

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INDUCIDAS A
TRAVÉS DE LA CADENAS CD3 ÉPSILON Y EL CO-
RECEPTOR CD4 DURANTE EL DESARROLLO *IN VITRO*
DE TIMOCITOS MURINOS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA**

**PRESENTA:
VIOLETA RAYÓN ESTRADA**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

VOCAL: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIA: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

SUPLENTE: DRA. MARINA MACÍAS SILVA

SUPLENTE: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE
INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS, UNAM**

ASESORA DEL TEMA: GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

SUSTENTANTE: VIOLETA RAYÓN ESTRADA

Dedico con todo mi cariño esta tesis a mi hermana Gaby, a mi mami, a mi futuro esposo David y a mi tío Marco, quienes comprendiendo mis ideales, me han alentado siempre a seguir mi sueño de incursionar en este asunto maravilloso de la ciencia.

*Ustedes son mis ángeles, mi fortaleza y mi inspiración,
muchas gracias.*

Agradecimientos

Muchas gracias...

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo y los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Martha Robles, el Dr. Carlos Rosales por su apoyo en la realización de este trabajo y por toda su crítica constructiva. A los miembros del jurado, Dr. Edgar Zenteno, Dr. Enrique Ortega, Dra. Martha Robles, Dr. Roberto Coria y Dra. Marina Macías por la revisión y crítica de este manuscrito de tesis.

Biól. Ramsés Chávez Ríos por su ayuda técnica durante la realización de este trabajo, Carlos Castellanos por su apoyo con la separación de células por citometría de flujo, Georgina por su apoyo en el bioterio y a Leticia García por su apoyo en el área administrativa académica.

Al CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo y mi beca.

Muchas gracias a mi familia que vela por mi bienestar y que me apoya siempre.

A mis amigos del laboratorio: Karen, Paula, Diana, Ileana, Germán, Ramsés, Nelly, Xochitl, Roxana, Carlos, Erika y Ebadrel por su apoyo incondicional y por compartir conmigo momentos muy gratos y por apoyarme en los difíciles. Se de corazón que el futuro les depara mucho éxito, sepan que los quiero de corazón.

Y a mis amigos de toda la vida quienes llevo siempre conmigo en mi corazón...

ÍNDICE

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	9
2.1. Desarrollo de Linfocitos T.....	9
2.1.1. Factores solubles que influyen en el desarrollo de los timocitos.....	13
2.1.2. Procesos de selección tímica.....	16
2.1.2.1. Selección Positiva.....	18
2.1.2.2. Selección Negativa.....	19
2.1.2.3. Elección del Linaje CD4 vs. CD8.....	20
2.1.2.3.1. Modelos de elección del linaje.....	20
2.1.2.3.2. Papel de las quimiocinas.....	24
2.1.2.3.3. Papel de Notch.....	25
2.1.2.3.4. Regulación transcripcional.....	26
2.2. Señalización a través del Receptor de linfocitos T.....	27
2.2.1. Señalización del TCR durante el desarrollo de los linfocitos.....	31
2.2.2. Participación de los ITAM del CD3 en la discriminación de las señales.....	35
2.3. Sistema de dimerización químico.....	40
3. Justificación.....	43
4. Hipótesis.....	44
5. Objetivos.....	44
5.1. Objetivos particulares	44
6. Metodología.....	45
6.1. Líneas celulares.....	45
6.2. Tinción de marcadores extracelulares.....	46
6.3. Obtención de transfectantes de alta expresión de CD4 y CD3 ϵ quiméricas.....	47
6.4. Identificación de CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD4 FKBP-12 x 2 a través de Inmunoprecipitación y Western Blot.....	48
6.5. Flujos de Calcio.....	49

6.6. Ensayos de fosforilación intracelular por citometría de flujo.....	50
6.7. Obtención de sobrenadantes virales.....	50
6.8. Infección retroviral de timocitos fetales y co-cultivo con la línea celular OP9-DL1.....	51
7. Resultados.....	53
7.1. Evaluación funcional del entrecruzamiento de CD4 2FKBP-12 ó CD3 ϵ 3FKBP-12.....	53
7.1.1. Elaboración de transfecciones estables de las quimeras CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD4 FKBP-12 x 2 en la línea celular EL4.	53
7.1.2. Análisis de los Flujos de Calcio inducidos por el entrecruzamiento de los receptores quiméricos.....	59
7.1.3. Fosforilación de Zap-70.....	62
7.1.4. Fosforilación de Erk1/2.....	67
7.2. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en la elección del linaje.....	70
7.2.1. Desarrollo de timocitos en el sistema OP9-DL1.....	70
7.2.2. Expresión de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en timocitos.....	73
7.2.3. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD4 FKBP-12 x 2 en el desarrollo de los timocitos en la monocapa de OP9-DL1.....	75
8. Discusión.....	82
8.1. Evaluación funcional del entrecruzamiento de CD4 2FKBP-12 ó CD3 ϵ 3FKBP-12.....	82
8.2. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en la elección del linaje.....	88
9. Conclusiones.....	92
10. Referencias.....	93

1. Resumen

Los linfocitos T poseen un receptor, conocido como receptor de linfocitos T (TCR), que reconoce específicamente antígenos peptídicos. Debido a que el TCR posee un dominio intracelular corto, su señalización se da a través de un complejo conocido como CD3, que posee 10 motivos fosforilables en su porción intracelular. El resultado de la activación del TCR-CD3 se traduce en la activación de diversas cascadas de señalización: la salida de calcio del retículo endoplásmico, la activación de la vía de las MAP cinasas y el remodelaje del citoesqueleto. De la magnitud de estas señales depende el destino de los linfocitos T (activación ó muerte). Durante el desarrollo de los linfocitos T, la señalización a través del TCR permite que se lleven a cabo tres procesos clave de selección: (1) una señal baja lleva a la supervivencia por selección positiva, (2) una señal alta a la muerte por selección negativa y (3) una señal persistente a la elección del linaje CD4, mientras que una señal baja y breve a la elección del linaje CD8. Sin embargo, en la actualidad no se sabe la manera por medio de la cual el TCR tiene la capacidad de discriminar entre las señales fuertes y débiles.

En este trabajo se evaluaron las señales reguladas específicamente a través de la subunidad épsilon del complejo CD3 ($CD3\epsilon$) y el co-receptor CD4 (el cual también puede modular la señal del TCR) utilizando un sistema de dimerización químico. Este sistema consiste en la fusión de la porción intracelular de $CD3\epsilon$ ó CD4 a varias copias de la inmunofilina FKBP-12, la cual permite la dimerización de las

proteínas a través de la adición de la droga AP20187. Para medir la respuesta funcional de las células como resultado del entrecruzamiento con AP20187, se realizaron ensayos de flujo de calcio y fosforilación de Erk y Zap70. Además, se evaluó si la activación de estas proteínas altera el desarrollo de linfocitos T inmaduros en un sistema de cultivo *in vitro*. Como resultado se observó que el entrecruzamiento de CD3 ϵ es suficiente para inducir una activación de Zap70. Por otro lado, el entrecruzamiento de CD4 alteró el desarrollo de los linfocitos T inmaduros, afectando el porcentaje de las poblaciones dobles negativas y dobles positivas. En conclusión, se observó que la activación individual de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 posee la capacidad de iniciar una respuesta funcional en las células de manera independiente al complejo TCR-CD3 y que contrario a lo esperado, el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en timocitos induce una disminución de la población CD4 simple positiva.

2. Introducción

Los linfocitos T son células del sistema inmune adaptativo que juegan un papel importante en la respuesta específica hacia patógenos mediante diversas funciones efectoras, así como en la regulación de la actividad de otras células y en la generación de memoria inmunológica. Su característica principal es que poseen un receptor, conocido como receptor de linfocitos T (TCR), conformado por dos cadenas que son creadas azarosamente a través del rearreglo genético del DNA. Sin embargo, el amplio repertorio de linfocitos T está sujeto a procesos de selección positiva y negativa durante su diferenciación, lo cual permite que éste sea autotolerante y preferencialmente dirigido hacia el reconocimiento de antígenos extraños. En general, la capacidad de reconocimiento específico del TCR se lleva a cabo a través de su interacción con péptidos antigénicos que se encuentran ensamblados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), aunque también existen ciertos tipos de linfocitos T capaces de reconocer antígenos de manera MHC independiente (linfocitos $\gamma\delta$) o bien antígenos no peptídicos (glicolípidos), presentados por moléculas MHC no clásicas (MHC-like) (células NKT).

2.1. *Desarrollo de los linfocitos T*

A diferencia de la mayoría de las células hematopoyéticas, las cuales surgen y maduran en la médula ósea, los linfocitos T maduran en un órgano especializado denominado timo. Los progenitores que dan lugar a células T surgen en la médula ósea o hígado fetal y son

pluripotenciales, por lo que necesitan del microambiente tímico para comprometerse al linaje T.

El timo es un órgano bilobulado (multilobulado en el humano) que está estructuralmente constituido por dos regiones anatómicas: una región externa, denominada corteza y una región interna, denominada médula. Estas regiones definen microambientes funcionales que proporcionan un entorno propicio para la diferenciación de los timocitos (Petrie y Zúñiga-Pflücker, 2007). Este microambiente se constituye de células estromales, epiteliales, mesenquimales, endoteliales y miocitos, aunque la mayoría de la celularidad del timo se compone de timocitos (células T inmaduras). En el timo se desarrollan varios tipos de células T, las cuales se pueden diferenciar principalmente por la composición de su receptor en $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Asimismo, se pueden generar células CD4, CD8, NKT y Treg.

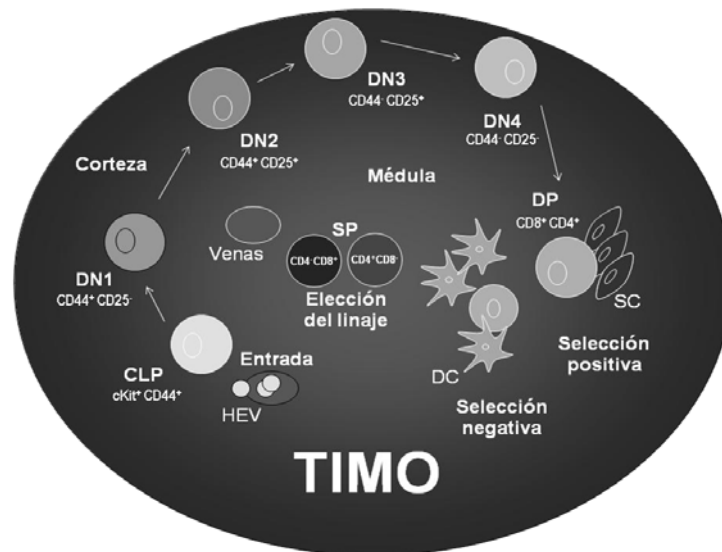


Figura 1. Desarrollo de los linfocitos T. Durante de su maduración a partir de progenitores linfoides, los timocitos migran desde la médula tímica a la corteza y de regreso.

El timo no posee la capacidad de generar timocitos *de novo* por lo cual depende del flujo constante progenitores linfoides desde la médula ósea ó del hígado fetal, en la etapa embrionaria. Estos precursores ingresan al timo por medio de vénulas especializadas localizadas en la parte medular, conocidas como vénulas del endotelio alto (HEV), las cuales se encuentran en baja frecuencia e importan cantidades bajas de progenitores. El desarrollo de los progenitores a linfocitos T inmaduros o timocitos se relaciona con el movimiento de las células desde la médula hacia la corteza del timo (Petrie y Zúñiga-Pflücker, 2007). Esta migración va acompañada de varios ciclos de proliferación, así como de la expresión de diferentes moléculas en la superficie de los timocitos, las cuales se pueden utilizar como marcadores de maduración (Figura 1). Los timocitos se pueden clasificar de acuerdo a la expresión en superficie de los co-receptores CD4 y CD8 en: dobles negativos (CD4⁻CD8⁻), dobles positivos (CD4⁺CD8⁺) y simples positivos (CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺). A su vez, los timocitos en estadio doble negativo (DN) se pueden subclassificar en 4 grupos: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻).

El movimiento de los timocitos hacia la corteza tímica se da a través de contactos célula-célula entre los timocitos y las células del estroma y se facilita a través de moléculas de adhesión como VCAM-1 (expresada en células estromales) (Prockop et al., 2002) y las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (expresada en timocitos) y de E-cadherina, la cual se expresa tanto en timocitos como en células estromales (Lee et al., 1994). Además, se ha descrito la participación de algunas proteínas de matriz extracelular durante la diferenciación de los timocitos (Savino et al., 2002), como por ejemplo, la laminina-2 (ratón), y la laminina-5 (humano), que intervienen en la progresión DN-DP.

La activación del receptor Notch1 en los timocitos es importante en el compromiso de los progenitores linfoides al linaje de células T (Jaleco et al., 2001; Tan et al., 2005; Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002; Schmitt et al., 2004). El ligando de Notch, llamado Delta 1 (DL-1) se expresa en las células estromales del timo, lo cual refuerza la idea de que la interacción de los linfocitos y las células estromales es determinante para su desarrollo. La regulación génica de Notch se da a través de la conversión de represores transcripcionales a complejos activadores. La vía canónica de señalización involucra la interacción de Notch con su ligando, seguido de dos escisiones de Notch. La segunda escisión se lleva a cabo por un complejo de presenilina (Laky y Fowlkes, 2007) con actividad de γ -secretasa, el cual libera la porción intracelular, conocida como NCID. Esta porción posee la capacidad de translocarse al núcleo, donde se une a al regulador transcripcional CSL (también conocido como RBPJk), lo cual libera co-represores y atrae co-activadores de la familia Mastermind (MAML), entre otros. Además de la especificación al linaje T, se ha observado que Notch posee otros genes blanco en estas células: Deltex (Chang et al., 2000; Pirot et al., 2004), Nrap (Pirot et al., 2004), pT α (Campese et al., 2006), CD25 (Maillard et al., 2006), IL-4 (Amsen et al., 2004), T-bet (Minter et al., 2005) y GATA3 (Amsen et al., 2007). La señalización por Notch se lleva a cabo en una gran diversidad de células y su efecto depende tanto del tipo celular como del estadio de desarrollo de las células.

En el estadio de diferenciación DN1, las células llevan a cabo alrededor de 10 divisiones seriadas y se van liberando periódicamente hacia la corteza. La expansión de DN2 y DN3 es limitada debido a la alta competencia por el microambiente, ya que la mayor parte de las señales que los timocitos reciben es a través de proteínas ancladas a la membrana de las células estromales. Algunas DN2 retienen el potencial de desarrollarse a otros linajes linfoides como células NK o dendríticas (Lu et al., 2005; Marquez et al., 1998; Alonso et

al., 2001). En este punto la señalización a través de Notch es crucial para el compromiso al linaje T. Las proteínas RAG comienzan el rearrreglo de la cadena beta del TCR, lo cual da origen a la expresión en membrana de un complejo conocido como pre-TCR, la cual se compone de la cadena β rearrreglada unida a una glicoproteína no polimórfica conocida como pre-T α .

En el estadio de diferenciación DN3 los timocitos ya han rearrreglado los genes de la cadena β de su receptor de linfocitos T (TCR) (Petrie et al., 1995), por lo que su compromiso al linaje T es irreversible. Además, en este estadio de diferenciación ocurre el primer punto de control conocido como selección beta, en el cual los timocitos que no han logrado un rearrreglo satisfactorio de la cadena beta del TCR no reciben las señales de supervivencia y mueren por apoptosis. Los timocitos en estadio DN4 reactivan la expresión de los genes RAG para realizar el rearrreglo de los genes para de la cadena alfa del TCR.

2.1.1. Factores solubles que influyen en el desarrollo de los timocitos

La maduración de los timocitos también es dependiente de una diversidad de factores solubles como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y morfógenos.

El papel de las quimiocinas en el desarrollo de los timocitos se relaciona estrechamente con su migración desde el sitio de ingreso de los progenitores en la médula del timo hacia la corteza, donde maduran en los subestadios DN, y de regreso a la zona medular, donde los timocitos se enfrentan a diversos procesos de selección. El proceso de entrada de los

progenitores está regulado principalmente por los receptores de quimiocinas CCR7, CXCR4 y CCR9 (Robertson et al., 2006) y tiene lugar a través de vénulas presentes en la región medular del timo (Petrie y Zúñiga-Pflücker, 2007).

La transición de DN1 a DN2 es un proceso que involucra a la quimiocina CCL19 (Misslitz et al., 2004), ya que la subpoblación DN2 expresa transitoriamente CCR7 (receptor de CCL19 y CCL21), y la ausencia de éste conlleva un acumulo de timocitos en estadio DN2 en la médula (Petrie y Zúñiga-Pflucker, 2007). En el estadio DN3 la señalización inducida por el Pre-TCR marca un cambio en la migración de los timocitos, los cuales invierten su dirección y se dirigen de la parte más externa de la corteza a la parte más interna de la misma. Esto viene acompañado de un incremento en la expresión de CCR9 en superficie, que se expresa en altos niveles en la subpoblación DP. Por otro lado, la migración de los timocitos hacia la corteza involucra a CXCL12 (a través del receptor CXCR4) y CCL25 (a través de CCR9). Finalmente, la re-expresión de CCR7 en timocitos SP como resultado de la selección positiva redirige la migración de regreso a la médula (Ueno et al., 2004), donde se expresan los ligandos CCL19 y CCL21 (Adachi et al., 2001) Asimismo, se ha observado que la expresión de CCR7 favorece el egreso de los timocitos (Ueno et al., 2002), el cual es controlado a través del receptor S1P₁ (Matsuyuki et al., 2006)

La dependencia de los timocitos por algunas citocinas es mayor durante los estadios DN. Dos factores muy importantes son el stem cell factor (SCF; ligando de Kit) (Massa et al., 2006; Rodewald et al., 1997) e IL-7 (Wang et al., 2006), los cuales inducen proliferación y supervivencia, y son indispensables para el establecimiento de un compartimento tímico adecuado. Las células en estadios DN1-3 son muy dependientes de estas citocinas. Por su parte, IL-7 contribuye a la expresión del TCR, favorece la adhesión (Ye et al., 2001; Munitic et al., 2004) y la accesibilidad a la recombinación de los loci del TCR, siendo

especialmente importante para rearreglo de los loci de las cadenas γ y δ que componen el TCR $\gamma\delta$ (Ye et al., 2001; Huang et al., 2001). La dependencia de los timocitos a IL-7 disminuye una vez que ha ocurrido el rearreglo de la cadena β , lo cual se ve reflejado en una disminución de la expresión de su receptor (IL-7R) (van DeWiele et al., 2004), aunque se ha observado que la supervivencia de timocitos SP también es dependiente de IL-7, pero una vez que la selección positiva ha ocurrido.

Las proteínas morfógenas también tienen un papel importante durante el desarrollo tímico. El epitelio tímico posee la capacidad de producir la glicoproteína Wnt. Se cree que Wnt provee señales esenciales de proliferación en timocitos en estadio doble negativo y de supervivencia en células en estadio doble positivo (Ioannidis et al., 2001). Las proteínas hedgehog, en particular sonic hedgehog (SHh) se expresan en células epiteliales (TEC) y contribuyen a la expansión, supervivencia y diferenciación de las células DN1-3 (Shah et al., 2004; El Andaloussi et al., 2006) y su señal parece que ya no es requerida después de la selección β .

Otras proteínas morfógenas, miembros de la superfamilia del TGF β como las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), también parecen tener un papel importante durante el desarrollo de los timocitos. La adición de BMP a cultivos de órgano fetal (FTOC) provoca un arresto en el estadio DN1 y disminuye la transición DN-DP (Graf et al., 2002; Hager-Theodorides et al., 2002). Las BMP también son importantes para la formación adecuada del estroma tímico (Bleul y Boehm, 2005) y pueden inducir la expresión del factor de transcripción FoxN1 y de algunas quimiocinas (Tsai et al., 2003).

Por otro lado, se ha implicado a las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales se expresan en el epitelio tímico en ratón, en el desarrollo de timocitos. La ausencia de TGF-

$\beta 1$ deriva en un fenotipo de autoinmunidad (Bommireddy et al., 2003) indicando que esta molécula está estrechamente relacionada al desarrollo de linfocitos T. Utilizando cultivos de timo fetal (FTOC) se ha observado la influencia de las isoformas de TGF β en el desarrollo de timocitos: TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ afectan el desarrollo de timocitos en DN1, DP y CD4 SP, mientras que TGF- $\beta 1$ promueve la maduración a un estado intermedio simple positivo y TGF- $\beta 2$ a CD8 SP (revisado por Licona-Limón y Soldevila, 2007).

Recientemente, nuestro grupo de investigación describió la presencia de las proteínas activinas e inhibinas en el timo (las cuales señalizan a través de receptores tipo I y II y proteínas señalizadoras Smad2, Smad3 y Smad4), de manera que se observa una mayor expresión de receptores tipo I y II y Smad2, Smad3 y Smad4 en timo fetal al día 14 de desarrollo, en comparación con el día 16 y el timo adulto (Licona et al., 2006). En un análisis de expresión de las subunidades de inhibinas y activinas en el timo se observó que preferencialmente se encuentra expresada la subunidad α , lo cual apunta a que las inhibinas podrían tener un papel importante en la organogénesis y en el desarrollo temprano de los timocitos. La función de estas moléculas en el timo ha sido confirmada en estudios recientes de nuestro grupo que demuestran que las Activinas e Inhibinas son capaces de regular el desarrollo de los timocitos *in vitro* y que la ausencia de la subunidad α puede reflejarse en un defecto en el desarrollo de los timocitos fetales (Licona-Limón et al., 2009).

2.1.2. Procesos de selección tímica

Como ya se ha mencionado antes, los timocitos sufren varios procesos de selección durante su desarrollo. Estos procesos son de gran importancia ya que a través de ellos se

seleccionan los timocitos aptos para salir a periferia y se eliminan los que tienen el potencial de ser autoreactivos. Estos procesos de selección ocurren en diferentes etapas de su maduración. Las señales que dictan el resultado de cada uno de los procesos provienen de la interacción de los timocitos con células estromales y linfoides, así como de diversos factores solubles; sin embargo, son dirigidas a través de la señalización del receptor de linfocitos T.

En el estadio DN3 los genes que conforman la cadena beta del TCR han sido rearrreglados. Esto permite la expresión de este receptor en la membrana celular y su acoplamiento a una glicoproteína conocida como pre-T α . Este receptor inmaduro presente en los timocitos se conoce como pre-TCR. Se piensa que la señalización a través de este receptor provee a las células de señales de supervivencia que las rescatan de la muerte por apoptosis, lo cual se conoce como selección beta. Hasta la fecha no se ha descrito un ligando del pre-TCR por lo que se postula que su activación es autónoma.

Los eventos posteriores de selección se dan en el estadio doble positivo, durante el cual los timocitos ya expresan un receptor TCR maduro compuesto por las cadenas β y α (conocido como TCR). Este receptor maduro posee afinidad por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) unido a un péptido. Este ligando es presentado por las células estromales epiteliales de la corteza tímica. A través de la interacción con su ligando, el TCR le proporciona a los timocitos señales que dependiendo de su intensidad, dan paso a los procesos de selección conocidos como muerte por negligencia, selección positiva, selección negativa y elección de linaje (cooperador o citotóxico). A la par que los timocitos pasan a través de estos procesos de selección y llegan a su estado final de maduración, migran desde la corteza de regreso a la médula tímica, donde luego salen del timo hacia la periferia.

2.1.2.1. Selección positiva

Los genes de la cadena α del TCR comienzan a rearrreglarse desde que la célula pasa la selección β ; sin embargo, el rearrreglo robusto comienza en el estadio DP. La obtención de un producto rearrreglado de la cadena α no es suficiente para la terminación del proceso, puesto que la señal de término requiere que la cadena α generada posea la capacidad de acoplarse a la cadena β previamente generada y que el heterodímero tenga afinidad por el MHC presentado en las células estromales (Borgulya et al., 1992; Brandle et al., 1992). Esta interacción entre TCR y MHC rescata a las células de la apoptosis, lo cual se conoce como selección positiva. Sólo un bajo porcentaje de células logran rearrreglos exitosos de la cadena α , por lo que la presencia de múltiples sitios V/J en el gen de α permite la recombinación de múltiples cadenas α , a expensas de la eliminación de la cadena formada anteriormente. La vida de las células DP es de 3 a 4 días. Durante este tiempo el locus α puede sufrir una gran cantidad de rearrreglos, lo cual se correlaciona con el tiempo de vida de la célula. Debido a que sólo las células con rearrreglos funcionales de su TCR reciben señales de supervivencia, la selección positiva es un punto de control a través del cual se asegura que los timocitos generados tengan restricción a MHC propio. Se ha observado que el proceso de selección positiva se lleva a cabo a través de la unión prolongada del TCR con MHC propio, lo cual permite que exista una señalización adecuada (Wilkinson et al., 1995). El reconocimiento de MHC permite la represión de los genes RAG, supervivencia, migración a la médula y diferenciación a linfocitos T maduros.

De manera alternativa, si el TCR maduro no posee afinidad por MHC propio y ya no se puede recombinar la cadena α , los timocitos mueren por apoptosis, lo cual se conoce como muerte por negligencia (ocurre en el 95% de los casos).

Se ha propuesto que los péptidos unidos al MHC que interactúan con el TCR de los linfocitos T influyen en la selección positiva, aunque esta propuesta es todavía materia de controversia. Por un lado, existe la propuesta de que los péptidos que seleccionan positivamente a los timocitos están relacionados a los péptidos antigénicos que activarán a la célula madura en periferia, aunque en menor concentración (Kraj et al., 2001; Cook et al., 1997). Alternativamente, se ha propuesto que la naturaleza de los péptidos es antagonista a los que inducirán la activación de los linfocitos en periferia (Smyth et al., 1998; Stefanski et al., 2001). Finalmente, se ha planteado que los péptidos que llevan a la selección positiva no tienen relación con los péptidos antigénicos que provocarán la activación de las células en periferia (Alam et al., 1996; Williams et al., 1999), aunque sí posean alta relación estructural con ellos (Starr et al., 2003). Esta última, es la propuesta más aceptada actualmente.

2.1.2.2. Selección Negativa

La selección negativa consiste en la eliminación de células cuyo TCR posee muy alta afinidad por MHC. Una diferencia importante entre la selección positiva y negativa es que para que se lleve a cabo este segundo proceso se necesita de la activación del TCR acompañada de señales de co-estimulación. Esto fue confirmado a través de la activación *in vitro* de timocitos DP (Starr et al., 2003). Los péptidos presentados a los timocitos en esta etapa del desarrollo son proporcionados por células presentadoras de antígeno

profesionales (APC), lo cual es importante para obtener un co-estímulo adecuado. Asimismo, las células epiteliales medulares (mTEC) son de gran importancia en el proceso de selección negativa, ya que tienen la capacidad de expresar un gran número de antígenos propios de diferentes tejidos. La expresión de estos antígenos está regulado por un factor de transcripción conocido como AIRE (revisado por Peterson et al., 2008) y la deficiencia de este factor de transcripción tiene como consecuencia un fenotipo severo de autoinmunidad (Kuroda et al., 2005; Peterson y Peltonen, 2005).

Un aspecto interesante de estos procesos de selección es que restringen el repertorio de células a aquellas que poseen un TCR con afinidad intermedia por MHC.

2.1.2.3. Elección de linaje CD4 vs. CD8

El paso final de maduración de los timocitos es la elección de un linaje, la cual consiste en la represión de un co-receptor: CD4 ó CD8.

2.1.2.3.1. Modelos de elección de linaje

Inicialmente, se postularon dos modelos principales que describen los mecanismos involucrados en este proceso: *el modelo estocástico*, que apunta que los linfocitos tienen una represión azarosa de un co-receptor seguida de un proceso de selección; y *el modelo instructivo*, que propone que los timocitos reciben señales a través de su receptor que les dictan el co-receptor que les corresponde. Ambos modelos están respaldados por evidencia, lo cual ha ocasionado que el análisis de los datos se haga teniendo en cuenta la contraposición de uno y otro (revisado en Germain, 2002).

El modelo estocástico postula que la elección de linaje sucede en dos pasos: (1) los timocitos reprimen la expresión de alguno de los co-receptores al azar y (2) sólo se seleccionan positivamente las clonas que interactúan con el MHC que corresponde al co-receptor expresado. Si no existe concordancia por el mismo MHC entre la especificidad del TCR y el co-receptor elegido al azar, las células no reciben señales de supervivencia y mueren por apoptosis. En ratones deficientes de MHC I se observan cantidades importantes de formas transitorias de timocitos DP: CD4^{medium} CD8^{high}. La presencia de éstas poblaciones sirvió como evidencia de que el co-receptor se elige al azar, debido a que al carecer de MHC I, los timocitos CD4^{medium} CD8^{high} no se generaron en respuesta a una señal inicial que los instruyera a elegir linaje CD8 (Chan et al., 1993; Crump et al., 1993). Asimismo, el efecto correspondiente fue encontrado en los ratones deficientes de MHC clase II, en los cuales hay presencia de células CD4^{high} CD8^{medium} (Chan et al., 1993; Crump et al., 1993).

El modelo instructivo de elección de linaje postula que la activación de uno de los co-receptores da origen a la represión de la transcripción del otro co-receptor. La evidencia inicial de que este proceso sucede se encontró en ratones deficientes de CD4, en los cuales se observa que si existen células CD4 simples positivas. Esta es también el caso de ratones deficientes de CD8. En modelos donde se utilizan co-receptores quiméricos que expresan la parte extracelular de CD8 combinada con la porción intracelular de CD4 se comprobó que la señalización del co-receptor es más importante que su capacidad de reconocimiento de MHC (Seong et al., 1992, Itano et al., 1996). En estos experimentos se observó el desarrollo de timocitos que contienen estas proteínas quiméricas en un ratón transgénico con TCR específico para MHC clase I. En este sistema se observó el desarrollo de células CD4⁺CD8⁻.

Más aún, el grupo de Itano y colaboradores postula que, debido a que la activación de Lck es diferente entre CD4 y CD8, la interacción TCR–co-receptor–MHC podría desencadenar señales de diferente intensidad dependiendo de cuál co-receptor se une. De acuerdo con esto, un TCR que reconoce MHC clase II reprime la transcripción de CD8 y uno que reconoce MHC clase I reprime a CD4. El reclutamiento de CD4 induce una señal fuerte y sostenida, mientras que CD8 induce una señal baja y sostenida (Itano et al., 1996). Es por ello que a este modelo se le conoce como “*intensidad de señal*”.

Por su parte, otros grupos han apoyado la idea de que la intensidad en la interacción entre el TCR y MHC tiene influencia en la elección de linaje. Matechek y colaboradores demostraron que en ratones deficientes de CD4, la señal generada a través del TCR es baja, lo que favorece la generación de linaje CD8 (aunque en su modelo también se encontró la formación de células CD4 SP) (Matechak et al., 1996). Por otro lado, Itawa y colaboradores demostraron que la concentración y el tiempo de exposición de linfocitos DP a ésteres de forbol ó a ionomicina (los cuales estimulan la activación de moléculas río abajo del TCR) resulta en la formación selectiva de CD4 ó CD8 SP (Ohoka et al., 1997): concentraciones altas y tiempos prolongados de exposición a dichos agentes dan paso a la elección del linaje de CD4; y concentraciones bajas y tiempos cortos a CD8.

El grupo de Zamoyska y colaboradores por su parte, confirmaron que Lck es importante para el compromiso. En su modelo utilizaron anticuerpos con capacidad de activar el TCR (bajos niveles de Lck) ó TCR–co-receptor (altos niveles de Lck). La interacción TCR-TCR da lugar a CD8, mientras que la activación de los co-receptores a CD4, sin importar cuál de los dos se active (Basson et al., 1998a; Basson et al., 1998b). Asimismo, Weist y

colaboradores demostraron que Lck se une preferentemente a CD4 que a CD8 (Wiest et al., 1993).

El grupo de Germain y colaboradores utilizó un sistema de cultivo *in vitro* en dos pasos: (1) un reagregado celular de timocitos y células de estroma tímico, en el cual se promueve la selección positiva; y (2) recuperación de las células que expresan el marcador CD69 del primer cultivo para observar su desarrollo en un segundo reagregado. Variando la calidad del péptido adicionado a los cultivos entre el primer y segundo reagregado se puede elucidar el tiempo de interacción co-receptor-MHC necesario para la elección de linaje (Yasutomo et al., 2000). Usando este método, los autores determinaron que el compromiso al linaje CD4 depende de una activación prolongada durante el primer cultivo mientras que la formación de células CD8 requiere de un tiempo más corto de estímulo (Kirberg et al., 1997; Kisielow y Miazek, 1995; Yasutomo et al., 2000). A este modelo se le denominó “*duración de la señal*” (Germain, 2002).

En el año 2000, Singer y colaboradores demostró que existe un estado intermedio entre DP y SP en el cual cesa la transcripción de CD8 de manera autónoma, aún cuando las células eligen CD8 como linaje final (Brugnera et al., 2000). Estas células CD4⁺CD8⁻ retienen la capacidad de reiniciar la transcripción de CD8 dependiendo de las señales del TCR. A este fenómeno se le denominó *reversión del co-receptor*. Si la célula recibe una señal prolongada a través de su TCR se compromete al linaje CD4, sin embargo, si la señal no persiste y existe IL-7 en el entorno, se compromete al linaje CD8. Dado que se propone que el compromiso al linaje depende de la duración de la interacción TCR y MHC, este modelo fue denominado “*cinética de señal*”.

Más recientemente, el grupo de Singer demostró que la cinética de señal del TCR es más importante que la actividad misma de los co-receptores durante la elección del linaje (Bosselut et al., 2003, Erman et al., 2006). En un modelo donde se combina la porción extracelular de CD8 α con la porción intracelular de CD4 (en ratones “knock in”) se observó que la señalización a través del co-receptor CD8 es importante para la selección positiva de los timocitos con TCR específico para CD8, pero esta señalización no es indispensable para el compromiso al linaje (Erman et al., 2006).

2.1.2.3.2. *Papel de las quimiocinas*

Dado que la migración y la maduración de los timocitos son dos eventos intrínsecamente relacionados, recientemente se ha explorado el papel de las quimiocinas en la elección del linaje. Tomando en cuenta que los timocitos DP expresan el receptor de quimiocinas CCR7 al pasar el proceso de selección positiva, se han utilizado ratones con TCR transgénicos, capaces de seleccionar preferentemente células CD4 ó CD8 para observar la expresión de este receptor. El grupo de Yin et al. muestra que existe una relación entre la expresión de CCR7 y el porcentaje de células que seleccionan para CD8 (Yin et al., 2007): una sobreexpresión de CCR7 se ve reflejada en un aumento del porcentaje de células CD8. Asimismo, los autores sugieren que podría haber una relación entre la expresión de CCR7 y la duración de la señal a través del TCR: los timocitos pre-seleccionados para CD8 aumentan la expresión de CCR7, lo cual podría favorecer la elección del linaje CD8.

2.1.2.3.3. *Papel de Notch*

Dado que Notch tiene un papel importante durante el desarrollo de timocitos, se ha estudiado su papel en el compromiso al linaje. De manera inicial, se observó que en ratones que expresan de manera constitutiva NCID (la porción intracelular de Notch) había un decremento de la formación de células CD4 SP y un aumento de células CD8 SP (revisado por Laky et al., 2006). A raíz de ello, se propuso que Notch tenía un papel importante en la elección del linaje CD8. Sin embargo, otros estudios posteriores demostraron que la señalización a través de Notch no dirige el linaje hacia CD8, sino que esta subpoblación tiene mayor dependencia de Notch para su sobrevivencia ya que Notch1 promueve la diferenciación de ambos CD4 y CD8 en ratones deficientes de MHC clase II (Deftos et al., 2000). Utilizando otros modelos de ratones transgénicos de NCID se observó que la ausencia de Notch1 causa defectos en el desarrollo de ambos CD4 y CD8 (Izon et al., 2001; Deftos et al., 2000) y el rescate de estas poblaciones es dosis dependiente (Izon et al., 2001), lo cual fue relacionado a una deficiencia en la señalización a través del TCR. Sin embargo, el grupo de Fowlkes reanalizó los resultados obtenidos de los transgénicos de NCID y observó una marcada disminución de células CD4 y un favorecimiento de la población CD8 en ambos fondos: MHC clase I y II (Fowlkes y Robey, 2002).

Las discrepancias obtenidas con los ratones deficientes de NCID llevaron a la elaboración de otros modelos de activación constitutiva de Notch1. Recientemente, mediante la utilización de un modelo deficiente de presenilina, se observó que la disminución de células CD4 SP puede ser atribuido a deficiencias de la capacidad de señalización del TCR durante el estadio DP (Laky y Fowlkes, 2007). Este hallazgo se confirmó dado que si

se aumenta la afinidad del TCR se puede restaurar el fenotipo en estos ratones (revisado por Laky y Fowlkes, 2008). Es por ello que actualmente se propone que la actividad de Notch no es decisiva en el proceso de elección de linaje, aunque sí tiene un papel modulador de la señal del TCR.

2.1.2.3.4. Regulación transcripcional

Se han encontrado dos factores de transcripción relacionados con el proceso de elección del linaje a CD4: ThPOK y GATA-3. La deficiencia de ThPOK no permite el desarrollo de células CD4 e incluso, redirige el linaje de células restringidas por MHC clase II (cuya afinidad es por CD4) al linaje CD8 (He et al., 2005). De manera inversa, la expresión forzada de ThPOK en células restringidas por MHC clase I (cuya afinidad es por CD8) redirige el linaje de estas células a CD4 (He et al., 2005; Sun et al., 2005). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción GATA-3 aumenta conforme las células se dirigen al linaje CD4 y disminuye para aquellas que se diferencian en CD8 (Hendriks et al., 1999; Hernandez-Hoyos et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de ThPOK, GATA-3 no tiene la capacidad de redirigir el linaje de células MHC clase I a CD4 (Hernandez-Hoyos et al., 2003; Ling et al., 2007). Debido a que se ha observado que las células deficientes de GATA-3 se arrestan en el paso DP-SP (Pai et al., 2003), se postula que GATA-3 es necesario para la supervivencia de timocitos CD4 (Ho y Pai, 2007; Pai et al., 2003). Sin embargo, recientemente el grupo de Wang y colaboradores postuló que el factor de transcripción GATA-3 es necesario para la expresión de ThPOK, dado que la expresión forzada de ThPOK en un ratón deficiente de GATA-3 no es capaz de rescatar el desarrollo de timocitos CD4 (Wang et al., 2008). Este grupo propone que el factor de transcripción

GATA-3 es necesario para un pre-compromiso, en el cual GATA-3 ayuda a aumentar la expresión de genes que llevan al linaje CD4.

Asimismo, se ha propuesto que los factores de transcripción TOX y RunX3 están involucrados en la elección del linaje CD8. Se ha propuesto que el factor de transcripción TOX puede dirigir las células al linaje CD8 (Wilkinson et al., 2002) mientras que RunX tiene la capacidad de silenciar genes encargados de la expresión de CD4 en células CD8 (Taniuchi et al., 2002; Woolf et al., 2003).

1.3. Señalización a través del Receptor de linfocitos T

El proceso de señalización a través del TCR se inicia a través de la interacción de sus cadenas α y β , que confieren la especificidad en el reconocimiento de péptidos, con su ligando, las moléculas del MHC propias cargadas de péptido. Sin embargo, las cadenas α y β del TCR no poseen la capacidad de señalar por sí mismas debido a que carecen de una porción citoplásmica que les permita anclar y activar moléculas señalizadoras. Para poder transducir señales, el TCR se asocia a un complejo conocido como CD3, el cual se compone de seis cadenas arregladas en forma de dímeros: $\delta\epsilon$, $\epsilon\gamma$ y $\zeta\zeta$ (Figura 2). Cada una de las cadenas δ , ϵ y γ posee un motivo conocido como ITAM (“immunoreceptor tyrosine-based activation motif”), que se compone de un par de secuencias con tirosinas fosforilables, mientras que ζ posee tres de estos motivos. El complejo CD3 se ensambla y se expresa en la membrana de los timocitos a la par de la expresión del pre-TCR (Ciofani y Zúñiga-Pflucker, 2007).

La cascada de señalización se activa a través de la unión del TCR con el MHC cargado de péptido. Esta interacción induce un cambio conformacional en las cadenas α y β del TCR que aproxima al CD3 al complejo. Los ITAM del CD3 son fosforilados por cinasas de la familia src (Lck, Fyn, Yes). La cinasa principal que participa en este proceso es Lck, la cual es acercada al complejo a través de su unión a la porción citoplásmica de los co-receptores CD4 y CD8. Los ITAM fosforilados forman el sitio de anclaje de las cinasas de tirosina de la familia de Zap70/Syk. A continuación, Zap70 se encarga de la fosforilación de proteínas adaptadoras como LAT, que está anclada a la membrana y SLP-76. La fosforilación de LAT es un punto clave en la propagación de la señal a partir del cual se activan tres cascadas de señalización: activación de MAP cinasas, movilización de calcio y rearreglo del citoesqueleto. Para llevar a cabo estas funciones, LAT recluta proteínas diferencialmente dependiendo de su grado de fosforilación: PLC γ 1 (fosfolipasa C-gamma1), PI3K (fosfatidil inositol 3-cinasa) y Grb2 (Figura 3). PLC γ 1 regula la inducción de calcio citoplásmico, Grb2 activa a la vía de las MAPcinasas y SLP-76 permite el reclutamiento de Vav y Nck los cuales regulan la polimerización de actina y la reorganización del citoesqueleto.

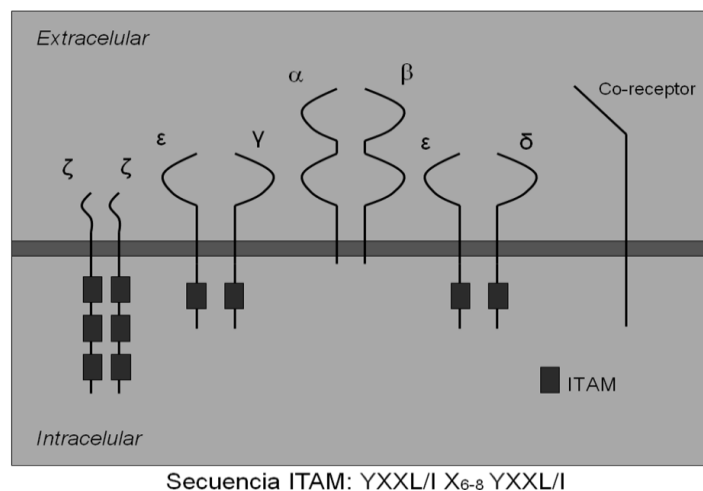


Figura 2. Estructura del complejo TCR-CD3.

La vía de las MAP cinasas es activada a través de la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) Sos. El reclutamiento de Sos a la membrana es mediado por Grb2; esta proximidad a la membrana le permite la activación de la pequeña GTPasa Ras, la cual fosforila a la primera cinasa de la cascada (MAPKKK) Raf-1. Raf-1 fosforila a MEK-1 y 2 (MAPKK) las cuales a su vez fosforilan a ERK-1 y 2 (MAPK). Por otro lado, MEK-3, 4 y 6 activan a la cinasa p38 (MAPK); y MEK-4 y 7 a la cinasa JNK (MAPK). Finalmente, las cinasas ERK, JNK y p38 se translocan al núcleo y fosforilan los factores de transcripción Ets, Elk-1, NF-AT y el complejo AP-1 (Fos-Jun) (Rincón, 2001).

PLC γ -1 tiene la hidroliza la molécula fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) anclada a la membrana. Los productos de la hidrólisis son fosfatidil inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ es un segundo mensajero que tiene la capacidad de migrar al retículo endoplásmico en donde se une a su receptor y permite la liberación de calcio de los reservorios. El incremento de calcio en el citoplasma permite la activación de la fosfatasa calcineurina, encargada de la activación del factor de transcripción NF-AT (Rao et al., 1997; Lewis, 2001). Por otro lado, DAG activa a la cinasa de serina y treonina PKC- θ la cual tiene la capacidad de activar la vía de las MAPcinasas de dos maneras diferentes: (1) activación directa de JNK y MKK4 (Avraham et al., 1998) y (2) activando a RasGRP (Ras guanyl nucleotide-releasing protein), la cual activa a Ras e inicia la vía de las MAPcinasas (Dower et al., 2000).

El rearrreglo del citoesqueleto se inicia a través de VAV, una GEF que se une a SLP-76. Vav se asocia a la membrana para a su vez anclar a vinculina y talina, dos proteínas que ayudan a unir F-actina a la membrana celular. Asimismo, Vav activa a la GTPasa Cdc42,

encargada de activar al complejo Wasp/Arp2/3 quien inicia la polimerización de actina (Samstag et al., 2003).

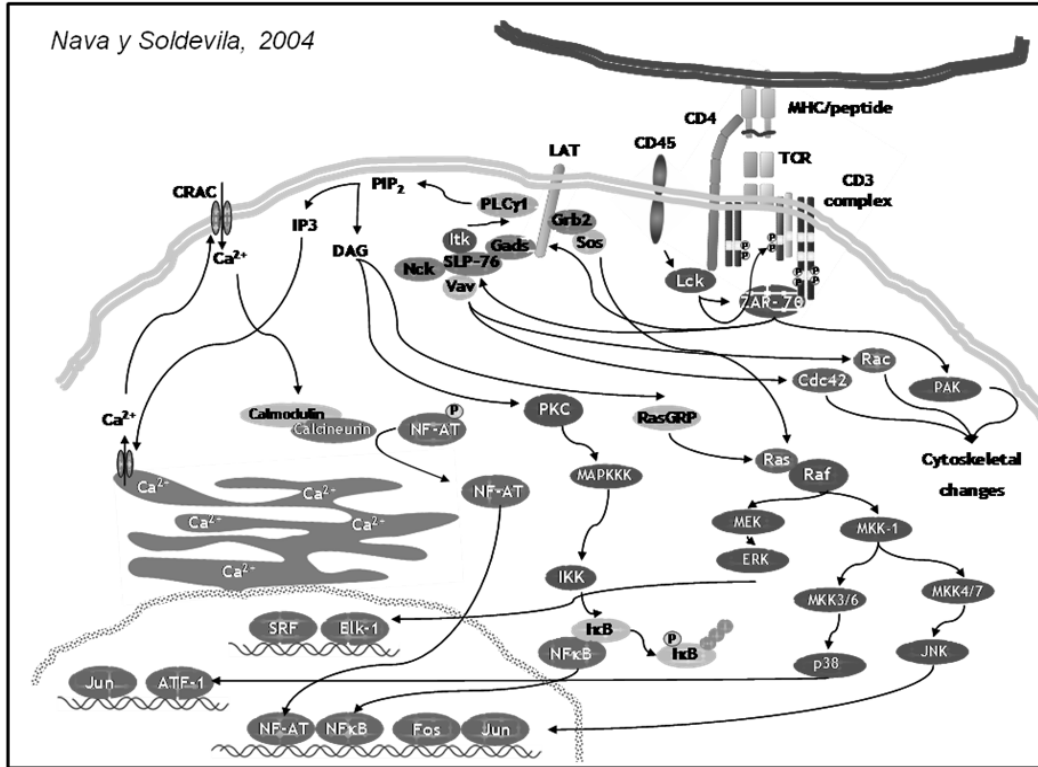


Figura 3. Cascadas de señalización activadas por el TCR. Figura obtenida de Nava y Soldevila, 2004.

La conexión de las diferentes vías de señalización da como resultado la activación de factores de transcripción que resultan principalmente en la activación de los linfocitos y la producción de IL-2.

2.2.1. Señalización del TCR durante el desarrollo de los linfocitos

Como ya se ha mencionado, los puntos de control del desarrollo de los linfocitos T están determinados a través de las señales del pre-TCR y TCR. Dependiendo del estadio del desarrollo de las células, las consecuencias de la activación de este receptor son muy diversas: supervivencia, apoptosis, represión o activación de factores de transcripción, proliferación, etc. y se relacionan directamente con la intensidad de la señal inducida. La capacidad de señalización del TCR es muy interesante debido a que para inducir esta gran diversidad de eventos utiliza un mismo complejo de señalización.

El primer punto de control, la selección beta es dependiente de la señalización del pre-TCR. Se ha postulado que el pre-TCR no posee un ligando específico y que su señalización es autónoma y se da a través de un complejo estable de la cadenas TCR β -preT- α con el complejo CD3. El resultado de esta señalización provee supervivencia, proliferación y reactivación de los genes Rag. Los ratones deficientes de Rag, TCR ó p-T α poseen timocitos que se encuentran arrestados en el estado de maduración DN3: CD25⁺CD44^{-low}CD117^{low} (Fehling et al., 1997), y por lo tanto, no han pasado la selección beta. En estos ratones se ha observado que la inyección de anti-CD3 ϵ restaura la maduración de los timocitos y la celularidad total del timo. Asimismo, la activación de Lck es necesaria para que se lleve a cabo este proceso (Hashimoto et al., 1996).

Más adelante, durante el estadio DP, los timocitos dependen de las señales del TCR para su desarrollo. Se ha observado que Lck, la cual se encuentra muy proximal al complejo TCR-CD3 tiene un papel muy importante en los diversos procesos de selección. El

bloqueo de Lck lleva al arresto de los timocitos en el estadio DP, deformidad tímica y bajo número de células T en periferia (Molina et al., 1992). En 1996, se describió que una forma inactiva de Lck, colocada al doble de la concentración de la normal es capaz de inhibir la selección positiva en un 80%; mientras que una isoforma constitutivamente activa de Lck es capaz de inducir selección positiva incluso en ausencia de TCR (Schmedt y Tarakhovsky, 2001). Esto indica que la ausencia de Lck no sólo impide el desarrollo de los timocitos sino que también interviene en la selección del repertorio de linfocitos T.

Selección positiva	Selección Negativa
↑Ca ²⁺	BIM
Erk (activación baja y sostenida)	Grb-2
SLP-76	JNK
Ras	p38
MEK	Erk (activación alta y corta)
RasGRP-1	CD40
↓c-Cbl	CD28/B7
↓SLAP	
↓Csk	

Figura 4. Moléculas involucradas en los procesos de selección positiva y negativa.

Existen otras proteínas proximales al TCR que están involucradas en la selección positiva. Se ha observado que los timocitos de ratones deficientes de Zap-70 presentan un bloqueo en su selección positiva (Negishi et al., 1995). Por otro lado, la deficiencia de CD3δ impide

el paso de selección positiva, aunque no tiene efecto en la selección β (Dave et al., 1997). Interesantemente, el proceso de selección positiva puede ocurrir en ausencia absoluta de los ITAM de CD3 ζ ; sin embargo, los timocitos seleccionados poseen un repertorio sesgado (Love y Shores, 2000). Finalmente, algunas proteínas inhibitorias proximales al TCR también se han relacionado con la selección positiva: c-Cbl, SLAP y Csk, y su deficiencia se refleja en un incremento en la selección positiva (Sohn et al., 2001).

Además, se ha observado que SLP-76 y GADs, que son reclutadas a LAT son indispensables para la selección positiva (Starr et al., 2003). Por otro lado, el flujo de calcio, así como la actividad de calcineurina (Gallo et al., 2007) son necesarios para la selección positiva debido a que el factor de transcripción NFAT4 activado por esta vía, es responsable de una eficaz selección positiva (Oukka et al., 1998). Los timocitos de ratones deficientes de RasGRP-1 también presentan deficiencias en este proceso de selección (Dower et al., 2000). Finalmente, la selección positiva depende en gran medida de la vía de las MAP cinasas. En sistemas en los que se expresan formas dominantes negativas de Ras y MEK se observó una disminución de selección positiva (Alberola-Ila et al., 1995 y 1996), lo cual fue confirmado con la delección de Erk1 (Pages et al., 1999). El factor de transcripción Egr-1 es el blanco probable de la activación de ERK en timocitos (Shao et al., 1997). Si se activa exógenamente este factor de transcripción de timocitos se obtiene selección positiva aún en condiciones no favorables (Miyazaki y Lemonnier, 1998).

Varias moléculas involucradas en las vías de muerte han sido estudiadas en el proceso de selección negativa. La vía mediada por receptores como FAS, TNFR1, FADD, DR3 y TRAILR2, no tiene influencia en la selección de timocitos en modelos transgénicos ni utilizando superantígenos (Nagata, 1997). Se ha observado que sólo la delección de BIM,

proteína de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-XL, disminuye la selección negativa, tanto en modelos murinos con TCR transgénico como en la activación a través de superantígenos y péptidos (Hara et al., 2002).

Aunque los mecanismos de muerte en los timocitos seleccionados negativamente aún no han sido totalmente esclarecidos, se conocen algunas vías que se han relacionado con la selección negativa. El adaptador Grb-2 es importante para la selección negativa (Gong et al., 2001), mientras que su influencia en la selección positiva es muy baja. Las vías de JNK y p38 también han sido involucradas en el proceso de selección negativa. Los niveles de JNK y p38 se encuentran aumentados durante la selección negativa (Gong et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de selección negativa no sólo es resultado de la interacción entre TCR-MHC sino que también requiere de señales co-estimuladoras. Se ha observado que la deficiencia de CD28 ó su ligando B7, resulta en resistencia a la apoptosis mediada por anti-CD3 o péptidos (Noel et al., 1998). Asimismo, la deficiencia de CD40 causa supresión de la selección negativa, aún en modelos transgénicos.

El factor de transcripción Nur 77 también posee un papel importante durante la selección negativa: su ausencia lleva a supresión de la selección negativa, mientras que su sobreexpresión causa aumento de muerte celular, utilizando el modelo de ratones TCR transgénicos HY, luego de la activación del TCR a través de anti-CD3 y péptido (Calnan et al., 1995; Zhou et al., 1996). Otro factor de transcripción importante en este proceso es NFκB. Se ha observado que la sobreexpresión del represor de NFκB, IκB incrementa la apoptosis como respuesta a la estimulación con anti-CD3 (Fiorini et al., 2002).

A partir de estas observaciones se han propuesto varias teorías por medio de las cuales se puede dar la discriminación entre las señales de supervivencia y muerte. Una de ellas implica una diferencia en la activación de la vía de las MAP cinasas: la activación de Erk baja y sostenida logra señales de supervivencia necesarias para la selección positiva, mientras que una señal corta y fuerte acompañada de la activación de JNK y p38 da paso a la selección negativa (Werlen et al., 2000; Mariathasan et al., 2001). La activación baja y sostenida de Erk podría ser resultado de la activación de RasGRP. Por otro lado, la activación de Grb-2 podría activar la vía de JNK y p38 debido a que es un intermediario anterior a la activación de estas moléculas. Esto podría estar relacionado a las señales de co-estímulo a través de la fosforilación diferencial de LAT, la molécula adaptadora que recluta y permite la activación de Grb-2. Asimismo, las señales co-estimuladoras podrían generar una amplificación de la señal de Grb-2.

2.2.2. Participación de los ITAM del CD3 en la discriminación de las señales

En la actualidad se conoce una gran cantidad de moléculas involucradas en la supervivencia y muerte de los linfocitos, y estos procesos a su vez, han sido relacionados con la intensidad de la señal iniciada en el TCR. Sin embargo, todavía no se sabe la manera por medio de la cual el TCR tiene la capacidad de discriminar entre las señales fuertes y débiles durante el desarrollo de los linfocitos T. Mientras que las cadenas del CD3 son las que poseen capacidad señalizadora (a través de sus motivos ITAM), se ha propuesto que estos motivos son los responsables de la diferenciación entre las señales débiles y fuertes.

Los motivos ITAM se encuentran usualmente presentes en una o varias copias en muchos receptores de las células del sistema inmune, como en receptores Fc, PIR-A (paired immunoglobulin-like receptor A), y receptores activadores de células NK, linfocitos B (BCR) y T (TCR). Dependiendo de la célula en que se encuentren y su estado de maduración, la fosforilación de estos motivos puede regular la sobrevivencia, muerte celular, desarrollo ó funciones efectoras (Pitcher y van Oers, 2003).

A la fecha todavía se desconoce por qué estos receptores poseen más de una copia de motivos ITAM. Para explicar este fenómeno se han postulado tres modelos. El primero, conocido como *modelo cuantitativo* se basa en que la multiplicidad de los ITAMs les confiere amplificación de la señal: un mayor número de ITAM fosforilados es capaz de atraer al receptor un mayor número de proteínas al sitio de activación. El segundo, conocido como *modelo cualitativo* propone que los distintos ITAM poseen la capacidad de discriminación de la señal: los ITAM de las diferentes cadenas del CD3 son capaces de reclutar moléculas específicamente o con diferente afinidad, lo cual deriva en la activación diferencial de cascadas de señalización. Esta hipótesis se basa en que aunque la secuencia de los ITAM es muy conservada, no es idéntica entre los ITAM de las diferentes cadenas del CD3. Esto podría indicar que los diferentes ITAM pueden reclutar las mismas de moléculas pero con diferentes grados de afinidad (Pitcher y van Oers, 2003).

El modelo cuantitativo postula que los 10 ITAMs que conforman el complejo CD3 son equivalentes. En el caso de la selección positiva, si la afinidad del TCR-MHC es intermedia, los timocitos sobreviven el proceso de selección. En este caso, la multiplicidad de los ITAM permite la amplificación de la señal de baja avidéz (ante péptidos propios)

para favorecer la selección positiva de los timocitos. Esto se propuso a partir de la observación de que los timocitos de ratones deficientes de CD3 ζ poseen una baja expresión del TCR (Malissen et al., 1993) y pocos de ellos son capaces de completar el proceso de maduración y salir a periferia, lo cual indica una baja selección positiva. Asimismo, los linfocitos T que se encuentran en periferia en estos ratones poseen un fenotipo autoreactivo, lo cual indica que la selección negativa también se ve afectada por la deficiencia de los ITAM de CD3 ζ (Lin et al., 1997). En modelos en los que se reconstituyen ratones deficientes de CD3 ζ con proteínas recombinantes que poseen 0, 1, 2 ó 3 ITAM, se observa una correlación entre la eficiencia de la selección positiva y negativa con el número de ITAM de ζ (Shores et al., 1994, 1997a, 1997b). Trabajos similares con ratones deficientes de otros componentes del CD3 no han corroborado estos datos, quizá debido a que la ausencia de CD3 γ , ϵ y/o δ afecta el ensamblaje del TCR, por lo que su expresión en membrana es baja o nula. Por otro lado, se ha observado que los ligandos de alta afinidad inducen la fosforilación completa de la molécula CD3 ζ , conocida como p23, mientras que los ligandos de baja afinidad inducen la formación de una especie menos fosforilada llamada p21. Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre p21 y p23 con selección positiva o negativa respectivamente. Sin embargo, durante la selección negativa se encuentra un mayor número de formas p21 y p23 que en la positiva (Lucas et al., 1999).

Se ha propuesto un tercer modelo conocido como *modelo cinético de activación*. En él se postula que una alta avidéz del TCR por su ligando se ve reflejada en un tiempo más prolongado de interacción, lo cual a su vez da paso a una mayor activación de proteínas río abajo del TCR. La magnitud de la activación de proteínas río abajo del TCR podría ser un mecanismo a través del cual la célula distingue ligandos de alta y baja avidéz (Mc

Keithan, 1995; Rabinowitz et al., 1996). Los ligandos de alta avididad pueden activar eventos tardíos de señalización los cuales median la selección negativa, como la activación de JNK y p38. En este caso, el número de ITAM fosforilados puede ser regulado por el tiempo de interacción entre el TCR y su ligando, incluso si los ITAM unen las mismas moléculas efectoras con afinidad similar, así como variar la proporción entre ITAM mono y di-fosforilados (Love y Shores, 2000).

Por otro lado, se ha observado que varias de las proteínas de la cascada de señalización del TCR se prenden diferencialmente durante los procesos de selección, como por ejemplo, miembros de la cascada de las MAP cinasas (Rincón et al., 1998; Sugawara et al., 1998). El grupo de Isakov y colaboradores demostraron, a través de ensayos de afinidad, que la unión de Zap70 a los ITAM posee una jerarquía: $\zeta_1 \geq \zeta_2 > \varepsilon \geq \zeta_3$ (Isakov et al., 1995). Por otro lado se observó que el ITAM ζ_3 une a la proteína SHC, pero no así el de CD3 ε (Ravichandran et al., 1993), que PI3K une específicamente a ζ_1 (Exhy et al., 1994) y que ζ_3 tiene capacidad de unión a actina (Rodzial et al., 1995).

Como ya se mencionó, la delección de los diferentes componentes del CD3 resulta en un bloqueo en el desarrollo de los timocitos en diferentes estadios de maduración. De acuerdo con el modelo cuantitativo, se esperaría que la deficiencia de CD3 ε ó γ no provocara deficiencias en la señalización del complejo ya que la ausencia de su único ITAM podría ser suplida por los ITAM de CD3 ζ . Sin embargo, este no es el caso, dado que se ha observado que la deficiencia de CD3 ε ó γ ocasiona un arresto en el estadio DN (Pitcher y van Oers, 2003). Más aún, las células deficientes de CD3 ζ logran pasar el proceso de selección beta, pero se quedan arrestadas en el estadio DP, no siendo capaces de pasar el proceso de selección positiva (Starr et al., 2003). Esta evidencia

apunta a que es probable que las cadenas del CD3 tengan funciones diferentes durante el desarrollo de los timocitos, por lo tanto, los ITAM de las cadenas no son equivalentes.

La deficiencia del motivo de unión a la cadena α del TCR de CD3 δ ocasiona un bloqueo en la selección positiva pero no afecta la selección negativa (Werlen et al., 2000). Por lo tanto, es posible que la activación que da paso a la selección positiva esté relacionada a la cadena CD3 δ . Asimismo, la selección positiva se ve afectada por la ausencia de CD3 γ (Haks et al., 2002).

Debido a que el estudio de ratones deficientes de los componentes de CD3 en muchas ocasiones no permite la localización del CD3 en la superficie, el grupo de Holst y colaboradores crearon un sistema en el cual insertaron cadenas de CD3 con ITAMs mutantes que poseen fenilalanina en sustitución de las tirosinas fosforilables (Holst et al., 2008). Este grupo encontró que los ratones que desarrollan autoinmunidad son aquellos que poseen menos de 7 ITAMs en total. Este hallazgo apoya la teoría de que la multiplicidad de los ITAM es necesaria para el funcionamiento adecuado de los timocitos. Los ratones que presentan autoinmunidad son invariablemente aquellos que tienen mutaciones en los primeros dos ITAM de ζ (ζ_a y ζ_b), aunque posean el resto de los ITAM intactos. Los ratones que poseen 6 ITAM provenientes de las cadenas ζ no presentan autoinmunidad, así como aquellos que poseen los ITAM de ϵ , γ , δ y ζ_b . Esta evidencia en conjunto podría sugerir que al menos la presencia de ζ_b es importante para evitar el desarrollo de autoinmunidad. Asimismo, contrario a lo que se esperaría los ratones que poseen ningún ó solamente 1 ITAM, proveniente de γ ó δ , no desarrollan autoinmunidad. En conclusión, aunque al parecer existe un rango de ITAM necesarios para evitar autoinmunidad, el papel de cada una de las cadenas del CD3 en este proceso también

podría tener un papel cualitativo, aunque aún queda por investigar si la diferencia es la sutil diferencia en secuencia o la localización de los ITAM.

Posteriormente, Holst y colaboradores observaron que el proceso de selección beta ocurre de manera eficiente con al menos 2 ITAMs en el complejo CD3 y que los ratones que presentan autoinmunidad también poseen células que escapan a la selección negativa. Esta observación se atribuyó a que al tener un número bajo de ITAMs, los timocitos con fenotipo autoreactivo son capaces de salir a periferia (Holst et al., 2008).

2.3. Sistema de dimerización químico

Los sistemas de dimerización químicos han sido utilizados ampliamente para diseccionar la participación de diversas moléculas en procesos de interés. El sistema de dimerización químico utilizado en este trabajo se basa en la activación condicional de las moléculas por medio de su unión a una o más copias de la inmunofilina FKBP-12, la cual puede ser dimerizada por medio de drogas como AP20187. Este sistema ha sido previamente utilizado para el estudio de receptores que regulan crecimiento celular (Spencer et al., 1993), diferenciación (Spencer et al., 1996) y muerte (Stockwell y Schreiber, 1998); así como para identificar la localización de proteínas (Graef et al., 1997; Yasuo y Malhotra, 2004) y el control de genes (Mootz et al., 2003). Más recientemente, este sistema ha sido utilizado para lograr una mejor regulación de la recombinación utilizando el sistema Cre (Jullien et al., 2007). En muchos sistemas biológicos, la iniciación de la respuesta funcional es resultado de la dimerización u oligomerización de proteínas. El TCR opera de esta misma manera: como resultado de la interacción de las cadenas TCR $\alpha\beta$ con su ligando, se ocasiona la agregación del receptor y consecuentemente, el acercamiento de

las cadenas del CD3 y su posterior activación. Es por ello que este sistema de dimerización químico es útil para observar la consecuencia del entrecruzamiento intracitoplásmico de las cadenas que conforman el CD3 (Irving y Weiss, 1991; Letourneur y Klausner, 1992).

Este tipo de dimerizadores ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio para medir las consecuencias de la activación de la molécula TCR ζ *in vitro* e *in vivo* (Soldevila et al., 2001). La ventaja de utilizar este sistema radica en que el entrecruzamiento del receptor permite diseccionar la señal regulada a través del mismo de manera específica. De esta manera podemos evaluar la contribución de cada una de las cadenas del complejo CD3 a la señal mediada por el TCR, independientemente del receptor endógeno. En este estudio se observó que el entrecruzamiento de la cadena ζ con el dimerizador AP1510 en la línea celular Jurkat tiene efectos funcionales en la producción de IL-2, sin embargo no se observaron los mismos resultados al entrecruzar individualmente la cadena ζ en timocitos y linfocitos T murinos. Más específicamente, la activación condicional de la cadena ζ en células primarias del ratón transgénico indujo señales parciales de activación (flujos de calcio moderados) pero no fue capaz de inducir proliferación o apoptosis de los linfocitos T maduros. De igual manera, el análisis del entrecruzamiento de ζ en timocitos silvestres o deficientes para ζ y Rag, no proporcionó la señal suficiente para inducir la selección β , positiva o negativa. Los datos obtenidos llevaron a la conclusión de que otros componentes del complejo TCR-CD3 y/o los co-receptores eran requeridos para completar las señales que permiten la diferenciación del linfocito T.

A partir de estos resultados se realizó la construcción de receptores quiméricos para CD3 ϵ y CD4, con los cuales se puede inducir homo y heterodimerización de receptores. A

diferencia del sistema de dimerización utilizado para el estudio de la cadena ζ , se diseñaron nuevas quimeras donde el motivo de unión de la droga AP20187, se une específicamente a un FKBP-12 mutante, mejorando la efectividad de la droga *in vitro* así como *in vivo* (Freeman et al., 2003). En este trabajo se estudiarán las consecuencias de la activación específica de estas moléculas en linfocitos T inmaduros en estado DP, empleando proteínas recombinantes para CD3 ϵ y CD4 unidas a varios módulos de FKBP-12 mutante (Figura 5), para permitir un distinto grado de entrecruzamiento.

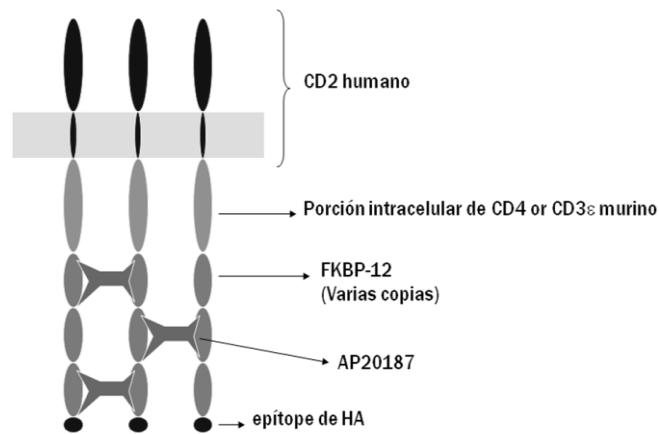


Figura 5. Estructura de las proteínas recombinantes utilizadas.

3. Justificación

Es importante comprender el papel de la señalización de los complejos pre-TCR y TCR durante los diversos estadios de maduración, ya que todavía se desconoce el mecanismo por el cual la transducción de señales a través de un mismo TCR/CD3 puede inducir respuestas funcionales tan distintas.

Se postula que la discriminación de la señal se da a través de la integración de las señales aportadas por cada componente de dichos complejos. Sin embargo, a la fecha todavía es materia de debate cuál es la contribución específica de cada ITAM en las cadenas del CD3. Más aún, el papel de las cadenas del CD3 no ha sido aún analizado durante el proceso de elección de linaje, en el cual además subsiste el debate de si el papel de los co-receptores es modular la señalización inducida a través del TCR ó tener un papel instructor. A este respecto, puesto que la cadena CD3 ϵ contiene un único ITAM, es probable que su activación condicional (independiente del resto del TCR-CD3) induzca una señal de baja avidéz que resulte en la elección del linaje CD8. Por otro lado, la activación condicional de CD4 podría activar vías de señalización que favorecieran el linaje CD4, pues su porción citoplásmica posee asociación constitutiva a Lck.

De esta manera, el estudio de las señales inducidas específicamente a través de CD3 ϵ y CD4 es relevante para disecar la participación específica de cada componente en la señalización conjunta del complejo TCR-CD3 y co-receptores durante los procesos normales de desarrollo. Asimismo, esta información ayudará a entender cómo las alteraciones de estos componentes podrían llevar a la pérdida de la tolerancia central.

4. Hipótesis

La activación independiente a través CD3 ϵ o CD4 activa vías de señalización distintas que afectarán diferencialmente el proceso de diferenciación de los timocitos: la activación de CD3 ϵ favorecerá la generación de CD8 SP y la activación de CD4 promoverá la generación de timocitos CD4 SP.

5. Objetivos

- Evaluar las vías de señalización reguladas a través de la activación individual de CD3 ϵ y CD4.
- Estudiar el papel de CD3 ϵ y CD4 en la elección del linaje CD4 vs CD8 a partir de timocitos DP.

5.1. *Objetivos particulares*

- Evaluar la consecuencia funcional de la activación de CD3 ϵ y CD4 a través de la fosforilación de Zap-70, Erk 1/2 y flujo de calcio.
- Caracterizar el desarrollo de timocitos fetales en el sistema de desarrollo *in vitro* OP9-DL1.
- Evaluar el efecto del entrecruzamiento específico de CD3 ϵ y CD4 en timocitos dobles positivos desarrollados *in vitro* a través de la medición del porcentaje de células en los estadios doble positivo, doble negativo y simples positivas.

6. Metodología

6.1. Líneas celulares y medios

La línea celular utilizada para la expresión de proteínas recombinantes fue el timoma murino EL4. Estas células fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), y HEPES 12.5mM (Gibco).

El medio de electroporación utilizado consiste en RPMI 1640 (Gibco) complementado con estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), y HEPES 12.5mM (Gibco).

La selección de células de expresión de los vectores se realizó en medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), HEPES 12.5mM (Gibco) y 30mg/ml de geneticina.

Finalmente, la estimulación de las células se realizó en un medio que permitiera la disminución de la fosforilación basal de las células. Para ello se utilizó medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 0.2% (Gibco), estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco) y HEPES 12.5mM (Gibco).

La creación de sobrenadantes virales fue realizada en la línea celular derivada de células humanas de riñón embrionario HEK 293 y línea celular derivada de fibroblastos 3T3, fue utilizada para medir la eficiencia de infección de sobrenadantes. Ambas líneas celulares se cultivaron utilizando el medio DMEM (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), glutamina

2mM, estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), y HEPES 12.5mM (Gibco).

Finalmente, la línea celular derivada de médula ósea OP9-DL1 fue cultivada en medio AlfaMEM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco), estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), y HEPES 12.5mM (Gibco).

Los co-cultivos celulares de OP9-DL1 y timocitos fueron realizados con medio AlfaMEM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100U/mL (Gibco), HEPES 12.5mM (Gibco) y las citocinas IL-7 1ng/mL y Flt3L 5µg/mL.

6.2. Tinción de marcadores extracelulares

Para observar la expresión de diferentes proteínas de membrana, se utilizó la citometría de flujo. A un pellet celular de 1×10^6 células se le adicionó una suspensión de anticuerpos directamente marcados ó biotinilados en 30µL de buffer de FACS (PBS 2% SFB 0.02% Azida de sodio). Las suspensiones celulares fueron incubadas 30 min a 4°C durante 30 min. Las células fueron lavadas con 200µL de buffer de FACS y en caso de tener anticuerpos primarios biotinilados, fueron incubadas con 30µL de una suspensión de streptavidina marcada con fluorocromo en buffer de FACS durante 30 min a 4°C. La fluorescencia de las células fue medida utilizando el equipo FACS Calibur (BD) y analizada utilizando el programa CellQuest (BD).

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD4 APC (1/300 v/v) (Pharmlingen), anti-CD8 CyChrome (1/300 v/v) (Pharmlingen), anti-CD25 FITC (1/100 v/v) (Pharmlingen), anti-CD44 PE (1/200 v/v) (Pharmlingen), anti-CD69 biotinilado (1/200 v/v) (Pharmlingen), anti-CD28 biotinilado (1/200 v/v) (Pharmlingen), anti-CD2 humano biotinilado (1/600 v/v) (TS2.18 purificado de ascitis), anti-sca1 PE (1/100

v/v) (Pharmingen), anti-ckit biotinilado (1/200 v/v) (Pharmingen), anti-B220 FITC (1/600 v/v) (Pharmingen), anti-CD28 biotinilado (1/200 v/v) (Pharmingen), anti-TCR β biotinilado (1/200 v/v) (Pharmingen), anti-CD3 FITC (1/100 v/v) (BD), streptavidina PE (1/600 v/v) (Pharmingen) y streptavidina CyChrome (1/600 v/v) (Pharmingen).

6.3. Obtención de transfectantes de alta expresión de CD4 y CD3 ϵ quiméricas

Los vectores de expresión en eucariotas PBJ5 modificados fueron clonados previamente en el laboratorio con los genes de las quimeras de CD2h-CD4-FKBP-12x2 y CD2h-CD3 ϵ -FKBP-12x3. Para expresar las quimeras en células eucariotas de manera estable, los plásmidos fueron linearizados utilizando las enzimas de restricción EcoRI y ClaI, respectivamente. El timoma murino EL4 fue electroporado con estos plásmidos linearizados utilizando el electroporador BTX modelo ECM630 a 960 μ F, 125 ohms y 240mV, en 300 μ L de medio de electroporación. Las transfectantes fueron crecidas en medio de selección durante un par de semanas. Posteriormente, las clonas de alta expresión fueron identificadas por medio de citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD2 humano unido a biotina (1/600 v/v), generado en el laboratorio y streptavidina conjugada a ficoeritrina (1/600 v/v) (streptavidin-PE, BD).

Las células de alta expresión fueron separadas por medio de citometría de flujo utilizando el equipo FACS Aria (Becton Dickinson) y el programa FACS Diva (BD) clonadas por medio de dilución clonal a 1.5 células/mL. Una clona de alta expresión para cada una de las quimeras fue seleccionada para realizar los ensayos posteriores de fosforilación y flujo de calcio. Estas clonas se crecieron en medio de selección durante el resto del tiempo.

6.4. Identificación de CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD4 FKBP-12 x 2 a través de Inmunoprecipitación y Western Blot

Para identificar y caracterizar las proteínas quiméricas se utilizaron varias combinaciones de anticuerpos para inmunoprecipitación y western blot. Los anticuerpos utilizados fueron puros: anti-HA (producido en el laboratorio), anti-HA-TAG (GIBCO), anti-FKBP12 (Affinity BioReagents), anti-CD4 (reconoce la porción intracelular) (Santa cruz biotechnology), anti-CD2 humano (producido en el laboratorio) y anti-CD3 ϵ (reconoce la porción intracelular) (Santa cruz biotechnology). Se tomaron lisados totales de 10×10^6 células y se incubaron con 3 μ g de anticuerpo por 1 hora a 4°C en agitación leve. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con 30 μ L de proteína G (Gibco) lavada con buffer de lisis y diluída 1:5.

El sobrenadante fue descartado y la proteína G lavada tres veces con 300 μ L de buffer de lisis frío y fresco. Al pellet de proteína G se le agregaron 30 μ L de buffer de lisis y 30 μ L de buffer de carga, de los cuales se cargaron 60 μ L en un gel al 8% de poliacrilamida de 12.4 x 14cm a 150 volts. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Gibco) en una cámara de transferencia semi-seca (Hoefer) a 10 volts constantes durante una hora. Las membranas fueron bloqueadas con TS 0.02% de tween y 5% de leche durante toda la noche a 4°C. Los western blots fueron realizados con 1 μ g/mL de anticuerpo puro diluído en TS-tween con 1% de leche. Se colocó el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces con TS tween y se colocó el anticuerpo secundario unido a HRP (anti-mouse HRP ó anti-rabbit HRP de Amersham) diluído en TS tween con 1% leche, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TS tween y se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (Pierce).

6.5. Flujos de Calcio

Los colorantes FuraRed (Molecular Probes) y Fluo3 (Molecular Probes) fueron resuspendidos en 50 μ L de DMSO (Sigma). Posteriormente, se tomaron 50 μ L de Fura Red y 30 μ L de Fluo3 y se resuspendieron en 5mL de RPMI al 2% de SFB con 5mg/mL de ácido plurónico (Molecular probes). Cinco millones de células de cada una de las clonas y la línea celular sin transfectar se colocaron en 1mL de la mezcla de colorantes y se incubaron 45min a 37°C en agitación leve. Las células se lavaron tres veces con RPMI al 2% de SFB (Gibco) y se resuspendieron en RPMI sin SFB para incubarlos 45 minutos a temperatura ambiente en agitación leve. Las células se lavaron tres veces con RPMI sin SFB, se resuspendieron en 1 mL de RPMI 0% y se guardaron en hielo en oscuridad.

Se tomaron 200 μ L de la suspensión celular y se llevaron a 1mL con RPMI sin SFB en un tubo de FACS (BD falcon). Se pasó esta suspensión por el FACS Can (Becton Dikingson) para grabar el basal. Posteriormente, se retiró el tubo sin parar la captura para adicionar los estímulos y se prosiguió con la captura para un total de 8 minutos. Las muestras se capturaron aproximadamente 3 minutos y sin interrumpir la captura, se retiró el tubo y se agregaron los estímulos. Los datos de la captura fueron transformados por medio del programa FACS Assistant para realizar gráficas de Fluo3/FuraRed contra tiempo (Microsoft Excel). El aumento en la pendiente de las gráficas representa el flujo de calcio en el interior de las células como respuesta a los estímulos colocados.

Los estímulos utilizados fueron: anti-CD3biotinilado (clona 2c11 BD) ó anti-CD2h biotinilado (TS2.18), seguido de streptavidina pura (Pierce) (a concentraciones entre 5 y 10 μ g/mL); ionomicina 0.1 μ g/mL (Sigma) y AP20187 1 y 0.1 μ M (Ariad Pharmaceuticals).

6.6. Ensayos de fosforilación intracelular por citometría de flujo

Se resuspendieron dos millones de células en 100µL de medio con estímulo y se colocaron a 37°C durante periodos de 1 a 10min. La reacción se paró con 300µL de buffer Lyse-Fix (BD Phosphoflow) y se incubó 10min a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lisadas con el buffer Perm-fix (BD Phosphoflow) durante 20 min a 4°C en oscuridad. En seguida, se adicionó el anticuerpo que reconoce específicamente la tirosina fosforilada de Zap-70 (BD) ó Erk1/2 (BD) (directamente acoplados al fluorocromo ALEXA). Las muestras fueron capturadas en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) y analizadas por medio del programa Flowjo (Tristar Inc.).

Los estímulos utilizados fueron: anti-CD3biotinilado ó anti-CD2h biotinilado, seguido de streptavidina pura (a concentraciones entre 5 y 10µg/mL); pervanadato (Sigma) y AP20187 (1 y 0.1µM).

6.7. Obtención de sobrenadantes virales

Los vectores de expresión en eucariotes MIG, clonados previamente en el laboratorio con los genes de CD3ε FKBP-12 x 3 y CD4 FKBP-12 x 2 fueron empaquetados en retrovirus en la línea celular de riñón HEK 293T, por medio de su co-transfección con el plásmido pcl-eco, que proporciona las proteínas virales. La transfección fue realizada a través de precipitación con cloruro de calcio. La línea celular HEK 293T se conservó en medio DMEM 10% SFB durante 48h posteriores a la transfección, tiempo al cual fueron colectados los sobrenadantes. Para corroborar la eficiencia de infección de los sobrenadantes colectados se infectó la línea celular 3T3. En una placa de 24 pozos se colocaron 80000 células 3T3 en medio DMEM al 10% SFB. Al día siguiente se le adicionó al pozo 1mL de medio, 1mL de sobrenadante viral y 8µg/mL de polibren (Sigma). La placa se

centrifuga a 2800rpm durante 90 minutos a 25°C. Después de 24 horas en cultivo a 37°C se despegan las células y se observan al microscopio de fluorescencia ó se pasan por el FACS Calibur para medir el número de células que expresan la proteína verde fluorescente (GFP).

6.8. *Infección retroviral de timocitos fetales y co-cultivo con la línea celular OP9-DL1*

Los timocitos fetales se obtienen de fetos de ratón de 14 días de gestación, obtenidos de ratonas de la cepa CD1. Los timos se disgregan en un tubo endendorff con 1mL de DMEM al 10% SFB por medio de un émbolo y las células se pasan por una malla para separar los timocitos del estroma. Las células se lavan tres veces en DMEM 10% SFB en esterilidad. Un millón de timocitos se colocan en placas de 24 pozos con 1mL de RPMI 10%SFB, 1mL de sobrenadante retroviral (frescos o conservados a -80°C) y 5µg/mL de polibren. La placa se centrifuga a 1400 rpm a 25°C por 1 hora. Posteriormente, la placa se incuba 2 horas a 37°C. Al término de la incubación, las células se retiran y se resuspenden en medio fresco.

La línea celular OP9-DL1 se siembra en placas de 6 pozos a una concentración de 100,000 células por pozo el día anterior, en medio AlfaMEM al 20% SFB. Antes de sembrar los timocitos, se retira el medio y se reemplaza con 2mL de medio alfa-MEM al 10% SFB complementado con 7ng/mL de IL-7 y 5µg/mL de Flt-3L.

Los timocitos se adicionan al cultivo de OP9-DL1 suplementado con citocinas a una concentración de 200,000 células por pozo. El cultivo se mantiene a 37°C y el medio se refresca cada 3 días retirando el medio anterior por succión de manera cuidadosa.

Para observar el estadio de desarrollo de las células, cada día de co-cultivo se retiran los timocitos a través de pipeteo fuerte y se tiñen con los anticuerpos: anti-

CD2h (TS2.18), anti-CD4 APC (BD) y anti-CD8 CyChrome (BD). Una vez que se obtuvo el tiempo óptimo de desarrollo de células en estadio DP, se adicionó al cultivo AP20187 (0.1 μ M) en un rango de 24 a 48 horas. Los timocitos tratados también fueron retirados al término de su incubación con AP20187 y teñidos con los marcadores mencionados. La fluorescencia de las células fue medida en el equipo FACS Calibur (BD) y analizada con el programa Flowjo (Tristar Inc.).

7. Resultados

7.1. Evaluación funcional del entrecruzamiento de CD4 2FKBP-12 ó CD3 ϵ 3FKBP-12

7.1.1. Elaboración de transfecciones estables de las quimeras CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en la línea celular EL4.

Para generar transfectantes estables se utilizaron vectores de expresión para células eucariotas (PBJ5 modificados) construidos previamente en el laboratorio conteniendo las secuencias que codifican las proteínas recombinantes CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2. Dichos vectores fueron digeridos con las enzimas Eco RI, Not 1 y Cla 1 para corroborar su integridad (Figura 6).

Como se observa en la Figura 6, el inserto que codifica para CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 puede ser cortado tanto con Eco RI como la combinación Not1-EcoRI, mientras que para cortar CD2 CD4 FKBP-12 x 2 se necesita la combinación de las enzimas Not1-Eco RI. Al corroborar que el inserto de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 tiene el peso molecular esperado de 2KB y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 tiene un peso de alrededor de 1.3KB, se prosiguió a la linearización de ambos plásmidos con Cla1 y Eco RI respectivamente (Figura 1), para favorecer la integración de los mismos al genoma de la célula.

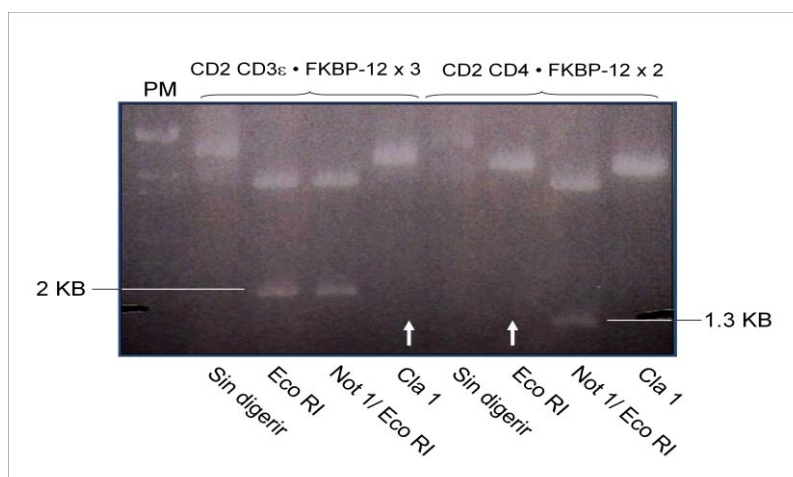


Figura 6. Digestión de los vectores PBJ-5 con diferentes enzimas de restricción. Las flechas señalan los carriles con el plásmido linearizado utilizado para la transfección de las células EL4. Los insertos de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 y CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 escindidos del plásmido corresponden al peso molecular esperado.

La línea celular de timoma murino EL4 fue transfectada con 10 μ g de plásmido linearizado para la generación de transfectantes estables. Las clonas que incorporaron el plásmido fueron seleccionadas por medio de su resistencia a geneticina (600 μ g/mL). A la semana de cultivo, las células fueron teñidas con anti-CD2 humano biotinilado (el cual reconoce específicamente la porción extracelular de las proteínas quiméricas) y estreptavidina-PE para analizar la expresión de las quimeras por medio de citometría de flujo. Los histogramas de intensidad media de fluorescencia (Figura 7A) muestran el control negativo, correspondiente a células no transfectadas, teñidas con anti-CD2bn y estreptavidina-PE en negro y el histograma correspondiente a las células transfectadas sobrepuesto en rojo ó verde, según el caso. Como se puede observar, sólo un pequeño porcentaje de células muestra tinción positiva (menor al 1%) en ambos casos.

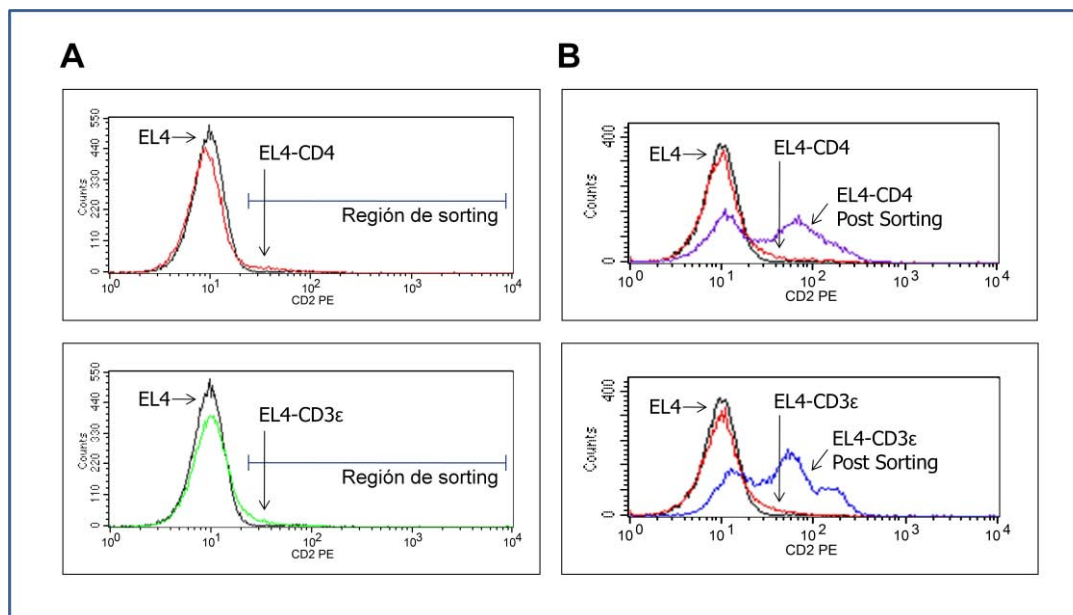


Figura 7. Separación de las células con alta expresión de CD2 humano por citometría de flujo. (A) Transfección de la línea celular EL4. Las células separadas fueron tomadas de la región marcada. (B) Tinción de CD2 humano en las células separadas.

Dado que estos eventos constituyen un porcentaje muy pequeño de la población, se prosiguió a enriquecer estas células por medio de separación por citometría de flujo (sorting). Para este propósito se tiñeron las células en condiciones de esterilidad con anti-hCD2 biotina y streptavidina-PE. Mediante la utilización del citómetro FACS Aria (Becton & Dickinson), se seleccionó la región mostrada en la Figura 7A para la separación. De la separación se obtuvo un número bajo de eventos con alta expresión de CD2 humano: 15,000 para las transfectantes de CD2 CD3εFKBP-12 x 3 y 20,000 para CD2 CD4 FKBP-12 x 2. Estas células fueron nuevamente teñidas para corroborar el enriquecimiento de las transfectantes positivas hCD2 (Figura 7B).

Posteriormente, se prosiguió a clonar estas células por dilución límite a 1.6 células/mL (calculando 0.3 células por pozo en placa de 96 pozos). Las células transfectadas con alta

expresión de cada quimera se denominarán EL4-CD3 ϵ y EL4-CD4. El criterio utilizado en la elección de las clonas de alta expresión fue la intensidad media de fluorescencia de hCD2. Se obtuvieron 19 clonas de EL4-CD3 ϵ y 31 clonas de EL4-CD4. Las clonas seleccionadas para realizar los experimentos posteriores se muestran en la Figura 8.

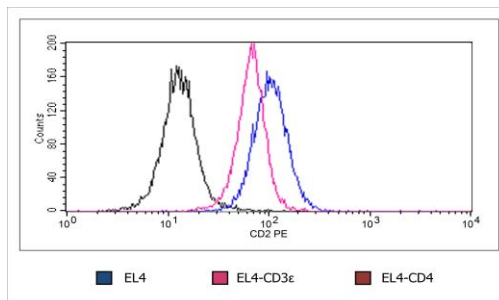


Figura 8. Clonas con alta expresión de CD2 humano. Las células EL4 parentales no expresan CD2 humano mientras que las clonas EL4-CD3 ϵ y EL4-CD4 poseen una alta expresión de CD2.

Para identificar las moléculas CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en las clonas de alta expresión a través de western blot, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y western blot con las siguientes combinaciones de anticuerpos: anti-hCD2, anti-FKBP-12, anti-HA, anti-HA TAG, anti-CD4 (porción intracelular) y anti-CD3 ϵ (porción intracelular). A través de la inmunoprecipitación con anti-CD3 ϵ y western blot con anti-FKBP-12 se identificó la a la proteína CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 (Figura 9). Sin embargo, no fue posible encontrar la combinación adecuada para corroborar la expresión de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 mediante inmunoprecipitación y western blot. La proteína codificada por la quimera CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 tiene un peso superior a 63KDa, lo cual es aproximado al peso esperado de la molécula. La identificación de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 por medio de western blot no sólo permite identificar el peso molecular de la proteína,

sino que también pone de manifiesto la integridad de la misma, ya que está siendo identificada por dos anticuerpos diferentes (α CD3 ϵ para IP y α FKBP-12 para WB).

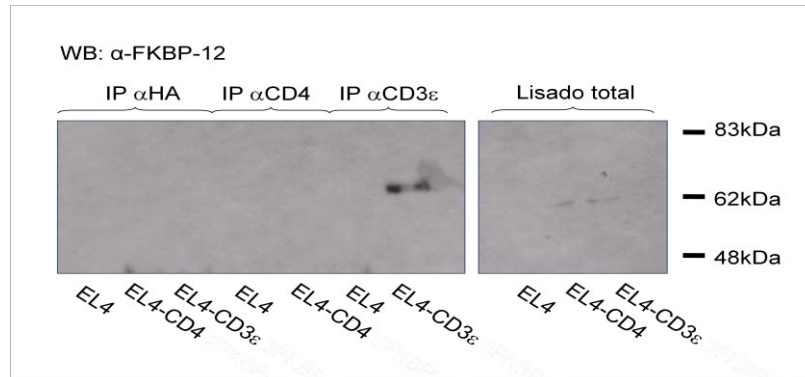


Figura 9. Identificación de CD3 ϵ FKBP-12 x 3. La proteína recombinante fue identificada de lisados de la clona de alta expresión por medio de su inmunoprecipitación con anti-CD3 ϵ , seguido de western blot con anti-FKBP12. Los lisados fueron obtenidos a partir de alicuotas de 10×10^6 células de cada línea celular.

Finalmente, para investigar si la transfección de las proteínas quiméricas pudiera haber ocasionado alteraciones en el fenotipo de la línea celular parental, se realizó la caracterización de distintos marcadores de superficie en las clonas estables incluyendo: CD3, TCR β , CD28, CD69, CD44, CD25, CD4 y CD8 (Figura 10).

De manera importante, se observa que la transfección no provocó una gran alteración en el fenotipo de la línea celular. La línea celular EL4 es un timoma caracterizado por su expresión del pre-TCR así como CD3 en superficie. En cuanto a los marcadores de superficie característicos de las poblaciones DN, la línea EL4 mostró ser CD44 $^+$ y CD25 $^-$.

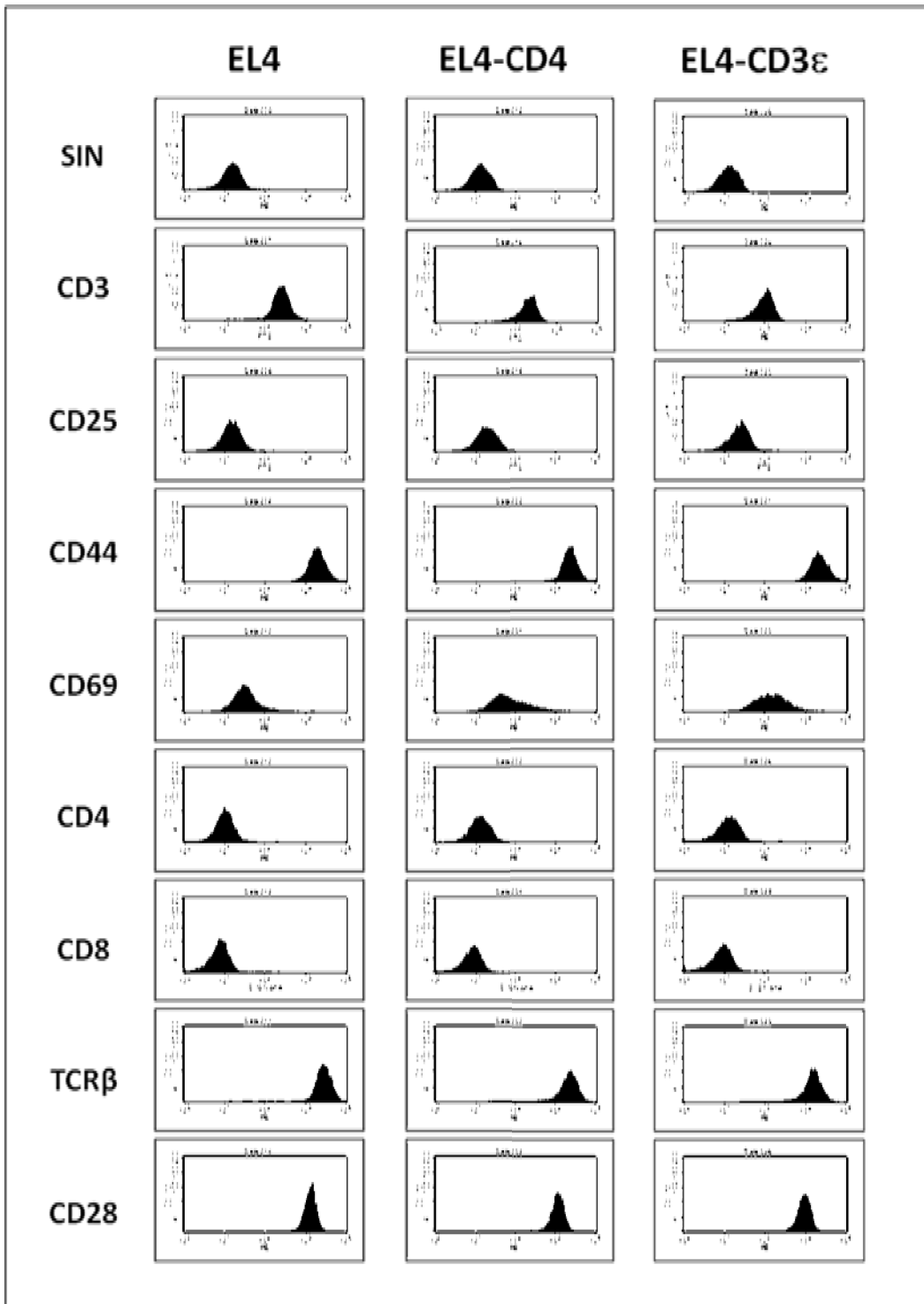


Figura 10. Marcadores de las líneas celulares EL4, EL4-CD3ε y EL4-CD4. La expresión de los marcadores de superficie que caracterizan a la línea celular EL4 fueron medidos por citometría de flujo para observar su alteración resultado de la transfección de las proteínas quiméricas.

Aunque este fenotipo es semejante al de timocitos en estadio DN1, se considera que su estadio es DN3 debido a la expresión del pre-TCR. En la Figura 10 se observa que CD44, CD25, CD4 y CD8 no se han alterado como resultado de la transfección. Asimismo, los marcadores de las células transfectadas CD3 y TCR β son de menor expresión mientras que CD69 se ve aumentado. Dado que estas células son líneas celulares transformadas, es difícil especular cuál sea el significado biológico del aumento del marcador CD69, el cual es un marcador de activación de linfocitos T en periferia. Por otro lado, las clonas estables muestran una disminución del receptor TCR β en la membrana, lo cual correlaciona con la disminución del complejo CD3 como resultado de la transfección.

7.1.2. Análisis de los Flujos de Calcio inducidos por el entrecruzamiento de los receptores quiméricos.

Como se ha mencionado antes, una de las consecuencias de la activación a través del receptor de linfocitos T es la liberación de calcio al citoplasma y es un parámetro que permite relacionar el entrecruzamiento de las proteínas recombinantes con una respuesta funcional temprana de las células. Para medir el flujo de calcio del retículo al citoplasma utilizamos citometría de flujo. Para ilustrar el procedimiento, se muestran los resultados obtenidos en la línea celular Jurkat, la cual induce flujo de calcio en respuesta al estímulo con anti-CD3 humano (Figura 11b). En estado basal de la célula, la fluorescencia de los colorantes se mantiene constante en el tiempo, lo cual se observa como una línea recta en una gráfica de Fluo3/Fura Red vs. tiempo (Figura 11a). Al adicionar ionomicina al tubo, el cual es un ionóforo, incrementa la concentración de calcio en el citoplasma. Este flujo

altera la fluorescencia de los colorantes y la relación FL1/FL3 se incrementa, lo cual se evidencia como un flujo de calcio en la gráfica (Figura 11a).

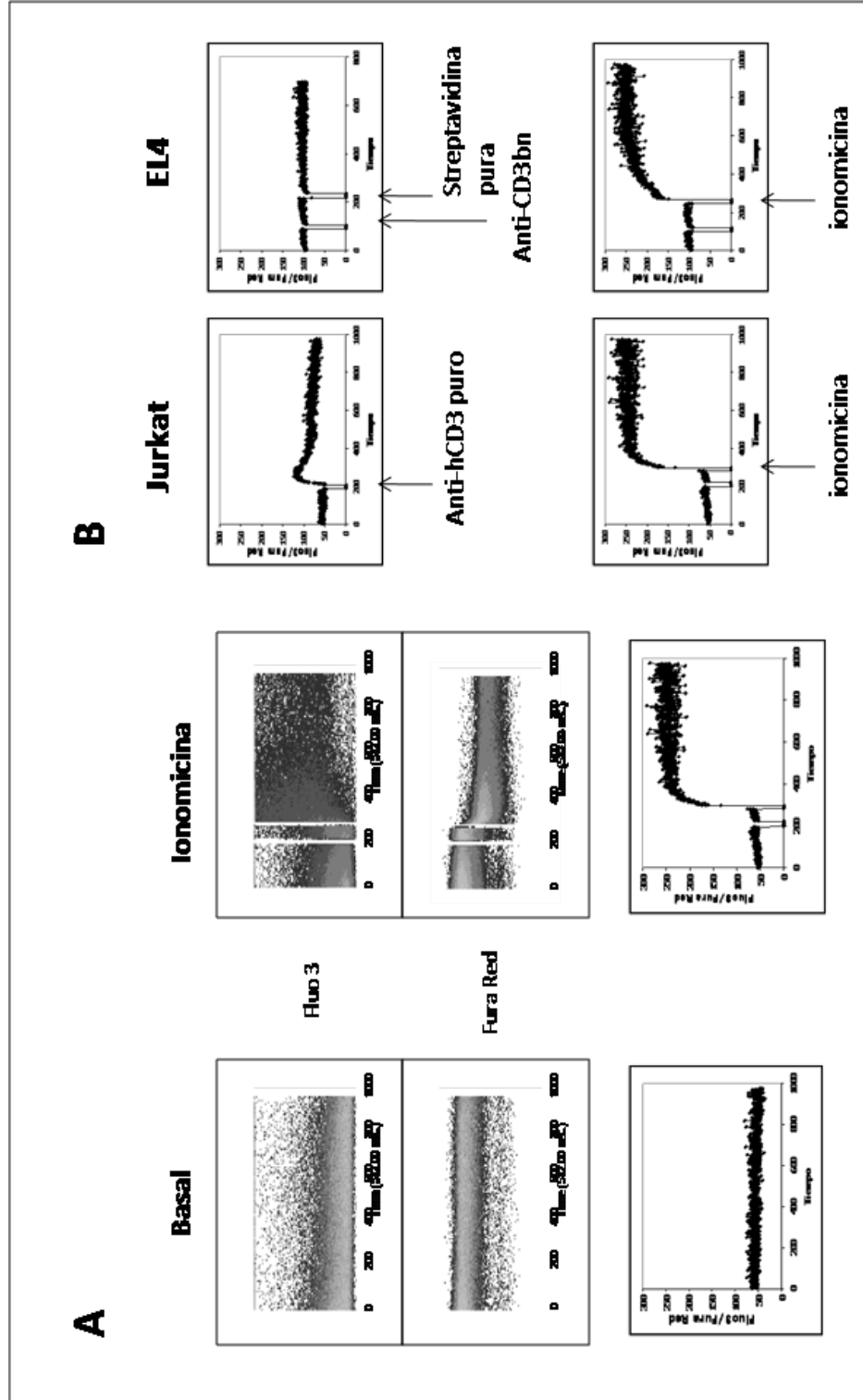


Figura 11. Flujo de calcio. (A) Las células teñidas con Fluo 3 y Fura Red simultáneamente mantienen una fluorescencia constante en el tiempo debida a un recambio basal de calcio. Asimismo, al aumentar la concentración de calcio en el citoplasma a través de la adición de ionomycin, la fluorescencia de Fluo 3 aumenta mientras que la del Fura Red disminuye. Esto se cuantifica a través de una gráfica del cociente Fluo3/Fura Red vs. tiempo. (B) La línea celular Jurkat, a diferencia de la línea EL4, tiene la capacidad de responder al estímulo a través de CD3.

El calcio medido en la línea celular Jurkat (Figura 11b) tras el estímulo con anti-hCD3 muestra un pico inicial (que corresponde a la salida de Ca^{2+} de las cisternas del retículo endoplásmico) el cual disminuye y se sostiene unos segundos indicando la entrada de calcio extracelular. Este flujo es muy inferior al inducido con ionomicina, que al inducir poros en la membrana refleja el máximo de calcio que se incorpora a la célula (proveniente del medio) y sirve como evidencia de que la línea celular incorpora los fluoróforos Fluo3 y FuraRed sin problema. En el caso de la línea celular EL4, no se logró observar flujo de calcio a través de la estimulación de las células con anti-CD3 murino (Figura 11b), aunque el control de ionomicina funcionó de la misma manera que en Jurkat en todos los experimentos. Esto sugiere que el estímulo a través de CD3 en la línea celular EL4 no es capaz de desencadenar una respuesta de flujo de calcio que sea observable a través de este método. Este resultado es inesperado debido a un antecedente proveniente del grupo de investigación, en el cual se utilizó previamente esta línea celular, en el cual sí se observó un flujo de calcio bajo (parecido al observado en la línea celular Jurkat), a través del estímulo con anti-CD3 biotinilado y streptavidina pura, utilizando el mismo protocolo de tinción, estímulo y medición del flujo de calcio aquí descritos (resultados no publicados).

Asimismo, se estimularon las clonas estables EL4-CD3 ϵ y EL4-CD4 con anti-CD3, anti-CD2, AP20187 1 μM y ionomicina. Estos estímulos tampoco fueron capaces de inducir un flujo de calcio detectable por medio de este método (resultados no mostrados). Dado que el estímulo a través de CD3 es nuestro control de activación, es posible que se requiera un método más sensible para esta detección que nos permita discernir si el entrecruzamiento de las quimeras puede inducir o no flujo de calcio.

7.1.3. Fosforilación de Zap-70

La fosforilación de las dos tirosinas que componen los motivos ITAM sirve de sitio de anclaje de la cinasa Zap-70. Si el entrecruzamiento de la proteína recombinante CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 es capaz de activar la vía de señalización del TCR, como resultado de la fosforilación de su ITAM, se podría esperar que uno de los resultados inmediatos del entrecruzamiento sea el reclutamiento y la fosforilación de Zap70. La fosforilación de esta cinasa fue determinada por medio de citometría de flujo, utilizando un anticuerpo que reconoce el epítoto fosforilado de Zap-70 directamente acoplado a ALEXA-647. La línea celular EL4-CD3 ϵ fue estimulada con anti-CD3, anti-hCD2 y AP20187 y posteriormente, las células fueron permeabilizadas para permitir la entrada del anticuerpo directamente marcado. El aumento en la intensidad media de fluorescencia (corrimiento del histograma hacia la derecha) indica un incremento en la fosforilación de esta molécula (Figura 12).

En todas las líneas celulares se observa un incremento de la fosforilación de Zap-70 como resultado de la activación de CD3 en comparación con el basal, lo cual indica que las células son competentes. Las concentraciones de anti-CD3 y anti-hCD2 de 10 μ g/mL utilizadas en los ensayos de activación fueron determinadas como óptimas previamente en el laboratorio. Para determinar la concentración de AP20187 se realizaron pruebas con las concentraciones 0.1 y 1 μ M de droga, a partir de lo cual se eligió la concentración de 0.1 μ M como óptima. Posteriormente se realizó un ensayo de activación con diferentes tiempos de estímulo: 1, 2, 3, 5 y 10 minutos para anti-CD3, anti-hCD2 y AP20187 0.1 μ M. A partir de estos ensayos se determinó que el tiempo de estímulo óptimo para fosforilar Zap-70 a través de todos los estímulos es de 3 minutos, por lo que los resultados mostrados en la Figura 12 corresponden a las condiciones de estímulo: 3min a 37°C con

10µg/mL de anti-CD3 y anti-hCD2 y 0.1µM de AP20187. Como control de especificidad, se utilizó la línea celular EL4 no transfectada, la cual no responde ante al estímulo a través de hCD2, ni tras la adición de la droga AP20187 (Figura 12). Esto indica que la fosforilación de Zap-70 como resultado de la estimulación con anti-hCD2 y AP20187 0.1µM es específica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 ó CD2 CD4 FKBP-12 x 2 respectivamente.

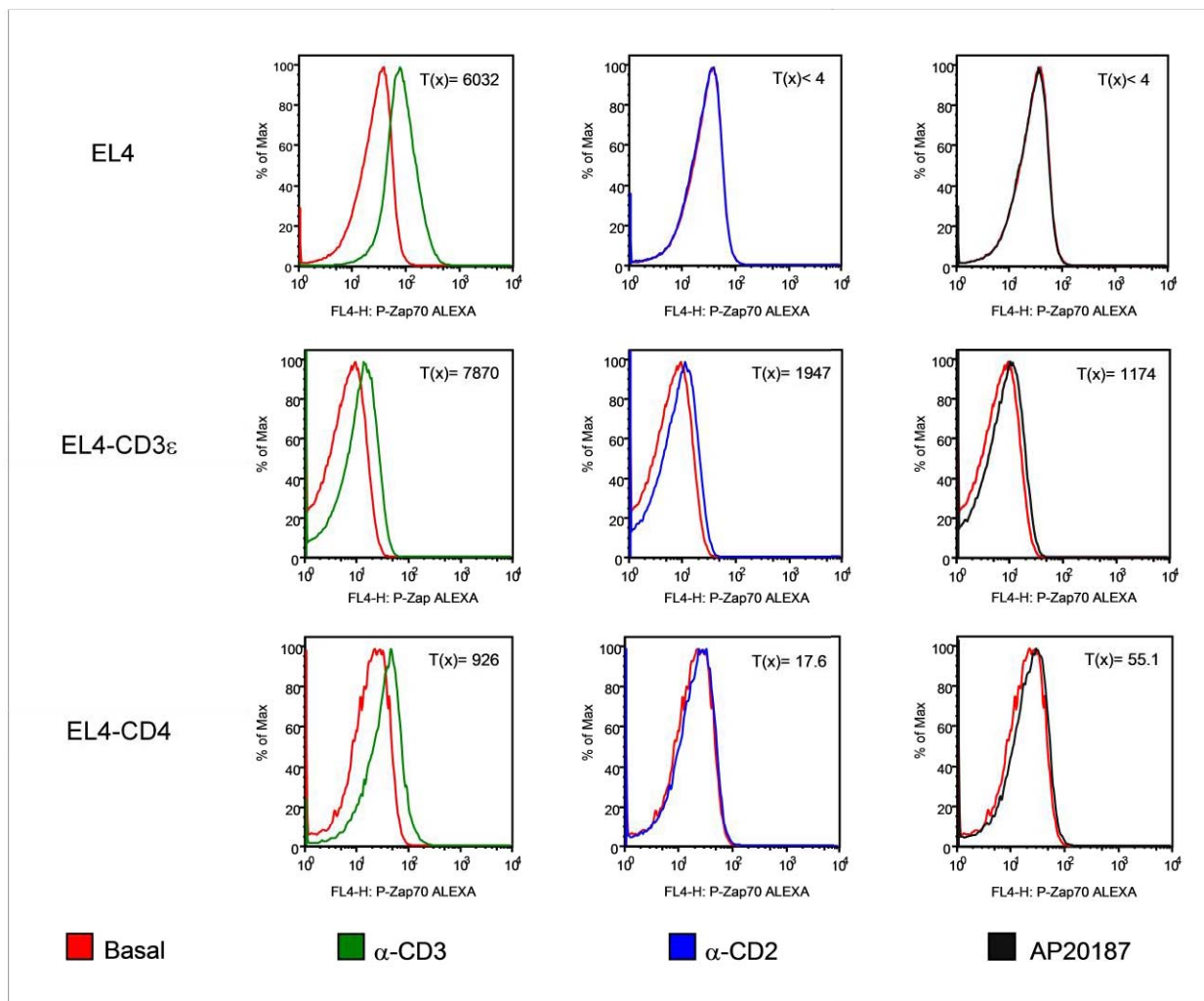


Figura 12. Fosforilación de Zap-70. La fosforilación de Zap-70 como respuesta a diferentes estímulos fue medida por medio de citometría de flujo tras una tinción intracelular. La intensidad de fluorescencia se mide de acuerdo a la fluorescencia media de los histogramas, por lo tanto un

mayor número de moléculas fosforiladas se relaciona con una mayor fluorescencia media. Los histogramas son representativos de cuatro experimentos.

En la Figura 12 se muestra el valor de $T(x)$, una prueba estadística de chi-cuadrada que se calcula utilizando el programa de análisis para citometría de flujo Flowjo. Esta prueba compara dos poblaciones y determina si son estadísticamente diferentes. La prueba se interpreta de la siguiente forma: una $T(x) < 4$ significa que dos poblaciones son iguales, mientras que una $T(x)$ mayor o igual a 4 refleja que dos poblaciones son estadísticamente diferentes a $p < 0.01$ (99% de confianza). Esta prueba permite medir si hay un corrimiento de las curvas basal y estímulo. Este parámetro es útil pues pone de manifiesto la significancia de un corrimiento muy bajo de las curvas. En el experimento representativo mostrado en la Figura 12 se observa que las únicas condiciones que no muestran una diferencia significativa entre el basal y el estímulo ($T < 4$) son: anti-hCD2 y AP20187 en la línea celular EL4.

Sin embargo, debido a la alta variabilidad encontrada entre los experimentos a diferentes días, el análisis de $T(x)$ no es suficiente para interpretar la significancia estadística de la fosforilación de Zap-70 (Figura 13A). Es por ello que se realizó una prueba estadística adicional T de student. Para homogenizar los datos, se calculó el incremento de la media de fluorescencia de cada estímulo con respecto a su basal. A partir de ellos se realizó la prueba estadística y se consideraron diferencias significativas entre el basal y el estímulo cuando $p < 0.05$ (Figura 13B).

En la línea celular EL4-CD3 ϵ , se observó que la fosforilación de Zap-70 como resultado del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 con anti-CD2 y AP20187 es mucho menor que el ocasionado a través del CD3, entrecruzado con anti-CD3 (17 y 10% del

originado con anti-CD3 respectivamente). Por otro lado, la fosforilación ocasionada con AP20187, aunque baja, es significativamente mayor al basal, mientras que la fosforilación de Zap70 en respuesta a CD2 no posee significancia estadística (n=4) (Figura 13B).

Por otro lado en la línea celular EL4-CD4, se observó que la fosforilación de Zap-70 al entrecruzar CD2 CD4 FKBP-12 x 2 por medio de anti-CD2 y AP20187 es muy bajo (2.6 y 3.4% con respecto al estímulo de CD3), lo cual se refleja en un corrimiento mínimo de las curvas (Figura 12), a excepción de un ensayo (Figura 13B). Esto indica que bajo las condiciones utilizadas, no se observa una fosforilación significativa de Zap-70 como resultado del entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2.

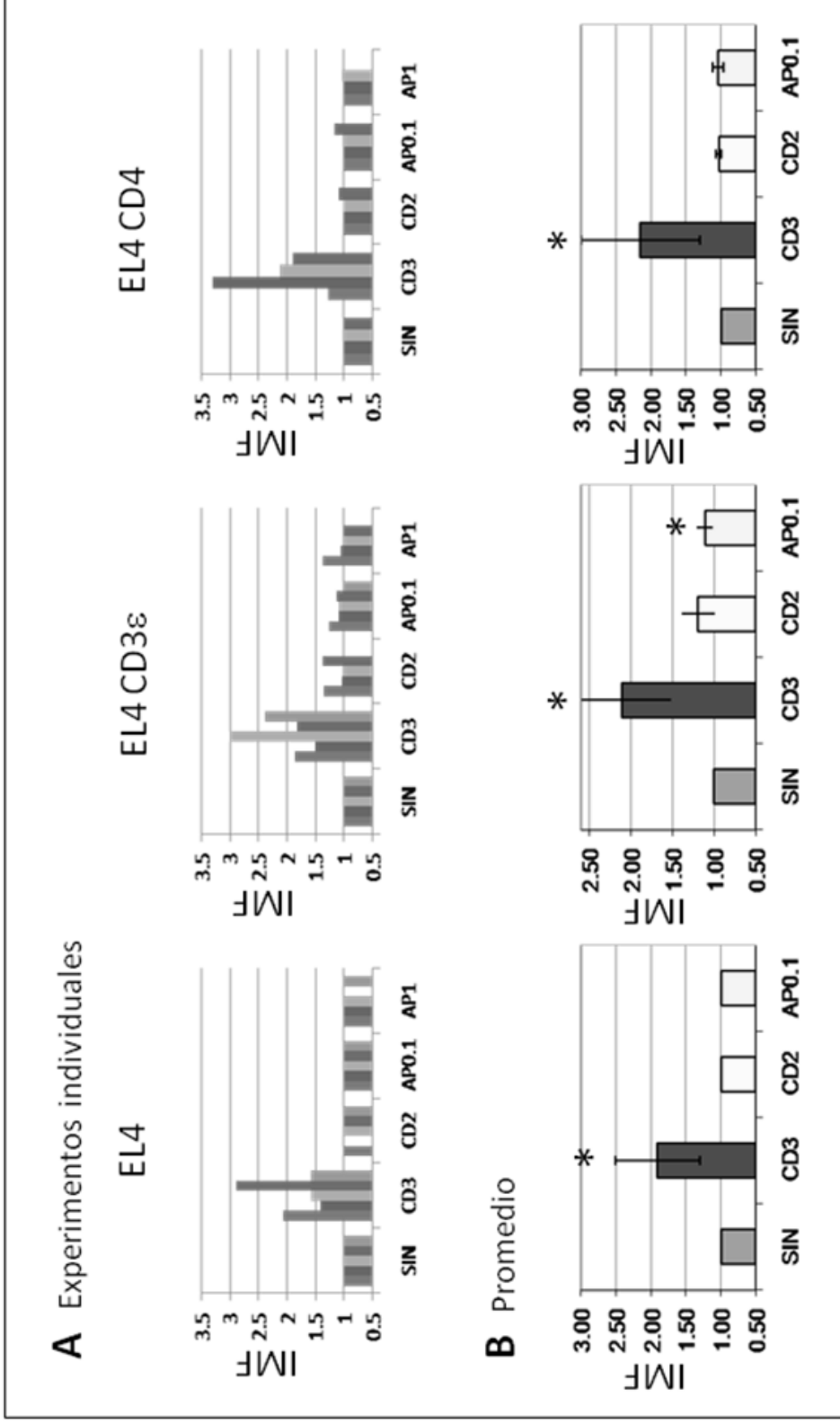


Figura 13. Fosforilación de Zap-70. (A) Experimentos individuales. Las gráficas representan el incremento de la media de fluorescencia (IMF) de cada estímulo con respecto al basal (SIN), al que se le otorgó el valor de 1. (B) Promedio del incremento medio de fluorescencia. Los incrementos fueron calculados comparando la media de fluorescencia del basal con los estímulos. Las barras representan la desviación estándar y los asteriscos los datos significativamente mayores al basal ($p=0.05$) determinados con una prueba de t de student ($n=5$).

7.1.4. Fosforilación de Erk1/2

La fosforilación de Erk1/2 es un evento río abajo en la activación del TCR y característico de la activación de la cascada de las MAP-quinasas que conduce a la activación de factores de transcripción. Como se muestra en la Figura 14, la activación del TCR-CD3 por medio de anti-CD3 induce la fosforilación de Erk1/2 tanto en la línea celular EL4 como en EL4-CD3 ϵ y EL4-CD4, aunque la fosforilación de Erk1/2 en la línea EL4 parental es mayor a la de las líneas transfectantes. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 14, el entrecruzamiento de hCD2 induce una ligera fosforilación en la línea parental, lo cual refleja cierta fosforilación inespecífica, dado que la molécula CD2 humana no está expresada en esta línea. Sin embargo, esta fosforilación es menor que la inducida en las líneas estables (Figura 15A).

De manera general, se observa que los estímulos con anti-hCD2 y AP20187 inducen un corrimiento en todos los experimentos realizados en las líneas celulares EL4-CD3 ϵ y EL4-CD4 (Figura 15A). Sin embargo, dada la gran variabilidad entre experimentos, el análisis estadístico de T de student muestra que el promedio de estos incrementos no es significativo con respecto al basal (Figura 15B).

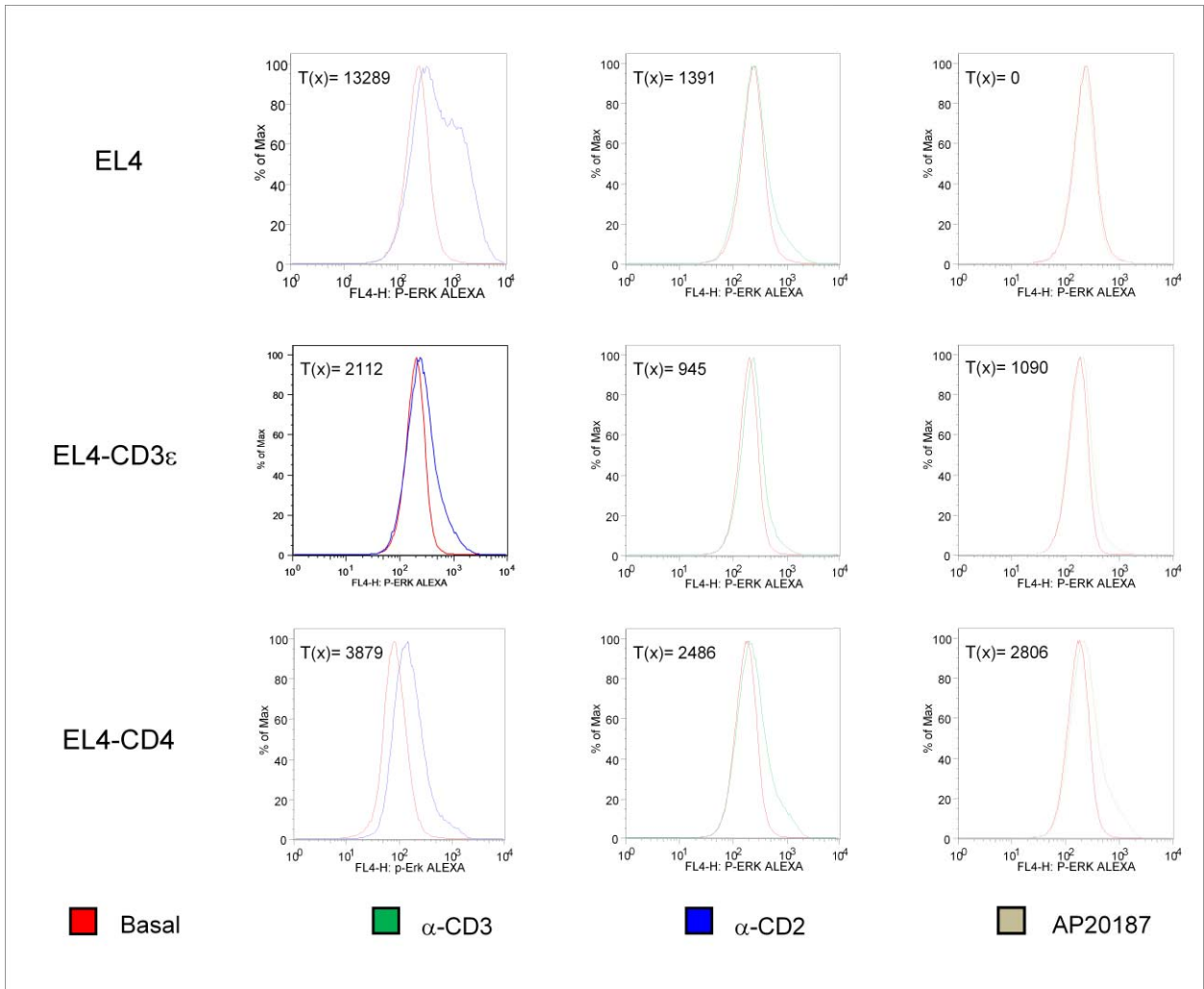


Figura 14. Fosforilación de Erk1/2. La fosforilación de las dos isoformas de Erk como respuesta a diferentes estímulos fue medida por medio de citometría de flujo tras una tinción intracelular. Figura representativa de cuatro experimentos con la misma tendencia.

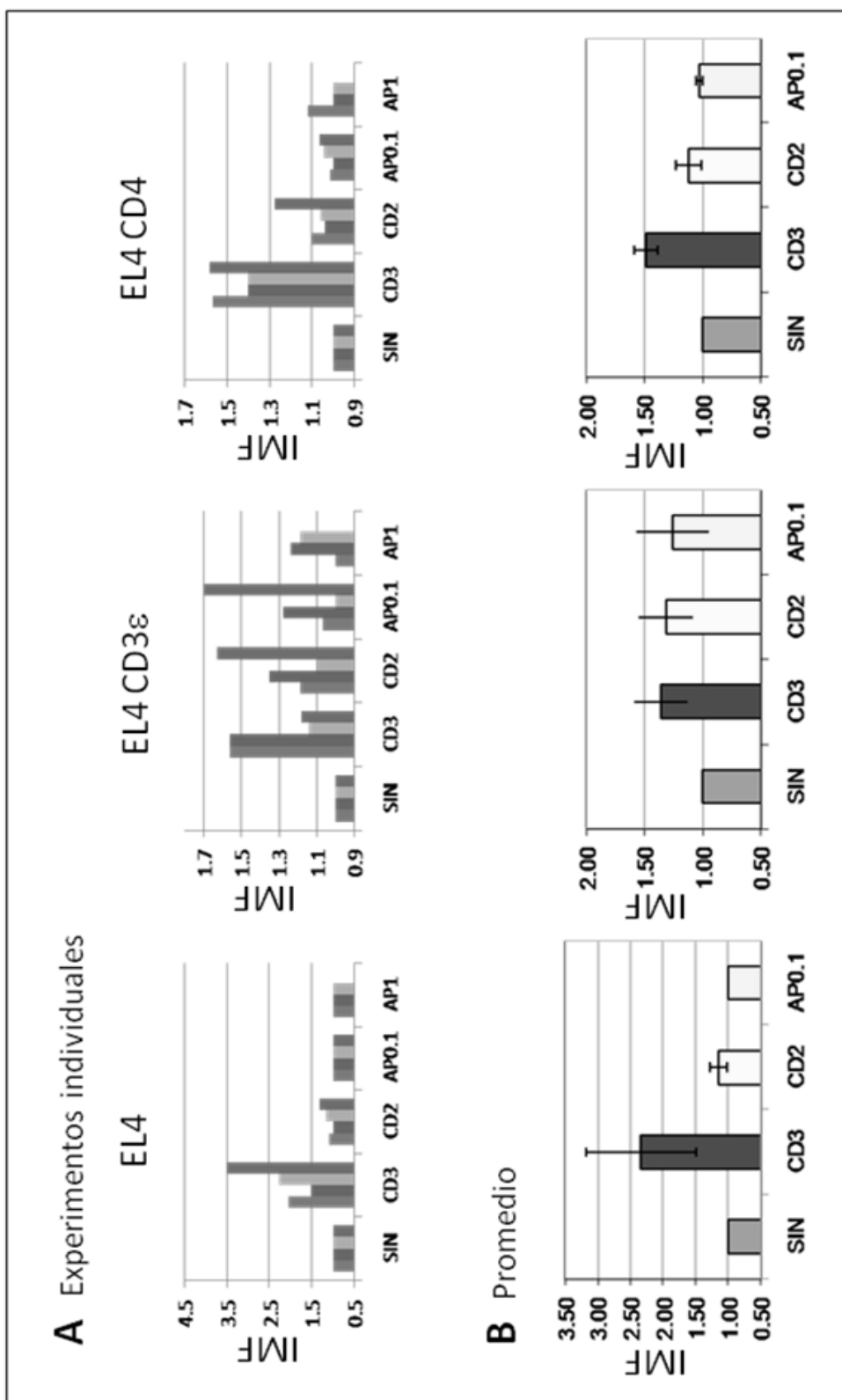


Figura 15. Fosforilación de Erk1/2. (A) Experimentos individuales. Las gráficas representan el incremento de la media de fluorescencia (IMF) de cada estímulo con respecto al basal (SIN), al que se le otorgó el valor de 1. (B) Promedio del incremento medio de fluorescencia. Los incrementos fueron calculados comparando la media de fluorescencia del basal con los estímulos. Las barras representan la desviación estándar y los asteriscos los datos significativamente mayores al basal ($p=0.05$) determinados con una prueba de t de student ($n=4$).

7.2. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en la elección del linaje

7.2.1. Desarrollo de timocitos en el sistema OP9-DL1

Un objetivo del presente trabajo es investigar si las señales generadas a través de la cadena CD3 ϵ y/o del co-receptor CD4 son capaces de inducir distintos procesos de diferenciación de los timocitos. Recientemente se ha descrito un sistema experimental de diferenciación de los timocitos *in vitro*, desarrollado por Zúñiga-Pflücker y colaboradores (Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2006). Este sistema de desarrollo consiste en co-cultivar progenitores linfoides con la línea estromal derivada de médula ósea OP9, transfectada con el ligando de Notch, Delta1. Se ha demostrado que Delta1 es necesario para el compromiso de los progenitores linfoides hacia el linaje de linfocitos T. Este sistema de desarrollo ha sido muy bien caracterizado para el desarrollo de linfocitos T a partir de médula ósea e hígado fetal. Debido a esto, en este trabajo se intentó reproducir este desarrollo *in vitro*. Sin embargo, dado que existe la posibilidad de que los timocitos en estadio DN se desarrollen a DP en un tiempo menor de cultivo, se decidió probar este sistema tomando como células iniciales timocitos extraídos de timo fetal de día 14 de desarrollo, los cuales se encuentran en estadio DN.

Para validar el desarrollo de progenitores linfoides y timocitos DN en el sistema OP9-DL1 se llevaron a cabo cinéticas de desarrollo. En el caso de los progenitores derivados de médula ósea e hígado fetal sólo se obtuvieron resultados preliminares de desarrollo en los

cuales se observó que las células que se desarrollan en la línea celular OP9 transfectada con el vector MIG vacío (OP9-MIG) proliferan a días más tempranos que las que se co-cultivan con OP9-DL1 (resultados no mostrados). El protocolo de desarrollo indica que al día 7 de co-cultivo de progenitores con células OP9-DL1 se pueden encontrar en el cultivo timocitos en estadio DN3 (CD44⁺, CD25⁻). Sin embargo, en resultados preliminares obtenidos a partir de progenitores linfoides no se pudo observar una población claramente definida que fuera TCRβ high (marcador utilizado para linaje T). Uno de los problemas con los que este sistema cuenta es la supervivencia de las células más allá del día 5 de co-cultivo, ya que a partir del día 4 comienza a haber muchas células muertas tanto por parte de las progenitoras que van en desarrollo, como de las células OP9 que se desprenden de la monocapa.

Por otro lado, el desarrollo de timocitos DN co-cultivados con células OP9-DL1 presentó varias ventajas sobre el desarrollo de progenitores: la obtención de las células es más sencilla y requiere de menor manipulación y los timocitos llegan al estadio DP al cabo de dos días de co-cultivo (Figura 16). Los timocitos se pueden desarrollar eficientemente hasta el estadio DP e incluso se observó que en el cultivo se pueden generar células simples positivas, aunque en un bajo porcentaje (Figura 16). En la Figura 16 se puede observar la tinción de los timocitos desarrollados *in vitro* con los marcadores CD4 y CD8 para identificar las poblaciones DN (cuadro inferior izquierdo), DP (cuadro superior derecho), CD4 SP (cuadro superior izquierdo) y CD8 SP (cuadro inferior derecho). Se puede observar que durante los días 2 y 4 de co-cultivo la proporción de células DP no varía mucho (Figuras 16 y 17) y a partir del día 5 de co-cultivo se empieza a observar una disminución en el número de células vivas en el cultivo y un aumento de células muertas. Esto último podría influir en el aumento del porcentaje de células dobles negativas en el día 5 de co-cultivo (Figura 16) debido a que el tamaño de algunos fragmentos celulares

provenientes de las células OP9-DL1 coincide con el tamaño de los timocitos. Esto fue confirmado midiendo células OP9-DL1 control, que fueron cultivadas a la par del co-cultivo pero sin timocitos (resultados no mostrados).

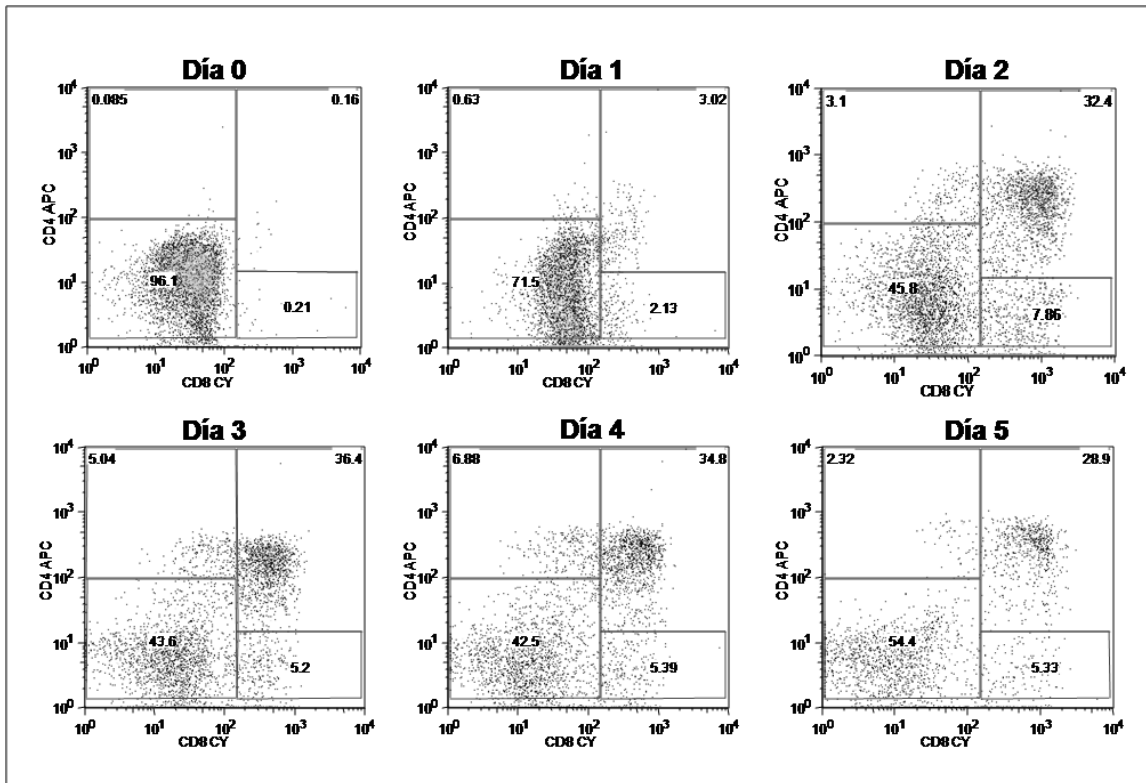


Figura 16. Desarrollo de timocitos en el sistema de desarrollo OP9-DL1. Los timocitos fueron recuperados del co-cultivo con OP9-DL1 y teñidos para los marcadores de superficie CD4 y CD8 para identificar las subpoblaciones DN, DP y SP. Las células extraídas de timo fetal al día 14 de desarrollo son capaces de madurar hacia el estadio DP al cabo de dos días de co-cultivo con la línea celular OP9-DL1. El porcentaje de DP no se incrementa de manera importante entre los días 2 y 5.

Debido a que ya se ha corroborado anteriormente en el laboratorio que los timocitos fetales se pueden infectar y expresar proteínas recombinantes y que su desarrollo en el sistema OP9-DL1 produce células DP en buena proporción, se decidió utilizar este

sistema para observar el resultado fenotípico de la activación de las proteínas recombinantes.

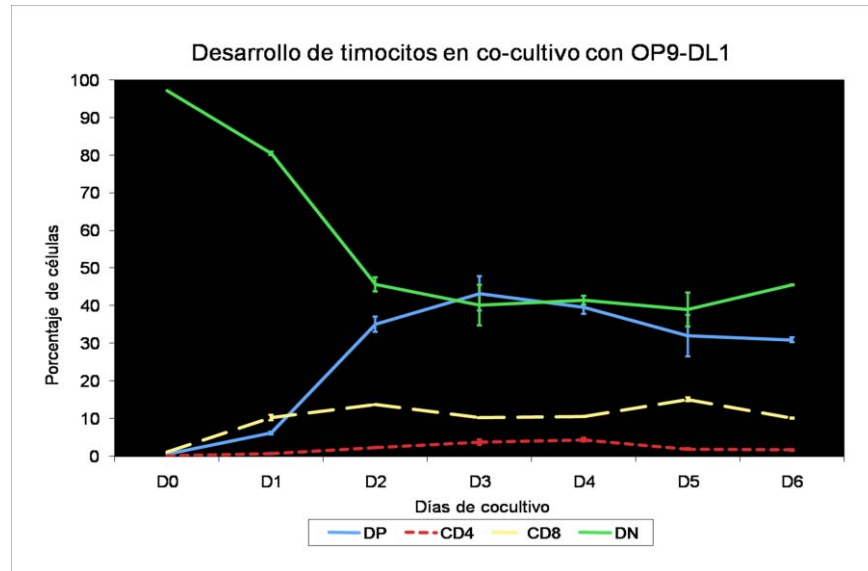


Figura 17. Cinética de desarrollo de timocitos fetales. La mayoría de las células extraídas de timo fetal se encuentran en estadio DN. Al estar varios días en cultivo disminuye esta población DN mientras que aumenta la población de DP y CD8 SP. Al segundo día de cultivo hay un aumento importante de células DP, población que se mantiene constante durante los 3 días de co-cultivo posteriores.

7.2.2. Expresión de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en timocitos

Los vectores de expresión en eucariotas MIG que poseen los genes de las proteínas quiméricas fueron creados previamente en el laboratorio. Estos vectores fueron utilizados para crear sobrenadantes virales por medio de la utilización de la línea celular derivada de fibroblastos de riñón 293. El vector de expresión retroviral MIG posee insertada la

secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) de manera bicistónica, por lo que la expresión de las proteínas quiméricas se relaciona con la expresión de GFP. Para evaluar la eficiencia de la infección se puede medir la intensidad de fluorescencia de GFP por citometría de flujo (Figura 19A). La línea celular 3T3 se utiliza para este fin debido a que es susceptible a la infección por los retrovirus generados. En la Figura 20A se observa que la eficiencia de infección de los retrovirus generados fue del 83.72% para CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y 63.5% para CD2 CD4 FKBP-12 x 2, las cuales expresan altos niveles de GFP. Estos resultados son representativos de 4 experimentos. Una vez que se corroboró que los plásmidos tienen un alto porcentaje de infección en células 3T3 se procedió a la infección de timocitos fetales. Debido a que los timocitos necesitan de un ambiente propicio para su supervivencia, los timocitos infectados fueron colocados sobre la monocapa de OP9-DL1 después de su infección. Las células OP9-DL1 son a su vez transfectantes estables de MIG, por lo cual también expresan la proteína GFP. Esto presentó un reto al establecer el porcentaje de infección de los timocitos. La estrategia utilizada para el análisis de timocitos fue la exclusión de las células por tamaño.

Las células OP9-DL1 son de mucho mayor tamaño que los timocitos y aparecen hacia la izquierda en una gráfica de Forward vs. Side scatter mientras que los timocitos forman una población homogénea hacia la derecha (Figura 19B columna izquierda). La gráfica de intensidad de fluorescencia de GFP vs. CD2 se hace con los datos de la región de timocitos. En esta gráfica se escoge la región que excluye células OP9-DL1 y timocitos sin infectar. En esta última región se incluyen los timocitos que fueron infectados eficientemente (expresan GFP) y que a su vez expresan las proteínas CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 ó CD2 CD4 FKBP-12 x 2 (Figura 19B columna media). El porcentaje de timocitos que expresan GFP es bajo (menor al 1%). A partir de esta región se puede medir el número de células DP, DN y SP.

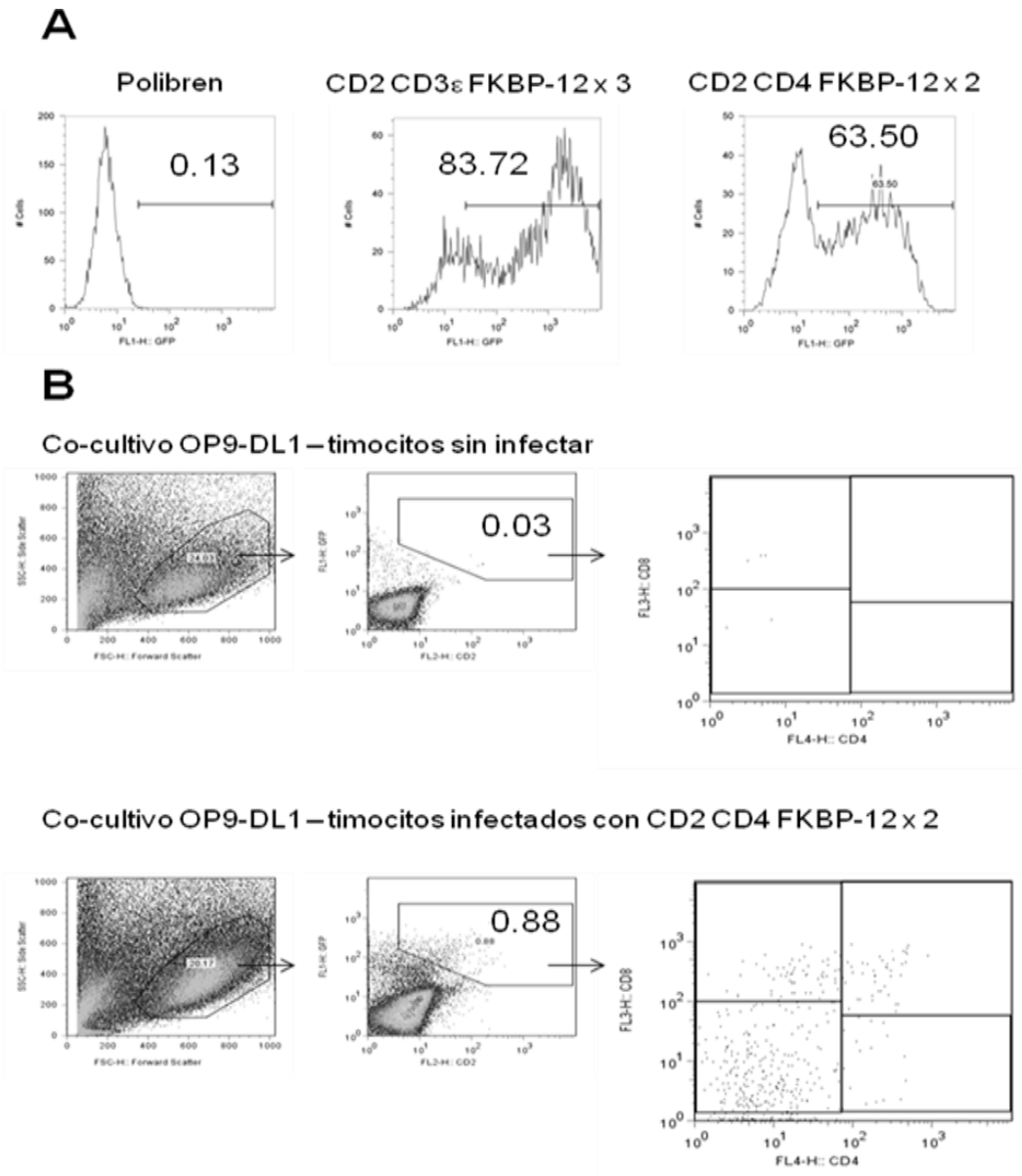


FIGURA 19. Análisis de la infección de timocitos. (A) Expresión de GFP en células 3T3. Las células 3T3 se infectan fácilmente, por lo que se utilizan para medir la eficiencia de infección de los vectores. (B) Timocitos recuperados al segundo día de co-cultivo fueron teñidos para identificar CD2, CD4 y CD8. El análisis de las células infectadas se realiza en la región de timocitos (primera columna) a partir de la cual se selecciona una subregión GFP-CD2 doble positiva (segunda columna). A partir de esta subregión se realiza la identificación de los marcadores CD4 y CD8 (tercera columna), la cual pertenece a los timocitos infectados que expresan la proteína quimérica CD2 CD4 FKBP-12 x 2.

Los timocitos fueron co-cultivados con las células OP9-DL1 para observar si la infección con los vectores retrovirales afecta su desarrollo. A partir de los resultados obtenidos se confirmó que en el cultivo aparecen células dobles positivas, que además expresan hCD2 en su superficie desde el día 2 de co-cultivo. Por otro lado, se observó que una infección muy eficiente en la línea celular 3T3 (de alrededor del 85%) resulta en una expresión muy baja de GFP y CD2 en timocitos (de menos del 1%) (Figura 19).

7.2.3. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en el desarrollo de los timocitos en la monocapa de OP9-DL1

De acuerdo con los resultados obtenidos, los timocitos infectados con los vectores retrovirales se desarrollan a DP desde el día 2 de co-cultivo y expresan hCD2. Para corroborar si el entrecruzamiento de las quimeras altera la maduración de los timocitos, se adicionó AP20187 0.1 μ M al primer día de co-cultivo (24h después de la infección). Como análisis preliminar, se mantuvo a los timocitos en co-cultivo con AP20187 durante 24 y 48 horas. Al término de este tiempo se recuperaron los timocitos del cultivo y se tiñeron para realizar el mismo análisis de la Figura 19B.

Analizando la proporción de linfocitos DP, DN y SP a partir de la región de timocitos (Figura 20A), se observa que no hay diferencias entre las células tratadas con AP20187 y las no tratadas para el caso de las células no infectadas (pero a las cuales se les adicionó polibrene). Este efecto es importante ya que nos indica que la droga no actúa de

manera inespecífica alterando el desarrollo de los timocitos. A este nivel de análisis tampoco se encontró diferencia entre las células infectadas con CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 ó CD2 CD4 FKBP-12 x 2 (Figura 21).

El análisis realizado en la subregión GFP-CD2h doble positiva sólo se puede realizar en las células infectadas con las proteínas quiméricas. Debido a que la infección de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 es muy baja (aproximadamente 0.2%) no existe un número de eventos suficiente para poder analizar el efecto de la droga sobre los timocitos cultivados (Figura 20B arriba). Sin embargo, sí se puede observar que la transfección con CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 no frena el desarrollo de los timocitos, ya que sí se observan poblaciones DP y SP tanto CD4 y CD8 en el cultivo (a las 48 horas de cultivo). Este resultado es alentador, debido a que sugiere que este sistema permitirá analizar el desarrollo de los timocitos después del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 con AP20187, cuando se logre obtener un número mayor de células GFP-hCD2 positivas tras la infección.

Por otro lado, la infección de timocitos con CD2 CD4 FKBP-12 x 2 es de alrededor de 1.5% de la población total de timocitos (Figura 20B abajo). Esto indica que la infección con CD2 CD4 FKBP-12 x 2 es más eficiente que la de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 en timocitos fetales.

En la figura 22A se observa que no existe diferencia en la población CD8 SP entre las células tratadas con AP20187 y las no tratadas; mientras que hay un ligero aumento en las poblaciones DN y SP, acompañado de una disminución del porcentaje de células CD4 SP. El número de células analizadas en este experimento es bajo, sin embargo fue realizado por triplicado y los datos obtenidos son suficientes para observar una diferencia

significativa a $\alpha=0.05$ (determinado a través de una prueba de t de student) entre las poblaciones CD4, DN y DP (Figura 22B).

Esto indica que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 con la droga AP20187 induce una disminución de las células CD4 SP. Debido a que no hay influjo de nuevas células al co-cultivo, esta disminución podría ser debida a un arresto de los timocitos en el estadio DP resultado de la activación de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 con la droga, lo cual se confirma con un mayor porcentaje de esta población con respecto a las células no tratadas.

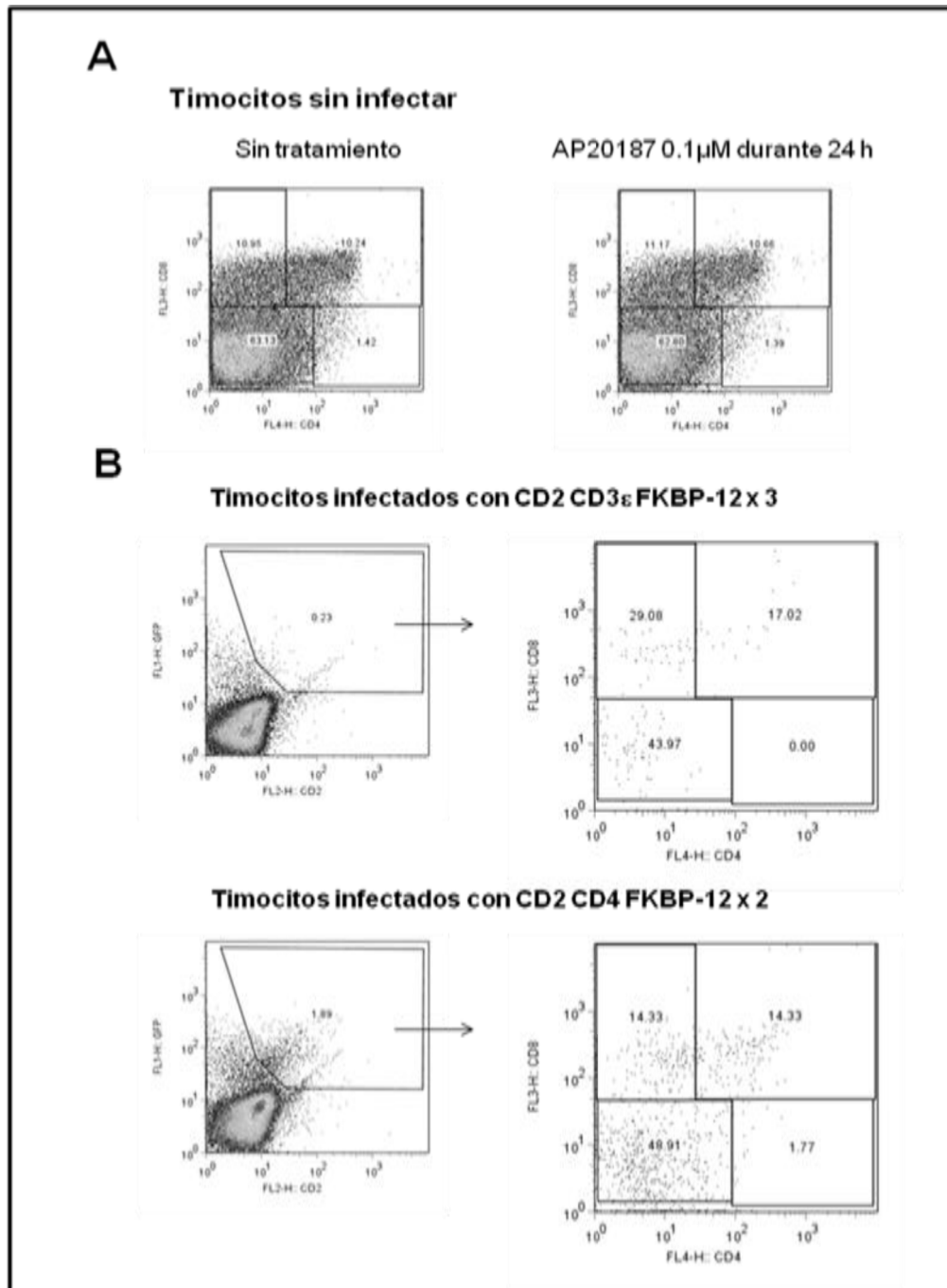


Figura 20. Co-cultivo de OP9-DL1 con timocitos estimulados con AP20187. Todas las gráficas son representativas de tres experimentos. (A) Timocitos no infectados de dos días de co-cultivo sin y con AP20187 0.1 μ M. Estas células fueron analizadas en la región de timocitos. (B) Porcentaje de infección de timocitos con CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 (izquierda arriba) y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 (izquierda abajo). Análisis de la subregión GFP-CD2 doble positiva (derecha).

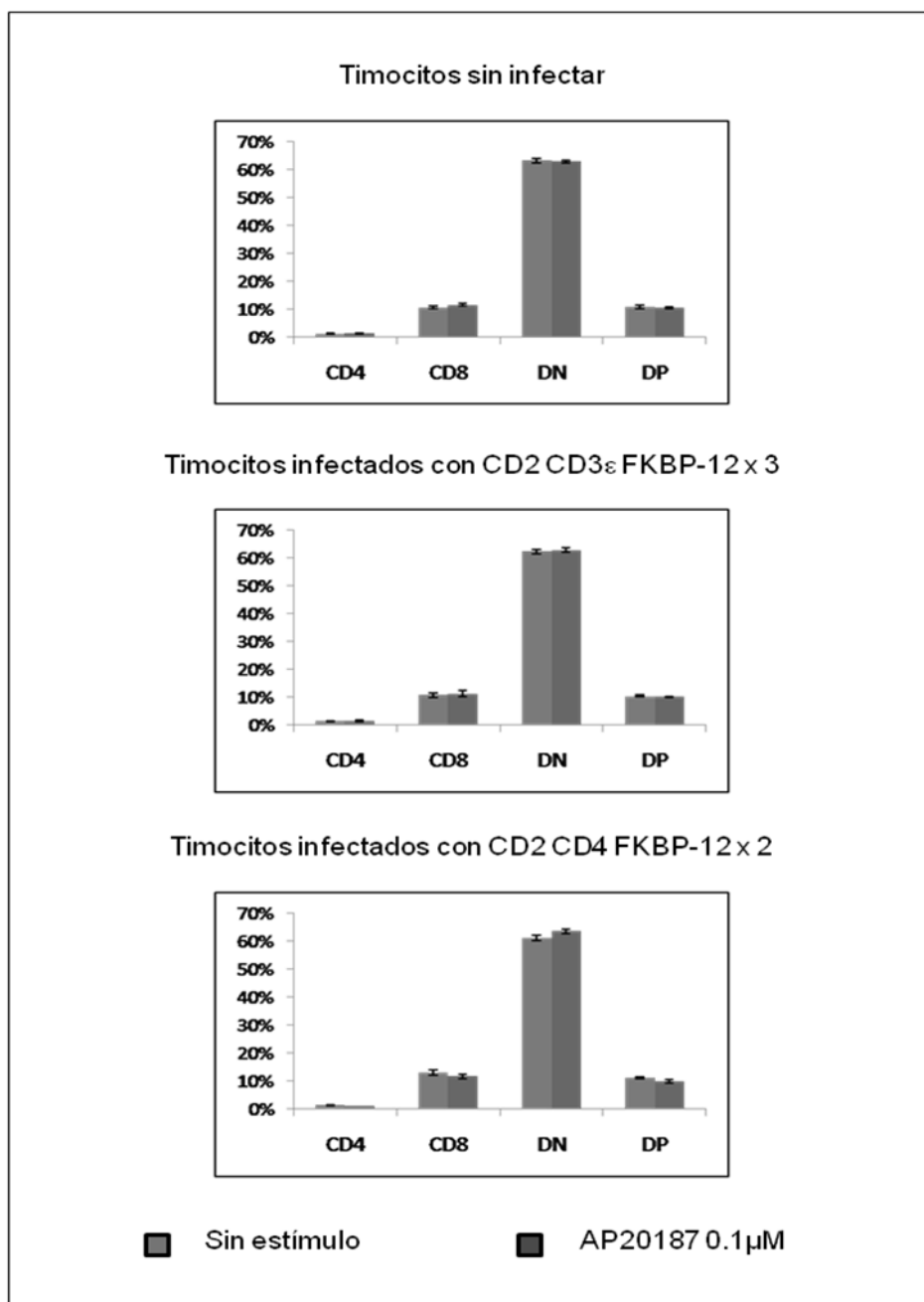


Figura 21. Porcentaje de las subpoblaciones timocitos al segundo día de co-cultivo con OP9-DL1. Los timocitos fueron incubados con y sin AP20187 0.1µM durante 24 horas. Las células fueron teñidas para CD2, CD4 y CD8 y analizadas de la región de timocitos. No se encontraron diferencias significativas a $p=0.05$ (con una prueba de t de student); las barras muestran el error estándar de tres experimentos.

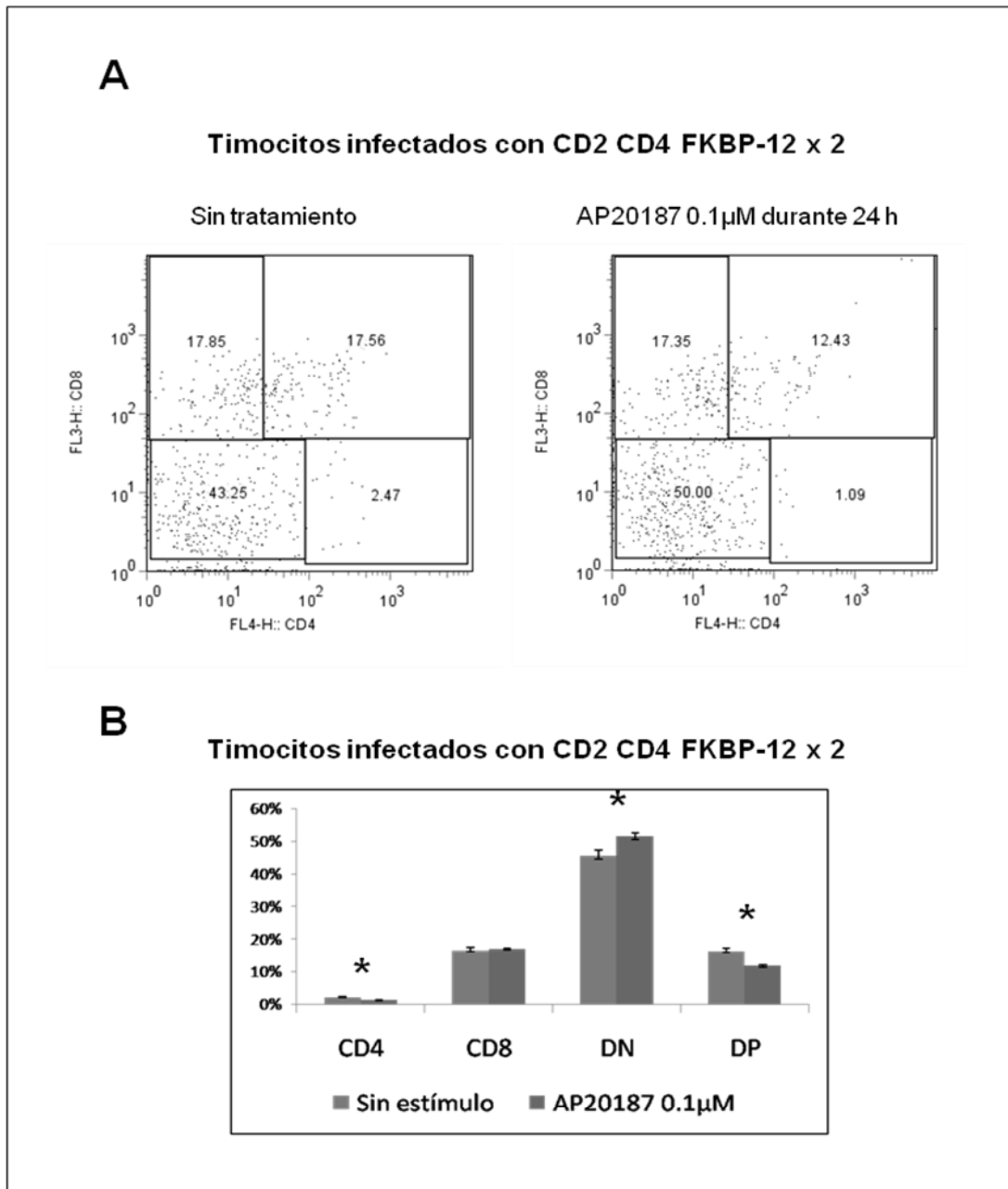


Figura 22. Timocitos infectados con CD2 CD4 FKBP-12 x 2 de dos días de co-cultivo sin y con AP20187. (A) Los timocitos infectados con CD2 CD4 FKBP-12 x 2 fueron co-cultivados con células OP9-DL1 sin y con AP20187 0.1µM durante 24 horas. Las células fueron analizadas en la región GFP-CD2 doble positiva. (B) Promedio de los porcentajes de células en las subregiones. Los asteriscos señalan las diferencias significativas a $p=0.05$, entre las células sin estimular y las tratadas con AP29187 (utilizando una prueba de t de student). Las barras muestran el error estándar (n=3).

8. Discusión

8.1. *Evaluación funcional del entrecruzamiento de CD2 CD4 2FKBP-12 ó CD2 CD3 ϵ 3FKBP-12*

Se ha observado que la cadena CD3 ϵ es un componente muy importante para el desarrollo de los timocitos, de tal manera que su ausencia ocasiona que los timocitos se arresten en un estadio muy temprano del desarrollo (Malissen et al., 1993). Más aún, se ha observado que aún en ausencia de las cadenas de CD3 ζ , la activación de CD3 ϵ es suficiente para que los linfocitos pasen la selección beta (Love y Shores, 2000). Utilizando un sistema de dimerizadores, que permite entrecruzar de manera específica esta cadena, se observó que este entrecruzamiento resulta en la fosforilación de Zap-70. Esto nos indica que la señal inducida a través de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 con AP20187 es suficiente para inducir una fosforilación de Zap-70 mucho menor a la observada al entrecruzar el CD3 (5 veces menor), lo cual se correlaciona con la presencia de un solo ITAM en el receptor quimérico, aunque hay que considerar que no se conoce con certeza el número de proteínas recombinantes que se conglomeran al entrecruzar con AP20187.

Asimismo, como se puede observar en la figura 15A, el entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 también es capaz de promover la fosforilación de Erk 1/2 como resultado del entrecruzamiento con AP20187 y hCD2. En algunos de los experimentos esta fosforilación es incluso de intensidad similar a la inducida a través de CD3, por lo cual es posible que al aumentar el número de experimentos se obtenga un dato con significancia estadística.

En conjunto, estos resultados demuestran por primera vez que el entrecruzamiento específico de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 utilizando el sistema de dimerización química FKBP-12/AP20187, es capaz de ocasionar una respuesta funcional en las células.

Se podría especular que la fosforilación de Zap-70 es resultado de la fosforilación el ITAM presente en CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3. Sin embargo, el panorama para CD3 ϵ es más complejo que la simple activación de su ITAM. Se ha encontrado que CD3 ϵ posee un dominio que promueve endocitosis, el cual puede contribuir a la degradación del TCR y a la eliminación de complejos parcialmente expresados en la membrana (Barroto et al., 1999). Por lo tanto, se podría pensar que la baja activación de Zap70 observada en este trabajo provenga de la internalización de los oligómeros de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 como resultado de su entrecruzamiento.

Por otro lado, se ha observado que la activación de CD3 ϵ provoca un cambio conformacional que resulta en la exposición de un motivo rico en prolina (PRS) localizado en la porción citoplásmica (Pitcher y van Oers, 2003). Todavía es materia de debate si la fosforilación del ITAM de CD3 ϵ se da antes o después de este cambio conformacional. Es por ello que algunos grupos han propuesto que la exposición del motivo PRS permite la unión de Nck, lo cual podría ser un mecanismo modulador de la fosforilación de los ITAM de las diferentes cadenas del CD3 (Pitcher y van Oers, 2003) a través de la facilitación de la unión de cinasas de la familia Src (Kesti et al., 2007). Incluso, se ha demostrado que el motivo PRS participa en la fosforilación de los ITAM de CD3 ζ (Mingueneau et al., 2008). De manera contrastante, se ha encontrado que la unión de Nck a la porción intracelular de CD3 ϵ abarca la tirosina 166 del motivo ITAM de CD3 ϵ (Takeuchi et al., 2008), de manera

que disminuye la fosforilación de esta cadena y no permite el reclutamiento de Zap-70. Debido a que la proteína Nck recluta proteínas de rearreglo de citoesqueleto, se propone que también podría estar relacionado con la internalización del TCR y su degradación a través del reclutamiento de SLAP y c-Cbl (Maltzman y Koretzky, 2008). Dado que la activación de Nck es insensible a estímulos por superantígenos (Tekeuchi et al., 2008), se ha propuesto que este mecanismo de internalización del TCR forma parte de un mecanismo de control ante la activación errónea de timocitos hacia estímulos de baja avidéz (Takeuchi et al., 2008; Mingueneau et al., 2008). Debido a las diversas funciones atribuidas al motivo PRS sería interesante estudiar su unión a CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3, en un sistema en el cual, alejado del resto del TCR, se podría estudiar su papel en la fosforilación del ITAM de CD3 ϵ y su papel en la internalización de esta cadena. Por lo pronto, el papel de Nck en la degradación del TCR concuerda con la baja fosforilación de Zap-70 observada como resultado del entrecruzamiento de la quimera.

Aunque a través de los resultados obtenidos en el presente trabajo no se analizó la activación de Lck como resultado del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3, es razonable suponer que esta molécula también se fosforile ya que las cinasas de la familia src (tales como Lck y Fyn) tienen un papel fundamental en la activación de Zap-70. Esto concuerda con reportes que indican que la activación de Lck es importante para el proceso de selección beta, en el cual se le ha atribuido una gran importancia a la cadena CD3 ϵ (Hashimoto et al., 1996).

Asimismo, se ha observado que la activación del TCR ocasiona su acercamiento a balsas lipídicas, donde se ha propuesto que se encuentra asociada la cinasa de la familia Src, Lck (Cherukuri et al., 2001). En general, se ha propuesto que el acercamiento de

proteínas a balsas lipídicas depende de su oligomerización, incluidos receptores del sistema inmune (Langlet et al., 2000), como es el caso de CD2. Se ha demostrado que la molécula CD2 humana es capaz de acercarse a estos motivos a través de su ectodominio, y de manera independiente al TCR, tras su entrecruzamiento con anticuerpos (Yang and Reinherz, 2001). Debido a que las quimeras se componen de la porción extracelular de CD2 humano, es posible que su oligomerización resulte en su asociación a balsas lipídicas. Esto podría promover su acercamiento a las proteínas de la cascada de señalización del TCR-CD3 asociadas a estos motivos como Lck, Fyn, LAT y PI3K (Cherukuri et al, 2001). De esta manera, es razonable pensar que CD2 CD3 ϵ FKBP-12 posea la capacidad de acercarse a sitios en el citoplasma ricos en Lck tras su oligomerización. Sin embargo, el inconveniente de estudiar este evento en la línea celular EL4 es que expresa el pre-TCR, el cual se ha propuesto está constitutivamente unido a balsas lipídicas y posee señalización autónoma (Yamasaki y Saito, 2007).

En conclusión, dada la diversidad de eventos descritos para CD3 ϵ , es posible que el entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 resulte en su acercamiento a balsas lipídicas, lo cual facilite la fosforilación de su ITAM, seguido de la iniciación de diversos eventos de señalización río abajo y, posiblemente, la endocitosis de los complejos.

En el caso de la proteína CD2 CD4 FKBP-12 x 2 se observa que no es capaz de desencadenar la fosforilación de Zap-70 (Figura 13 A y B). Sin embargo, sí se observa que en ocasiones el entrecruzamiento de esta cadena es capaz de inducir fosforilación de Erk1/2 como resultado del entrecruzamiento con hCD2 (Figura 15A). Dado que la conexión entre el co-receptor CD4 y el TCR tiene lugar a través de su reclutamiento a la sinapsis inmunológica durante el reconocimiento de la región β 2 de la molécula de MHC

Clase II, podría ser posible que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 tenga la capacidad de activar a la cinasa Lck, la cual se activa al asociarse al motivo intracitoplásmico de CD4, pero que esto no tenga como consecuencia su reclutamiento al TCR ni a su activación. De manera alternativa, es posible que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 no sea suficiente para iniciar una respuesta funcional por sí misma y requiera de la co-activación del TCR o de al menos una cadena del CD3.

Otro asunto por resolver es que, aunque se active Zap-70, sería importante analizar la fosforilación de otras moléculas río abajo como LAT o PLC γ , importantes para la maduración de los linfocitos T, para ver si la señal del TCR puede ser completada cuando se entrecruza la quimera de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 ó CD2 CD4 FKBP-12 x 2.

Interesantemente, este paso de validación del sistema nos indica que la proteína CD2 CD3 ϵ FKBP x 3 tiene la capacidad de inducir vías de señalización del TCR-CD3, lo cual es un indicativo de que se puede emplear este sistema para determinar la contribución de esta cadena en sistemas en los cuales se ha bloqueado el desarrollo de timocitos en diferentes etapas. El empleo de ratones deficientes de la cadena CD3 ζ , por ejemplo, podrían ser de utilidad para emplear este sistema, debido a que sus timocitos se arrestan en el estadio doble positivo. Es aquí cuando se podría obtener información valiosa de la contribución de esta cadena a la señal del TCR-CD3. De manera similar, la utilización de ratones deficientes para la molécula MHC Clase II, podría permitirnos evaluar la participación de esta cadena por sí sola en el proceso de elección de linaje CD4 versus CD8, que como es conocido, requiere de la interacción del TCR-Correceptor con el complejo péptido + MHC clase II.

En el estudio de la cadena CD3 ζ se observó que aunque su entrecruzamiento en células Jurkat fue capaz de inducir factores de transcripción como NFAT, su oligomerización en células primarias (ratones transgénicos) sólo fue capaz de inducir flujos de calcio transitorios pero no fue capaz de inducir la proliferación de linfocitos T o la diferenciación de timocitos en cultivos de timo fetal (Soldevila et al., 2001). La conclusión de dicho trabajo fue que eran necesarios otros componentes del complejo CD3 (tales como CD3 ϵ) o bien co-receptores (CD4 o CD8) para completar la señales que permiten la diferenciación de los linfocitos T *in vivo*. El conjunto de las señales generadas a través de las distintas cadenas podría ser el responsable de la diversidad de eventos que resultan del entrecruzamiento del TCR de manera que la combinación de la activación de diversos eventos es la que conforma el gradiente de señal que da paso a supervivencia, proliferación ó apoptosis.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la evaluación de las señales individuales producidas a través de las cadenas del CD3 y co-receptores. Con los resultados obtenidos, aún no se puede concluir acerca de la participación de estas cadenas en la señalización requerida para que se lleve a cabo cada uno de los eventos de diferenciación de los linfocitos T en el timo. Sin embargo una contribución importante de este trabajo es la comprobación de que el sistema de dimerizadores químicos, el cual es altamente específico y con uso potencial *in vivo*, es capaz de desencadenar eventos de señalización a través de componentes individuales del complejo TCR-CD3 así como del motivo citoplásmico del co-receptor CD4, por lo que puede ser utilizado para la posterior comparación de señales con otras cadenas del CD3 y co-receptores.

8.2. Evaluación fenotípica del entrecruzamiento de CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en la elección del linaje

En este trabajo se observó que el sistema de desarrollo OP9-DL1 tiene la capacidad de soportar el desarrollo de timocitos extraídos de timo fetal de 14 días de gestación. Esto supone la ventaja de que el tiempo de obtención de células en estadio DP es mucho menor que empleando células progenitoras de médula ósea o de hígado fetal como células de partida. Asimismo, este sistema experimental permite la manipulación de los timocitos sin que esto suponga un arresto en su maduración y permite la adición de factores que pueden modular el desarrollo de los timocitos como citocinas y en este caso, la adición de la droga. Asimismo, dado que las células OP9-DL1 son células estromales derivadas de médula ósea, carecen de la expresión de MHC Clase II, lo cual limita el desarrollo de células CD4 SP, lo que facilitará poner de manifiesto las células que se desarrollen hacia este linaje como resultado de la actividad de las proteínas recombinantes. Sin embargo, el sistema OP9-DL1 posee las desventajas, comparado con otros métodos como sería el cultivo de timo fetal (FTOC) o el cultivo de reagregación (Lehar y Bevan, 2002), de que no cuenta con todas las características que posee el timo para llevar a cabo la selección positiva y negativa, por lo tanto el repertorio seleccionado que logra desarrollarse a SP es muy limitado.

A pesar de la limitada capacidad de obtener células CD4⁺ en este sistema de desarrollo *in vitro*, se observa que se genera hasta un 6% de células CD4 simples positivas. A primera vista parece que esta generación es inesperada, sin embargo, se ha propuesto que durante el proceso de elección del linaje hay una población intermedia CD4⁺CD8⁻ que es

precursora tanto del linaje CD4 como CD8 (Erman et al., 2006). Es posible que las células CD4 simples positivas generadas en el cultivo pertenezcan a esta población intermedia, aunque se necesitaría corroborar cuál es su estado de maduración mediante la utilización de otros marcadores de superficie, tales como TCR o CD24. Alternativamente, podría ser posible que el sistema tenga cierta capacidad de generación de células CD4 SP de manera intrínseca: por ejemplo podrían generarse timocitos CD4+ pero restringidos a Clase I (Yin et al., 2007; Ling et al., 2007; Bosselut et al., 2003; Itano et al., 1996; Crump et al., 1993; Seong et al., 1992) o porque algunas células con expresión de MHC clase II provenientes del timo fetal se hayan introducido al co-cultivo junto con los timocitos.

Los datos preliminares obtenidos en el sistema de desarrollo *in vitro* muestran que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 induce un aumento en la población DN, el cual podría ser resultado del arresto de las células en este estadio del desarrollo o consecuencia de la proliferación de las mismas. Sin embargo, cualquiera que sea el caso, es difícil especular cuál es la significancia biológica de este evento, dado que las células en este estadio de maduración no poseen la expresión del co-receptor de manera natural. Es posible que al no estar capacitadas para recibir las señales iniciadas por este co-receptor, las células arreten su ciclo celular. Por otro lado, dado que se ha propuesto que la porción citoplásmica de CD4 posee un papel importante en la elección del linaje (Seong et al., 1992, Itano et al., 1996), parece extraño que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 haya ocasionado una disminución de la población CD4 SP. Sin embargo, estos experimentos implican que CD4 se asocia al complejo TCR/CD3 tras el reconocimiento de un péptido endógeno presentado por moléculas de MHC Clase II. Quizá se podría especular que la activación individual de CD4 por sí solo, recluta Lck fuera de la región donde se encuentra el preTCR, de manera que podría depletar parte

del Lck que es necesario para la señalización del preTCR y por eso se ve una reducción de DP y un acumulo de DN.

De manera alternativa, se ha postulado que la activación sostenida de Erk lleva a los timocitos hacia la selección negativa. Quizá se podría especular que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 (que se lleva a cabo colocando la droga AP20187 durante 24h) tenga como resultado la fosforilación de esta cinasa, lo cual favorezca la selección negativa, que se refleja en la disminución tanto de la población DP como de las CD4 SP. Dado que la droga estuvo en contacto con los timocitos 24 horas, sería interesante estudiar el efecto de una estimulación tan larga en la fosforilación de Erk1/2. Debido a que esta es la primera vez que se prueba la droga en este sistema, no se sabe cuáles son el tiempo ni la dosis óptima de estimulación. Por ello, se tiene la perspectiva de probar diferentes tiempos de estímulo y dosis de AP20187, así como el día de co-cultivo al cual se agrega la droga.

El hecho de que el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 con AP20187 disminuya la población CD4 SP, al menos bajo las condiciones utilizadas, sugiere que la señalización específica a través del co-receptor CD4 no posee una relación proceso de elección del linaje (aunque el análisis del entrecruzamiento específico de CD4 es novedoso, ya que anteriormente sólo se había estudiado en conjunto con el complejo CD3). El entrecruzamiento individual de CD4, aunque evidentemente es una situación poco probable que se de *in vivo*, nos serviría para evaluar si la activación por sí sola de Lck, y de las vías río abajo de esta cinasa, sin la participación de cadenas del complejo TCR/CD3 es capaz de inducir señales que permitan la diferenciación/selección de los timocitos. En un futuro se tiene contemplado evaluar la interacción de CD4 con la cadena epsilon del complejo CD3 mediante el entrecruzamiento de las dos quimeras CD2 CD3ε

FKBP-12 x 3 y CD2 CD4 FKBP-12 x 2, para evaluar la participación de ambas en la elección de linaje.

En el caso de la molécula CD2 CD3 ϵ FKBP-12 x 3 se tiene como perspectiva incrementar la eficiencia de infección de los sobrenadantes para poder obtener un mayor número de células para analizar. Asimismo, se plantea evaluar este modelo *in vivo* reconstituyendo la médula ósea de ratones deficientes de CD3 ζ (cuyos timocitos se arrestan en el estadio DP) y deficientes para MHC de Clase II (que carecen de CD4 SP) los cuales darán lugar a timocitos que expresan las moléculas recombinantes de CD3 ϵ o CD4, para observar si la señalización a través de CD3 ϵ y/o CD4 es capaz de rescatar estos fenotipos y permitir la maduración de los timocitos.

En resumen, este sistema de desarrollo *in vitro* es ideal para el estudio preliminar de la consecuencia del entrecruzamiento de las proteínas quiméricas durante el desarrollo ya que es manipulable, reproduce en cierta medida la maduración de los timocitos de manera fisiológica y se pueden obtener resultados en un tiempo corto. Esto facilita el acercamiento a un modelo *in vivo*, para el cual se tiene la perspectiva de infectar progenitores de médula ósea con las proteínas quiméricas y transferirlos intravenosamente para reconstituir a ratones letalmente irradiados. De esta manera se podrán analizar las alteraciones en el desarrollo de los timocitos como resultado del entrecruzamiento de las quimeras por la droga AP20187 administrada *in vivo*.

Finalmente, es importante mencionar que aunque el TCR es el punto central de la señalización durante el desarrollo de los timocitos, no se debe perder de vista que el ambiente del timo es complejo y que las señales que influyen en los procesos de

maduración de los timocitos también provienen de otros factores adheridos a membrana y solubles.

9. Conclusiones

- Se observó que la activación individual CD2 CD3 ϵ FKBP-12 induce la fosforilación de Zap70, lo cual demostró por primera vez que esta cadena posee la capacidad de iniciar una respuesta funcional en las células de manera independiente del complejo TCR-CD3. Sin embargo, no se logró observar si la activación independiente a través de CD3 ϵ o CD4 genera vías de señalización distintas la una de la otra.
- En este trabajo no se logró observar el papel de CD3 ϵ y CD4 en el proceso de elección del linaje CD4 y CD8, de manera que no se corroboró la hipótesis de que CD3 ϵ favorece la generación de células CD8 SP. Sin embargo, sí se obtuvieron resultados preliminares que muestran que, contrario a lo esperado, el entrecruzamiento de CD2 CD4 FKBP-12 x 2 en timocitos induce una disminución de la subpoblación CD4 positiva.

10. Referencias

- Abraham, K.M., Levin, S.D., Marth, J.D., Forbush, K.A., & Perlmutter, R.M. 1991. Delayed thymocyte development induced by augmented expression of p56lck. *J Exp Med*, 173: 1421-1432.
- Adachi, S., Kuwata, T., Miyaike, M., & Iwata, M. 2001. Induction of CCR7 expression in thymocytes requires both ERK signal and Ca(2+) signal. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 1188-1193.
- Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C., & Gascoigne, N.R. 1996. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature*, 381: 616-620.
- Alberola-Ila, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G., & Perlmutter, R.M. 1995. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature*, 373: 620-623.
- Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J., & Perlmutter, R.M. 1996. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med*, 184: 9-18.
- Alonso, C.L., Munoz, J.J., & Zapata, A.G. 2001. Delineation of intrathymic T, NK, and dendritic cell (DC) progenitors in fetal and adult rats: demonstration of a bipotent T/DC intermediate precursor. *J Immunol*, 167: 3635-3641.
- Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., & Flavell, R.A. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity*, 27: 89-99.
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., & Flavell, R.A. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, 117: 515-526.
- Avraham, A., Jung, S., Samuels, Y., Seger, R., & Ben-Neriah, Y. 1998. Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 28: 2320-2330.
- Basson, M.A., Bommhardt, U., Cole, M.S., Tso, J.Y., & Zamoyska, R. 1998. CD3 ligation on immature thymocytes generates antagonist-like signals appropriate for CD8 lineage commitment, independently of T cell receptor specificity. *J Exp Med*, 187: 1249-1260.
- Basson, M.A., Bommhardt, U., Mee, P.J., Tybulewicz, V.L., & Zamoyska, R. 1998. Molecular requirements for lineage commitment in the thymus--antibody-mediated receptor engagements reveal a central role for lck in lineage decisions. *Immunol Rev*, 165: 181-194.
- Basu, D., Williams, C.B., & Allen, P.M. 1998. In vivo antagonism of a T cell response by an endogenously expressed ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 14332-14336.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., & Bendelac, A. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*, 296: 553-555.
- Bettini, M., Xi, H., Milbrandt, J., & Kersh, G.J. 2002. Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol*, 169: 1713-1720.
- Bleul, C.C., & Boehm, T. 2005. BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol*, 175: 5213-5221.
- Bommireddy, R., Ormsby, I., Yin, M., Boivin, G.P., Babcock, G.F., & Doetschman, T. 2003. TGF beta 1 inhibits Ca2+-calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J Immunol*, 170: 3645-3652.
- Borgulya, P., Kishi, H., Uematsu, Y., & von Boehmer, H. 1992. Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell*, 69: 529-537.
- Borroto, A., Lama, J., Niedergang, F., Dautry-Varsat, A., Alarcon, B., & Alcover, A. 1999. The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals. *J Immunol*, 163: 25-31.
- Bosselut, R., Feigenbaum, L., Sharrow, S.O., & Singer, A. 2001. Strength of signaling by CD4 and

CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes. *Immunity*, 14: 483-494.

Bosselut, R., Ginter, T.I., Sharrow, S.O., & Singer, A. 2003. Unraveling a revealing paradox: Why major histocompatibility complex I-signaled thymocytes "paradoxically" appear as CD4+8lo transitional cells during positive selection of CD8+ T cells. *J Exp Med*, 197: 1709-1719.

Brandle, D., Muller, C., Rulicke, T., Hengartner, H., & Pircher, H. 1992. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 9529-9533.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Ginter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., & Singer, A. 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*, 13: 59-71.

Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., & Winoto, A. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity*, 3: 273-282.

Campese, A.F., Garbe, A.I., Zhang, F., Grassi, F., Screpanti, I., & von Boehmer, H. 2006. Notch1-dependent lymphomagenesis is assisted by but does not essentially require pre-TCR signaling. *Blood*, 108: 305-310.

Chan, S.H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C., & Mathis, D. 1993. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell*, 73: 225-236.

Chang, D., Valdez, P., Ho, T., & Robey, E. 2000. MHC recognition in thymic development: distinct, parallel pathways for survival and lineage commitment. *J Immunol*, 165: 6710-6715.

Cherukuri, A., Dykstra, M., & Pierce, S.K. 2001. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity*, 14: 657-660.

Cook, J.R., Wormstall, E.M., Hornell, T., Russell, J., Connolly, J.M., & Hansen, T.H. 1997. Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo. *Immunity*, 7: 233-241.

Crump, A.L., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., & Cantor, H. 1993. Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10739-10743.

Dave, V.P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., & Kappes, D.J. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J*, 16: 1360-1370.

Davis, M.M. 2002. A new trigger for T cells. *Cell*, 110: 285-287.

Deftos, M.L., Huang, E., Ojala, E.W., Forbush, K.A., & Bevan, M.J. 2000. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity*, 13: 73-84.

Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., & Stone, J.C. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol*, 1: 317-321.

El Andaloussi, A., Graves, S., Meng, F., Mandal, M., Mashayekhi, M., & Aifantis, I. 2006. Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat Immunol*, 7: 418-426.

Erman, B., Alag, A.S., Dahle, O., van Laethem, F., Sarafova, S.D., Ginter, T.I., Sharrow, S.O., Grinberg, A., Love, P.E., & Singer, A. 2006. Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic in vivo model. *J Immunol*, 177: 6613-6625.

Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J., & Terhorst, C. 1994. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent

on T cell activation. *J Biol Chem*, 269: 15140-15146.

Fehling, H.J., Iritani, B.M., Krotkova, A., Forbush, K.A., Laplace, C., Perlmutter, R.M., & von Boehmer, H. 1997. Restoration of thymopoiesis in pT alpha-/- mice by anti-CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha. *Immunity*, 6: 703-714.

Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W.E., Osborn, S.L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P.A., Tibaldi, E.V., Hussey, R.E., Kruisbeek, A.M., Reinherz, E.L., & Clayton, L.K. 2002. Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell*, 9: 637-648.

Fowlkes, B.J., & Robey, E.A. 2002. A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *J Immunol*, 169: 1817-1821.

Freeman, K.W., Welm, B.E., Gangula, R.D., Rosen, J.M., Ittmann, M., Greenberg, N.M., & Spencer, D.M. 2003. Inducible prostate intraepithelial neoplasia with reversible hyperplasia in conditional FGFR1-expressing mice. *Cancer Res*, 63: 8256-8263.

Gallo, E.M., Winslow, M.M., Cante-Barrett, K., Radermacher, A.N., Ho, L., McGinnis, L., Iritani, B., Neilson, J.R., & Crabtree, G.R. 2007. Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature*, 450: 731-735.

Graef, I.A., Holsinger, L.J., Diver, S., Schreiber, S.L., & Crabtree, G.R. 1997. Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70. *EMBO J*, 16: 5618-5628.

Germain, R.N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2: 309-322.

Girao, C., Hu, Q., Sun, J., & Ashton-Rickardt, P.G. 1997. Limits to the differential avidity model of T cell selection in the thymus. *J Immunol*, 159: 4205-4211.

Gong, Q., Cheng, A.M., Akk, A.M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., & Chan, A.C. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol*, 2: 29-36.

Graef, I.A., Holsinger, L.J., Diver, S., Schreiber, S.L., & Crabtree, G.R. 1997. Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70. *EMBO J*, 16: 5618-5628.

Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G., & Merkenschlager, M. 2002. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med*, 196: 163-171.

Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Shah, D.K., Sacedon, R., Shrimpton, R.E., Vicente, A., Varas, A., & Crompton, T. 2002. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol*, 169: 5496-5504.

Haks, M.C., Pepin, E., van den Brakel, J.H., Smeele, S.A., Belkowski, S.M., Kessels, H.W., Krimpenfort, P., & Kruisbeek, A.M. 2002. Contributions of the T cell receptor-associated CD3gamma-ITAM to thymocyte selection. *J Exp Med*, 196: 1-13.

Hara, H., Takeda, A., Takeuchi, M., Wakeham, A.C., Itie, A., Sasaki, M., Mak, T.W., Yoshimura, A., Nomoto, K., & Yoshida, H. 2002. The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes. *J Immunol*, 168: 2288-2295.

Hashimoto, K., Sohn, S.J., Levin, S.D., Tada, T., Perlmutter, R.M., & Nakayama, T. 1996. Requirement for p56lck tyrosine kinase activation in T cell receptor-mediated thymic selection. *J Exp Med*, 184: 931-943.

He, X., Dave, V.P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., Xu, W., Roe, B.A., & Kappes, D.J. 2005. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*, 433: 826-833.

Hendriks, R.W., Nawijn, M.C., Engel, J.D., van Doorninck, H., Grosveld, F., & Karis, A. 1999. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell

progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol*, 29: 1912-1918.

Hernandez-Hoyos, G., Anderson, M.K., Wang, C., Rothenberg, E.V., & Alberola-Ila, J. 2003. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity*, 19: 83-94.

Ho, I.C., & Pai, S.Y. 2007. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol*, 4: 15-29.

Holst, J., Wang, H., Eder, K.D., Workman, C.J., Boyd, K.L., Baquet, Z., Singh, H., Forbes, K., Chruscinski, A., Smeyne, R., van Oers, N.S., Utz, P.J., & Vignali, D.A. 2008. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol*, 9: 658-666.

Huang, J., Durum, S.K., & Muegge, K. 2001. Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. *J Immunol*, 167: 6073-6077.

Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H., & Held, W. 2001. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol*, 2: 691-697.

Irving, B.A., & Weiss, A. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 64: 891-901.

Isakov, N., Wange, R.L., Burgess, W.H., Watts, J.D., Aebersold, R., & Samelson, L.E. 1995. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med*, 181: 375-380.

Itano, A., Salmon, P., Kioussis, D., Tolaini, M., Corbella, P., & Robey, E. 1996. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med*, 183: 731-741.

Izon, D.J., Punt, J.A., Xu, L., Karnell, F.G., Allman, D., Myung, P.S., Boerth, N.J., Pui, J.C., Koretzky, G.A., & Pear, W.S. 2001. Notch1 regulates maturation of CD4+ and CD8+ thymocytes by modulating TCR signal strength. *Immunity*, 14: 253-264.

Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., & Parreira, L. 2001. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med*, 194: 991-1002.

Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J.L., Cremer, H., & Herman, J.P. 2007. Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre). *PLoS ONE*, 2: e1355.

Kesti, T., Ruppelt, A., Wang, J.H., Liss, M., Wagner, R., Tasken, K., & Saksela, K. 2007. Reciprocal regulation of SH3 and SH2 domain binding via tyrosine phosphorylation of a common site in CD3epsilon. *J Immunol*, 179: 878-885.

Kirberg, J., Berns, A., & von Boehmer, H. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med*, 186: 1269-1275.

Kisielow, P., & Miazek, A. 1995. Positive selection of T cells: rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. *J Exp Med*, 181: 1975-1984.

Kraj, P., Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kisielow, P., Jensen, P., & Ignatowicz, L. 2001. Positive selection of CD4(+) T cells is induced in vivo by agonist and inhibited by antagonist peptides. *J Exp Med*, 194: 407-416.

Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajiura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A., Yamada, G., & Matsumoto, M. 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol*, 174: 1862-1870.

Laky, K., Fleischacker, C., & Fowlkes, B.J. 2006. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol Rev*, 209: 274-283.

- Laky, K., & Fowlkes, B.J. 2007. Presenilins regulate alphabeta T cell development by modulating TCR signaling. *J Exp Med*, 204: 2115-2129.
- Laky, K., & Fowlkes, B.J. 2008. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol*, 20: 197-202.
- Langlet, C., Bernard, A.M., Drevot, P., & He, H.T. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol*, 12: 250-255.
- Lee, M.G., Sharrow, S.O., Farr, A.G., Singer, A., & Udey, M.C. 1994. Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells. *J Immunol*, 152: 5653-5659.
- Lehar, S.M., & Bevan, M.J. 2002. T cell development in culture. *Immunity*, 17: 689-692.
- Letourneur, F., & Klausner, R.D. 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science*, 255: 79-82.
- Lewis, R.S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19: 497-521.
- Licona, P., Chimal-Monroy, J., & Soldevila, G. 2006. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn*, 235: 1124-1132.
- Licona-Limón, P., Alemán-Muench, G., Chimal-Monroy, J., Macías-Silva, M., García-Zepeda, E.A., Matzuk, M.M., Fortoul, T.I. & Soldevila, G. 2009. Activins and inhibins: Novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Com*, 381: 229-235.
- Licona-Limon, P., & Soldevila, G. 2007. The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunol Lett*, 109: 1-12.
- Lin, S.Y., Ardouin, L., Gillet, A., Malissen, M., & Malissen, B. 1997. The single positive T cells found in CD3-zeta/eta-/- mice overtly react with self-major histocompatibility complex molecules upon restoration of normal surface density of T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med*, 185: 707-715.
- Linette, G.P., Grusby, M.J., Hedrick, S.M., Hansen, T.H., Glimcher, L.H., & Korsmeyer, S.J. 1994. Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8+ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity*, 1: 197-205.
- Ling, K.W., van Hamburg, J.P., de Bruijn, M.J., Kurek, D., Dingjan, G.M., & Hendriks, R.W. 2007. GATA3 controls the expression of CD5 and the T cell receptor during CD4 T cell lineage development. *Eur J Immunol*, 37: 1043-1052.
- Love, P.E., Lee, J., & Shores, E.W. 2000. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J Immunol*, 165: 3080-3087.
- Love, P.E., & Shores, E.W. 2000. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity*, 12: 591-597.
- Lu, M., Tayu, R., Ikawa, T., Masuda, K., Matsumoto, I., Mugishima, H., Kawamoto, H., & Katsura, Y. 2005. The earliest thymic progenitors in adults are restricted to T, NK, and dendritic cell lineage and have a potential to form more diverse TCRbeta chains than fetal progenitors. *J Immunol*, 175: 5848-5856.
- Lucas, B., Stefanova, I., Yasutomo, K., Dautigny, N., & Germain, R.N. 1999. Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire. *Immunity*, 10: 367-376.
- Lucas, J.A., Atherly, L.O., & Berg, L.J. 2002. The absence of Itk inhibits positive selection without changing lineage commitment. *J Immunol*, 168: 6142-6151.
- Maillard, I., Tu, L., Sambandam, A., Yashiro-Ohtani, Y., Millholland, J., Keeshan, K., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A., & Pear, W.S. 2006. The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J Exp Med*, 203: 2239-2245.

- Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Kontgen, F., Brun, N., Mazza, G., Spanopoulou, E., & et al. 1993. T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J*, 12: 4347-4355.
- Maltzman, J.S., & Koretzky, G.A. 2008. CD3varepsilon: PeRuSing for positive selection. *Nat Immunol*, 9: 457-459.
- Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A.M., Zuniga-Pflucker, J.C., & Ohashi, P.S. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol*, 167: 4966-4973.
- Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J.M., Ramiro, A.R., Carrasco, Y.R., Lopez-Botet, M., & Toribio, M.L. 1998. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*, 91: 2760-2771.
- Massa, S., Balciunaite, G., Ceredig, R., & Rolink, A.G. 2006. Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro. *Eur J Immunol*, 36: 526-532.
- Matechak, E.O., Killeen, N., Hedrick, S.M., & Fowlkes, B.J. 1996. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity*, 4: 337-347.
- Matsuyuki, H., Maeda, Y., Yano, K., Sugahara, K., Chiba, K., Kohno, T., & Igarashi, Y. 2006. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol*, 3: 429-437.
- McKeithan, T.W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5042-5046.
- Mingueneau, M., Sansoni, A., Gregoire, C., Roncagalli, R., Aguado, E., Weiss, A., Malissen, M., & Malissen, B. 2008. The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nat Immunol*, 9: 522-532.
- Minter, L.M., Turley, D.M., Das, P., Shin, H.M., Joshi, I., Lawlor, R.G., Cho, O.H., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J.C., Kostura, L., Fauq, A.H., Simpson, K., Such, K.A., Miele, L., Golde, T.E., Miller, S.D., & Osborne, B.A. 2005. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol*, 6: 680-688.
- Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H.T., & Forster, R. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med*, 200: 481-491.
- Miyazaki, T., & Lemonnier, F.A. 1998. Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, early growth response 1 (Egr-1). *J Exp Med*, 188: 715-723.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovski, D.P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., Veillette, A., & et al. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature*, 357: 161-164.
- Mootz, H.D., Blum, E.S., Tyszkiewicz, A.B., & Muir, T.W. 2003. Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc*, 125: 10561-10569.
- Muller, K.M., Luedecker, C.J., Udey, M.C., & Farr, A.G. 1997. Involvement of E-cadherin in thymus organogenesis and thymocyte maturation. *Immunity*, 6: 257-264.
- Munitic, I., Williams, J.A., Yang, Y., Dong, B., Lucas, P.J., El Kassas, N., Gress, R.E., & Ashwell, J.D. 2004. Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood*, 104: 4165-4172.
- Nava, K. & Soldevila, G., Molecular signals involved in CD4 versus CD8 T cell commitment. *Inmunología*, 23:313-327.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., &

- Loh, D.Y. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature*, 376: 435-438.
- Nie, H., Yao, X., Maika, S.D., & Tucker, P.W. 2008. SATB1 is required for CD8 coreceptor reversal. *Mol Immunol*, 46: 207-211.
- Noel, P.J., Alegre, M.L., Reiner, S.L., & Thompson, C.B. 1998. Impaired negative selection in CD28-deficient mice. *Cell Immunol*, 187: 131-138.
- Norment, A.M., Forbush, K.A., Nguyen, N., Malissen, M., & Perlmutter, R.M. 1997. Replacement of pre-T cell receptor signaling functions by the CD4 coreceptor. *J Exp Med*, 185: 121-130.
- Ohoka, Y., Kuwata, T., Asada, A., Zhao, Y., Mukai, M., & Iwata, M. 1997. Regulation of thymocyte lineage commitment by the level of classical protein kinase C activity. *J Immunol*, 158: 5707-5716.
- Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., & Glimcher, L.H. 1998. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9: 295-304.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., & Pouyssegur, J. 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286: 1374-1377.
- Pai, S.Y., Truitt, M.L., Ting, C.N., Leiden, J.M., Glimcher, L.H., & Ho, I.C. 2003. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity*, 19: 863-875.
- Peterson, P., Org, T., & Rebane, A. 2008. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol*, 8: 948-957.
- Peterson, P., & Peltonen, L. 2005. Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun*, 25 Suppl: 49-55.
- Petrie, H.T., Livak, F., Burtrum, D., & Mazel, S. 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J Exp Med*, 182: 121-127.
- Petrie, H.T., & Zuniga-Pflucker, J.C. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*, 25: 649-679.
- Pirot, P., van Grunsven, L.A., Marine, J.C., Huylebroeck, D., & Bellefroid, E.J. 2004. Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 322: 526-534.
- Pitcher, L.A., & van Oers, N.S. 2003. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol*, 24: 554-560.
- Prockop, S.E., Palencia, S., Ryan, C.M., Gordon, K., Gray, D., & Petrie, H.T. 2002. Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol*, 169: 4354-4361.
- Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Lyons, D.S., Davis, M.M., & McConnell, H.M. 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1401-1405.
- Rao, A., Luo, C., & Hogan, P.G. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15: 707-747.
- Ravichandran, K.S., Lee, K.K., Songyang, Z., Cantley, L.C., Burn, P., & Burakoff, S.J. 1993. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science*, 262: 902-905.
- Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol*, 13: 339-345.
- Rincon, M., Whitmarsh, A., Yang, D.D., Weiss, L., Derijard, B., Jayaraj, P., Davis, R.J., & Flavell, R.A. 1998. The JNK pathway regulates the in vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J Exp Med*, 188: 1817-1830.
- Robertson, P., Means, T.K., Luster, A.D., & Scadden, D.T. 2006. CXCR4 and CCR5 mediate

- homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp Hematol*, 34: 308-319.
- Rodewald, H.R., Ogawa, M., Haller, C., Waskow, C., & DiSanto, J.P. 1997. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity*, 6: 265-272.
- Rozdzial, M.M., Malissen, B., & Finkel, T.H. 1995. Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity*, 3: 623-633.
- Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., & Wabnitz, G.H. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol*, 73: 30-48.
- Schaeffer, E.M., Broussard, C., Debnath, J., Anderson, S., McVicar, D.W., & Schwartzberg, P.L. 2000. Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and selection. *J Exp Med*, 192: 987-1000.
- Schmedt, C., & Tarakhovsky, A. 2001. Autonomous maturation of alpha/beta T lineage cells in the absence of COOH-terminal Src kinase (Csk). *J Exp Med*, 193: 815-826.
- Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., & Zuniga-Pflucker, J.C. 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med*, 200: 469-479.
- Schmitt, T.M., & Zuniga-Pflucker, J.C. 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*, 17: 749-756.
- Schmitt, T.M., & Zuniga-Pflucker, J.C. 2006. T-cell development, doing it in a dish. *Immunol Rev*, 209: 95-102.
- Seong, R.H., Chamberlain, J.W., & Parnes, J.R. 1992. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature*, 356: 718-720.
- Shah, D.K., Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Ross, S.E., Varas, A., & Crompton, T. 2004. Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol*, 172: 2296-2306.
- Shao, H., Kono, D.H., Chen, L.Y., Rubin, E.M., & Kaye, J. 1997. Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med*, 185: 731-744.
- Shores, E., Flamand, V., Tran, T., Grinberg, A., Kinet, J.P., & Love, P.E. 1997. Fc epsilonRI gamma can support T cell development and function in mice lacking endogenous TCR zeta-chain. *J Immunol*, 159: 222-230.
- Shores, E.W., Huang, K., Tran, T., Lee, E., Grinberg, A., & Love, P.E. 1994. Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science*, 266: 1047-1050.
- Shores, E.W., Tran, T., Grinberg, A., Sommers, C.L., Shen, H., & Love, P.E. 1997. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med*, 185: 893-900.
- Smyth, L.A., Williams, O., Huby, R.D., Norton, T., Acuto, O., Ley, S.C., & Kioussis, D. 1998. Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 8193-8198.
- Sohn, S.J., Forbush, K.A., Pan, X.C., & Perlmutter, R.M. 2001. Activated p56lck directs maturation of both CD4 and CD8 single-positive thymocytes. *J Immunol*, 166: 2209-2217.
- Soldevila, G., Castellanos, C., Malissen, M., & Berg, L.J. 2001. Analysis of the individual role of the TCRzeta chain in transgenic mice after conditional activation with chemical inducers of dimerization. *Cell Immunol*, 214: 123-138.
- Sosinowski, T., Killeen, N., & Weiss, A. 2001. The Src-like adaptor protein downregulates the T cell receptor on CD4+CD8+ thymocytes and regulates positive selection. *Immunity*, 15: 457-466.

- Spain, L.M., Jorgensen, J.L., Davis, M.M., & Berg, L.J. 1994. A peptide antigen antagonist prevents the differentiation of T cell receptor transgenic thymocytes. *J Immunol*, 152: 1709-1717.
- Spencer, D.M., Belshaw, P.J., Chen, L., Ho, S.N., Randazzo, F., Crabtree, G.R., & Schreiber, S.L. 1996. Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol*, 6: 839-847.
- Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L., & Crabtree, G.R. 1993. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, 262: 1019-1024.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., & Hogquist, K.A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21: 139-176.
- Stefanski, H.E., Mayerova, D., Jameson, S.C., & Hogquist, K.A. 2001. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J Immunol*, 166: 6602-6607.
- Stockwell, B.R., & Schreiber, S.L. 1998. Probing the role of homomeric and heteromeric receptor interactions in TGF-beta signaling using small molecule dimerizers. *Curr Biol*, 8: 761-770.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., & Takahama, Y. 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity*, 9: 565-574.
- Sun, G., Liu, X., Mercado, P., Jenkinson, S.R., Kypriotou, M., Feigenbaum, L., Galera, P., & Bosselut, R. 2005. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol*, 6: 373-381.
- Takeuchi, K., Yang, H., Ng, E., Park, S.Y., Sun, Z.Y., Reinherz, E.L., & Wagner, G. 2008. Structural and functional evidence that Nck interaction with CD3epsilon regulates T-cell receptor activity. *J Mol Biol*, 380: 704-716.
- Tan, J.B., Visan, I., Yuan, J.S., & Gidos, C.J. 2005. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol*, 6: 671-679.
- Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., & Littman, D.R. 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, 111: 621-633.
- Tsai, P.T., Lee, R.A., & Wu, H. 2003. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood*, 102: 3947-3953.
- Ueno, T., Hara, K., Willis, M.S., Malin, M.A., Hopken, U.E., Gray, D.H., Matsushima, K., Lipp, M., Springer, T.A., Boyd, R.L., Yoshie, O., & Takahama, Y. 2002. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity*, 16: 205-218.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., & Takahama, Y. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*, 200: 493-505.
- Van De Wiele, C.J., Marino, J.H., Murray, B.W., Vo, S.S., Whetsell, M.E., & Teague, T.K. 2004. Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J Immunol*, 172: 4235-4244.
- Wang, C.R., Hashimoto, K., Kubo, S., Yokochi, T., Kubo, M., Suzuki, M., Suzuki, K., Tada, T., & Nakayama, T. 1995. T cell receptor-mediated signaling events in CD4+CD8+ thymocytes undergoing thymic selection: requirement of calcineurin activation for thymic positive selection but not negative selection. *J Exp Med*, 181: 927-941.
- Wang, H., Pierce, L.J., & Spangrude, G.J. 2006. Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T-cell differentiation culture system. *Exp Hematol*, 34: 1730-1740.
- Wang, L., Wildt, K.F., Zhu, J., Zhang, X., Feigenbaum, L., Tessarollo, L., Paul, W.E., Fowlkes, B.J., & Bosselut, R. 2008. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. *Nat Immunol*, 9: 1122-1130.
- Werlen, G., Hausmann, B., & Palmer, E. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls

positive selection by modulating ERK activity. *Nature*, 406: 422-426.

Wiest, D.L., Yuan, L., Jefferson, J., Benveniste, P., Tsokos, M., Klausner, R.D., Glimcher, L.H., Samelson, L.E., & Singer, A. 1993. Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J Exp Med*, 178: 1701-1712.

Wilkinson, B., Chen, J.Y., Han, P., Rufner, K.M., Goularte, O.D., & Kaye, J. 2002. TOX: an HMG box protein implicated in the regulation of thymocyte selection. *Nat Immunol*, 3: 272-280.

Wilkinson, R.W., Anderson, G., Owen, J.J., & Jenkinson, E.J. 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol*, 155: 5234-5240.

Williams, J., Bjornsson, S., Cameron, A.D., Mathers, A., Yahya, S.Z., & Pell, J.P. 1999. Prospective study of external cephalic version in Glasgow: patient selection, outcome and factors associated with outcome. *J Obstet Gynaecol*, 19: 598-601.

Wong, P., Barton, G.M., Forbush, K.A., & Rudensky, A.Y. 2001. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J Exp Med*, 193: 1179-1187.

Woolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Brenner, O., Berke, G., Levanon, D., & Groner, Y. 2003. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7731-7736.

Yamasaki, S., & Saito, T. 2007. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol*, 28: 39-43.

Yang, H., & Reinherz, E.L. 2001. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem*, 276: 18775-18785.

Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., Fuchs, C., & Germain, R.N. 2000. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature*, 404: 506-510.

Ye, S.K., Agata, Y., Lee, H.C., Kurooka, H., Kitamura, T., Shimizu, A., Honjo, T., & Ikuta, K. 2001. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRgamma locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity*, 15: 813-823.

Yin, X., Ladi, E., Chan, S.W., Li, O., Killeen, N., Kappes, D.J., & Robey, E.A. 2007. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J Immunol*, 179: 7358-7364.

Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., & Mountz, J.D. 1996. Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med*, 183: 1879-1892.