que interactúan con $G_{\alpha i2}$ y $G_{\alpha i6}$ después de la unión del ligando, y que las cinasas MEK y ERK se activan por esta vía. MEK y ERK son miembros de la familia MAPK (Mitogen Activating Protein Kinases) que son serin/treonin cinasas que se activan en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y stress celular y participan en respuestas proliferativas y mitogénicas. Se ha demostrado que algunas moléculas adicionales, conectan a las

INTRODUCCION

$G_{\beta} \alpha$ vía Ras/MAPK, estas incluyen a PI-3 cinasa, la cual es activada al contacto con $G_{\beta} \alpha$. Con los receptores CXCR1 y CXCR2 se ha demostrado en neutrófilos la activación de PKB (Protein Kinase B) por PI-3K, sugiriendo un papel en la sobrevivencia celular por las quimiocinas (30). Además hay evidencia de que la activación de PI-3K es importante para el estallido respiratorio y la fagocitosis, así como para rearme de citoesqueleto y por tanto para llevar a cabo quimiotaxis (31, 32) (ver fig 2).

Además de las proteínas G, otras moléculas están involucradas en la función efectora de las quimiocinas. Por ejemplo, se ha demostrado que los receptores asociados a proteínas cinasas de tirosina citoplásmicas denominadas Cinasas de Janus (JAKs) y los transductores monoméricos de señales y activadores de transcripción (STATs) desempeñan un papel fundamental en la activación celular. Por esta ruta la unión del ligando induce la agregación del receptor y la activación de las JAKs con la subsecuente fosforilación de las STATs. Las proteínas STAT se dimerizan para posteriormente traslocarse al núcleo. Hasta ahora, se han descrito seis proteínas STAT, STAT1 y STAT2 están involucradas en la regulación de la inmunidad innata, mientras que STAT4 y STAT6 las cuales juegan papeles importantes en la inmunidad adquirida. STAT3 regula genes de respuesta de fase aguda durante el daño a tejido. Esta ruta se ha estudiado intensamente para CCR2 y su ligando CCL2 (MCP-1) y se demostró que CCL2 induce la activación de JAK2/STAT3 y la fosforilación de CCR2 (33). Resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que Jak 3 participa en la vía de señalización de CCR9 y CXCR4 en timocitos (Soldevila et al, sometido 2003)

Mientras la mayoría de las quimiocinas señalizan a través de MAPK, se demostró que RANTES (CCL5) activa linfocitos T por dos rutas de transducción diferentes, una mediada por proteínas G y la otra asociada a la activación de proteínas cinasas. RANTES media la actividad de la Proteína Asociada a la Cadena Zeta

(ZAP)-70 y a la Proteína Cinasa de Adhesión Focal (FAK) pp125^{FAK} (34). La vía que involucra proteínas G está asociada a quimiotaxis mientras que la ruta de cinasas de tirosina está asociada al receptor de IL-2 y a la proliferación de linfocitos T, así como a la apertura de canales de Ca²⁺ y la liberación de citocinas (35).

v. Agregación de receptores

La agregación de receptores representa un mecanismo regulatorio flexible con diversas consecuencias funcionales. Varios tipos de receptores se dimerizan para transducir señales, por ejemplo la familia de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRs), los receptores β 2-adrenérgicos (36), los receptores opioides (37), los receptores D₁, D₂ y D₃ para dopamina (38-40), y los receptores para quimiocinas (41,42). Sin embargo, los mecanismos de dimerización entre cada uno de los tipos de receptores difieren considerablemente. Por ejemplo, se ha visto que en el receptor β 2-adrenérgico, la dimerización involucra interacciones entre segmentos transmembranales (43-45); en los receptores opioides se ha demostrado por mutagénesis dirigida que la dimerización es dependiente del extremo carboxilo terminal, esto en contraste con los receptores extracelulares sensibles a calcio y los de glutamato que se dimerizan en función de los enlaces disulfuro de las cisteínas que presentan en la zona amino terminal.

En el caso del Receptor para Linfocitos T (TCR), se ha evidenciado que la oligomerización es fundamental para el inicio de la transducción de señales. Particularmente, se han realizado estudios donde se utilizaron complejos solubles de MHC/péptido en monómeros y oligómeros en los cuales se demostró que el TCR no es inducido por la ligación monovalente del MHC/péptido sino por la agregación de varias moléculas de TCR. Con los oligómeros se encontró que se necesitan al menos tres moléculas de TCR juntas para inducir flujo de calcio (46).

INTRODUCCION

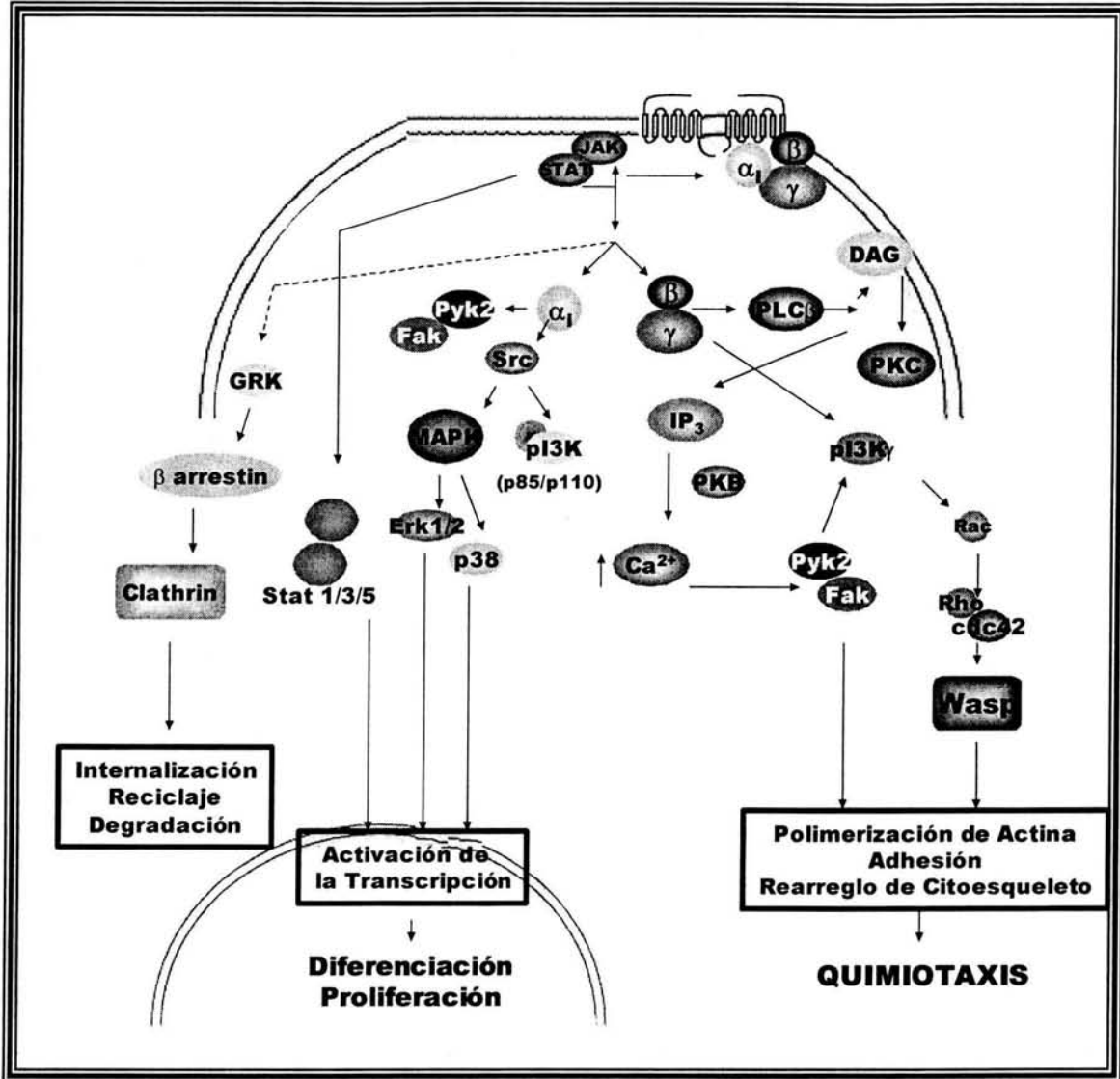


Figura 2. Señalización a través de receptores para quimiocinas. Las células al activarse a través de receptores para quimiocinas como CCR5 desencadenan señales a través de la vía Jak/STAT lo cual induce la traslocación de otras STAT al núcleo. Además se ha demostrado que esta vía se encuentra río arriba de las señales de las proteínas G heterotriméricas. Cuando las proteínas G se desensamblan en α y $\beta\gamma$, las subunidades disociadas activan distintas rutas de señalización, incluyendo la ruta cAMP/ PKA, la ruta de las MAPK, la ruta de fosfatidil inositol/ calcio/ PKC y la ruta JNK (27-29). La activación de las pequeñas GTPasas como Rho y cdc42 provocan la polimerización de actina y el rearreglo del citoesqueleto, por lo que están directamente relacionadas con la quimiotaxis. A través de las proteínas G también se promueve la internalización y el reciclaje de los receptores para quimiocinas en vesículas de clatrina.

INTRODUCCION

La activación de células T a través del TCR implica cambios conformacionales y de agregación de los receptores y por fosforilación y defosforilación de cinasas transmiten los mensajes hasta el núcleo. En principio, el evento que inicia la activación del receptor, inducido por la unión del ligando, es el cambio conformacional del complejo TCR-CD3- ζ , es decir la inducción de un tipo de agregación. Esta activación, está basada en la capacidad del ligando (MHC/péptido) para disparar una respuesta intracelular por su unión al TCR. La dimerización/ oligomerización del receptor induce una cascada de señales a través de proteínas cinasas de tirosina que al llegar al núcleo promueven la transcripción de nuevos genes.

Para que se lleve a cabo la activación del receptor, éste necesita interactuar con el complejo CD3, además de que las proteínas en este complejo contribuyen con la señalización, porque el TCR tiene un dominio intracitoplasmático muy corto, pero su asociación con CD3 le confiere acceso a un gran número de motivos intracitoplasmáticos conocidos como "inmunoreceptor tyrosine activation motifs" o ITAMs. Estos ITAMs son fosforilados por una familia de cinasas de tirosina llamadas Src que son reclutadas al complejo TCR/CD3 por la unión del antígeno y la oligomerización. Una de estas Cinasas Src es Lck; ésta se recluta a los ITAMs del complejo TCR/CD3 y los fosforila en los residuos de tirosina para iniciar la señalización hacia al núcleo. Los ITAMs fosforilados son sitios de acoplamiento para proteínas con dominios SH2 en su estructura, como ZAP-70, la cual también es reclutada y activada por la fosforilación de Lck.

ZAP-70 inicia diferentes cascadas independientes; cada una de las cuales activa a factores de transcripción. Por ejemplo activa a la fosfolipasa C (PLC) para fraccionar fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂) en dos segundos mensajeros: inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG). IP3 libera a su vez Ca²⁺ de retículo endoplásmico, éste activa a la fosfatasa calcineurina que interactúa con el factor

INTRODUCCION

de transcripción NF-AT. El DAG activa a la serin/treonin cinasa PKC que activa al factor de transcripción NF- κ B. También activa la vía ras que inicia la cascada a través de MAP cinasas que activan al factor de transcripción AP-1 (47).

Se ha reportado que algunos receptores para quimiocinas se dimerizan para activarse (48-53) y para llevar a cabo respuestas funcionales como la quimiotaxis, tal es el caso de CCR2 y CXCR4, que se agregan en presencia de CCL2 y CXCL12 (MCP1 y SDF 1 α : Stromal cell-derived factor 1 α) respectivamente, sin embargo los cambios en los niveles de calcio no dependen de esta agregación. También se ha demostrado que el sistema de quimiocina-receptor presenta mecanismos moduladores que involucran a diferentes receptores para quimiocinas interactuando simultáneamente para generar una señal conjunta, ya que se encontró que CCR2 y CCR5 se heterodimerizan bajo ciertas condiciones de activación, aunque los mecanismos de regulación aun son desconocidos (54-56).

Hay varias formas de inducir la dimerización artificial de los receptores *in vitro* para estudiar las respuestas generadas por la agregación de éstos. Uno de estos es el entrecruzamiento extracelular con anticuerpos. Hay otro sistema descrito en el cual se utilizan agentes dimerizadores intracelulares para controlar el nivel de agregación para generar dímeros, oligómeros y multímeros. Este sistema de dimerización se basa en que la droga FK1012 (dímero de FK506) es capaz de inducir la activación de un receptor quimérico a través de agregación intra citoplasmática. La quimera contiene el dominio NH2 de c-Src (14 residuos, que funcionan como anclaje a la membrana citoplásmica), y de 1-3 copias de FKBP12. La molécula modificada se expresa en la membrana gracias a su unión con el dominio de c-Src que funciona como sitio de miristilación. Por el uso de este sistema se demostró el entrecruzamiento de la cadena ζ del TCR transfectado estable y transitoriamente en la línea celular Jurkat T Ag y que este "crosslink" activa a la célula (por la producción de IL-2). Además, estos resultados mostraron

INTRODUCCION

que la multimerización del dominio FKBP12 tiene un efecto sinérgico en la activación, por agregar a la cadena ζ del TCR, en comparación con la dimerización u oligomerización de las cadenas que provoca una respuesta menor (57-60).

Las funciones asociadas a FK506 se hallaron en búsqueda de inmunosupresores que redujeran el riesgo de rechazo en transplantes. FK506 (en conjunto con Ciclosporina A) es capaz de bloquear la degranulación, así como la activación transcripcional de varios genes de citocinas, tales como Interleucina 3 (IL-3) e IL-15 (61-65), así como de genes involucrados en la síntesis de leucotrienos por lo que se le escogió como candidato para terapia previa a transplantes. Esta droga se modificó, por síntesis química para generar un dímero y así obtener dos sitios de interacción disponibles por molécula (66) obteniéndose así una nueva droga llamada FK1012.

El sistema que se utilizó en esta investigación es una variante del que describió Spencer et al. Se empleó una modificación de la droga FK1012 denominada AP20187, la cual es totalmente sintética y liposoluble, por lo tanto, altamente permeable a la membrana y es específica para un ligando modificado de FKBP12* (F36V) (67, 68); con esta modificación se logra una mayor actividad de la droga y además se evita la interacción del dimerizador con las moléculas de FKBP endógenas. FKBP12 (FK506 Binding Protein) son moléculas ampliamente distribuidas en la célula, pertenecen al grupo de las ciclofilinas y funcionan como chaperonas, inicialmente fueron descritas por su alta afinidad a drogas altamente inmunosupresoras como FK506 y Rapamicina (69).

vi. Receptor para quimiocinas CCR4

El receptor CCR4 se expresa en plaquetas, monocitos, células dendríticas inmaduras, células natural killer (NK) y diferencialmente en linfocitos CD4⁺ tipo Th₂ principalmente (70, 71). Sus funciones se asocian a tráfico de células dendríticas, recirculación de células T de los tejidos a ganglios linfáticos, migración de células T hacia el timo durante su maduración, así como el homing de células T de memoria hacia los tejidos (72, 73). El cDNA se clonó originalmente de una biblioteca derivada de una línea celular de leucemia basofílica (74), encontrando que el marco de lectura abierto (ORF) está constituido en un solo exón que contiene un polipéptido de 360 aminoácidos de longitud.

Sus ligandos de alta afinidad son CCL17 (TARC: Thymus and Activation-regulated Chemokine) y CCL22 (MDC: Macrophage-derived Chemokine) (75, 76), sin embargo también es capaz de unir con baja afinidad a CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein 1: MCP-1), CCL3 (MIP1- α) y CCL5 (Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted: RANTES).

Al analizar el fenotipo de ratones deficientes en CCR4 se observó un desarrollo normal, mostrando que la delección de este gen no es letal; encontraron que células de timo y de bazo de estos ratones no responden a CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC); también se encontró que CCL3 (MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 α) no activa a células de estos ratones, o induce alguna respuesta *in vitro* (77). Además se demostró que la delección de CCR4 no tiene efecto en la diferenciación celular hacia Th₂ *in vitro* o en un modelo de inflamación de vías respiratorias dependiente de Th₂ lo cual indica que CCR4 es un marcador para células diferenciadas hacia Th₂, sin embargo no es determinante para que la polarización hacia este fenotipo se lleve a cabo.

III. JUSTIFICACIÓN

No está claro el papel de la agregación molecular en la activación de receptores 7 transmembranales asociados a proteínas G (GPCRs). En el caso de receptores para quimiocinas, se sabe que CCR2, CCR5 y CXCR4 se dimerizan para activarse y que esta agregación provoca respuestas funcionales diferentes como la degranulación de leucocitos, liberación de mediadores inflamatorios y la redistribución de integrinas y proteínas de citoesqueleto para migración celular, así como una cascada de señales que regulan la activación celular.

Por lo tanto se decidió estudiar las diferencias funcionales generadas por el nivel de agregación del receptor de quimiocinas CCR4 y su efecto en la inducción de señales hacia el núcleo por la dimerización, oligomerización o multimerización del receptor, utilizando un sistema de dimerización química que induce la agregación intracelular en distintos grados de los receptores y compararlos con la activación del receptor por sus ligandos naturales CCL17 y CCL22.

IV. HIPÓTESIS

El nivel de agregación de los receptores para quimiocinas regula diferencialmente procesos de activación celular tales como la quimiotaxis, por lo que en este trabajo se espera encontrar diferencias de actividad quimiotáctica en las células con diferentes grados de agregación del receptor CCR4 y una mayor respuesta quimiotáctica en las células que multimerizen CCR4 en comparación con las células que dimerizen el receptor en presencia de sus ligandos CCL17 y CCL22.

V. OBJETIVOS

1. Evaluar la actividad quimiotáctica de linfocitos T que expresen diferentes estados de agregación del receptor para quimiocinas CCR4 en presencia de sus ligandos.

1.1 Determinación de la actividad quimiotáctica inducida por las quimiocinas CCL17 (Thymus and Activation Regulated Chemokine) y CCL22 (Macrophage-derived Chemokine) en Linfocitos Humanos activados y en la línea celular Jurkat T Ag.

1.2 Analizar el efecto de la agregación en distintos niveles, del Receptor para Quimiocinas CCR4 por los agonistas de alta afinidad (CCL17 y CCL22) o Dimerizadores Químicos (AP20187) en la línea celular Jurkat T Ag transfectada con moléculas quiméricas compuestas por CCR4 y de 1 a 3 copias de la Inmunofilina FKBP12.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

i. Clonación del receptor CCR4 en los vectores pC₄F_v1E, pC₄MF_v2E y pC₄F_v3E

El receptor para quimiocinas CCR4, se obtuvo, por una donación del Dr. P. Murphy (NIH Bethesda, USA), clonado en el plásmido pREP 9 en los sitios KpnI – BamHI (ver figura 3). El tamaño de la secuencia codificante es de 1.082 Kb (La secuencia está disponible en el GenBank con el número de acceso NM_005508). El inserto se extrajo del vector, por ensayos de restricción, con las enzimas KpnI y BamHI (GIBCO BRL) siguiendo las especificaciones del distribuidor.

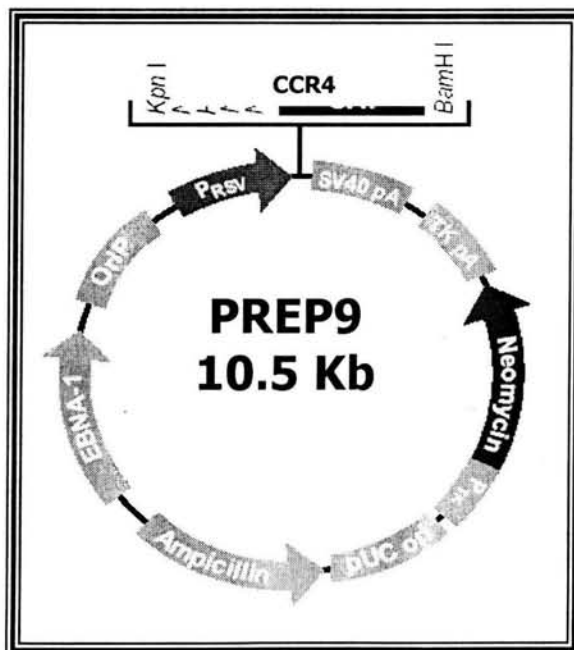


Figura 3. CCR4 en el plásmido original pREP 9, clonado en los sitios Kpn I y BamHI. Se muestran las principales características del plásmido. El Polylinker además contiene los sitios Nhe I, Hind III, Nhe I, Not I. (Modificado de Invitrogen Life technologies).

MATERIAL Y METODO

Por PCR, se le agregaron sitios para la enzima Xba I (GIBCO BRL) a ambos lados de la secuencia por PCR (Polimerase Chain Reaction): 5' – 3' GG TCT AGA ATG AAC CCC ACG GAT; 3' – 5' GG TCT AGA TTT TTC CTA CAG AGC. Los primers se unen en los sitios 183 – 197 y 1271 – 1257 respectivamente. En este paso se eliminó el codón de término, y se mantuvo el codón de inicio.

Utilizando la enzima fosfatasa alcalina (CIAP), se defosforiló la secuencia del receptor y se ligó con ayuda de T4 Ligasa (ambas de GIBCO BRL) a los plásmidos pC₄F_v1E y pC₄MF_v2E en el sitio Xba I, los cuales ya contienen la secuencia de FKBP12 con 1 o 2 copias, respectivamente. Una vez obtenidos los plasmidos recombinantes, se transformaron en células *Escherichia coli* de la cepa DH 5 α por electroporación. Las condiciones con las cuales se electroporaron son las siguientes: BTX ECM 630; 2.5 KV High Voltage; 125 Ω (R5); 25 μ F.

El receptor para quimiocinas CCR4, se clonó en el sitio 692 (Xba I) en los plásmidos pC₄F_v1E y pC₄MF_v2E, pC₄F_v3E. El marco de lectura del receptor se mantuvo con el de las moléculas de FKBP12 adyacentes al clonar en este sitio, esto es necesario para transcribir una proteína completa, no obstante, el receptor puede insertarse en dos sentidos en el plásmido. Para determinar la orientación del inserto en el plásmido, se realizó una digestión con la enzima Sac I (Promega). Esta enzima tiene un sitio único en el receptor en 119, y en los plásmidos, corta en los sitios 9 y 522, por lo tanto al digerir con la enzima los plásmidos que presentaron el receptor en la orientación adecuada mostraron el siguiente patrón con 3 bandas constantes de los siguientes pesos: 5.5 Kb (5.8 o 6.1 dependiendo del plásmido), 0.5 y 0.3 Kb. (ver figura 4), estas dos últimas son las más importantes para determinar la orientación.

MATERIAL Y METODO

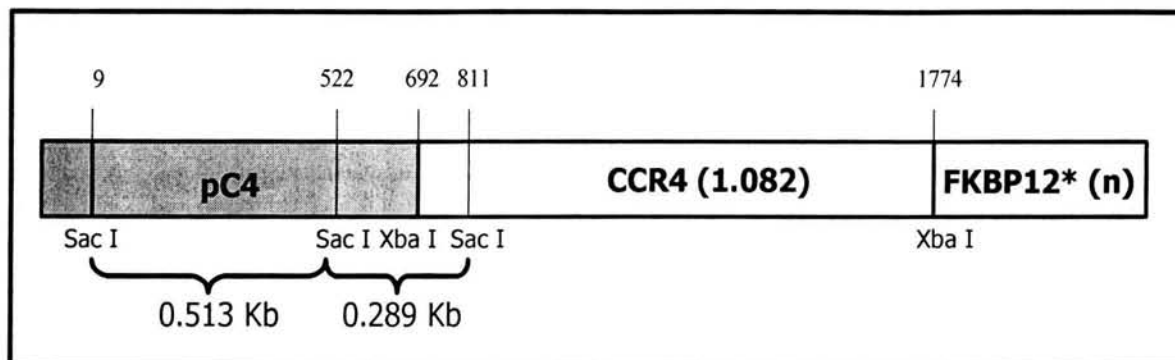


Figura 4. Patrón general de restricción para los plásmidos pC₄F_v1E y pC₄MF_v2E, pC₄F_v3E con el Receptor para Quimiocinas CCR4 clonado en el sitio 692 (Xba I). Cuando el plásmido es cortado con la enzima Sac I, aparecen tres bandas constantes que corresponden al vector sin el inserto 5.5, 0.513 y 0.289 Kb. Esto indica la orientación adecuada del inserto, si el inserto está clonado erróneamente aparecen las bandas de 5.5 y 0.513, pero la banda de 0.289 cambia por 1.1 Kb.

ii. Sistema de dimerización

Los plásmidos utilizados para la clonación de CCR4, son derivados del plásmido pCGNN, a los cuales se les incluyó el promotor humano para CMV y un sitio de origen de replicación para SV40, el cual amplifica la replicación en líneas celulares como las Jurkat T Ag, que contienen el fragmento largo del antígeno T. El sistema de dimerización consiste de los plásmidos pC₄F_v1E y pC₄MF_v2E y el agente dimerizante AP20187. Para la generación del plásmido pC₄F_v3E se cortó el fragmento Fv2 del plásmido pC₄MF_v2E, y se insertó en el sitio Spe I de pC₄F_v1E (ARIAD Pharmaceuticals) (ver figura 5). Estos plásmidos se utilizaron como vector de transfección y expresión de las moléculas quiméricas de CCR4 mas FKBP12 en líneas celulares humanas.

a. **Información general de los plásmidos**

pC₄F_v1E: El inserto (1 copia de FKBP12*)(Fv1) se encuentra clonado en los sitios Xba I- Spe I y se transcriben bajo el control del promotor CMV (C) y se expresa con un epítoto Carboxy – terminal del gen de hemaglutinina (HA) de influenza (E), porción de 9 aminoácidos).

pC₄MF_v2E: Al igual que el pC₄F_v1E el FKBP12* se encuentra clonado en los sitios Xba I- Spe I y se transcriben bajo el control del promotor CMV (C). Este plásmido contiene dos copias en tandem de la inmunofilina (Fv2), además el dominio v-src que se ancla en la membrana (miristilación)(M), y se expresa con un epítoto Carboxy – terminal del gen de Hemaglutinina de Influenza (E).

pC₄F_v3E: Este plásmido fue generado a partir de el pC₄F_v1E, en el cual se clonó el fragmento Fv2 de pC₄MF_v2E en el sitio Spe I, obteniéndose tres copias en tandem de FKBP12* (Fv3).

FKBP12*: En los tres plásmidos la secuencia original de FKBP12 fue mutada en el aminoácido 36 de Fenilalanina a Valina. Se ha visto que esta mutación da una mayor afinidad para interactuar con la droga sintética AP20187 (67).

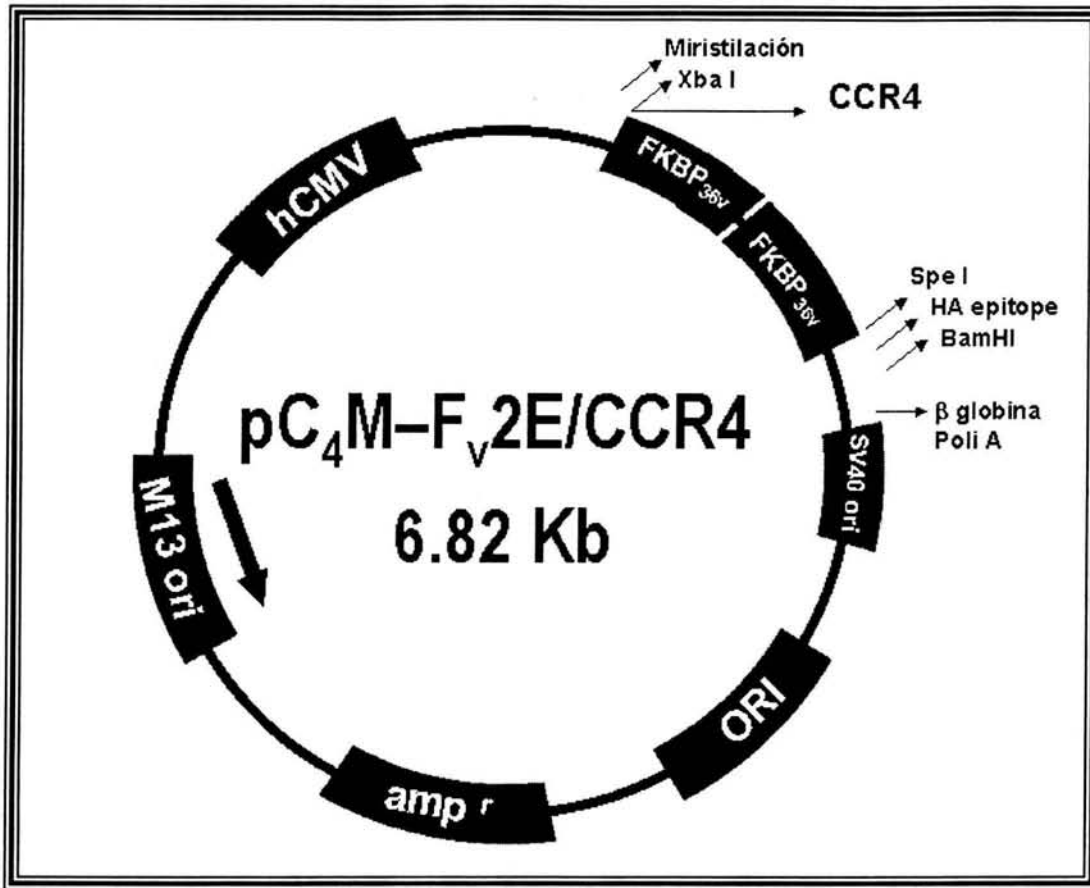


Figura 5. Plásmido pC4M-Fv2E. Se muestran las principales características del plásmido y el sitio de clonación de CCR4 en el sitio Xba I 692. Las moléculas de FKBP se encuentran adyacentes a este sitio en los tres plásmidos. Para la generación de pC4Fv3E se clonó el fragmento Fv2 en el plásmido PC4Fv1E en el sitio Spe I que corresponde a 2457.

b. **Agente dimerizador**

AP20187 es una molécula generada sintéticamente en su totalidad (ver figura 6) a partir de las modificaciones hechas a la molécula FK1012. Es un dimerizador que se utiliza para inducir homodimerización. No tiene ninguna propiedad inmunosupresora y no es tóxica para las células. Además posee mayor estabilidad en ensayos in vivo.

MATERIAL Y METODO

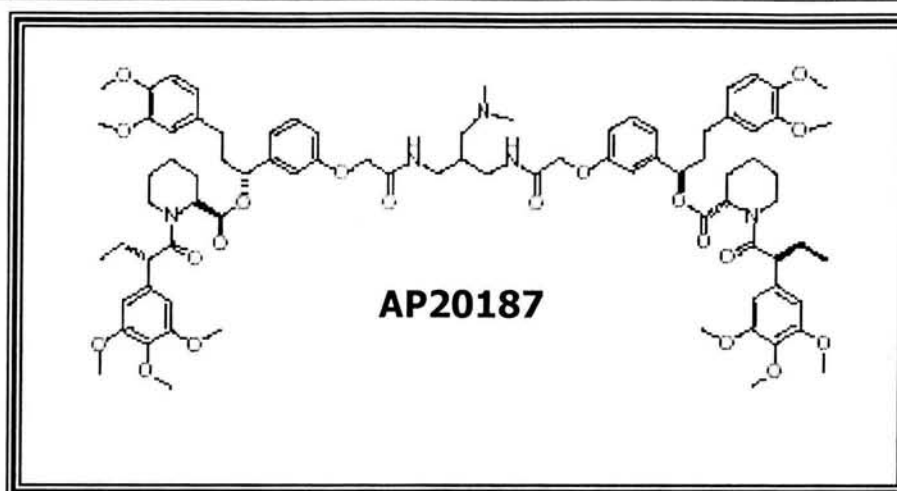


Figura 6. Estructura Química del Agente Dimerizador AP20187 .

iii. Secuenciación directa para determinar orientación

Para secuenciar cada una de las construcciones, se desnaturalizaron 3.5 μ g de cada uno de los plásmidos con NaOH 2M y EDTA 2mM a 37° C. Se precipitaron con CH₃COONa 3M y etanol absoluto, (Todos los reactivos de USB Sequenase 7 V. 2.0). . Se utilizaron los primers: 3' – 5'; AT GCC TTC TTT GGT GCA AGG CTT, 5' – 3'; AAA AAC ACG AGA CGG TTA TGA CA, 5' – 3'; TGG AGA AGC CGG TCG CTT AAC, que se unen en los sitios 283 – 261, 1156 – 1176 y 651 – 671 respectivamente. Los primeros mapean en CCR4 y el tercero en pCGNN. El annealing se realizó a 65° C durante 3 min, esto es para que los primers se unan al DNA y posteriormente la enzima (Sequenase) incorpore los nucleótidos. Se utilizó α ATP-³⁵S de Amersham. La reacción de secuencia se corrió en un gel de acrilamida (acr-bisacr 40%), SDS, Urea 8% para determinar las secuencias. Cada una de las autorradiografías obtenidas se leyeron directamente y se compararon con los datos reportados en el GenBank utilizando el software Standard nucleotide-nucleotide BLAST ® para demostrar que correspondieran a las secuencias de clonación de CCR4 en el plásmido pCGNN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>).

iv. Aislamiento y estimulación de linfocitos humanos de sangre periférica

Las células humanas de sangre periférica se obtuvieron por donación voluntaria. La sangre se obtuvo usando heparina como anticoagulante (20 U/ml). Una vez aislado un volumen de sangre, se diluyó 1:1 en HBSS (Buffer Salino). Cuidadosamente la sangre se vertió en tubos de polipropileno, el cual ya contenía un volumen igual de Histopaque 1077 (Sigma) (éste es una matriz de diatrizoato de sodio y Ficoll). Para separar las células mononucleares de los polimorfonucleares se centrifugó por 30 min a 400 x g, temperatura ambiente (ver figura 7). Después de centrifugar la sangre se formó una interfase, en la cual se encuentran las células mononucleares (MN), ésta se aisló y se resuspendió en HBSS para eliminar el Ficoll. Se centrifugó una vez más con las mismas condiciones. Para finalizar, se lavó dos veces más cambiando el medio y resuspendiendo al final en RPMI 1640, 10% SFB, 1% Pen / Strep, 25 mM HEPES incubando a 37° C, 5% CO₂ y 90 % de humedad.

Después de incubar de 2 a 6 horas, se agregó fitohemaglutinina (PHA – L) (Boehringer – Mannheim) 10 µg/ml para activar a la población de linfocitos y se incubó en las mismas condiciones durante 96 horas, para posteriormente agregar IL-2 e incubar 24 h más (78, 79). Los monocitos humanos se adhieren después de unas horas de estar en cultivo, mientras que los linfocitos humanos se mantienen en suspensión, por lo que se descartan las células adheridas y solo se utiliza la suspensión que contiene los linfocitos activados.

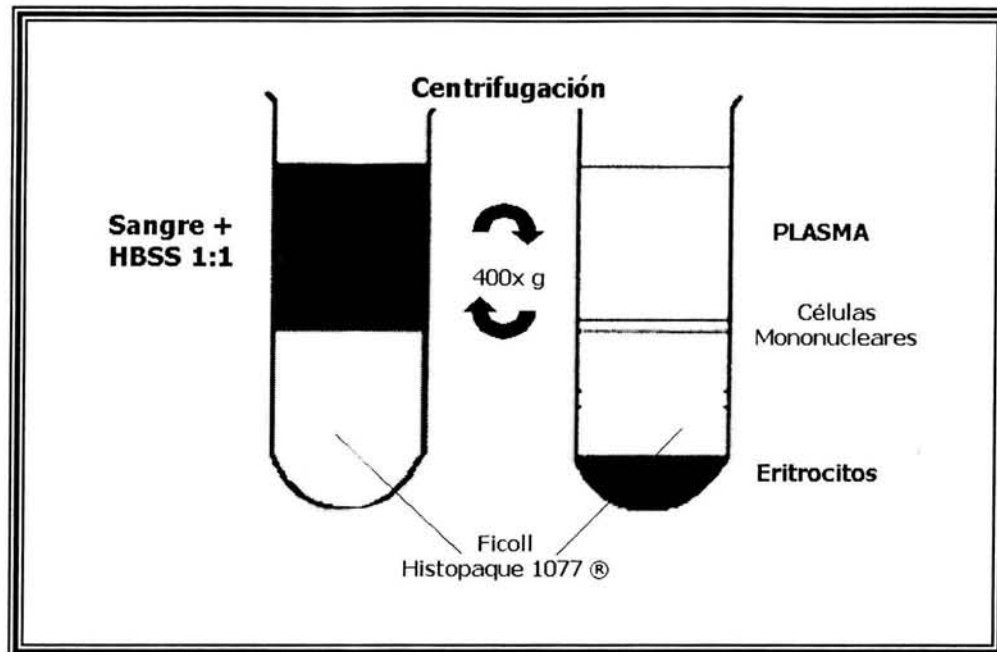


Figura 7. Separación de células mononucleares por el método descrito por Boyum (1968) (ref. 80, 81). Las células polimorfonucleares se sedimentan en conjunto con los eritrocitos, mientras que las células mononucleares se separan en la interfase que se forma. Se centrifuga durante 30 minutos a temperatura ambiente.

v. Transfección transitoria de CCR4-FKBP12(n) en células Jurkat T Ag

Por electroporación, se induce la incorporación de DNA en células eucariontes, una vez que lo han incorporado son capaces de expresar las moléculas transcritas. Las células seleccionadas para realizar la transfección transitoria por electroporación, fueron la línea celular Jurkat T Ag. Estas células provienen de una leucemia linfocítica aguda humana, expresan el fragmento largo T de SV40. Las condiciones con las cuales se electroporaron son las siguientes: BTX ECM 630; 250 V Low Voltage; 125 Ω ; 800 μ F. Se incubó con RPMI 1640, 10% SFB, 1% Pen / Strep, 25 mM HEPES por 24 h. Se cambia el medio y se resiembran con las mismas condiciones por 24 h más. El número de células que se utilizaron por ensayo es 1×10^7 con 5 μ g de DNA de cada una de las moléculas.

vi. Extracción de RNA y RT – PCR

Se realizaron extracciones de RNA de los linfocitos humanos activados con PHA (10µg/ml) – IL-2 y de la línea celular Jurkat T Ag transfectadas con CCR4-FKBP12(n) y de las células estimuladas con la droga AP20187; utilizando STAT – 60™ (Tel – Test Inc). Las muestras se resuspendieron en STAT – 60™ y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron 15 min a 14 000 rpm. Como resultado se forma una separación de fases y se aisló la fase acuosa superior que contiene el RNA. Se agrega Isopropanol y se centrifugó 30 min a la misma velocidad. Se lavó con etanol al 75% y se secaron las muestras. El pellet se resuspendió en agua DEPC (0.1%). El análisis de la calidad y estado del RNA se hizo por electroforesis en geles de agarosa.

La RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction) se realizó como control de transfección (células transfectadas Jurkat T Ag) o de expresión del receptor (linfocitos humanos activados) utilizando el sistema de SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GIBCO BRL). Se utilizaron los primers 5' ATG AAC CCC ACG GAT y 3' AAA AAG GAT GTC TCG que amplifican 1.084 Kb de CCR4. Como control de RT-PCR se amplificó CXCR4 y β-actina: con los primers: para CXCR4 CCA CCG CAT CTG GAG AAC y ACA TCT GTG TTA GCT GGA GTG A, mientras que para β-Actina TAG CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC y TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG. Para los linfocitos humanos, además de los primers anteriores se amplificaron bandas para CCR2 con los primers TGG CTG TGT TTG CTT CTG TC y TCT CAC TGC CCC TAT GCC TCT y se utilizaron primers que se unen en zonas diferentes de CCR4 como control: GTG GGC TTT TAC AGT GGC AT y TAA GAT GAG CTG GGG GTG TC que amplifican un fragmento de 738 bp.

MATERIAL Y METODO

El programa utilizado para amplificar el receptor fue el siguiente: Desnaturalización inicial: 10 min 95° C, 30 ciclos de: desnaturalización 1min 95° C, annealing 2 min 57° C, extensión 3 min 72° C y la extensión final de 10 min 72° C. (Icycler, Bio Rad Inc)

vii. Quimiotaxis

Este ensayo se realizó para analizar la respuesta funcional, de los linfocitos humanos y de las células transfectadas con CCR4-FKBP12(n). Las células humanas después de activarse durante 5 días, se centrifugaron y resuspendieron en HBSS BSA 0.05% (medio de quimiotaxis) a una concentración de 5×10^6 /ml y se les tiñó con calceína (1 μ g/ml) para su posterior análisis por fluorometría(30 min 37 °C en oscuridad agitando cada 10 min). Las células Jurkat T Ag, transcurridas 48 h después de la transfección se centrifugaron y resuspendieron en medio de quimiotaxis y se resuspendieron a 5×10^6 /ml, para después teñirse con calceína de igual forma. La estimulación con la droga AP20187 (50 ng/ml 37° C) se realizó durante 10 min previos a cargar las células en la cámara de Boyden. La inhibición de quimiotaxis se realizó con Toxina pertussis 100ng/ml

Se realizaron distintas concentraciones de CCL17 en medio de quimiotaxis (0, 10 , 50, 100, 500 y 1000 ng/ ml). Se realizó una comparación de quimiotaxis para los linfocitos humanos activados con el otro ligando de alta afinidad de CCR4: CCL22. Las diluciones se incubaron durante 15 min a 37° C previos a cargarlas en la cámara de quimiotaxis.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon membranas de quimiotaxis con poros de 5 μm de diámetro, de policarbonato libres de PVP (polivinil pirrolidona). Este tipo de células requieren de proteínas de matriz extracelular, para adherirse a la membrana, por lo que cada membrana, se incubó previo al ensayo, durante 30 min a 37° C con Colágena Tipo I (20 $\mu\text{g/ml}$). En la cámara de Boyden (ver figura 8a) se cargaron en la parte inferior las distintas concentraciones de quimiocinas (25 μl / pozo) y en la parte superior las células (50 μl /pozo). Se incubaron durante 90 min a 37° C, 5% de CO₂ y 90 % de humedad. Después se separan las células que no migraron de la membrana de quimiotaxis y se enjuaga la membrana con PBS. A continuación se seca (ver figura 8b)y se fija con Metanol 80 % o Fix Solution (Diff Quick). El análisis de las células se hizo utilizando el Fluor S (Bio Rad Inc).

MATERIAL Y METODO

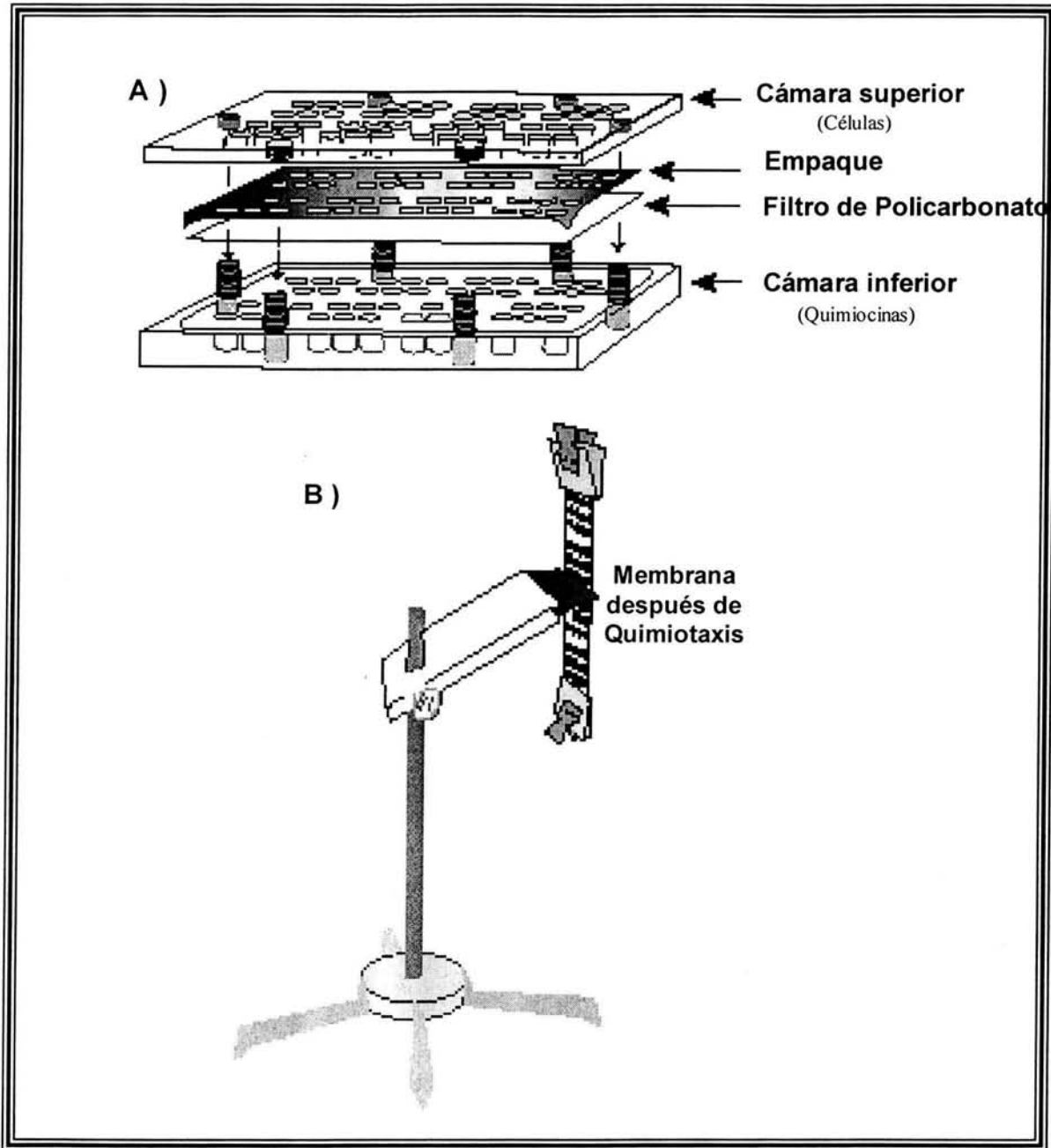


Figura 8. a) Cámara de Boyden. En la cámara inferior se colocan las quimiocinas en distintas concentraciones (30 ml/ pozo), después se coloca la membrana (filtro) de policarbonato, sobre esta se coloca un empaque y al final la cámara superior, donde las células se cargan (5×10^6 ; 50 ml/ pozo). b) Transcurrido el tiempo de migración, se raspa la membrana para eliminar las células que no migraron y se fija con Fix Solution (Diff-Quik) (Modificado de Ernst et al, 1999) (82).

VII. RESULTADOS

La orientación adecuada de los receptores clonados en los plásmidos pC₄F se determinó con patrones de restricción de las secuencias del Receptor para Quimiocinas CCR4. Cuando se digirieron los vectores pC₄F_v1E, pC₄MF_v2E y pC₄F_v3E con la enzima Sac I, y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, se pudo observar el siguiente patrón de restricción: tres bandas 2 constantes de 0.5 y 0.3 Kb y un variable de 5.5, 5.8 o 6.1 Kb correspondientes a los productos de digestión de Sac I en los sitios 9, 522 y 811 (La tercera banda es la que permite identificar la orientación del inserto) de cada uno de los diferentes vectores de clonación (ver figura 9). La variabilidad en peso de la banda más grande corresponde a la diferencia en peso de los vectores provocada por la clonación de diferente número de copias de FKBP12 (cada una de las copias de FKBP12 pesa 0.33 Kb) en cada uno de ellos. Si el inserto está clonado erróneamente aparecen las bandas de 5.5 y 0.513, pero la banda de 0.289 cambia por 1.1 Kb

El análisis de restricción de los vectores pC₄F_v1E, pC₄MF_v2E y pC₄F_v3E mostró que las moléculas quiméricas se habían generado satisfactoriamente. No obstante un análisis más fino se requirió para eliminar cualquier posibilidad de error, por lo que se empleó la secuenciación directa. Con las lecturas directas de la secuenciación y la comparación de las secuencias en el standard nucleotide-nucleotide BLAST ®, se pudo determinar que las moléculas quiméricas se encuentran en la orientación correcta y que el marco de lectura (ORF) se conservó, permitiendo así la transcripción y la expresión de la molécula. En la secuenciación de las moléculas de CCR4 en los plásmidos del sistema de dimerización se analizaron las secuencias correspondientes a los sitios de restricción de la enzima Xba 1 y Eco R1 contenidos en CCR4 como control positivo de clonación y de orientación. Para las tres moléculas se registró la misma secuencia positiva.

RESULTADOS

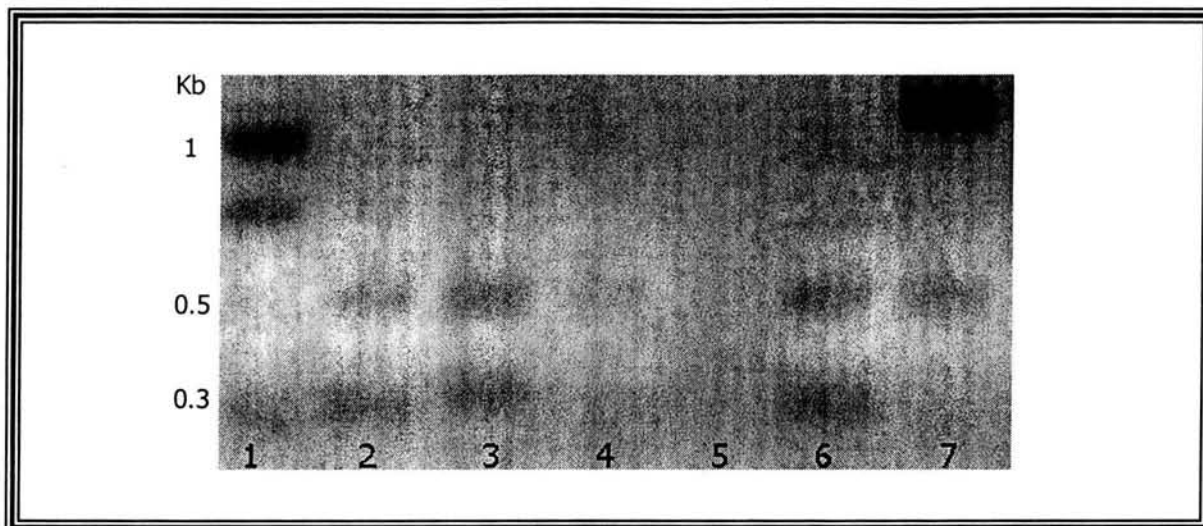


Figura 9. Patrón general de restricción para los plásmidos pC4Fv1E y pC4MFv2E, pC4Fv3E con CCR4 clonado en el sitio 692 (Xba I). Digestión con Sac I, aparecen tres bandas constantes que corresponden al vector sin el inserto 5.5 (no se muestra en la figura), 0.5 y 0.3 Kb. Esto indica la orientación adecuada del inserto, si el inserto está clonado erróneamente aparecen las bandas de 5.5 y 0.513, pero la banda de 0.289 cambia por 1.1 Kb. 1. 1Kb Plus Ladder (GIBCO BRL), 2. pC4-Fv1E-CCR4, 3. pC4M-Fv2E-CCR4, 4. Orientación Incorrecta, 5. No ligación de CCR4, 6. pC4-Fv3E-CCR4, 7. Orientación Incorrecta.

Posteriormente con los plásmidos conteniendo el inserto de los receptores quiméricos, se transfectaron las células Jurkat T Ag. Para corroborar la transfección verificamos que las moléculas de CCR4-FKBP12(n) se transcribieran por RT-PCR. Los resultados obtenidos muestran que después de la transfección, las células Jurkat T Ag expresaban transitoriamente el transcrito de las distintas moléculas quiméricas (ver figura 10). Como control, se realizó RT-PCR a células Jurkat T Ag sin transfectar, para demostrar que éstas células no expresan endógenamente CCR4.

RESULTADOS

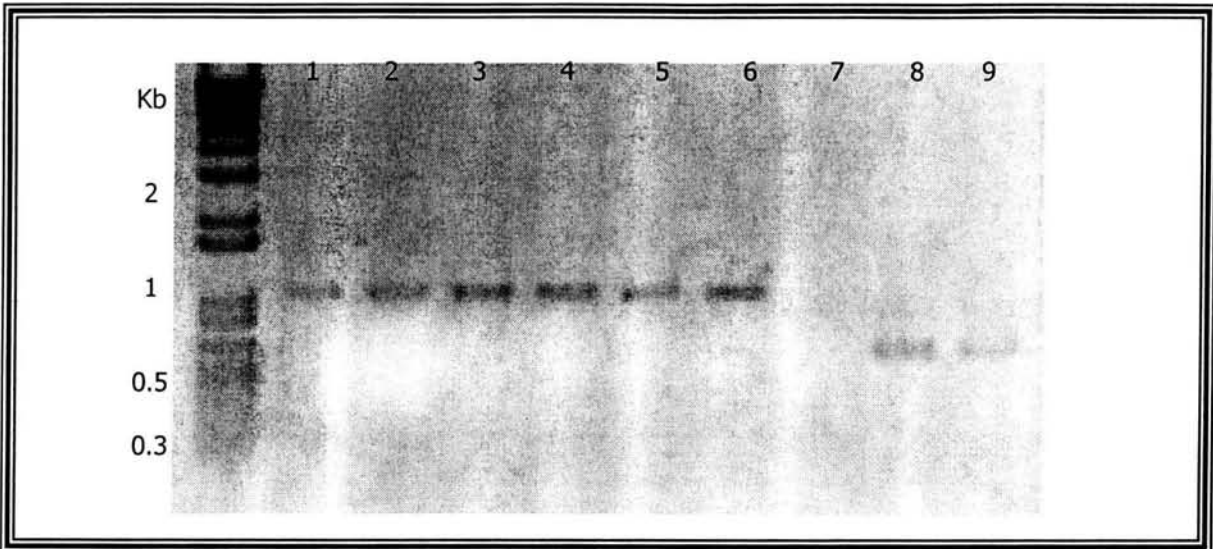


Figura 10. Detección de las moléculas pC4Fv1E y pC4MFv2E, pC4Fv3E con el receptor para quimiocinas CCR4 por RT-PCR. El RNA total se obtuvo de células Jurkat T Ag transfectadas transitoriamente con las construcciones de 1,2 y 3 copias de FKBP/CCR4. Los carriles 1,2 y 3 corresponden a CCR4; 4,5 y 6 son el control de PCR con primers para CXCR4; 7,8 y 9 corresponden a β -actina.

Los controles positivos para la expresión de CCR4 se realizaron con linfocitos humanos de sangre periférica activados durante 5 días con PHA/ IL-2. Wong, M y E. Fish (1998) reportan que CCR4 se expresa en linfocitos humanos activados con mitógenos polivalentes como PMA y se ha reportado que los receptores para quimiocinas se sobreexpresan cuando se utilizan estos mitógenos, en particular PHA. Linfocitos humanos sin activar también fueron sometidos a RT-PCR como controles. Se utilizaron primers para amplificar CXCR4 y β -actina. Escogimos los primers de CXCR4 y β -actina como controles de PCR, porque las células Jurkat T Ag expresan constitutivamente éstas dos proteínas (ver figura 11).

RESULTADOS

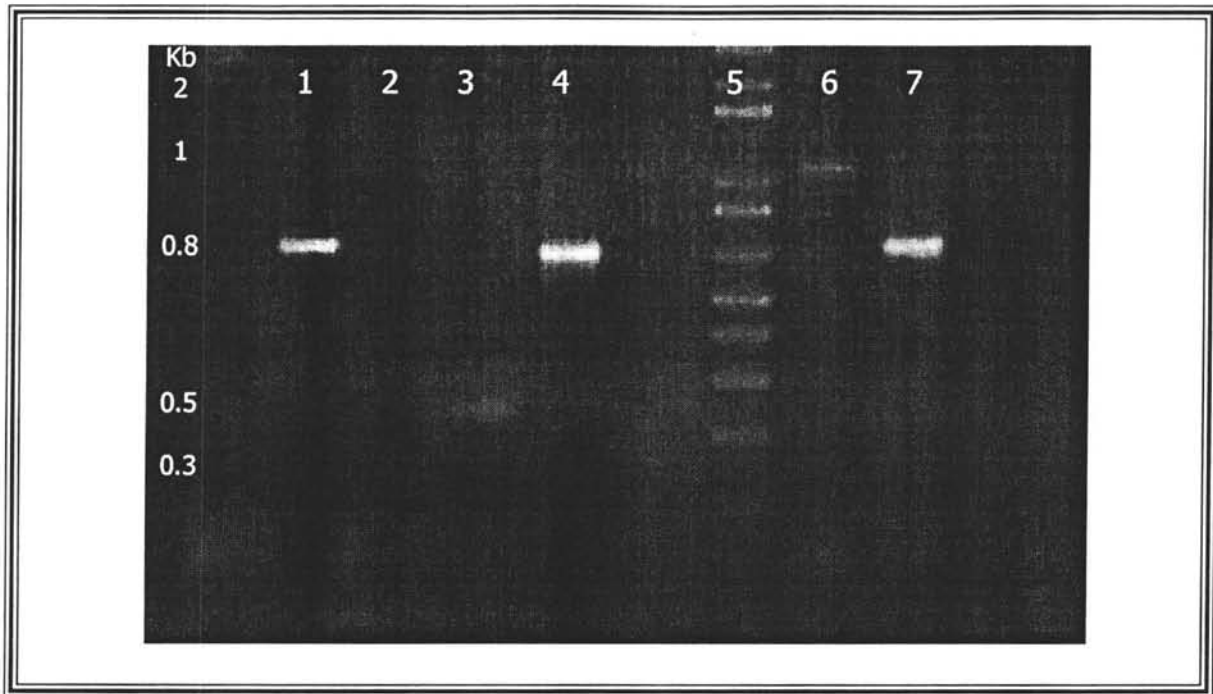


Figura 11. 1. Jurkat T Ag transfectadas con CCR4 (pREP9/CCR4); 2. Linfocitos humanos no activados; 3. Linfocitos humanos activados con PHA/IL-2; 4. Linfocitos humanos activados con PHA/IL-2; 5. Marcador 1 Kb ladder; 6 y 7. Jurkat T Ag transfectadas con CCR4-FKBP12(2). Se utilizaron primers para CCR4 (comparar las secuencias en material y método) 1, 2, 4 y 7. primers CCR4 de 0.8 kb; 3 β -actina; 6 primers CCR4 de 1 Kb

Por RT-PCR se demostró que las moléculas no solo son incorporadas por la línea celular, si no que además la transcripción de cada una de estas se lleva a cabo. Con los primers para CCR4 se amplifica una banda de 1 Kb, con CXCR4 de 0.9 Kb, mientras que β -actina amplifica un fragmento de 0.4 Kb.

Para analizar si las células transfectadas con las moléculas quiméricas de CCR4 generan respuestas funcionales, se realizaron ensayos de quimiotaxis. Como controles, se utilizaron los linfocitos humanos activados y no activados (ver figuras 12-15). Se puede observar que los linfocitos humanos sin activar no expresan CCR4 y por tanto no muestran actividad quimiotáctica en presencia de CCL17, sólo

RESULTADOS

las células que fueron activadas con PHA/ IL-2 realizan quimiotaxis frente a CCL17 (figura 12). El nivel más alto de quimiotaxis se encontró a 100 ng/ml de CCL17 disminuyendo en una curva dosis-respuesta típica en forma de campana.

Distintos ligandos actúan de formas diversas a través del mismo receptor, por lo que se compararon a los 2 ligandos mas afines a CCR4, por lo que se realizaron ensayos de quimiotaxis con CCL17 y con CCL22. Aunque la cinética para CCL22 fue similar a la de CCL17 la respuesta quimiotáctica es menor con CCL22 (ver figuras 14 y 15). En presencia de CCL22 los linfocitos humanos también mostraron un pico de actividad máxima en 100 ng/ml y una saturación que inicia en 500 ng/ml. Las células no activadas con PHA/ IL-2 no mostraron actividad, por lo que al igual que con CCL17 se concluye que la expresión de CCR4 es nula en linfocitos no activados (figura 12). Los tratamientos con Toxina pertussis (Ptx), que es un inhibidor de proteínas G heterotriméricas, bloquearon totalmente la quimiotaxis.

Como se mencionó anteriormente los receptores para quimiocinas pertenecen a un grupo extenso de receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptor GPCR) por lo tanto la respuesta funcional a través de receptores para quimiocinas es dependiente de proteínas G (83-85). Para demostrar esta característica en CCR4, se hicieron tratamientos con una proteína derivada de *Bordetella pertussis*: toxina pertussis (Ptx) que inhibe proteínas Gi. La toxina pertussis no solo inhibe la respuesta quimiotáctica a través de GPCRs, sino además otras respuestas funcionales como cambios en los niveles de flujo de calcio; en condiciones fisiológicas provoca la muerte de las poblaciones de linfocitos T. En estos experimentos se observó que la toxina pertussis inhibe totalmente quimiotaxis en los linfocitos humanos (ver fig. 12-16). Si se comparan los niveles de respuesta de las células no activadas con las que fueron tratadas con toxina pertussis, se observan niveles muy similares, lo que indica que la quimiotaxis a través del receptor CCR4, es totalmente dependiente de proteína G. Estos resultados confirman observaciones hechas por otros grupos de investigación (86-89).

RESULTADOS

En contraste las células sin activar no mostraron diferencias significativas en respuesta a CCL17 con o sin tratamiento con toxina pertussis.

En general, la respuesta quimiotáctica de los linfocitos humanos es mucho mayor que con cualquiera de las transfecciones con las diferentes quimeras de CCR4 en la línea celular. Esto puede deberse a que la molécula de CCR4 expresada por las células Jurkat T Ag solo es transitoria y que en las líneas celulares se encuentran una mezcla heterogénea de células que no expresan las moléculas en la superficie al mismo nivel. Los linfocitos humanos en cambio, si son una población homogénea seleccionada por la activación con PHA/IL-2. Para los ensayos de quimiotaxis con las células transfectantes no se hicieron tratamientos con CCL22, excepto para CCR4^{wt} (pREP9/CCR4). En este último caso se evidenció que la respuesta es similar que con los linfocitos humanos, es decir, el comportamiento es el mismo, con pico en 100 ng/ml y después comienza a descender, pero la proporción de actividad en comparación con CCL17 es mucho menor.

RESULTADOS

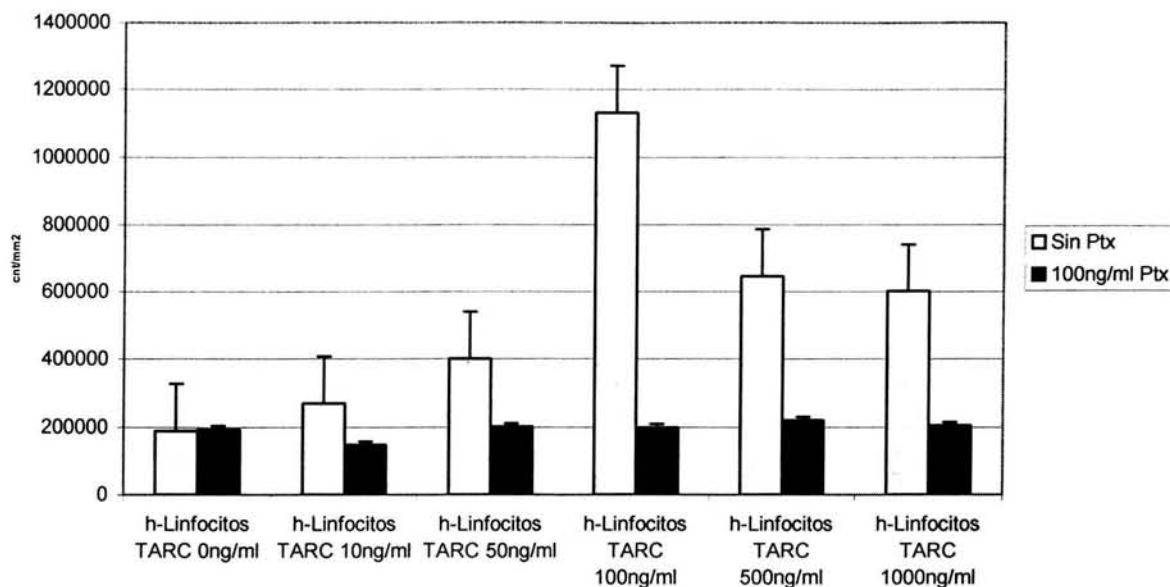


Figura 12. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos activados con PHA /IL2, con la quimiocina CCL17 (TARC).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

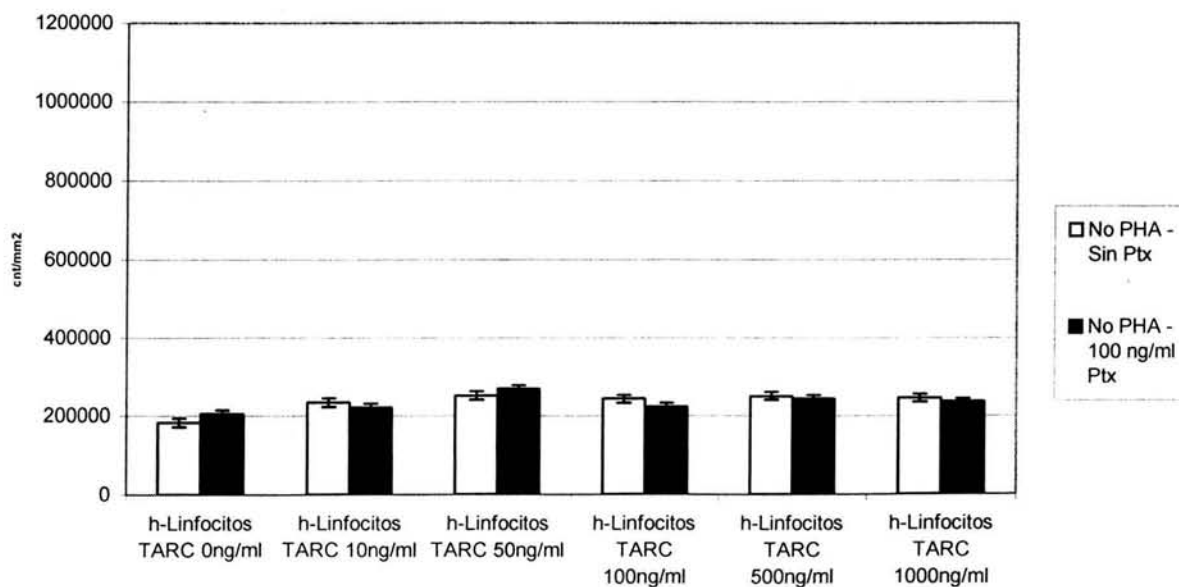


Figura 13. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos no activados, con la quimiocina CCL17 (TARC).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

RESULTADOS

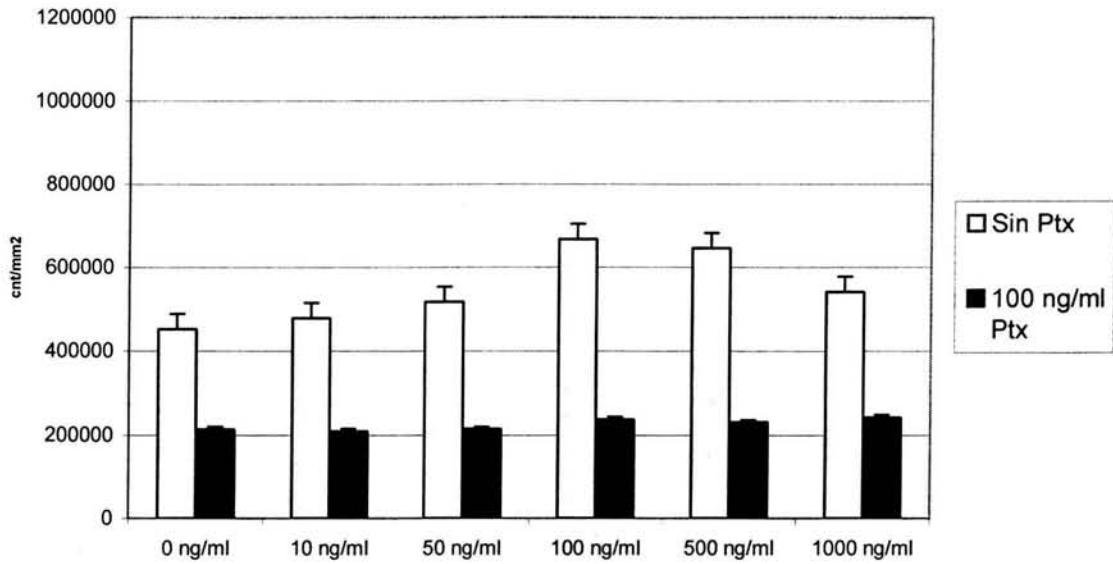


Figura 14. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos activados con PHA /IL2, con la quimiocina CCL22 (MDC).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

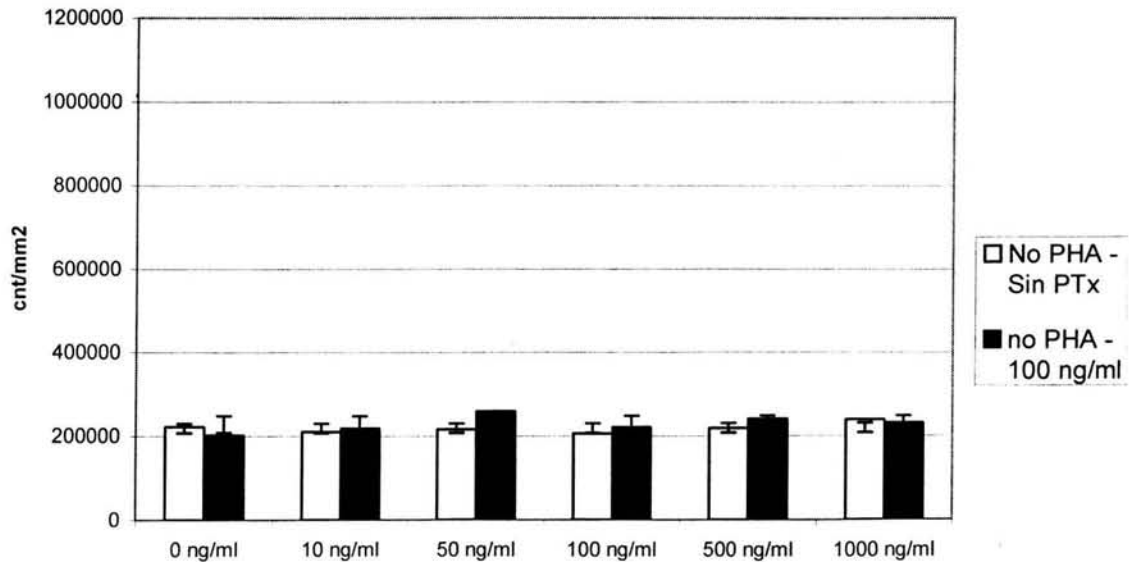


Figura 15. Actividad quimiotáctica de linfocitos humanos no activados, con la quimiocina CCL22 (MDC).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxi

RESULTADOS

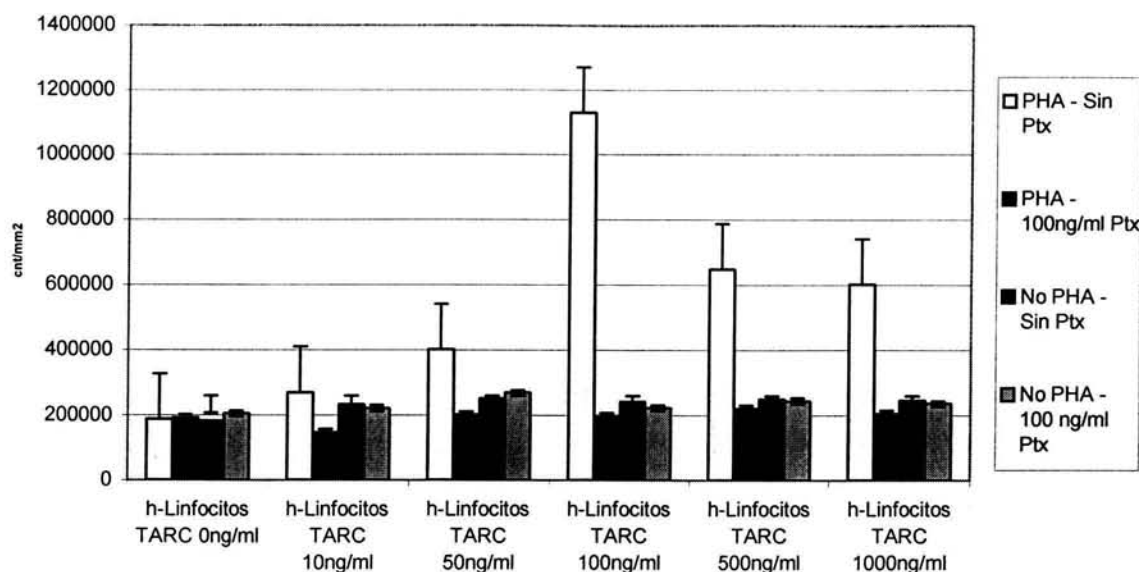


Figura 16. Comparación de la actividad quimiotáctica de linfocitos humanos no activados y activados con PHA /IL2, con la quimiocina CCL17 (TARC).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

La respuesta quimiotáctica de las células transfectadas con CCR4-FKBP12(n) fue similar a los niveles de quimiotaxis de linfocitos humanos activados y no activados, además células sin transfectar fueron analizadas para este ensayo, se compararon con células transfectadas con CCR4 sin FKBP12 (en pREP9/CCR4)(ver figura 17). El objetivo de transfectar células solo con CCR4 es para ver el nivel de quimiotaxis que induce este receptor por si solo, sin ninguna modificación traduccional provocada por la clonación de FKBP12. Las células Jurkat T Ag transfectadas con CCR4 mostraron niveles de quimiotaxis similares a los de los linfocitos humanos activados, con un máximo de quimiotaxis en 100 ng/ ml al igual que las células humanas, solo que hay diferencias significativas en cuanto al nivel de respuesta. La respuesta máxima en la línea celular transfectada con CCR4 alcanzó apenas el 57 % de respuesta en comparación con los linfocitos humanos activados.

RESULTADOS

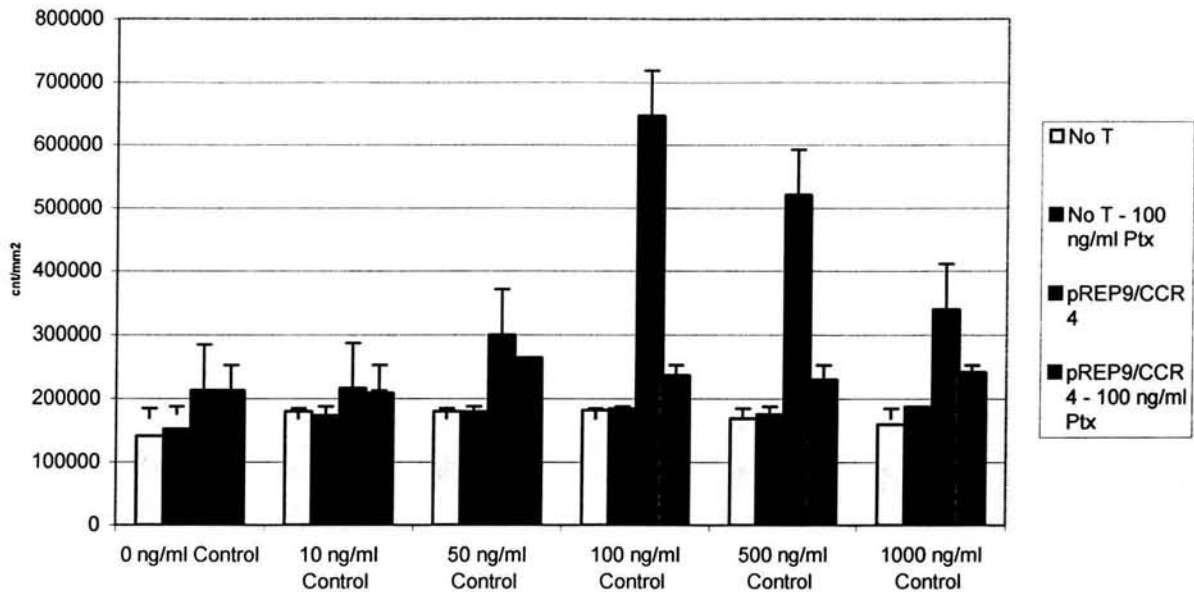


Figura 17. Comparación de la actividad quimiotáctica de la línea celular Jurkat T Ag sin transfectar y transfectada con CCR4 (pREP9/ CCR4), con la quimiocina CCL17 (TARC). Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

La actividad quimiotáctica, al igual que en los linfocitos humanos, se vio disminuida por el uso de Ptx. Es claro que no hay diferencias entre las células no transfectadas tratadas y no tratadas con la toxina, con lo cual se corrobora la nula expresión endógena de CCR4 en la línea celular. En cuanto a las células transfectadas con CCR4, el tratamiento con Ptx inhibió la actividad quimiotáctica.

Las células transfectadas con las diferentes quimeras, mostraron desempeños diversos en cuanto a la actividad quimiotáctica. Como se observa en la figura 18, las quimeras de CCR4-FKBP12(1) no producen respuesta quimiotáctica, en comparación con el mismo grupo de células inhibidas con toxina pertussis. Cuando se añadió la droga AP20187, no se observaron diferencias significativas con respecto a las células que no recibieron el tratamiento con la droga.

RESULTADOS

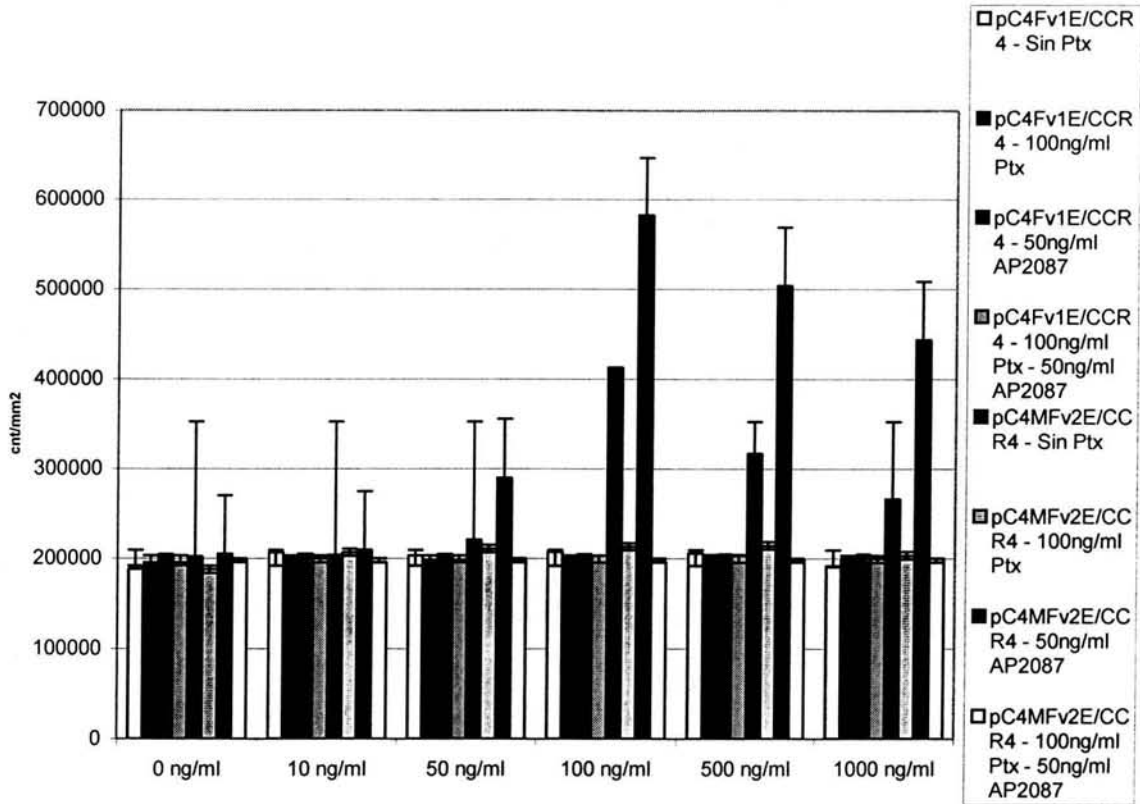


Figura 18. Comparación de la actividad quimiotáctica de la línea celular Jurkat T Ag transfectada con CCR4-FKBP12(1) y CCR4-FKBP12(2) , con la quimiocina CCL17 (TARC).Se utilizó la droga AP20187 como agente dimerizador (50 ng/ml).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

La figura 18 además se muestra el comportamiento de las células transfectadas con CCR4-FKBP12(2). El grupo transfectado y sin tratamiento con la droga muestra una cinética clásica de quimiotaxis con un pico de actividad máxima en 100 ng/ml. Al tratar este mismo grupo de células con AP20187, se aprecia que hay sinergia a partir de 50 ng/ml, y al observar el pico, en 100 ng/ml, se observa un aumento del 30% con respecto a las transfectantes de CCR4-FKBP12(2) sin la droga. En ambos casos la quimiotaxis se inhibe al tratarlas con pTx.

RESULTADOS

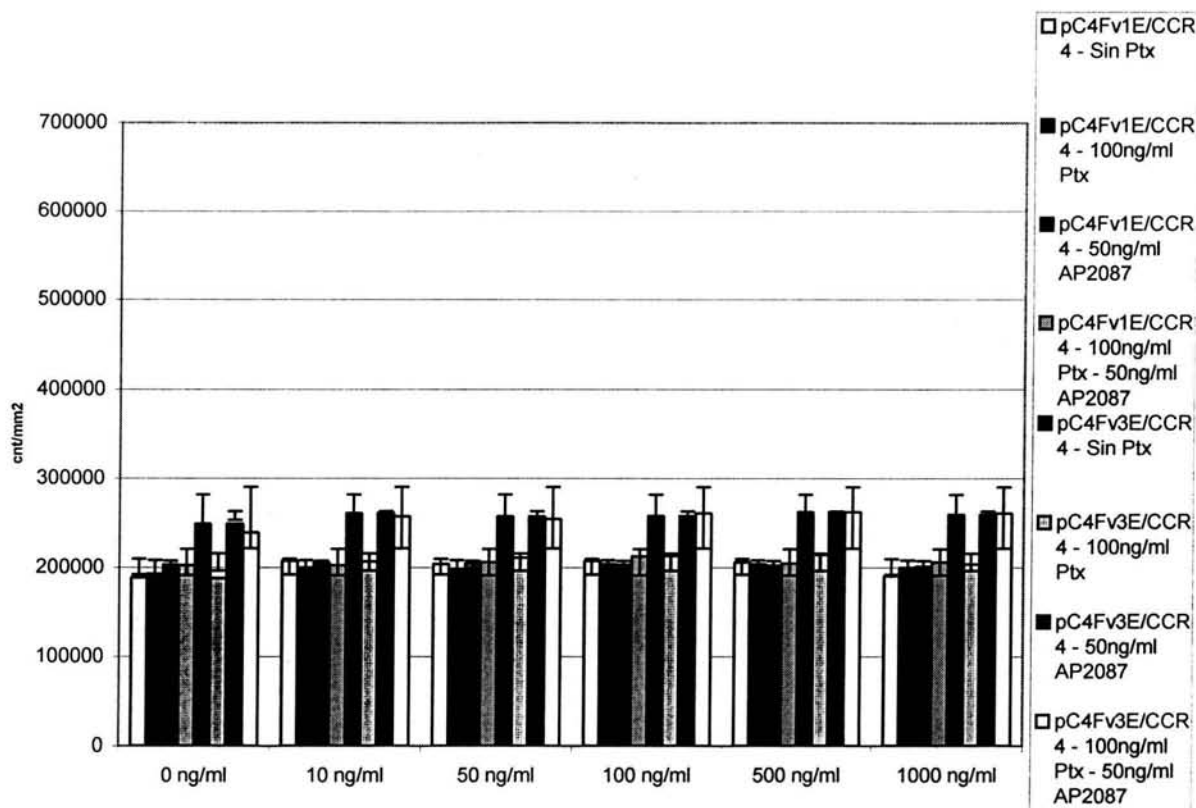


Figura 19. Comparación de la actividad quimiotáctica de la línea celular Jurkat T Ag transfectada con CCR4-FKBP12(1) y CCR4-FKBP12(3) , con la quimiocina CCL17 (TARC).Se utilizó la droga AP20187 como agente dimerizador (50 ng/ml).Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis.

Las células CCR4-FKBP12(3) positivas mostraron una curva de quimiotaxis típica en forma de campana. La actividad máxima en este grupo de células corresponde a 10 ng/ml con la droga que en comparación con los valores obtenidos con las expuestas a pTx no muestra una diferencia significativa, esto es indicativo de que la quimiotaxis no se llevó a cabo (ver figura 19). Comparando a las transfectantes de CCR4-FKBP12(1) y CCR4-FKBP12(3) se observa que no hay diferencias significativas entre una y otra.

RESULTADOS

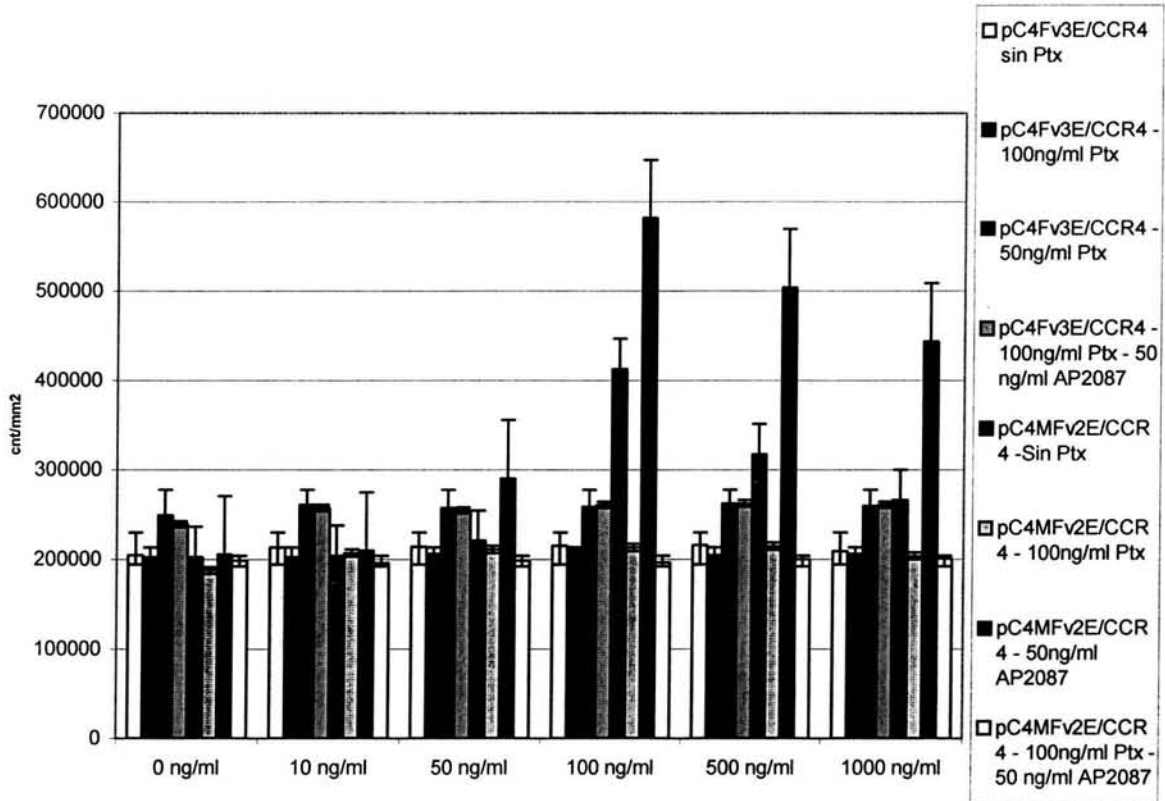


Figura 20. Comparación de la actividad quimiotáctica de la línea celular Jurkat T Ag transfectada con CCR4-FKBP12(2) y CCR4-FKBP12(3) , con la quimiocina CCL17 (TARC). Se utilizó la droga AP20187 como agente dimerizador (50 ng/ml). Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis

En la figura 20 se muestran las diferencias observadas entre las transfectantes CCR4-FKBP12(2) y CCR4-FKBP12(3) con respecto a su actividad quimiotáctica. Basados en la hipótesis de esta investigación, se esperaba encontrar el mayor efecto funcional en el grupo de CCR4-FKBP12(3) en presencia de AP20187. Sin embargo en esta figura claramente se puede apreciar que no hay respuesta quimiotáctica por parte de este grupo en comparación con las células transfectadas con CCR4-FKBP12(2).

RESULTADOS

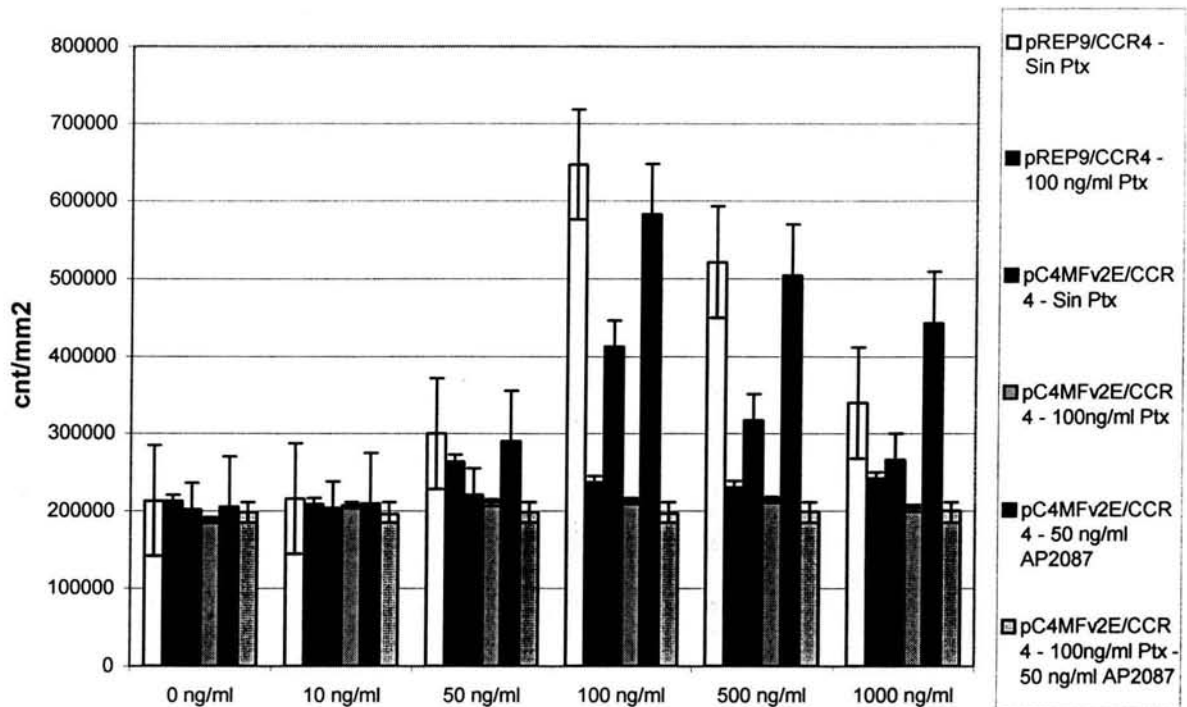


Figura 21. Comparación de la actividad quimiotáctica de la línea celular Jurkat T Ag transfectada con CCR4 (pREP9/CCR4) y CCR4-FKBP12(2) , con la quimiocina CCL17 (TARC). Se utilizó la droga AP20187 como agente dimerizador (50 ng/ml). Las muestras fueron tratadas con Ptx (100 ng/ml) para inhibir quimiotaxis

Para corroborar la sinergia provocada por la agregación de receptores en presencia de la droga AP20187, se compararon las células transfectantes con CCR4-FKBP12(2) con células transfectantes de CCR4 (pREP9/CCR4) para determinar si hay diferencias entre la respuesta producida por el tratamiento con la droga mas la quimiocina (CCL17) que solo con el receptor y su ligando. Sorprendentemente, encontramos que las células transfectantes con CCR4 tuvieron un desempeño mayor que las células CCR4-FKBP12(2) en 100 ng/ml (pico de actividad) de CCL17. en estas células la quimiotaxis también se vio inhibida por pTx al igual que los otros grupos transfectantes (ver figura 21).

VIII. DISCUSIÓN

Uno de los aspectos mas discutidos en la literatura en el área de las quimiocinas es acerca de la redundancia del sistema de regulación entre estas proteínas y sus receptores. Esta redundancia se propuso desde un principio como un mecanismo regulatorio potencial en la patogénesis. En algunos casos, como la neumonía eosinófila, un complejo formado por ligando–receptor produce el avance y desarrollo patológico de la enfermedad. Sin embargo en la mayoría de los casos, patrones espaciales y temporales de expresión de receptores y quimiocinas se vinculan con la especificidad ligando–receptor para dar como resultado una respuesta fisiológica multifactorial (90).

Para llevar a cabo el trafico de leucocitos a través del organismo y dirigirse a sitios de invasión, las células migran a través de gradientes de quimiocinas y esta migración juega un papel primordial para dirigir la vigilancia de órganos del sistema inmune y el ataque a sitios de inflamación (91), que se lleva a cabo fundamentalmente en procesos de desarrollo de enfermedades. En el caso de las células que migran a través de la expresión de CCR4, se les ha visto asociadas a enfermedades como asma, hiperreactividad en vías respiratorias (92), hipereosinofilia crónica (93) fallas en la activación de plaquetas (94), fallas en la población del timo en desarrollo (95) entre otras.

Para determinar el nivel de agregación de receptores de quimiocinas y su relación con los procesos de activación involucrados en fenómenos biológicos se utilizó un sistema de dimerización intracelular basado en el descrito por Spencer et al (op. cit). Se empleó este sistema para analizar el efecto de la agregación de los

DISCUSIÓN

receptores en la actividad quimiotáctica a través de CCR4, comparándolo con la actividad quimiotáctica *in vitro* de linfocitos T humanos, activados con PHA/IL-2 en presencia del ligando de CCR4: CCL17 (TARC) en concentraciones crecientes. En presencia de CCL17, se observó que los linfocitos T presentan una actividad quimiotáctica con pico en 100 ng/ml. Al comparar, el otro ligando de alta afinidad de CCR4: CCL22, se observó una cinética de quimiotaxis con un nivel de desempeño del 50% de CCL17. Los mecanismos involucrados en esta regulación no son claros, sin embargo ya se ha propuesto para otros receptores, mecanismos de regulación dependientes de ligando, en donde la variedad de respuestas incluye hasta 10 quimiocinas que se unen a un mismo receptor, como es el caso de CCR1, el cual une a 10 quimiocinas, 7 de ellas con alta afinidad: CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1), CCL15 (Lkn-1) y CCL23 (MPIF-1), mientras que a CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β) y CCL8 (MCP-2) los une con afinidad de baja a media respectivamente, evidenciados por diferencias en la inducción de quimiotaxis (96-104).

Para estudiar la actividad de CCR4 en linfocitos T, transfectamos el receptor en una línea celular que no expresa la molécula constitutivamente. Esta necesidad, parte de que si utilizáramos células que expresan CCR4 normalmente, los resultados obtenidos, siempre tendrían un nivel basal de expresión del receptor, y el discernir entre estos y los provocados por nuestra molécula sería sumamente difícil. La línea celular Jurkat T Ag no expresa CCR4 endógenamente como se demuestra en las figuras 9-11, sin embargo expresa constitutivamente el fragmento largo del antígeno T del virus SV40, que se une al origen de replicación de SV40, incluido en nuestro vector de expresión, que amplifica la transcripción de las secuencias contenidas bajo este marco de lectura.

En esta investigación se demostró que estas células no expresan CCR4 por RT-PCR utilizando primers para CCR4, CXCR4 y β -actina. Como se esperaba, al electroporar

DISCUSIÓN

pREP9-CCR4 en estas células, claramente, se puede apreciar una banda de 1.082 correspondiente a CCR4 (ver figuras 10 y 11). Por quimiotaxis quedó evidenciado de igual forma, que las células no transfectadas son CCR4⁻, ya que no migraron en presencia de los dos ligandos de CCR4: CCL17 y CCL22.

Para saber si la expresión de las moléculas quiméricas sería viable, se analizó la transcripción de la proteína por medio de RT-PCR después de transfectar la línea celular. De las células transfectadas con cada una de las quimeras, se extrajo RNA total y a partir de éste, se realizó el RT-PCR. En la figuras 9-11 se muestra la localización de CCR4 de longitud de 1.083 Kb, amplificado con primers específicos para el receptor. Cada una de las quimeras mostraron ser eficientemente transcritas en la línea celular; esto nos indica que las modificaciones hechas al receptor por la clonación de otras moléculas adyacentes a éste, no impidió que la transcripción se llevara a cabo. Incluso la quimera de CCR4-FKBP12(3) se transcribió, sin importar el tamaño de la molécula generada con la clonación que es la más grande de las tres.

Cada una de las transfecciones con las quimeras, se comparó con la transfección de CCR4 silvestre(pREP9-CCR4) en la misma línea celular y con células no transfectadas, para demostrar que la moléculas transcritas son producto de la transfección de las células con CCR4-FKBP(n). Los primers específicos para CCR4 amplifican, no solo en las células transfectadas con CCR4 sino además también las células con CCR4-FKBP(n) muestran una banda de 1.083 kb correspondientes a CCR4. En el RT-PCR realizado para las células sin transfectar con CCR4 no se amplificó ninguna banda.

En todos los ensayos de amplificación, se incluyeron primers para CXCR4 y β -actina, este ultimo se expresa constitutivamente en este tipo celular mientras que CXCR4 se expresa preferencialmente en células CD4⁺ naive, Th₀ y sufre regulación positiva (upregulation) en linfocitos activados con fitohemaglutinina e IL-2 (105).

DISCUSIÓN

Otra forma de detectar la expresión de las moléculas, se hizo utilizando anticuerpos contra CCR4 o contra el, epítotope de la Hemaglutinina del virus de la influenza, incluido en cada una de las quimeras de CCR4-FKBP12(n) por inmunoprecipitación. Este método ofrece la ventaja de poder observar la proteína quimérica inmunoprecipitada, comparándola con patrones de pesos moleculares, por SDS-PAGE. En este estudio se utilizaron los anticuerpos CKR-4 (H-48): α -CCR4 (Santa Cruz Biotechnologies) y 12CA5 α -HA (Roche) para inmunoprecipitar, sin embargo ninguno de los dos anticuerpos dio señal suficiente para detectar la molécula.

Las diferencias quimiotácticas, sirven como control de transfección, transcripción y traducción de CCR4 y estos resultados son apoyados por la expresión de los transcritos de cada una de las quimeras transfectadas.

CCL17 y CCL22 son ligandos de alta afinidad de CCR4, por lo que ambas inducen señalización a través de este receptor; las afinidades de unión y las concentraciones requeridas de ambas quimiocinas son similares a las interacciones de otros receptores para quimiocinas con sus ligandos. Además de mostrar actividades similares entre ellas, ambas quimiocinas comparten patrones de expresión *in vivo* análogos y están estrechamente vinculadas en el cromosoma 16 (locus 16q13). CCL17 y CCL22 participan de estas similitudes funcionales a pesar de compartir solo el 37% de identidad de aminoácidos, compartir el mismo receptor (CCL17 solo se une a CCR4, mientras que CCL22 se ha propuesto que se une además a CCR8), patrones y sitios (tejido específico) de expresión. Durante el curso de esta investigación, se encontraron diferencias significativas en los patrones de quimiotaxis entre los dos ligandos de CCR4. Se encontró que CCL17 indujo el doble de quimiotaxis que CCL22. En un estudio realizado por Toshio Imai et al (1998) se encontró que CCL22 realizó 4 veces mas quimiotaxis que CCL17 en la línea celular L1.2 transfectada con CCR4 (106). Al igual que en este estudio, el pico máximo de quimiotaxis se da en la misma concentración.

DISCUSIÓN

La dimerización representa un mecanismo regulatorio poderoso y flexible que implica diversas consecuencias, incluyendo actividades quimiotácticas. Se ha documentado y demostrado experimentalmente que varios tipos de receptores requieren dimerizarse para transducir señales (*e. gr.* Receptores para cinasas de tirosina) (ver Tabla 4). Mas particularmente, de la familia de GPCRs, se ha demostrado que llevan a cabo homodimerización los receptores β 2-adrenérgicos (107), los receptores opioides (108-110), los receptores D₁, D₂ y D₃ para dopamina (111-114), el receptor 5 metabotrópico para glutamato (115-119) los receptores extracelulares sensibles a calcio (120, 121) y en el caso de los receptores para quimiocinas, se ha demostrado esta actividad en CCR2b y CCR5 (122-126). Sin embargo, los mecanismos de dimerización entre cada uno de los tipos de receptores difieren considerablemente; por ejemplo, se ha visto que en el receptor β 2-adrenérgico, la dimerización involucra interacciones entre segmentos transmembranales (127-129); en los receptores opioides se ha demostrado por mutagénesis dirigida que la dimerización es dependiente del extremo carboxilo terminal, esto en contraste con los receptores extracelulares sensibles a calcio y los de glutamato que se dimerizan en función de los enlaces disulfuro de las cisteínas que presentan en la zona amino terminal.

En CCR2b y CCR5 se demostró que sus agonistas activan a la vez que funcionan como estabilizadores del homodímero formado por los receptores. Esto sugiere que la homodimerización tiene un papel regulatorio no solo en los mecanismos de activación, sino alternativamente en la desensitización y en el proceso de internalización de los receptores (que dependen del agonista). En CCR2, la evidencia indica que CCL2 (MCP-1) tiene un papel directo en la activación, que la dimerización es un prerrequisito para la señalización a través de éste receptor. Esto no significa que la dimerización sea universal para todos los receptores, pero implica que es un mecanismo de algunos GPCRs y que es necesaria para la transducción de señales.

DISCUSIÓN

Tabla 4. Estrategias implicadas en la dimerización de Proteínas (Modificada Klemm et al, 1998) (73)

Consecuencias físicas y fisiológicas de la dimerización	Ejemplos
Proximidad y Orientación	Receptores únicos transmembranales de superficie celular
Regulación diferencial por heterodimerización	Myc/Mad/Max Familia Bcl-2
Umbrales temporales y espaciales	Id Emc
Especificidad Intensificada	Proteínas de unión a DNA, DCoH
Aumento en superficie del área	Interacciones en receptores de factores de crecimiento
Transiciones reguladas monómero a dímero	Proteínas STAT Proteínas Smad
Barreras Cinéticas	E-caderina Sinaptotagmina

En el caso de CCR4, se indujo la agregación del receptor con la droga AP20187, sin embargo el agregado formado por los receptores podría afectar la estabilidad del complejo en presencia de la quimiocina, ya que el grupo de moléculas FKBP12 agregado con CCR4, presenta una estructura tridimensional modificada del complejo receptor-receptor. No obstante, el hecho de que las células transfectadas lleven a cabo quimiotaxis nos indica que los eventos de expresión del receptor en la membrana plasmática, unión a ligando, internalización de los receptores se realizan, además de la señalización para activar las células con sus consecuencias funcionales.

DISCUSIÓN

La quimiotaxis de las células transfectadas con CCR4-FKBP12(2) y CCR4-FKBP12(3) indica que en las células, la dimerización de receptores no es la única llave para activarlas, sino que eventos como la oligomerización y la multimerización pueden, no solo activar sino además mostrar un mayor actividad quimiotáctica como lo demuestran las figuras 17-21, donde la actividad quimiotáctica máxima realizada por el lote de células transfectadas con CCR4-FKBP12(2) es al menos dos veces mayor a cualquiera de los otros grupos transfectantes y no transfectantes. Estas figuras también muestran que hay, de alguna forma, saturación del sistema, dado que el lote transfectante con CCR4-FKBP12(3) muestra una actividad inferior, de solo el 44%, en comparación con el lote CCR4-FKBP12(2). Esto significa que el complejo multimérico, puede no ser tan estable como el oligomérico, que no es internalizado tan eficientemente como el complejo CCR4-FKBP12(2), o bien que la señalización a través del multímero es deficiente en comparación con el oligómero. La saturación del sistema puede deberse a inestabilidad molecular o imposibilidad estérica para mantenerse por el número de proteínas involucradas en las interacciones del complejo.

Hay diversas aproximaciones al conocimiento de la agregación de receptores, para entender el papel de las moléculas de superficie celular en activación y en rutas de señalización. Estos estudios, en la mayoría de los casos, utilizan modelos en los que el agente dimerizador es un anticuerpo (mono o policlonal) que entrecruza los receptores extracelularmente. Aunque los anticuerpos son específicos para determinadas secuencias en los receptores, muchos factores pueden afectar al sistema, así la afinidad de los anticuerpos y la redundancia entre estas secuencias compartidas por los receptores (especialmente los receptores para quimiocinas) pueden hacer menos específica la acción entrecruzadora de los anticuerpos. Una de las principales desventajas de este sistema, es que debido a la concentración de anticuerpos que se emplea para entrecruzar los receptores, en lugar de dos

DISCUSIÓN

moléculas pueden estarse agregando mas moléculas (formación de oligómeros), es decir pueden formarse cadenas de receptores y anticuerpo siempre se desconoce cuantas moléculas estan participando en el proceso.

El sistema de dimerización utilizado en este estudio (ARGENT™, ARIAD Pharmaceuticals, Inc) presenta la ventaja de que en las funciones tales como transducción de señales por homo o heterodimerización, identificar proteínas diana río abajo ("downstream") en las rutas, estudiar la expresión de genes modulada por eventos de señalización y una gran variedad de procesos celulares, se tiene el control químico del proceso através del reclutamiento de un número específico de moléculas involucradas. Una de las ventajas del sistema, es que imita eficazmente, las condiciones fisiológicas celulares, esto porque se pueden estudiar las señales provocadas cada molécula; por ejemplo en el caso de la transfección transitoria que se llevó a cabo en esta investigación con la proteína quimérica CCR4-FKBP12(1), sabemos con certeza que la respuesta quimiotáctica inducida, es solo el producto de la interacción de dos moléculas de CCR4 agregadas por AP20187-FKBP12, tal como sucedería en el sistema fisiológico.

Con las modificaciones hechas a la droga original FK1012 para obtener la actual AP20187, se eliminó su acción sobre proteínas de FKBP endógenas, con una eficacia de casi el 100% (AP20187 se une con una afinidad subnanomolar a FKBP por la sustitución de F36V [F_v] y a su vez con una afinidad mil veces menor a las proteínas silvestres), es por esta altísima afinidad que ningún anticuerpo podría superar el desempeño de este sistema (130, 131). El modo de acción de este sistema es otra ventaja que se puede traducir en resultados mas eficaces, por ejemplo al ser liposoluble y por lo tanto permeable a la membrana citoplasmática atraviesa fácilmente y desde la cara interna de la membrana, agrega a los receptores exponiendo así, de manera directa a las colas intracitoplasmáticas de los receptores que son las responsables de iniciar las señales de fosforilación y de interactuar con otras moléculas tales como proteínas G.

DISCUSIÓN

En esta investigación se utilizó un sistema de agregación acoplado a CCR4, para inducir respuesta funcionales. El método fue descrito por primera vez en un sistema utilizando el receptor de células T (TCR). El TCR es un receptor que contiene 2 cadenas variables de unión a ligando (α y β), las cuales están asociadas no covalentemente con las subunidades CD3 y ζ para formar un complejo de 8 cadenas ($\alpha \beta \gamma \delta \epsilon_2 \zeta_2$). La asociación de proteínas regulatorias es crucial para que se lleve a cabo la cascada de señalización a través del TCR. Cuando el TCR se agrega por inducción de una célula presentadora de antígenos (APC), las colas citoplasmáticas de las cadenas asociadas (CD3 y ζ , de las cuales ζ es la mas importante) se unen. Esto lleva a la fosforilación de las subunidades de TCR por proteínas cinasas de tirosina (Fyn o Lck) de la familia de cinasas de Src que están constitutivamente unidas a las subunidades de TCR o a los correceptores CD4 o CD8 (132, 133). Una ruta de señalización similar puede iniciarse entrecruzando el complejo TCR usando anticuerpos anti-CD3.

Aunque las bases moleculares para el incremento de la fosforilación de las subunidades de TCR no es muy claro, se pretende que la agregación puede crear nuevos microambientes para cinasas asociadas previamente, activando por un cambio conformacional o por trans-fosforilación. La fosforilación de ζ tiene como consecuencia la creación de sitios de unión (docking sites) de alta afinidad para ZAP-70. Las moléculas de ZAP-70 asociadas a membrana, participan en la activación de la fosfolipasa C (PLC) - γ , que por fosforilación activa su habilidad para desdoblar su sustrato: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato en los segundos mensajeros diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). DAG activa a la ruta de la Proteína Cinasa C (PKC), contribuyendo a su vez en la ruta de las proteínas MAP cinasas, mientras IP_3 lleva a la liberación de calcio y a la subsecuente activación de la fosfatasa Calcineurina. Una vez que Calcineurina ha sido activada, la defosforilación de NF- At_c , la subunidad citoplásmica del activador transcripcional NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells), provoca su translocación en el núcleo,

DISCUSIÓN

donde se encuentra con su contraparte NF-AT_n. NF-AT_n es un miembro de los factores de transcripción diméricos que son activados por si mismos en la ruta de las proteínas MAP cinasas (134-141)

Para demostrar la eficacia del sistema de dimerización, Pruschy, et al (1994) crearon una proteína quimérica (MZF3E), consistente de varios elementos modulares: el extremo amino de MZF3E contiene una secuencia de 14 aminoácidos que funcionan como sustrato para la enzima miristil-transferasa, posterior al sitio de miristilación (M) se clonó el dominio intracelular de la cadena ζ del TCR (Z) unido a 3 copias en tandem de la Inmunofilina FKBP12 (F) y el epítipo para la hemaglutinina del virus de la influenza (E), que es reconocido por el anticuerpo monoclonal 12CA5. FK1012 es un dímero creado a partir de la unión de dos monómeros de FK506, unidos a través de un grupo funcional en el dominio de unión a Calcineurina. Los complejos de FKBP12-FK506 y FKBP12-Rapamicina (otro ligando de FKBP12) se unen a Calcineurina inhibiendo así la señalización a través del TCR. Con la construcción de FK1012, se mantienen los sitios de unión a FKBP12, pero se eliminan los sitios de unión a Calcineurina y por lo tanto la señalización no es inhibida. FK1012 mantiene la señalización dependiente de calcio, aún a altas concentraciones. Pruschy et al (1994) concluyeron en su estudio que la señalización a través de MZF3E se lleva a cabo de la manera similar a la que ocurre en condiciones fisiológicas con el TCR y que ζ es de las cadenas mas importantes del TCR por realizar procesos regulatorios del complejo TCR-CD3 asociados a la transducción de señales.

En este estudio, se utilizó el receptor para quimiocinas CCR4 que difiere estructural y funcionalmente del TCR y otra diferencia en el sistema fue la introducción de una nueva droga como agente dimerizador denominada AP20187. AP20187 es una molécula totalmente sintética creada a partir de FK1012. Originalmente FK1012 se denominó FK1012 A, que fue modificada estructuralmente para optimizar su

DISCUSIÓN

desempeño. A partir de esta molécula se generaron dos nuevas drogas AP1903 y AP20187.

La dimerización entre moléculas del sistema inmune es un evento frecuente. Muchos factores de crecimiento y receptores de citocinas realizan (hetero) dimerización a partir de la unión del ligando, lo cual lleva a una activación de proteínas cinasas de tirosina. La velocidad de la señal, en el lado interno de la membrana plasmática depende de la movilidad lateral de los receptores, por lo tanto la señalización no ocurre de manera instantánea. En contraste, los receptores de siete dominios transmembranales operan como interruptores conformacionales que poseen estados inactivos (no señalizan o lo hacen basalmente) y activos donde la señalización es muy rápida, por ejemplo la movilización de Calcio (Ca^{2+}). Esta conclusión permite la posibilidad de que los receptores operen tanto monoméricamente como en agregados moleculares. Estudios similares sugieren que las quimiocinas inducen la agregación (dimerización u oligomerización) de varios receptores para quimiocinas, como CCR2b, CXCR4 y CCR5, lo cual resulta en la activación de los transductores de señales de las cinasas de Janus y activadores de transcripción STAT (ruta JAK-STAT) (142, 143)

La activación celular puede llevarse a cabo por transducción de señales a través de monómeros y de agregados de receptores. Se ha sugerido que la velocidad de la respuesta mediada por receptores de citocinas, depende del grado de agregación en el que el receptor actúe. Algunos receptores como los de citocinas, actúan como monómeros y se les asocia una velocidad de respuesta menor a 15 s, mientras que receptores que se ha visto que se dimerizan responden entre los 20 y los 60 s. Algunos agregados de receptores que se han evidenciado por su unión a arrestina tienen velocidades de respuesta muy bajas, responden incluso después de 60 s. Por lo que el tiempo de respuesta, parece estar regulado por el nivel de agregación de los receptores (ver figura 22).

DISCUSIÓN

En el caso de la respuesta quimiotáctica obtenida por las células transfectadas transitoriamente con CCR4 y CCR4-FKBP12(n), no se estudió el tiempo de respuesta. Observamos que el dímero y el multímero de CCR4 realizaron actividades bajas en comparación con el oligómero de CCR4 que tuvo un nivel de actividad del mismo rango que los linfocitos humanos en presencia de CCL22 (ver figuras 17-21). Todos los ensayos de quimiotaxis se realizaron bajo los mismos parámetros, entre estos, el tiempo de migración (90 min), por lo que no podría analizarse la velocidad de respuesta de las células en función de la agregación, al menos para este tipo de estudio. Por los resultados, es claro que la oligomerización es el nivel de agregación más eficiente para llevar a cabo una respuesta más potente, sin embargo no sería la forma más veloz de transducir señales. En el caso de los multímeros, poca información hay al respecto y los estudios previos con el uso de este sistema de dimerización señalaban una respuesta mayor con el multímero que con los dímeros o los oligómeros.

La formación de agregados de receptores en la membrana plasmática también está involucrada en la regulación de la respuesta inmune. En la mayoría de las quimiocinas tipo Th₂ hay una sobre expresión (upregulation) en tejidos no linfoides bajo condiciones inflamatorias y reclutan células T efectoras; los receptores que unen quimiocinas inflamatorias son también sobreexpresados durante la generación de células T efectoras en los órganos linfoides secundarios. Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de receptores y respuestas a quimiocinas inflamatorias son dependientes de IL-2 (144-146).

Para que la quimiotaxis se lleve a cabo, se necesita la agregación de los receptores de quimiocinas y su interacción con proteínas G heterotriméricas, es decir, se requiere que haya un acoplamiento funcional del receptor con la proteína G α_i . Sin embargo, la proteína G α_i por si misma, no es suficiente para la migración celular. El paso esencial, es la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G y el

DISCUSIÓN

acoplamiento de G_i con el receptor. Se ha demostrado que únicamente es la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ del complejo proteína G_i -receptor y no la liberación de $\beta\gamma$ de otras proteínas G (G_s o G_q) la que puede regular reacomodo de actina en la célula y por tanto migración celular (147). La importancia del acoplamiento de G_i fue adicionalmente demostrada con receptores que bajo condiciones fisiológicas, no se unen a quimiocinas y no inducen quimiotaxis.

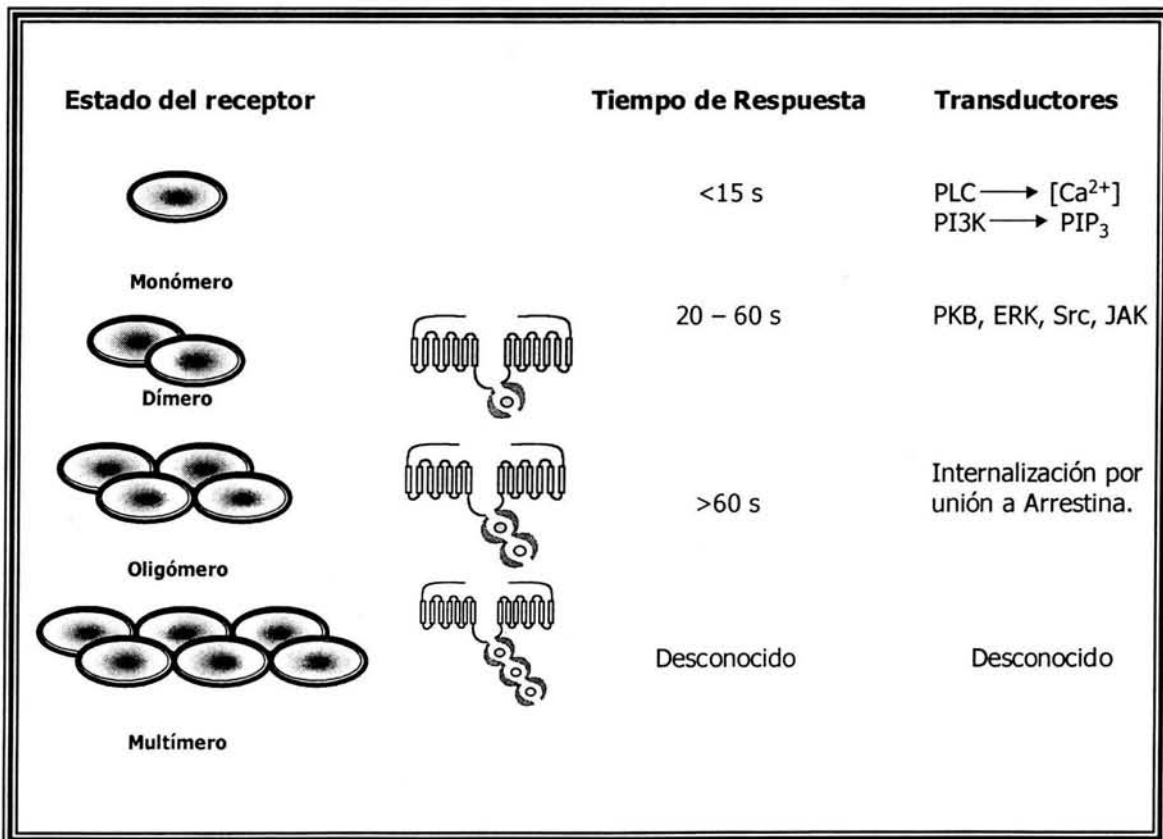


Figura 22. Señalización regulada por el estado de agregación de los receptores. Se muestra el caso de las proteínas quiméricas construidas en este estudio para dimerización, oligomerización y multimerización.

DISCUSIÓN

En este estudio, se demostró que la quimiotaxis de linfocitos humanos activados y de células transfectadas con CCR4 en presencia de CCL17 o CCL22, es dependiente de proteínas G_i. Cada uno de los ensayos realizados en presencia de CCL17 o CCL22 tuvieron curvas típicas de quimiotaxis, pero con los pretratamientos de toxina pertussis la quimiotaxis se inhibió (ver figuras 12-21). Este tratamiento con Ptx, demuestra que la quimiotaxis en cada uno de los lotes transfectantes con las moléculas quiméricas de CCR4 está asociado al acoplamiento de los dímeros, oligómeros o multímeros a proteínas G.

CCR4 en conjunto con CCL17 y CCL22 son sobreexpresados en timocitos en desarrollo, sitios de inflamación, en células efectoras (tipo Th₂) y en células de memoria que expresan CLA (células sanguíneas en reposo). La expresión de CCR4 y sus ligandos, también está asociado al desarrollo del asma, por lo que se han convertido en blancos para el diseño de tratamiento y terapias para evitar la enfermedad o disminuir sus efectos. El uso de anticuerpos neutralizantes contra moléculas (como CCR4) involucradas en asma, disminuyen el proceso inflamatorio y son utilizados como terapia en pacientes que ya han generado la enfermedad (148).

Se ha observado que los pacientes asmáticos presentan infiltrados aumentados en las vías respiratorias de eosinófilos. Esta identificación llevó a la asociación de la severidad del asma con el número de eosinófilos infiltrados, su estado de activación, el estado de activación de las citocinas (*i. e.* IL-5) y los niveles de expresión de las quimiocinas (*i. e.* eotaxina). Las quimiocinas como CCL17 y CCL22 entre otras activan a estas células para secretar mediadores proinflamatorios (149). Esto demuestra que las quimiocinas juegan múltiples papeles centrales en la respuesta inmediata y en las fases tardías en las enfermedades alérgicas. Las consecuencias nocivas que la modulación de las quimiocinas en las enfermedades

DISCUSIÓN

alérgicas suscitan son: la quimiotaxis selectiva de células inflamatorias, la promoción y el aumento en la liberación de mediadores de basófilos y eosinófilos, polarización Th₂ vs Th₁, aumento en la expresión de genes de citocinas tipo 2 sobre las tipo 1 y síntesis de IgE por acciones dirigidas en células B. Las consecuencias favorables son: la probable prevención de la atopia y la promoción de respuestas tipo 1 sobre las tipo 2.

De esta manera la agregación del receptor CCR4 está involucrada en todos los procesos en los que CCR4 actúa. Dado que CCR4 es uno de los receptores que se sobreexpresan en asma, se puede abundar más en la biología de esta enfermedad y dirigirla a desarrollar terapias para prevenirla(150, 151). Se puede enfocar este estudio a la búsqueda de antagonistas para CCR4 y sus ligandos y también para CCR3 que es el receptor más expresado en eosinófilos que son las células más predominantes en los infiltrados en vías respiratorias asociados a asma, para prevenir la enfermedad o detenerla cuando el proceso ya ha sido iniciado.

IX. CONCLUSIONES

Las diferencias quimiotácticas entre CCL17 y CCL22 a través de CCR4 sugieren mecanismos finos de regulación para el mismo receptor mediados por la interacción del receptor con su ligando, las cuales están involucradas en funciones diferentes.

CCR4 requiere de su agregación para transducir señales al núcleo; estas señales pueden ser generadas por sus ligandos o por dimerizadores químicos específicos. Al analizar funcionalmente la actividad quimiotáctica de CCR4 en distintos niveles de agregación observamos que las células transfectadas con la quimera CCR4-FKBP12(2) presentaron niveles mayores de quimiotaxis hacia los ligandos CCL17 y CCL22 en comparación con las otras dos quimeras CCR4-FKBP12(1) y CCR4-FKBP12(3).

Los distintos niveles de agregación de los receptores generan diferencias en la respuesta quimiotáctica de células transfectadas con moléculas quiméricas de CCR4, por lo que los resultados de esta investigación muestran que la agregación diferencial de receptores es importante para regular la activación celular.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chvatchko, Y., A. J. Hoogewerf, et al. (2000). "A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." J Exp Med **191**(10): 1755-64.
2. Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-8.
3. Taub, D. D. y E. Schaffer. 2000. Biological Responses to Chemokine Superfamily Members. In: Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 6.12 1-6.12.32
4. Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
5. Martinet, Y., N. Martinet, et al. (1994). "Blood monocyte chemotaxis." J Immunol Methods **174**(1-2): 209-14.
6. Van Damme, J. and Conings, R. (1991) Assays for Chemotaxis. In: F. R. Balkwill (ed), Cytokines, a practical approach, Oxford University Press, Oxford. 137 pp
7. Zetter, B. R. (1980). "Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumour-derived factors." Nature **285**(5759): 41-3.
8. Zigmond, S. H. (1987). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors". JCB. (75) 606
9. Senior, R. M. and Daughaday. 1991. Chemotaxis. In: R. G. Crystal, J.B. West, P. J. Barnes, N. S. Cherniack, and E. R. Weibel (Eds), The Lung. Raven Press, New York, USA. 131pp
10. Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
11. Keane, M. P., D. A. Arenberg, et al. (1997). "The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis." J Immunol **159**(3): 1437-43.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Arenberg, D. A., P. J. Polverini, et al. (1997). "The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer." *J Leukoc Biol* **62**(5): 554-62.
 13. Folkman, J. and R. Cotran (1976). "Relation of vascular proliferation to tumor growth." *Int Rev Exp Pathol* **16**: 207-48.
 14. Strieter, R. M., P. J. Polverini, et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." *J Biol Chem* **270**(45): 27348-57.
 15. Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* **18**: 217-42.
 16. Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-76.
 17. Farzan, M., T. Mirzabekov, et al. (1999). "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry." *Cell* **96**(5): 667-76.
 18. Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." *Embo J* **12**(4): 1693-703.
 19. Ahuja, S. K., J. C. Lee, et al. (1996). "CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct." *J Biol Chem* **271**(1): 225-32.
 20. Ahuja, S. K. and P. M. Murphy (1996). "The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor." *J Biol Chem* **271**(34): 20545-50.
 21. Monteclaro, F. S. and I. F. Charo (1996). "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* **271**(32): 19084-92.
 22. Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (1997). "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* **16**(23): 6996-7007.
 23. Ling, K., P. Wang, et al. (1999). "Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 7922-7.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Morohashi, H., T. Miyawaki, et al. (1995). "Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells." J Leukoc Biol **57**(1): 180-7.
 25. Zaitseva, M., A. Blauvelt, et al. (1997). "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection." Nat Med **3**(12): 1369-75.
 26. Zhang, S., B. S. Youn, et al. (1999). "Differential effects of leukotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha on neutrophils mediated by CCR1." J Immunol **162**(8): 4938-42.
 27. Iacovelli, L., M. Sallese, et al. (1999). "Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins." Faseb J **13**(1): 1-8.
 28. Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-72.
 29. Shyamala, V. and H. Khoja (1998). "Interleukin-8 receptors R1 and R2 activate mitogen-activated protein kinases and induce c-fos, independent of Ras and Raf-1 in Chinese hamster ovary cells." Biochemistry **37**(45): 15918-24.
 30. Tilton, B., M. Andjelkovic, et al. (1997). "G-Protein-coupled receptors and Fcgamma-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes." J Biol Chem **272**(44): 28096-101.
 31. Thelen, M., M. Ugucioni, et al. (1995). "PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes." Biochem Biophys Res Commun **217**(3): 1255-62.
 32. Araki, N., M. T. Johnson, et al. (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages." J Cell Biol **135**(5): 1249-60.
 33. Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.
 34. Bacon, K. B., M. C. Szabo, et al. (1996). "RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells." J Exp Med **184**(3): 873-82.
 35. Bacon, K. B., B. A. Premack, et al. (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." Science **269**(5231): 1727-30.
 36. Hebert, T. E., S. Moffett, et al. (1996). "A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation." J Biol Chem **271**(27): 16384-92.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

37. Cvejic, S. and L. A. Devi (1997). "Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization." *J Biol Chem* **272**(43): 26959-64.
 38. Ng, G. Y., B. F. O'Dowd, et al. (1996). "Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides." *Biochem Biophys Res Commun* **227**(1): 200-4.
 39. Nimchinsky, E. A., P. R. Hof, et al. (1997). "Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells." *J Biol Chem* **272**(46): 29229-37.
 40. George, S. R., S. P. Lee, et al. (1998). "A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization." *J Biol Chem* **273**(46): 30244-8.
 41. Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3628-33.
 42. Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis." *J Cell Biol* **144**(4): 755-65.
 43. Jordan, B. A., N. Trapaidze, et al. (2001). "Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 343-8.
 44. Mercier, J. F., A. Salahpour, et al. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **277**(47): 44925-31.
 45. Xu, J., J. He, et al. (2003). "Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors." *J Biol Chem* **278**(12): 10770-7.
 46. Boniface, J. J., J. D. Rabinowitz, et al. (1998). "Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]." *Immunity* **9**(4): 459-66.
 47. Lanzavecchia, A., G. Lezzi, et al. (1999). "From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior." *Cell* **96**(1): 1-4.
 48. Kazmierski, W. M., L. Boone, et al. (2002). "CCR5 chemokine receptors: gatekeepers of HIV-1 infection." *Curr Drug Targets Infect Disord* **2**(3): 265-78.
 49. Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." *Faseb J* **13**(13): 1699-710.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

50. Vila-Coro, A. J., M. Mellado, et al. (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3388-93.
 51. Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation." Annu Rev Immunol **19**: 397-421.
 52. Mellado, M., A. J. Vila-Coro, et al. (2001). "Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(4): 575-82.
 53. Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado, et al. (2001). "Chemokine receptor dimerization: two are better than one." Trends Immunol **22**(11): 612-7.
 54. Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." Embo J **20**(10): 2497-507.
 55. Biswas, S. K. and A. Sodhi (2002). "Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway." Int Immunopharmacol **2**(8): 1095-107.
 56. Thelen, M. and M. Baggiolini (2001). "Is dimerization of chemokine receptors functionally relevant?" Sci STKE **2001**(104): PE34.
 57. Spencer, D. M., T. J. Wandless, et al. (1993). "Controlling signal transduction with synthetic ligands." Science **262**(5136): 1019-24.
 58. Siekierka, J. J. and N. H. Sigal (1992). "FK-506 and cyclosporin A: immunosuppressive mechanism of action and beyond." Curr Opin Immunol **4**(5): 548-52.
 59. Adamiec, R. (1992). "[The role of calmodulin and calcium ions in the immunosuppressive mechanism of the action of cyclosporin A]." Postepy Hig Med Dosw **46**(1): 53-65.
 60. Rondeau, E. (1992). "[Mechanism of action of the new immunosuppressants: cyclosporin A, FK 506 and rapamycin]." Nephrologie **13**(3): 137.
 61. Cirillo, R., M. Triggiani, et al. (1990). "Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin." J Immunol **144**(10): 3891-7.
 62. de Paulis, A., R. Cirillo, et al. (1991). "Characterization of the anti-inflammatory effect of FK-506 on human mast cells." J Immunol **147**(12): 4278-85.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

63. de Paulis, A., R. Cirillo, et al. (1991). "Antiinflammatory effect of FK 506 on human basophils." Transplant Proc **23**(6): 2905-6.
 64. Hultsch, T., J. L. Rodriguez, et al. (1990). "Cyclosporin A inhibits degranulation of rat basophilic leukemia cells and human basophils. Inhibition of mediator release without affecting PI hydrolysis or Ca²⁺ fluxes." J Immunol **144**(7): 2659-64.
 65. Hultsch, T., M. W. Albers, et al. (1991). "Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6229-33.
 66. Pruschy, M. N., D. M. Spencer, et al. (1994). "Mechanistic studies of a signaling pathway activated by the organic dimerizer FK1012." Chem Biol **1**(3): 163-72.
 67. Clackson, T., W. Yang, et al. (1998). "Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10437-42.
 68. Pollock, R., R. Issner, et al. (2000). "Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13221-6.
 69. Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree (1992). "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506." Immunol Today **13**(4): 136-42.
 70. Imai, T. et al. (1998). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th 2 cells towards antigen - presenting cells by the CC Chemokines Thymus and Activation Chemokine and Macrophage-derived Chemokine". International Immunology. **11**(1): 81 – 88.
 71. Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." J Exp Med **187**(6): 875-83.
 72. Ono, S. J., T. Nakamura, et al. (2003). "Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1185-99; quiz 1200.
 73. Hordijk, P. (2003). "Endothelial signaling in leukocyte transmigration." Cell Biochem Biophys **38**(3): 305-22.
 74. Power, C. A., A. Meyer, et al. (1995). "Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line." J Biol Chem **270**(33): 19495-500.
 75. Imai, T., M. Baba, et al. (1997). "The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4." J Biol Chem **272**(23): 15036-42.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

76. Imai, T., D. Chantry, et al. (1998). "Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4." *J Biol Chem* **273**(3): 1764-8.
 77. Katoh, S., K. Fukushima, et al. (2003). "Accumulation of CCR4-expressing CD4+ T cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia." *Allergy* **58**(6): 518-23.
 78. Coligan, J. E. et al., eds., (1998) *Current Protocols in Immunology*, J. Wiley and Sons, New York, vol. 3, p. 18.3.
 79. Coligan, J. E. et al., eds., (1998) *Current Protocols in Immunology*, J. Wiley and Sons, New York, vol. 2, p. 10.4.
 80. Bøyum, A. (1964): "Separation of white blood cells". *Nature* **204**,793
 81. Bøyum, A. (1966): "Separation of leukocytes from blood and bone marrow". *Scand. J. Clin. Invest* **21**,Suppl 97:77
 82. Ernst, D., Mochizuki, D. Y., Shih, J., Guan O., Balderas, R., Sasaki, S., Elia, J., Wilson, J., Shih, C. C., and E. L. Morgan. (1999). "Cytokine / Chemokine Manual. Genes Proteins Cells. Application Manual". *Pharmingen*. p 73
 83. Soriano, S. F., A. Serrano, et al. (2003). "Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses." *Eur J Immunol* **33**(5): 1328-33.
 84. Huang, Z. (2002). "Structure, function and modulation of chemokine receptors: members of the g-protein-coupled receptor superfamily." *Mini Rev Med Chem* **2**(4): 373-83.
 85. Onuffer, J. J. and R. Horuk (2002). "Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments." *Trends Pharmacol Sci* **23**(10): 459-67.
 86. Maghazachi, A. A. (1997). "Role of the heterotrimeric G proteins in stromal-derived factor-1alpha-induced natural killer cell chemotaxis and calcium mobilization." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 270-4.
 87. Maghazachi, A. A. (2003). "G protein-coupled receptors in natural killer cells." *J Leukoc Biol* **74**(1): 16-24.
 88. Oh, S. B., T. Endoh, et al. (2002). "Regulation of calcium currents by chemokines and their receptors." *J Neuroimmunol* **123**(1-2): 66-75.
 89. Kaplan, A. P. (2001). "Chemokines, chemokine receptors and allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **124**(4): 423-31.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

90. Gerard, C. and B. J. Rollins (2001). "Chemokines and disease." Nat Immunol **2**(2): 108-15.
91. El-Shazly, A., N. Yamaguchi, et al. (1999). "Novel association of the src family kinases, hck and c-fgr, with CCR3 receptor stimulation: A possible mechanism for eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis." Biochem Biophys Res Commun **264**(1): 163-70.
92. Blease, K., N. W. Lukacs, et al. (2000). "Chemokines and their role in airway hyper-reactivity." Respir Res **1**(1): 54-61.
93. de Lavarelle, A., F. Roufousse, et al. (2001). "Clonal Th2 cells associated with chronic hypereosinophilia: TARC-induced CCR4 down-regulation in vivo." Eur J Immunol **31**(4): 1037-46.
94. Clemetson, K. J., J. M. Clemetson, et al. (2000). "Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets." Blood **96**(13): 4046-54.
95. Jo, Y., T. Matsumoto, et al. (2003). "CCR4 is an up-regulated chemokine receptor of peripheral blood memory CD4+ T cells in Crohn's disease." Clin Exp Immunol **132**(2): 332-8.
96. Neote, K., D. DiGregorio, et al. (1993). "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor." Cell **72**(3): 415-25.
97. Gao, J. L., D. B. Kuhns, et al. (1993). "Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor." J Exp Med **177**(5): 1421-7.
98. Youn, B. S., S. M. Zhang, et al. (1997). "Molecular cloning of leukotactin-1: a novel human beta-chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3." J Immunol **159**(11): 5201-5.
99. Tsou, C. L., R. P. Gladue, et al. (1998). "Identification of C-C chemokine receptor 1 (CCR1) as the monocyte hemofiltrate C-C chemokine (HCC)-1 receptor." J Exp Med **188**(3): 603-8.
100. Ko, J., I. S. Kim, et al. (2002). "Leukotactin-1/CCL15-induced chemotaxis signaling through CCR1 in HOS cells." FEBS Lett **515**(1-3): 159-64.
101. Khan, I. A., P. M. Murphy, et al. (2001). "Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection." J Immunol **166**(3): 1930-7.
102. Cheng, S. S., J. J. Lai, et al. (2001). "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils." J Immunol **166**(2): 1178-84.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

103. Nardelli, B., H. L. Tiffany, et al. (1999). "Characterization of the signal transduction pathway activated in human monocytes and dendritic cells by MPIF-1, a specific ligand for CC chemokine receptor 1." *J Immunol* **162**(1): 435-44.
 104. Yamamoto, J., Y. Adachi, et al. (2000). "Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells." *J Leukoc Biol* **68**(4): 568-74.
 105. Loetscher, P., M. Seitz, et al. (1996). "Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes." *J Exp Med* **184**(2): 569-77.
 106. Yoshie, O., T. Imai, et al. (1997). "Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors." *J Leukoc Biol* **62**(5): 634-44.
 107. Rousseau G, Nantel F, Bouvier M. (1996). "Distinct receptor domains determine subtype-specific coupling and desensitization phenotypes for human beta1- and beta2-adrenergic receptors." *Mol Pharmacol*. **49**(4):752-6.
 108. George, S. R., T. Fan, et al. (2000). "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." *J Biol Chem* **275**(34): 26128-35.
 109. Gomes, I., B. A. Jordan, et al. (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy." *J Neurosci* **20**(22): RC110.
 110. Portoghese, P. S. (2001). "From models to molecules: opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptor probes." *J Med Chem* **44**(14): 2259-69.
 111. Guo, W., L. Shi, et al. (2003). "The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer." *J Biol Chem* **278**(7): 4385-8.
 112. Lee, S. P., Z. Xie, et al. (2000). "Oligomerization of dopamine and serotonin receptors." *Neuropsychopharmacology* **23**(4 Suppl): S32-40.
 113. Yao, L., M. P. Arolfo, et al. (2002). "betagamma Dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption." *Cell* **109**(6): 733-43.
 114. Zawarynski, P., T. Tallerico, et al. (1998). "Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain." *FEBS Lett* **441**(3): 383-6.
 115. Sato, T., Y. Shimada, et al. (2003). "Amino acid mutagenesis of the ligand binding site and the dimer interface of the metabotropic glutamate receptor 1. Identification of crucial residues for setting the activated state." *J Biol Chem* **278**(6): 4314-21.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

116. Selkirk, J. V., R. A. Challiss, et al. (2002). "Characterization of an N-terminal secreted domain of the type-1 human metabotropic glutamate receptor produced by a mammalian cell line." *J Neurochem* **80**(2): 346-53.
 117. Gomes, I., B. A. Jordan, et al. (2001). "G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function." *J Mol Med* **79**(5-6): 226-42.
 118. Kunishima, N., Y. Shimada, et al. (2000). "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." *Nature* **407**(6807): 971-7.
 119. Romano, C., W. L. Yang, et al. (1996). "Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer." *J Biol Chem* **271**(45): 28612-6.
 120. Bai, M., S. Trivedi, et al. (1998). "Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells." *J Biol Chem* **273**(36): 23605-10.
 121. Ward, D. T., E. M. Brown, et al. (1998). "Disulfide bonds in the extracellular calcium-polyvalent cation-sensing receptor correlate with dimer formation and its response to divalent cations in vitro." *J Biol Chem* **273**(23): 14476-83.
 122. Borchers, M. T., T. Ansay, et al. (2002). "In vitro assessment of chemokine receptor-ligand interactions mediating mouse eosinophil migration." *J Leukoc Biol* **71**(6): 1033-41.
 123. Vila-Coro, A. J., M. Mellado, et al. (1999). "Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex." *J Immunol* **163**(6): 3037-44.
 124. Oppermann, M., M. Mack, et al. (1999). "Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus." *J Biol Chem* **274**(13): 8875-85.
 125. Ganju, R. K., P. Dutt, et al. (1998). "Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK." *Blood* **91**(3): 791-7.
 126. Proudfoot, A. E., R. Buser, et al. (1999). "Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors." *J Biol Chem* **274**(45): 32478-85.
 127. Gouldson, P. R., C. R. Snell, et al. (1997). "A new approach to docking in the beta 2-adrenergic receptor that exploits the domain structure of G-protein-coupled receptors." *J Med Chem* **40**(24): 3871-86.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

128. Venter, J. C. and C. M. Fraser (1983). "beta-Adrenergic receptor isolation and characterization with immobilized drugs and monoclonal antibodies." Fed Proc **42**(2): 273-8.
 129. Venter, J. C. and C. M. Fraser (1985). "Beta-adrenergic receptor structure, synthesis, antibodies and human disease." Bull Eur Physiopathol Respir **21**(5): 13s-18s.
 130. Klemm, J. D., S. L. Schreiber, et al. (1998). "Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction." Annu Rev Immunol **16**: 569-92.
 131. ARIAD Pharmaceuticals, Inc. 2001. ARGENT TM, Regulated Homodimerization Kit Version 2.0. Cambridge. 21 p
 132. Samelson, L. E., A. F. Phillips, et al. (1990). "Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4358-62.
 133. Veillette, A., M. A. Bookman, et al. (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." Cell **55**(2): 301-8.
 134. Tenzer, A., D. Zingg, et al. (2002). "Signal transduction inhibitors as radiosensitizers." Curr Med Chem Anti-Canc Agents **2**(6): 727-42.
 135. Pollock, R., M. Giel, et al. (2002). "Regulation of endogenous gene expression with a small-molecule dimerizer." Nat Biotechnol **20**(7): 729-33.
 136. Pollock, R. and T. Clackson (2002). "Dimerizer-regulated gene expression." Curr Opin Biotechnol **13**(5): 459-67.
 137. Paulus, W., I. Baur, et al. (1996). "Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells." J Virol **70**(1): 62-7.
 138. Go, W. Y. and S. N. Ho (2002). "Optimization and direct comparison of the dimerizer and reverse tet transcriptional control systems." J Gene Med **4**(3): 258-70.
 139. Hwang, J. J., Z. Scusic, et al. (1996). "Novel retroviral vector transferring a suicide gene and a selectable marker gene with enhanced gene expression by using a tetracycline-responsive expression system." J Virol **70**(11): 8138-41.
 140. Rollins, C. T., V. M. Rivera, et al. (2000). "A ligand-reversible dimerization system for controlling protein-protein interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7096-101.
 141. Rivera, V. M. (1998). "Controlling gene expression using synthetic ligands." Methods **14**(4): 421-9.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

142. Paavola, C. D., S. Hemmerich, et al. (1998). "Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B." J Biol Chem **273**(50): 33157-65.
143. Aragay, A. M., M. Mellado, et al. (1998). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2985-90.
144. Loetscher, M., B. Gerber, et al. (1996). "Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes." J Exp Med **184**(3): 963-9.
145. Oh, J. W., L. M. Schwiebert, et al. (1999). "Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes." J Neurovirol **5**(1): 82-94.
146. Tan, J., B. Deleuran, et al. (1995). "Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-derived cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-13." J Immunol **154**(8): 3742-52.
147. Neptune, E. R. and H. R. Bourne (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14489-94.
148. Bochner, B. S. (2002). "Anticytokine and antichemokine therapy in asthma". Proc Adv Stud Med. **2**(7): 265-269.
149. Hayglass K. T., Gangur V. and Simons R. E. (2000). "Chemokines: An Immunoregulatory role in Allergy beyond Chemotaxis". Res Trends ACI Int. **12**(1) 13-19.
150. Pérez-Granados, P. 2000. Transducción de Señales Mediada por el Receptor para Quimiocinas CCR4 e Inducida por Dimerizadores Químicos. Póster en el VI Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León" del Instituto de Investigaciones Biomédicas.
151. Pérez-Granados, P. 2001. Transducción de Señales Mediada por el Receptor para Quimiocinas CCR4 e Inducida por Dimerizadores Químicos. Póster en el VII Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León" del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Sometidos

Soldevila G., Licona, I., Salgado, A., Ramírez, M., Chávez, R. and García-Zepeda, E. (2003). "Impaired chemokine mediated migration in during T cell development in the absence of Jak 3."