



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**PAPEL DE PI3K EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA  
POR CCR7 DEPENDIENTE DE JAK 3 DURANTE LA  
MIGRACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ROXANA OLGUÍN ALOR**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Profesor: Constantino III Roberto López Macías

**VOCAL:** Profesor: Enrique Ortega Soto

**SECRETARIO:** Profesor: María Gloria Soldevila Melgarejo

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia

**2° SUPLENTE:** Profesor: Julio César Martínez Álvarez

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

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO**



**SUSTENTANTE: ROXANA OLGUÍN ALOR**

*Dedico esta tesis a mis papás,  
Joel y Sonia, a mi hermanita Zule,  
a mis tíos, Cuca y Miguel, y a Ana quienes,  
a veces sin entender lo que realizo,  
han sido mi soporte y apoyo incondicional  
como persona y profesional.*

*¡Los quiero!*

## **Agradecimientos**

Gracias Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por su guía y sus consejos los cuales han sido de gran ayuda; además, le agradezco por las observaciones en la realización de este trabajo.

Agradezco a Biol. Ramsés Chávez Ríos por su apoyo en el tipaje de los ratones Jak 3 y por su apoyo técnico en la realización de este trabajo. Georgina y sus colaboradores por su apoyo en el bioterio.

Agradezco especialmente a Carlos que ha estado conmigo desde el inicio de mi carrera, siendo novio, apoyo y guía en mi vida.

A mis amigos del laboratorio: Xochitl, Erika, Nelly, Violeta, Karen, Diana, Germán, Ramsés, Ebzadrel y Horacio los cuales hacen del laboratorio un ambiente grato para trabajar, gracias por sus consejos y su apoyo.

Karen, Gaby y Gaby Rubí, gracias chicas por ser mis amigas y por tantos momentos gratos que tuvimos y que seguiremos teniendo. Las quiero.

Gracias a Zulema y Sandy por ser mis hermanas. Sepan que las quiero mucho.

A mi familia que me apoya y me cuida, muchas gracias.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	9
1.1.    Desarrollo de linfocitos T .....	9
1.2.    Tráfico linfocitario.....	12
1.2.1.    En el timo .....	12
1.2.2.    Hacia órganos linfoides secundarios .....	13
1.3.    Quimiocinas y sus receptores .....	15
1.3.1.    Receptores de quimiocinas .....	17
1.3.2.    Señalización a través de receptores de quimiocinas.....	19
1.3.3.    Regulación de la señalización mediada por receptores de quimiocinas .....	21
1.4.    CCR7 y sus ligandos.....	22
1.5.    Cinasa Janus.....	25
1.5.1.    Vía Jak/STAT.....	27
1.5.2.    Regulación de la vía Jak/STAT .....	27
1.6.    Deficiencia de Jak3.....	29
1.6.1.    Ratón Jak 3 -/- .....	29
1.6.2.    Jak/STAT y quimiocinas .....	31
1.7.    Fosfoinositol 3 cinasa.....	33
1.7.1.    PI3K clase I.....	34
1.7.2.    PI3K clase II .....	36
1.7.3.    PI3K clase III .....	37
1.7.4.    PI3K en migración.....	37
2. Justificación .....	43
3. Hipótesis.....	44
4. Objetivo .....	44
4.1.    Objetivos particulares .....	44
5. Material y Metodología .....	45
5.1.    Obtención de DNA .....	45

5.2.	Amplificación de los genes Jak3 y resistencia a Neomicina .....	45
5.3.	Identificación de los genes Jak3 y resistencia a Neomicina en geles de agarosa .....	46
5.4.	Obtención de células .....	46
5.5.	Lisis de eritrocitos.....	47
5.6.	Panning .....	47
5.7.	Tinción de marcadores de superficie .....	48
5.8.	Ensayos de fosforilación .....	48
5.9.	Análisis estadístico .....	49
6.	Resultados y Discusión .....	50
6.1.	Fosforilación de p85 $\alpha$ a través del tiempo .....	52
6.2.	Ensayos de fosforilación con células Jak 3 -/- .....	56
7.	Conclusión.....	68
8.	Perspectivas .....	68
9.	Referencias .....	69
10.	Anexo A. Reactivos y soluciones .....	82
10.1.	Reactivos .....	82
10.2.	Reactivos biológicos .....	84
10.3.	Soluciones.....	86

## RESUMEN

A diferencia del resto de las células del sistema inmune, los linfocitos T se originan en la médula ósea pero el proceso de diferenciación y maduración tiene lugar en el timo. Al final de desarrollo linfocitario, los linfocitos T maduros migran a los ganglios periféricos para lo cual se requiere la participación del receptor de quimiocinas CCR7, expresado en linfocitos vírgenes que responden a las quimiocinas CCL19 y CCL21, expresadas en los órganos linfoides secundarios.

Se sabe que en la señalización mediada por quimiocinas participa la vía Jak/STAT. Existe evidencia de que los ratones  $Jak3^{-/-}$  carecen de Linfocitos T en ganglios periféricos sugiriendo una deficiencia en el reclutamiento hacia los distintos órganos secundarios. Datos publicados por nuestro grupo ha demostrado que los ratones  $Jak3^{-/-}$  tienen deficiencia en la migración mediada por el receptor de quimiocina CCR7.

Se ha demostrado que PI3K participa en la señalización mediada por quimiocinas. De manera interesante, la migración de progenitores de linfocitos T en respuesta a CXCL12, involucra la activación de PI3K de manera dependiente de la fosforilación de Jak2. Por otro lado, existen isoformas de PI3K, como  $PI3K\alpha$  y  $PI3K\gamma$ , que están directamente implicadas en el proceso de migración de linfocitos T. Por lo tanto, nuestro grupo propone que PI3K podría estar involucrada en la señalización mediada por CCR7 dependiente de Jak3 en linfocitos T y que, en ausencia de Jak3, la activación de PI3K se verá afectada.

En este trabajo se evaluó la participación de PI3K, la subunidad reguladora  $p85\alpha$ , en la migración dependiente de Jak3 a través del receptor CCR7. Mediante el uso de la técnica de citometría de flujo, se realizaron ensayos de fosforilación en donde analizó la fosforilación de



esta molécula en respuesta a la estimulación con la quimiocina CCL21 (100 ng/mL), la cual es ligando de CCR7. Se comparó la fosforilación de p85 $\alpha$  en linfocitos T obtenidos a partir del bazo de ratones Jak3<sup>+/+</sup> o bien Jak3<sup>-/-</sup> (knock out).

Los resultados obtenidos mostraron que p85 $\alpha$  es fosforilada en respuesta al estímulo con la quimiocina CCL21 en linfocitos T provenientes de ratones silvestres y que dicha activación se presenta a los 3 minutos de estimulación; sin embargo, dicha activación no está significativamente afectada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> ni T CD8<sup>+</sup> deficientes de Jak 3.

Por lo tanto se concluye que la clase IA de PI3K no participa en la señalización mediada por CCR7 dependiente de Jak 3. Sin embargo, la participación de PI3K en el proceso de migración dependiente de CCR7 podría estar dada por otra isoforma de PI3K en una vía de señalización independiente o dependiente de proteína G.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El Sistema Inmune es el conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos que se encargan de la respuesta colectiva y coordinada ante patógenos. El sistema inmune suele dividirse en sistema inmune innato, el cual provee la respuesta inicial y rápida contra una infección, y el sistema inmune adaptativo, el cual provee una respuesta, después de la inmunidad innata, caracterizada por su alta especificidad y generación de memoria.

Los linfocitos T son uno de los componentes celulares principales del sistema inmune adaptativo los cuales participan en la respuesta inmune específica mediante diversas funciones efectoras y de regulación. A diferencia de las otras células del Sistema Inmune, los linfocitos T maduran en el Timo para después migrar a la periferia alojándose en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos) [1].

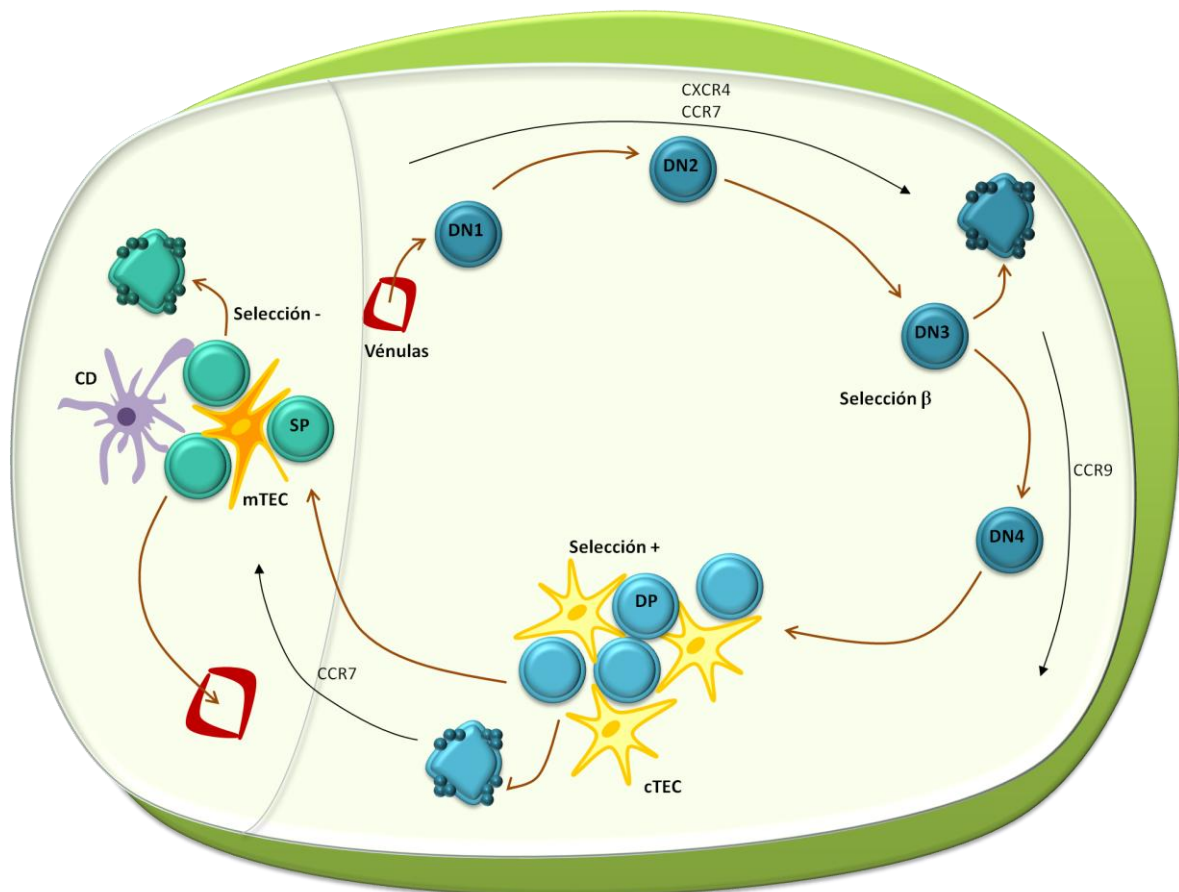
### **1.1 DESARROLLO DE LINFOCITOS T**

Los linfocitos T surgen de células progenitoras hematopoyéticas que migran al Timo. Su desarrollo requiere de señales provenientes de células estromales, incluyendo varios tipos de células epiteliales tímicas (TECs), células dendríticas, macrófagos y fibroblastos mesenquimales.

Las células progenitoras entran al Timo por medio de las vénulas localizadas cerca de la zona cortico-medular del mismo. Dichas células son llamadas Doble Negativas (DN) debido a que no expresan los correceptores CD4/CD8. Las células DN pueden diferenciarse en 4 subgrupos en base a su grado de maduración y la expresión de

moléculas superficiales: DN1 (CD24<sup>-/lo</sup> CD25<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>), DN2 (CD24<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>), DN3 (CD24<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> CD117<sup>-</sup>) y DN4 (CD25<sup>-</sup> CD44<sup>lo</sup> CD117<sup>-</sup>) los cuales se diferencian mientras migran de la zona cortico-medular a la corteza del Timo (Figura 1).

Cuando las células progenitoras entran al timo se denominan células DN1 las cuales, mediante las señalizaciones a través del receptor de IL-7 y cKit (receptor de Stem cell Factor), proliferan abundantemente (revisado en [2, 3]).



**Figura 1.** Desarrollo de Linfocitos T.

La expresión de CD25 en células DN1 marca la progresión a la etapa DN2, en donde siguen proliferando activamente por señales de IL7R y c-Kit. En este punto, comienza la recombinación en los genes

para las cadenas  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del receptor de linfocitos T (TCR), por lo que estos timocitos inmaduros podrán diferenciarse en linfocitos  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . El compromiso a linaje  $\alpha\beta$ T aún no está completo en células DN2, dicho compromiso irreversible se da cuando comienzan a expresar la forma inmadura del TCR (preTCR), el cual medía la selección  $\beta$  ya que señala para rescatar de la apoptosis, expansión celular y también para cesar la recombinación de TCR $\beta$ . La recombinación de la cadena  $\alpha$  del TCR marca la transición de células DN3 a DN4 o preDP.

Cuando los timocitos expresan las proteínas CD4 y CD8 en la superficie se les denomina células doble positivas (DP), las cuales expresan un receptor maduro (TCR). Debido al contacto periódico con las células estromales que expresan moléculas en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se promueve la selección positiva en donde los timocitos sufren el proceso de la elección de linaje, a través del cual se comprometen a un fenotipo CD8+ o CD4+.

Las células SP se mueven a una zona rica en células dendríticas (CDs) en donde se lleva a cabo la selección negativa. La clave de la selección negativa es la interacción entre el TCR y el MHC, además de la presencia de coestimulación provista por CD80/86 en células dendríticas y células epiteliales medulares, favoreciendo la selección de timocitos tolerantes contra antígenos propios [4, 5], además se induce la deleción de timocitos autorreactivos y la generación de células T reguladoras antígeno-específicas [6].

Una vez que las células SP han completado su proceso de maduración, las células salen del timo como linfocitos T y migran hacia los órganos linfoides secundarios a través de vénulas de la región medular y gracias a un mecanismo dependiente de S1P (sphingosine 1 phosphate) receptor [7].

## **1.2 TRÁFICO LINFOCITARIO**

### **1.2.1 En del timo.**

Durante el proceso de maduración de los timocitos, las células tienen que migrar por diferentes zonas del timo. La localización específica de los subtipos de timocitos en el timo (corteza y médula) se explican por la diferencia en la respuesta quimotáctica de dichos subtipos. Las señalizaciones que medían dicho movimiento están dadas principalmente por las quimiocinas y receptores de quimiocinas.

Los factores que inducen el reclutamiento tímico de los progenitores de linfocitos T no están bien definidos pero, según diferentes autores, pueden participar los ligandos de los receptores CCR9 y CCR7 [8, 9, 10] .

Una vez que los precursores se encuentran en el timo, la migración en dirección hacia la parte más externa de la corteza esta mediada por la quimiocina CXCL12 (ligando del receptor CXCR4), ya que está ampliamente distribuida en las células estromales de la corteza tímica y no en la médula. Además, se sabe que el receptor CCR7 es altamente expresado en células DN1 y DN2, por lo que sus ligandos, CCL19 y CCL21, en las células estromales y el receptor CCR7 en los timocitos son requeridos para una eficiente acumulación de células en la zona subcapsular [11].

En células tardías DN3, la expresión de CCR9 es aumentada en respuesta a la expresión del preTCR [12]. La quimiocina CCL25, ligando de CCR9, es producida en la zona subcapsular del timo indicando que es necesaria para la migración a esta zona. Esto se ha demostrado ya que la sobreexpresión de CCR9 provoca la acumulación de células DN3 [13].

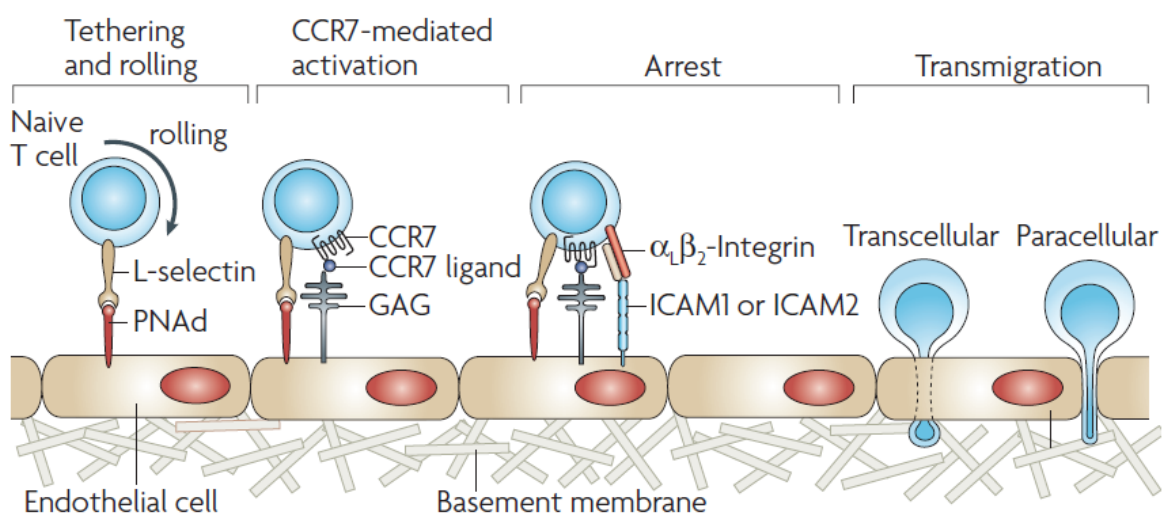
Continuando con la maduración de los timocitos, en células DP seleccionadas positivamente se induce de nuevo la expresión de CCR7, además CCL19 y CCL21 son producidas por las células epiteliales de la médula provocando que las células migren hacia la médula.

Una vez terminada la maduración de los timocitos es requerida la interacción entre CCL19 y CCR7 para favorecer el egreso de los linfocitos T del timo [14]; sin embargo, no son las únicas señales involucradas en este proceso, como se mencionó anteriormente, SP1 participa activamente.

### **1.2.2 Hacia órganos linfoides secundarios.**

La principal entrada de los linfocitos T a los órganos linfoides secundarios es a través de las venas de endotelio alto (High Endothelial Venules o HEVs), en donde los linfocitos T van rodando antes de ser adheridas firmemente a la superficie. Para que los linfocitos T interaccionen con el endotelio, es necesario que se activen las L-selectinas las cuales se unen a adresinas de ganglios periféricos (PNAd), que son un grupo de sialomucinas que están presentes en HEVs (Figura 2). Esta interacción permite que los linfocitos se fijen rápido pero transitoriamente a las HEVs ya que, debido al flujo sanguíneo, inducen que los linfocitos rueden ("rolling"). Después, los linfocitos se unen a CCL19 ó CCL21, los cuales se encuentran inmovilizados debido a que están unidos a glicosaminoglicanos en la superficie de HEVs. La señalización mediada por CCR7 induce cambios conformacionales de las integrinas  $\alpha_L\beta_2$  en los linfocitos que permiten la unión firme a moléculas de adhesión intermolecular 1 (ICAM1) e ICAM2. Además, dicha señalización también activa las integrinas  $\alpha_4\beta_2$ , las cuales se unen a la molécula de adhesión celular adresina mucosa 1 (MAdCAM) la cual es expresada en HEVs que conducen a los ganglios linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. Enseguida, los linfocitos sufren una locomoción

lateral seguida por la migración transendotelial, la cual es posiblemente inducida por los ligandos de CCR7 presentes en la parte luminal ó abluminal de las HEVs. Potencialmente, los linfocitos escogen entre dos rutas de migración transendotelial; la paracelular, en donde migran alrededor de las células endoteliales, y la transcelular, en donde atraviesan el citoplasma endotelial. Las quimiocinas CCL21 y CCL19 son la causa de que se activen las integrinas de linfocitos T pero no de otros leucocitos. El 80% de la quimiocina CCL21 es producida por las células endoteliales del HEV y puede inducir rápidamente la unión de integrinas a ICAM1 y MADCAM1. En contraste, CCL19 es producida por células estromales que se encuentran alrededor de HEV y parece ser transportada a la superficie luminal del HEV. La quimiocina CXCL12 también participa en menor magnitud durante la adhesión de linfocitos T a HEV, puede inducir rápidamente la adhesión de linfocitos T a ICAM1 activando LFA1 y también puede inducir el anclaje de los linfocitos T a VCAM1 por medio de la integrina VLA4. Al igual que CCL19, CXCL12 es probablemente producida en otro lado y transportado a HEV. Las interacciones CXCL12-CXCR4 se han relacionado principalmente para linfocitos T de memoria (revisado en [15, 16, 17]).



**Figura 2.** Migración de linfocitos hacia los ganglios linfáticos [17].

### **1.3 QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES.**

Las quimiocinas son una familia de citocinas quimotácticas de bajo peso molecular (8-10 kDa) las cuales fueron identificadas en base a su habilidad de inducir la migración de diferentes tipos celulares, particularmente aquellos de origen linfoide, ya que las células que son atraídas por quimiocinas siguen la señal de un incremento en la concentración hacia la fuente de la quimiocina. Además, las quimiocinas han demostrado activar leucocitos, influenciar la hematopoyesis, modular la angiogénesis y participar en la respuesta inmune e inflamación a través de la quimioatracción y activación de leucocitos (revisado en [18, 19]).

Hasta el momento, cerca de 50 quimiocinas, que se expresan en un rango amplio de tipos celulares y tejidos, han sido identificados en humanos. Estas citocinas de bajo peso molecular han sido divididas en cuatro familias en base al arreglo de dos residuos de cisteína que se encuentran en el extremo amino terminal (N-terminal): CXC, CC, CX<sub>3</sub>C y XC (Tabla 1).

En las quimiocinas CXC, las cisteínas están separadas por un aminoácido (cisteína-aminoácido X-cisteína); en las quimiocinas CC, las cisteínas se encuentran adyacentes (cisteína-cisteína). Las otras dos familias han sido descritas como: la quimiocina XC con sólo una en vez de dos cisteínas conservadas y la quimiocina CX<sub>3</sub>C (fractalcina), en la cual las cisteínas están separadas por tres aminoácidos. Estas diferencias estructurales están asociadas con la habilidad de actuar particularmente en leucocitos.



<b>Nombre Sistemático</b>	<b>Nombre Alternativo</b>	<b>Receptor de Quimiocina</b>
<b>CXC</b>		
CXCL1	GRO $\alpha$	CXCR2
CXCL2	GRO $\beta$	CXCR2
CXCL3	GRO $\gamma$	CXCR2
CXCL4	PF4	
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4
CXCL13, CXCL16	BCA-1	CXCR5, CXCR6
CXCL14	BRANK	Desconocido
<b>CC</b>		
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$ S	CCR1, CCR5
CCL3L1	MIP-1 $\alpha$ P	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR2, CCR5
CCL11	Eotaxina	CCR3
CCL12	Desconocido	? CCR2
CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2
CCL14	HCC-1	CCR1
CCL15	HCC-2	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4	CCR1, CCR3
CCL17	TARC	CCR4
CCL18	PARC	Desconocido
CCL19	ELC	CCR7
CCL20	MIP-3 $\alpha$	CCR6
CCL21	SLC	CCR7
CCL22	MDC	CCR4
CCL23	MPIF-1	CCR1
CCL24	Eotaxina 2	CCR3
CCL25	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxina 3	CCR3
CCL27	CTACK	CCR10
CCL28	MEC	CCR10
<b>XC</b>		
XCL1	Linfotactina	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	XCR1
<b>CX3C</b>		
CX3CL1	Fractalcina	CX3CR1

**Tabla 1.** Quimiocinas Humanas y sus Receptores [18].

Las quimiocinas son diversas en la selectividad de sus células blanco. Por ejemplo, las quimiocinas CXC tienen el potencial para activar

y atraer neutrófilos y linfocitos T [20, 21]. Las quimiocinas CC son activas en múltiples subtipos de leucocitos, como monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T, células dendríticas, células NK y, en una menor extensión, neutrófilos [22, 23, 24]. La familia de quimiocinas XC ejerce sus acciones en linfocitos T y células NK. Finalmente, la quimiocina CX<sub>3</sub>C fractalcina es activa en linfocitos T, células NK, monocitos y neutrófilos [25, 26].

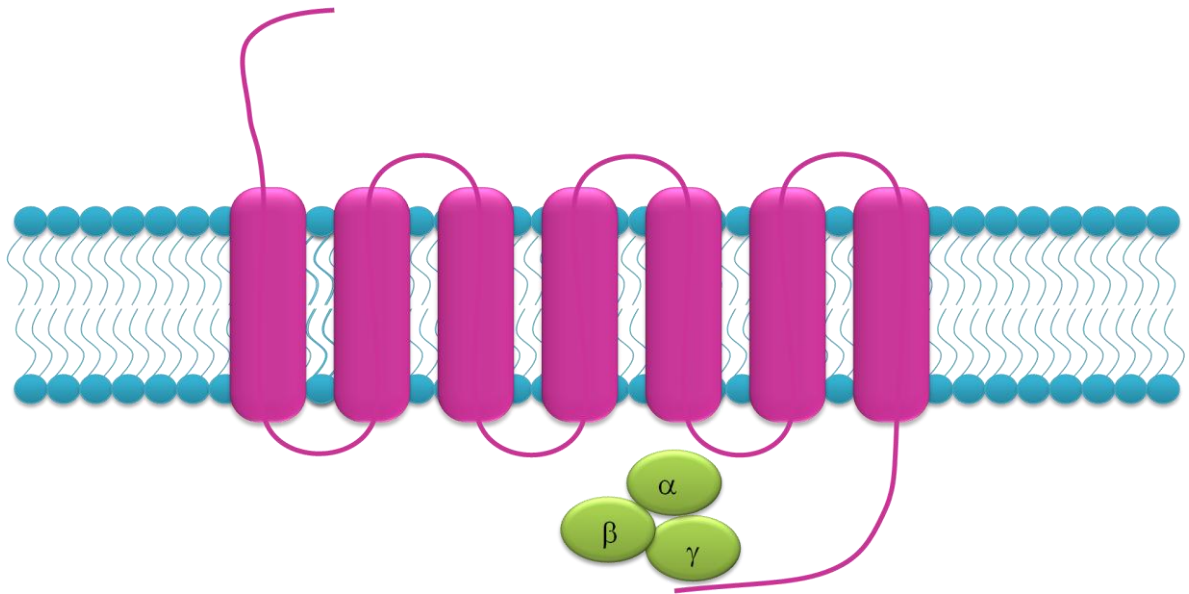
Existen quimiocinas que son llamadas quimiocinas inflamatorias o inducibles como CXCL8, CXCL1, CCL2, CCL2 y CCL3. Por el contrario, existen otras quimiocinas que son llamadas quimiocinas no inflamatorias o de homeostasis ya que están constitutivamente expresadas en el timo y tejidos linfoides como CXCL12, CXCL13 y CCL22.

Todas las quimiocinas, con excepción de CXCL16 y CX<sub>3</sub>CL1 las cuales son proteínas integrales de la membrana, son proteínas secretadas que se unen a glicosaminoglicanos (GAGs) cargadas negativamente [27]. Las GAGs están generalmente sujetas a proteínas en la superficie celular o en la matriz extracelular formando estructuras llamadas proteoglicanos. De esta manera, cuando las células endoteliales u otras células parenquimales liberan quimiocinas, éstas quedan concentradas e inmovilizadas en el tejido del sitio.

### **1.3.1 Receptores de quimiocinas.**

Los mensajes de las quimiocinas son decodificadas por receptores específicos que inician los eventos de transducción de señal provocando una multitud de respuestas celulares.

Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G con 7 dominios transmembranales (GPCR) presentes en las células (Figura 3). Muchos receptores de quimiocinas interactúan con múltiples quimiocinas, indicando la redundancia y versatilidad características del sistema de quimiocinas; sin embargo, quimiocinas CXC interactúan exclusivamente con receptores de quimiocinas CXC y quimiocinas CC se unen sólo con receptores CC.



**Figura 3.** Receptor de quimiocina.

Se han caracterizado 20 receptores de quimiocinas hasta la fecha, los cuales se han dividido en 4 familias dependiendo el tipo de quimiocinas a las que unen: receptores CXCR que unen quimiocinas CXC, CCR que unen quimiocinas CC, CX<sub>3</sub>CR que une a la quimiocina CX<sub>3</sub>C y XCR que une a quimiocinas XC. Los receptores de quimiocinas comparten varias características estructurales; son similares en el tamaño (alrededor de 350 aminoácidos), tienen 7 hélices transmembranales con tres loops hidrofílicos extracelulares y tres

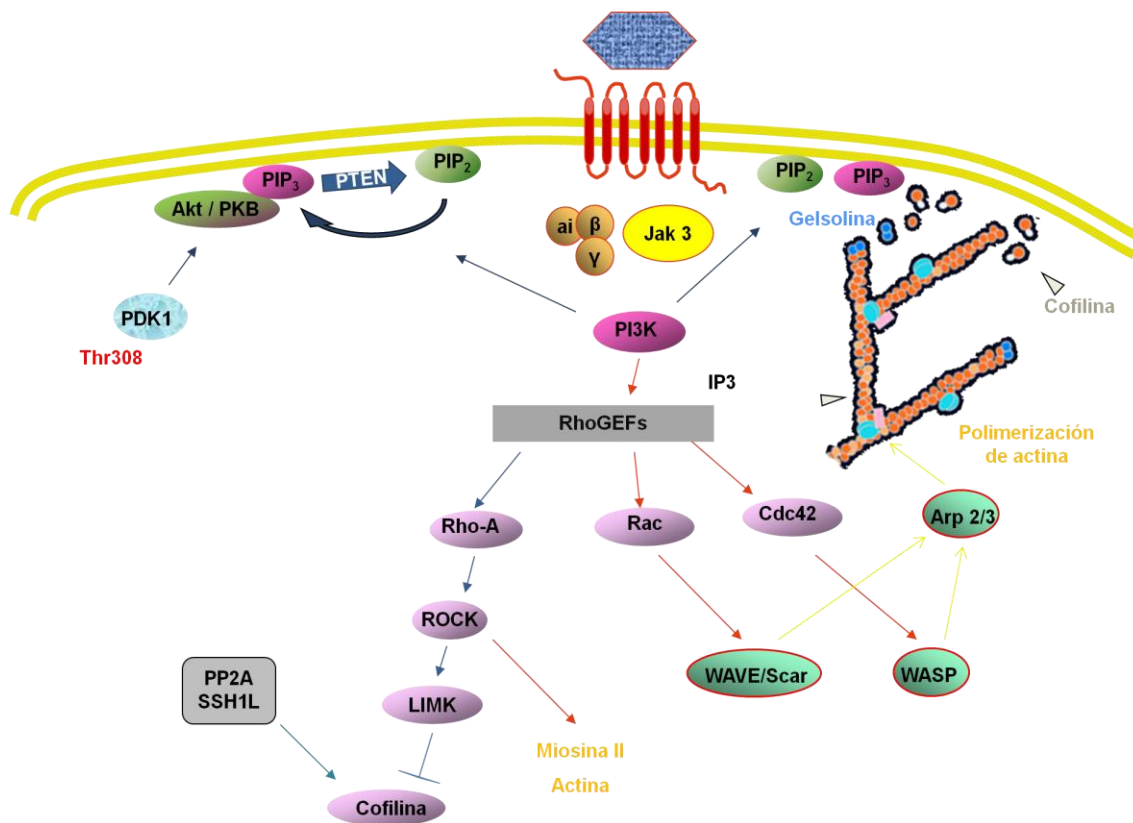
intracelulares y el extremo C-terminal contienen residuos de serina y treonina importantes para la regulación del receptor. Los primeros dos loops extracelulares tienen un residuo de cisteína conservado que permite la formación de un puente disulfuro entre estos ellos.

La proteína G está unida al extremo C-terminal para permitir la señalización intracelular después de la activación del receptor, mientras que el dominio N-terminal determina la especificidad de la unión al ligando [28].

### **1.3.2 Señalización a través de receptores de quimiocina.**

Los receptores de quimiocinas se asocian con las proteínas G para transmitir las señales a consecuencia de la unión del receptor con el ligando. Dicha unión provoca la activación de cinasas serina/treonina, las cuales previenen la señalización extensa debido a que fosforilan rápidamente a los receptores de quimiocina, permitiendo que se asegure la trascendencia de la respuesta leucocitaria mediada por quimiocina.

La activación de proteínas G provoca la activación de la enzima Fosfolipasa C (PLC). PLC rompe a la molécula Fosfatidilinositol (4,5)bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en dos segundos mensajeros: Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y Diacilglicerol (DAG), que disparan diversos eventos de señalización; DAG activa otra enzima llamada proteína cinasa C (PKC), e IP<sub>3</sub> provoca la liberación de calcio [29]. Estos eventos promueven muchas cascadas de señalización que generan respuestas como quimiotaxis, degranulación, liberación de aniones superóxidos y cambios en la avidéz de moléculas de adhesión celular (integrinas) [28].



**Figura 4.** Transducción de Señal a través de GPCR.

Existe evidencia que los receptores de quimiocina pueden activar varios efectores intracelulares diferentes río debajo de la unión de proteínas G<sub>i</sub>, como las proteínas Ras y Rho, Fosfolipasa A2, Fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), cinasas de tirosina y la vía de MAP cinasa.

### **1.3.3 Regulación de la señalización mediada por receptores de quimiocinas.**

Después de la activación debido a la unión de las quimiocinas, los receptores de quimiocinas se vuelven parcialmente o totalmente desensibilizados a una estimulación repetida con la misma quimiocina u otros agonistas. Este proceso es dado por medio de la fosforilación de los residuos de serina y treonina por las cinasas de receptor acoplado a proteína G y el secuestro del receptor por medio de la internalización.

Las quimiocinas son reguladas en los niveles de transcripción y postranscripción [30]. Muchas de las quimiocinas proinflamatorias son inducidas por IL-1 $\beta$  o por TNF- $\alpha$ . Algunas quimiocinas CXC fueron inicialmente identificadas en base a la regulación positiva mediada por INF- $\gamma$  [31]. Otras quimiocinas, especialmente aquellas que juegan un rol específico en el tráfico leucocitario, aparentemente son expresadas constitutivamente.

## 1.4 CCR7 Y SUS LIGANDOS

Aunque la expresión de muchas de las quimiocinas es inducida durante la infección e inflamación, algunas quimiocinas, incluyendo CCL19 y CCL21, son expresadas constitutivamente y controlan el movimiento celular en homeostasis. Tanto CCL19 como CCL21 son ligandos del receptor de quimiocina CCR7 el cual es expresado por varios tipos celulares del sistema inmune. CCR7 y sus ligandos están esencialmente involucrados con la entrada de varios subtipos de linfocitos T y de células dendríticas hacia los ganglios linfáticos (revisado en [17]).

Existe evidencia reciente que demuestra que los contactos de linfocitos T y células dendríticas dependientes de CCR7 son esenciales para la inducción de tolerancia periférica y la regulación de la respuesta inmune por medio de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [32, 33, 34]. Además, series de estudios han mostrado que CCR7 es indispensable para el desarrollo de linfocitos T en el timo y la selección negativa de linfocitos T autorreactivos [35].

Al contrario de CCL19, CCL21 tiene una larga cola C-terminal que contiene 32 aminoácidos de los cuales 12 son residuos básicos [36] que permiten la unión a GAGs y otras moléculas. Dicha unión puede ser requerida para una eficiente presentación de CCL21 en la superficie de células endoteliales y otras células [36, 37, 38].

Como resultado de la duplicación génica, en ratón existen dos genes que codifican variantes de CCL21 funcionales. CCL21-Leu, el cual contiene una leucina en la posición 65, es expresada en vasos linfáticos de órganos no linfoides como el pulmón, colon, estómago, corazón y piel, mientras CCL21-Ser es expresada en órganos linfoides como el

timo, ganglios linfáticos y el bazo. De manera interesante, el genoma humano aparentemente sólo tiene el gen que codifica CCL21-Leu [39]. En órganos linfoides secundarios de ratón y de humano, CCL21 es producida por células reticulares fibroblásticas en el área rica en linfocitos T; además, en ratón también es expresada en las HEVs [40]. En los ganglios linfáticos, las células reticulares fibroblásticas parecen ser la única fuente de CCL19 tanto en humanos como en ratones [41].

Al igual que todos los receptores de quimiocinas, CCR7 es un GPCR. El receptor CCR7 es expresado por células dendríticas, timocitos durante etapas definidas del desarrollo, linfocitos B y T vírgenes, linfocitos T reguladores y en linfocitos T de memoria. Además, CCR7 es expresada también por diferentes células que no forman parte del sistema inmune.

A pesar de la afinidad similar a CCR7, CCL19 y CCL21 inducen diferentes efectos a través del receptor. CCL19 estimula efectivamente la fosforilación de CCR7 y su internalización dejando una pérdida de sensibilidad del receptor [42, 43]. Lo anterior implica que la respuesta celular a CCL19 puede tener un lapso corto a diferencia de la respuesta por CCL21. También, CCL19 puede desensibilizar el receptor hacia un estímulo subsecuente con CCL21 pero no viceversa. Aún no está claro como esta señalización diferencial influye en las funciones celulares en ambientes que contienen ambas quimiocinas.

Los ligandos CCL19 y CCL21, junto con CCL25, se unen también con alta afinidad a otra proteína superficial llamado receptor de quimiocina CC-X (CCX-CKR). CCX-CKR no se asocia a vías de señalización características de proteína G y ha mostrado internalizar sus ligandos y reutilizar ó posiblemente transportarlos, de ese modo actuando como un interceptor de quimiocina [44].



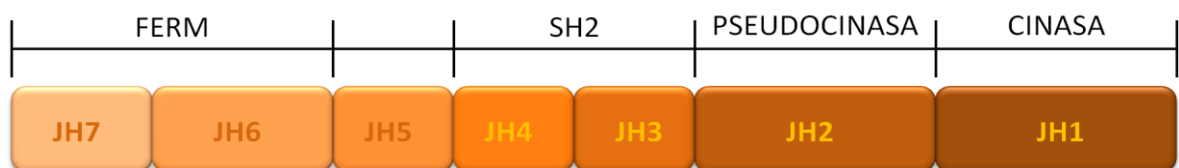
Muchos de los linfocitos T entran a los ganglios linfáticos vía HEVs, probablemente siguiendo un programa de pasos secuenciales de interacción y adhesión a las células endoteliales. En ratones deficientes de CCR7, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer están carentes de linfocitos T [45]. Siguiendo ensayos de transferencia en recipientes silvestres, los linfocitos T deficientes de CCR7 no pueden llegar a los ganglios linfáticos; sin embargo, están presentes en el bazo donde se acumulan en la pulpa roja y son completamente excluidos de la pulpa blanca. Aunque CCR7 ha sido identificado como un receptor de llegada hacia ganglios linfáticos, existe evidencia de que este receptor está involucrado en la recirculación de los linfocitos [46, 47].

## 1.5 CINASA JANUS

Las cinasas Janus (Jak) son proteínas cinasas de tirosina que se encuentran en el citoplasma de las células. En mamíferos, la familia de Jak consta de cuatro miembros; Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2 las cuales están involucradas en el crecimiento celular, sobrevivencia, desarrollo y diferenciación de células del sistema inmune (revisado en [48, 49, 50]).

Las Jaks están compuestas de más de 1 000 aminoácidos por lo que son consideradas unas proteínas grandes. Se han identificado 7 regiones homólogas Jak (JH1 a JH7) las cuales forman el dominio estructural de los miembros de la familia Jak (Figura 5).

El dominio catalítico con actividad cinasa (JH1) se encuentra en el extremo carboxilo terminal, directamente precedida por el dominio enzimático inactivo pseudocinasa (JH2) el cuál es una característica única en Jaks. El dominio JH2 pseudocinasa tiene funciones esenciales reguladoras.



**Figura 5.** Dominios de la proteína Jak.

En seguida, se encuentran los dominios JH3-JH4 que corresponden a un dominio tipo SH2, al cual no se le ha asociado alguna actividad, y los dominios JH6-JH7 corresponden al dominio homólogo 4.1, ezrina, radixina, moesina (FERM). El dominio FERM está compuesto por 300

aminoácidos y está implicado en mediar las interacciones con las proteínas transmembranales como los receptores de citocinas. Adicionalmente, este dominio regula positivamente la actividad catalítica del dominio cinasa [51].

En mamíferos Jak1, Jak2 y Tyk2 se encuentran expresados ampliamente. En contraste, Jak3 es expresada principalmente en células hematopoyéticas y está altamente regulada en el desarrollo y activación celular. A nivel celular, las Jaks están localizadas en endosomas y asociadas a las regiones próximas a la membrana cerca de los receptores [52, 53].

Un gran número de citocinas dependen de Jak1, incluyendo la familia que usa una subunidad de receptor llamada cadena común  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ), que incluye IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y IL-21. Estas citocinas son dependientes de Jak3 porque, al igual que Jak1, se une de manera constitutiva a la cadena  $\gamma_c$ . Jak1 es esencial para otra familia que usa la subunidad de receptor gp130 (IL-6, IL-11, oncostatina M, Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), Factor neutrófico ciliárico (CNF), como también el Factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) e Interferones (INFs). Jak2 es esencial para otras citocinas que actúan como hormonas, como la hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y la familia de citocinas que señalizan a través del receptor de IL-3 (IL-3, IL-5 y el factor de estimulación de colonia de granulocitos y macrófagos, GM-CSF). Jak2 es importante también para citocinas que usan el receptor gp130 y para algunos INFs.

Tyk2 está implicada en la señalización de INF e IL-12 pero no en INF- $\alpha/\beta$  o para citocinas que usan gp130.

### **1.5.1 Vía Jak/STAT**

La proteína a través de la cual las Jaks ejercen principalmente su actividad son los transductores de señales y activadores de transcripción (STAT). En mamíferos, existen 7 genes STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Las proteínas STAT están inactivas como factores de transcripción en ausencia de estimulación de receptor específico, y se encuentran localizadas en el citoplasma en células sin estimular (revisado en [50]).

Las Jaks se unen específicamente a dominios intracelulares de las cadenas del receptor de citocinas. Tras la unión de citocinas al receptor se induce la homo o heterodimerización de los receptores permitiendo la transfosforilación y activación de la Jak asociada, la cual fosforila al receptor creando un sitio de reclutamiento para las STATs a través del dominio SH2. Los factores de transcripción son fosforilados por Jak y forman homodímeros o heterodímeros de las proteínas. Los dímeros de STAT son transportados del citoplasma al núcleo para unirse al DNA y regular la expresión de genes.

La afinidad del complejo STAT-DNA para un promotor natural es determinado por interacciones cooperativas dímero-dímero mediante aminoácidos del extremo amino terminal.

Diversas cinasas de proteínas, incluyendo MAP cinasas, fosforilan STATs en residuos de serina permitiendo a otras vías de señalización potenciar el primer estímulo de activación de STAT.

### **1.5.2 Regulación de la vía Jak/STAT.**

Como otras cinasas de tirosina, las Jaks se autofosforilan. La autofosforilación en el sitio de activación regula positivamente la actividad cinasa; sin embargo, en Jak3 la fosforilación en esta región

puede aumentar o inhibir la actividad catalítica dependiendo del sitio de fosforilación [54]. Recientemente, dos nuevos sitios de fosforilación de tirosinas (Y904 y Y939) que se encuentran en el dominio JH1 fueron identificados los cuales regulan positivamente la actividad de Jak3 [55]. Un residuo conservado en Jak2 y Jak 3 que reside en la región entre JH1 y JH2 es un sitio prominente de autofosforilación (Tyr813 en Jak2 y Tyr 785 en Jak3) [56]. Este sitio sirve para reclutar la proteína adaptadora SH2-B $\beta$ , que regula positivamente la actividad de Jak2.

La regulación negativa de la vía JAK-STAT puede estar dada por la internalización y degradación del receptor; por fosfatasas de tirosina, como CD45 y SHP-1, que actúan a nivel del complejo receptor-cinasa ó en el núcleo por defosforilación de dímeros de STAT y reciclamiento.

Otro mecanismo de regulación de la señalización de Jak es mediado por la proteína supresora de señalización de citocinas (SOCS) y la proteína inducible por citocina SH2-domain-containing (CIS). SOCS1 a SOCS7 y CIS están compuestas por un dominio central SH2, una caja SOCS en el extremo carboxilo terminal y un dominio variable en el extremo amino terminal. La caja SOCS funciona como una ligasa de ubiquitina E3. La región amino terminal parece ser responsable de la degradación de la proteína. SOCS1 y SOCS3 contienen una región inhibitoria de cinasa (KIR) que inhibe la actividad de Jak actuando como un pseudosustrato [57, 58].

## **1.6 DEFICIENCIA DE JAK 3**

La deficiencia de Jak3 se ha reportado frecuentemente en humanos. El análisis de pacientes con formas autosomales recesivas de SCID (síndrome de inmunodeficiencia severa combinada) revelaron que mutaciones homocigotas de Jak3 pueden causar la enfermedad [59, 60]. Debido a que la enfermedad se relaciona sólo con células del sistema inmune, los pacientes con Jak3-SCID son tratados mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas [61].

### **1.6.1 Ratón Jak 3 -/-**

El ratón Jak 3 -/- se generó por medio de la inserción del gen de resistencia a neomicina, el cual reemplazó secuencias que codifican para los subdominios I-IV del dominio cinasa de Jak3, provocando la deficiencia en la actividad enzimática de la cinasa [62].

Los ratones homocigotos Jak3 -/- son sanos y no muestran grandes diferencias en el tamaño o peso comparado con los ratones silvestres; sin embargo, se encuentran diferencias significativas en el desarrollo de células B y T.

En médula ósea de los ratones Jak3 KO, el número total de células no muestra diferencias con respecto a los ratones silvestres; sin embargo, el desarrollo de linfocitos B se ve afectado a nivel de pre-B, ya que no se encuentran linfocitos B inmaduros ni maduros. En contraste, no se afectan los números de células Mac1+.

El timo de ratones Jak3 -/- es hipoplásico, mostrando números totales de los timocitos ampliamente (10-100 veces) menores que los ratones Jak3+/+. Además, se presenta un incremento en las células SP

CD4+CD8-, respecto a las CD8+CD4-, al igual que en ratones deficientes de la cadena  $\gamma$ c.

En el bazo de los ratones deficientes de Jak3 se observa una alta celularidad (hiperplasia), entre 10 a 500% con respecto a ratones silvestres. Además, se muestra también el bloqueo en la maduración de linfocitos B. La fracción de linfocitos T está generalmente normal aunque se muestra sustancialmente más células CD4+ y menos células CD8+. Notablemente, los linfocitos T presentan un fenotipo "activado", ya que se encuentran altamente expresados distintos marcadores de activación. Además, el tamaño de los linfocitos T deficientes de Jak3 es mayor que el de linfocitos T silvestres.

En contraste con el bazo, los ganglios linfáticos y placas de Peyer en ratones Jak3-/- no se pueden detectar, lo cual implica una deficiente migración de los linfocitos a través de las HEV, que está mediada por CCR7 [63].

Jak3 está asociado a IL-15R que es esencial para el desarrollo de células NK y Células T  $\gamma\delta$  de intestino. Esto explica porque las células NK no se encuentran en periferia del ratón deficiente de Jak3 y también en pacientes con SCID basado en mutación de Jak3.

La proliferación y la capacidad de responder a citocinas de células T periféricas deficientes de Jak3 están severamente dañadas. Aunque las células T deficientes de Jak3 pueden ser activadas por medio del TCR con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, no pueden proliferar y por el contrario son más susceptibles a la apoptosis [64].

Estudios in vitro, demostraron que los linfocitos T cooperadores de ratones Jak 3 KO, después de su estimulación con anti-CD3, no parecen adoptar un fenotipo alternativo parecido a células reguladoras inducibles (CD25- Foxp 3+); sin embargo, secretan grandes cantidades de TFG $\beta$  e

IL-10 [65]. Además, la señalización de IL-2 e IL-7, dos citocinas mayormente involucradas en la proliferación de células T y la expansión homeostática, están dañadas en el ratón Jak3 KO, lo cual concuerda con una mayor susceptibilidad a apoptosis de las células T Jak 3 -/- activadas.

### **1.6.2 Jak/STAT y quimiocinas.**

Aunque la vía Jak/STAT ha sido principalmente implicada en la señalización por citocinas, existe evidencia que dicha vía está involucrada en diferentes GPCR como el receptor de Angiotensina AT1, receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos y receptores de quimiocinas.

La participación de cinasas Janus en la señalización mediada por quimiocina se ha demostrado por la asociación de la fosforilación temprana de Jaks y STATs después de la unión de quimiocinas a sus receptores.

La primera evidencia de la participación de cinasas Janus en la señalización mediada por quimiocina fue que CCL2 es capaz de inducir la rápida fosforilación y asociación de Jak2 al receptor CCR2 en líneas celulares de monocitos humanos (Mono Mac1), teniendo como consecuencia la fosforilación de STAT3. [66]

Otro receptor de quimiocina que ha sido estudiado es CCR5. Se demostró que CCL5 induce la activación de STAT 1 y 3 en líneas celulares de linfocitos T humanos. Además, usando líneas celulares de linfocitos T transfectadas con CCR5, se demuestra que CCL5 es capaz de inducir asociación de Jak2 y 3 a CCR5. [67]



Además, las quimiocinas CXC pueden activar la vía Jak/STAT. En un estudio se demostró que SDF-1 (CXCL12) es capaz de inducir dimerización de CXCR4 permitiendo la fosforilación del receptor, el cual involucra la activación y reclutamiento de Jak3 en líneas celulares de Linfocitos T humanos. Dicha activación permite la fosforilación de STAT 1, 2, 3 y 5 pero no de STAT 4 y 6 [68].

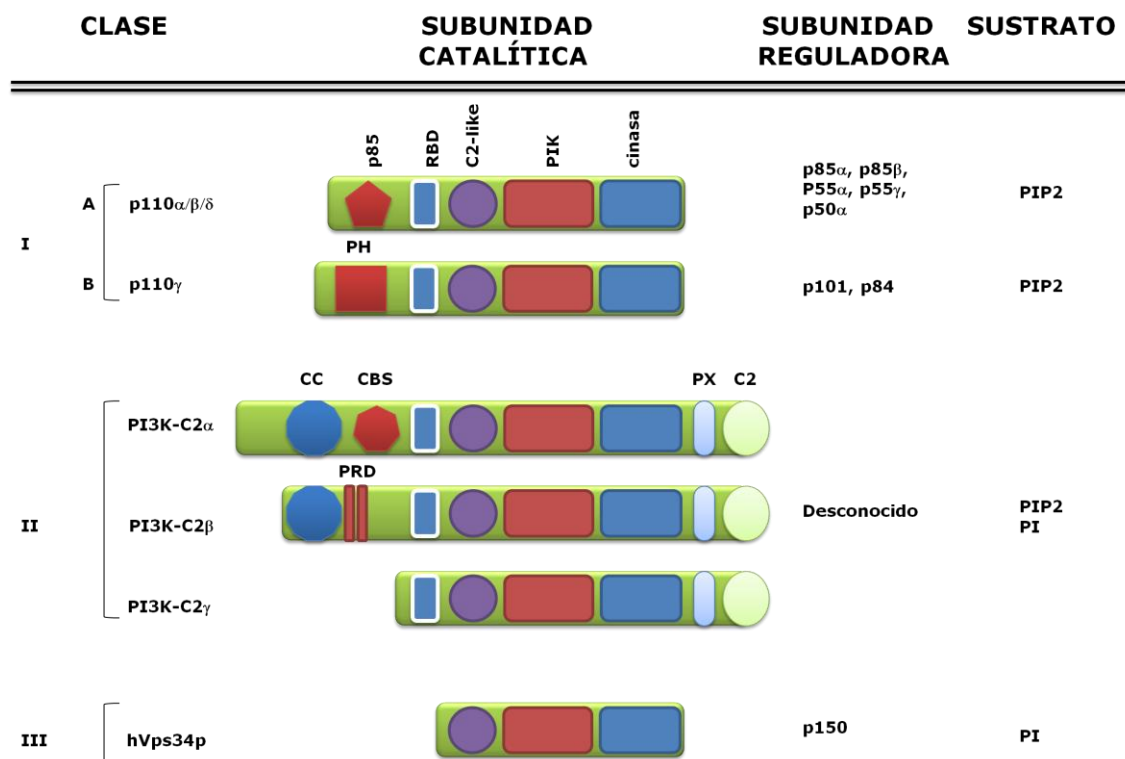
Por otro lado, se ha demostrado que Jak3 participa en la señalización a través de CCR9 y CXCR4 en progenitores de médula ósea y timocitos [69]. Además, se demuestra que el problema en el desarrollo de linfocitos T deficientes de Jak3 puede ser, en parte, el resultado de un decremento en la migración de progenitores tímicos de la médula ósea al timo, y/o por el decremento en la migración a través de diferentes compartimentos del timo.

Finalmente, se ha demostrado que Jak3 se fosforila en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21 en células de ganglios linfáticos y que la inhibición farmacológica de Jak3 o el uso de linfocitos T vírgenes deficientes de Jak3 resulta en deficiencia en las respuestas quimiotácticas hacia dichos ligandos, indicando que Jak3 es requerida para la migración mediada por CCR7 [63]. Además, se demostró que los linfocitos T deficientes de Jak3 tienen defectos intrínsecos para llegar a órganos linfoides periféricos mediante experimentos de transferencia adaptativa y ensayos competitivos de homing.

## 1.7 FOSFATIDILINOSITOL 3 CINASA (PI3K)

Las Fosfatidilinositol 3 cinasas (PI3Ks) son una familia de enzimas que regulan diversas funciones biológicas, como supervivencia y crecimiento celular, así como migración, en todos los tipos celulares (revisado en [70]). PI3K genera segundos mensajeros lipídicos ya que fosforila la cabeza de fosfatidilinositoles (PIP) en la posición 3' y el efecto de PI3K es transmitida a través de estos productos.

La familia se puede dividir, en base a sus sustratos y a la homología en la secuencia, en tres clases: clase I, clase II y clase III (figura 6).



**Figura 6.** Familia de PI3K. C2-like (dominio homólogo PKC 2), CBS (sitio de unión a clatrina), CC (dominio "colied-coil"), p85 (sitio de unión de p85), PRD (dominio rico en prolina), PX (dominio fox), RBD (sitio de unión de RAS).

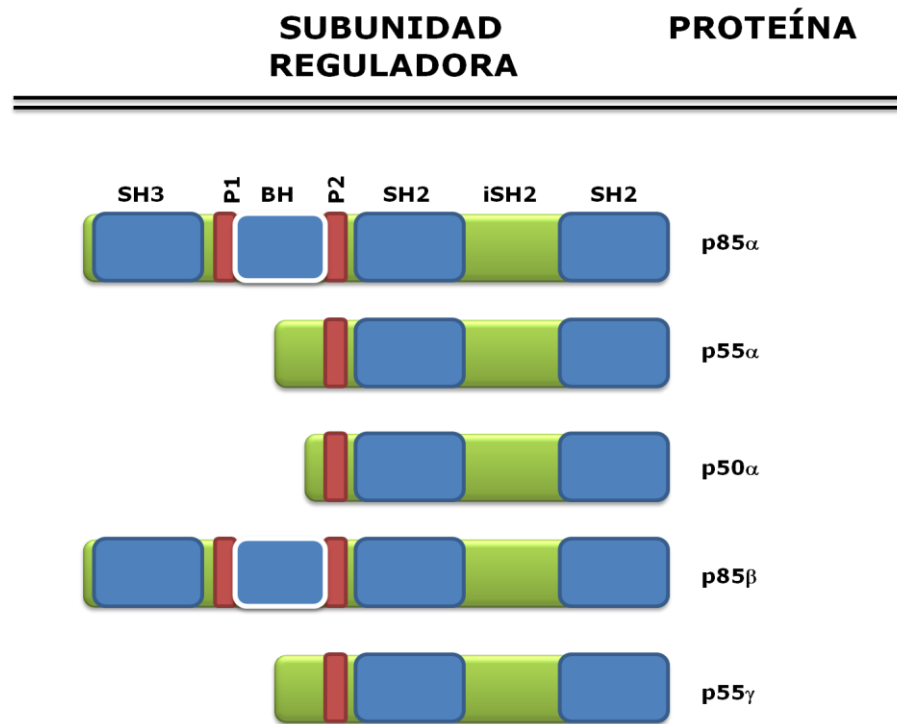
### 1.7.1 PI3K clase I.

La clase I de PI3K está subdividida en dos grupos: la clase IA y la clase IB. Ambas son estructuralmente cercanas, existiendo en heterodímeros estables comprendiendo una subunidad catalítica altamente homóloga de 110kDa y una subunidad reguladora estrechamente asociada.

La función de PI3K clase I es convertir moléculas de fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato ( $PIP_2$ ) en fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato ( $PIP_3$ ) en el citoplasma cerca de la membrana celular.  $PIP_3$  actúa como un sitio de unión para numerosas enzimas intracelulares que contienen dominios PH con selectividad por este lípido. Probablemente el más importante de estas enzimas es la cinasa de serina/treonina AKT/PKB, la cual tiene una importante participación en proliferación celular, crecimiento, sobrevivencia y metabolismo en muchos tipos celulares.

La clase IA de PI3K es activada por receptores asociados a cinasas de tirosina, incluyendo receptores de antígenos, coestimuladores y receptores de citocinas, así como por la señalización a través de Ras. Existen tres isoformas catalíticas:  $p110\alpha$  y  $p110\beta$ , las cuales están distribuidas ampliamente en los tejidos; y  $p110\delta$ , el cual tiene un patrón de expresión restringido a células leucocitarias. Todas se unen a una de cinco subunidades reguladoras ( $p85\alpha$ ,  $p85\beta$ ,  $p55\alpha$ ,  $p55\gamma$ ,  $p50\alpha$ ) (figura 7) (revisado en [71]). Las subunidades reguladoras más abundantes son  $p85\alpha$  y  $p50\alpha$ , con baja cantidad de  $p85\beta$  (revisado en [72]). Las subunidades reguladoras consisten dominios SH2 dispuestos en tándem con una región entre ellas, la cual es el sitio de unión a las subunidades catalíticas. Los dominios SH2 se unen a tirosinas fosforiladas en

dominios citoplasmáticos de receptores, y de esta manera, reclutan a las subunidades p110 a la membrana donde fosforilan a los PIP<sub>2</sub> (revisado en [73]).



**Figura 7.** Subunidades reguladoras de la clase IA. SH: dominio SH. BH: dominio BH. iSH2: intermedio de dominios SH. P: dominios ricos en prolina.

Por otro lado, la clase IB está constituida por la isoforma catalítica p110 $\gamma$ , expresada en leucocitos, unida a las subunidades reguladoras p101 o p84 y es activada principalmente por la señalización vía GPCRs por la unión a la proteína G $\beta\gamma$  y por Ras. Sin embargo, también algunos GPCRs, incluyendo receptores de quimiocina, activan a la clase IA de PI3K (revisado en [74, 75]).

Existe evidencia que demuestra la unión de p110 $\beta$  a GPCRs tanto en estudios *in vitro*, donde muestran la activación de p110 $\beta$  por subunidades G $\beta\gamma$  [76, 77], como en experimentos celulares, donde la

función de p110 $\beta$  fue probada por la microinyección de un anticuerpo neutralizante de p110 $\beta$  [78, 79], RNA de interferencia contra p110 $\beta$  [80] o la expresión de p110 $\beta$  [80, 81]. Evidencia reciente utilizando células derivadas de ratón con una inactivación condicional genética de p110 $\beta$ , ha revelado que tanto p110 $\beta$  como p110 $\gamma$  pueden unirse redundantemente al mismo GPCR agonista, incluyendo algunas quimiocinas [82].

Los efectos producidos por PIP<sub>3</sub> son contrarrestados por las fosfatasas de lípidos PTEN (fosfatasa y tensina homóloga deletado en cromosoma 10) y SHIP (fosfatasa de inositol que contiene SH2), los cuales convierte dichos lípidos en PI(4,5)P<sub>2</sub> y PI(3,4)P<sub>2</sub> respectivamente [83].

### **1.7.2 PI3K clase II.**

La clase II de PI3K, en donde hay tres isoformas in mamíferos (PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$ , PI3K-C2 $\gamma$ ), está ampliamente asociada con membranas y se piensa que no requiere una subunidad reguladora.

Aunque PI3K de clase II ha sido implicada en la regulación de la adhesión celular y reorganización de actina durante migración celular, parece que su importancia ha sido subestimada debido a la escasez y acción limitada de herramientas farmacológicas contra estas isoformas.

### **1.7.3 PI3K clase III**

Existe sólo una proteína de clase III, Vps34 (proteína vacuolar de selección 34) el cual requiere una subunidad reguladora, p150, para su actividad. Vps34 contribuye a la integración de la respuesta celular debida al cambio nutricional de la célula, ya que está involucrado en la regulación tanto de la autofagia como la síntesis de proteínas a través de la vía de señalización de mTOR [84].

### **1.7.4 PI3K en migración**

Considerables trabajos en modelos de neutrófilos de mamíferos y *Dictyostelium* amoeba se han enfocado en la contribución de la señalización dependiente de PI3K en los mecanismos de motilidad y quimiotaxis; sin embargo, la participación precisa de PI3K en la regulación de la migración celular aún no ha sido del todo establecida.

La polarización de la célula, que involucra procesos moleculares que conducen a la formación de un frente de migración (leading edge) y una la parte trasera (urópodo) en la célula en movimiento, lo cual es un prerrequisito para una la migración eficiente. De este modo, en el urópodo se realiza la organización central de microtúbulos en su base y mantiene una rica acumulación de moléculas de adhesión, así como la acumulación de mitocondrias para asegurar la disponibilidad de ATP en esta posición. En varios sistemas, las GTPasas pequeñas Rho, Rac y Cdc42 tienen un papel clave en la regulación de la polarización y la morfología de células en migración a través de los efectos en el citoesqueleto de actina y la contracción de actomiosina, los cuales

usualmente involucran la activación de otros elementos como PI3K (revisado en [72]).

De manera interesante, se ha observado que la subunidad reguladora  $p85\alpha$ , además de su función reguladora, puede estimular, de manera independiente, vías de señalización involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina [85, 86]. Existe evidencia que demuestra que el dominio BH de  $p85\alpha$  une a Cdc42, la cual es una GTPasa pequeña que controla el citoesqueleto de actina, pudiendo contribuir a la activación de p110 [87]; sin embargo, el dominio BH de  $p85$  no activa a Cdc42.

Aunque la remodelación de actina está mediada por la familia Rho de GTPasas, PI3Ks son importantes para mantener la polaridad y definir el frente de migración de la célula, como también para una eficiente migración. Existen "loops" de retroalimentación positiva, que involucran a la GTPasa Rho y la señalización de PI3K, los cuales tienen el propósito de integrar y amplificar la señalización celular, por tanto ambos son requeridos para una eficiente migración celular (revisado en [71]).

La polarización y migración de los linfocitos T requiere de la rápida formación de F-actina dirigida por Rac en el frente de migración de la célula. En linfocitos T y B vírgenes, la formación temprana de F-actina inducida por quimiocinas es iniciada por el GEF (guanine-nucleotide-exchange factor) de Rac, DOCK 2 (dedicator of cytokinesis). La motilidad intersticial de linfocitos T y B deficientes de DOCK2 en tejido linfoide es mucho más baja [88]. Además, DOCK2 es requerida para la adhesión de linfocitos T humanos promovidos por quimiocina, la cual es mediada por la integrina  $\alpha4\beta1$  [89]. Se ha propuesto que otra Rac GEF, Tiam1 (linfoma de linfocitos T invasión y metástasis 1), actúa subsecuentemente a DOCK2 durante la estabilización del eje frente de migración-urópodo después de la regulación positiva inicial de F-actina

por DOCK2. A pesar de lo anterior, el ratón deficiente de Tiam1 tiene su estructura y celularidad linfoide normal, en contraste con el ratón deficiente de DOCK2 o  $G\alpha_{i2}$ .

Existen fuertes evidencias farmacológicas y genéticas de que la señalización dependiente de Rho es un componente clave de la migración y adhesión en respuesta a varias quimiocinas en linfocitos T maduros y timocitos [90, 91, 92]. La activación de RhoA parece ser necesaria para la activación de integrinas inducida por Rap1 y Rac en timocitos. Al parecer, RhoA controla a la integrina  $\alpha L\beta 2$  en su estado de alta afinidad inducido por quimiocinas, como también la movilidad lateral inducida por quimiocinas [93]. Además, las forminas se encuentran río abajo de los efectores de RhoA, los cuales son factores de ensamblaje de actina. En contraste con Arp2/3 (proteína 2/3 relacionada a actina), la cual crea ramificaciones en la red de actina, las forminas generan filamentos de actina [94].

Varias GEFs, particularmente aquellas con especificidad por Rac, son reguladas por IPs (Inositolfosfatos), mientras que la actividad de PI3K puede ser modulada por Rho GTPasas [95, 96, 97]. Además, otro efector río abajo de PI3K, la cinasa de serina/treonina Akt, ha sido implicado en la polimerización de F-actina y el ensamblaje de miosina [98, 99, 100, 101].

La actividad de Rac, la cual está involucrada en la promoción de la formación del frente de migración mientras que la actividad de RhoA está restringida a los lados o la parte final de la célula, puede estar sustentada a través de "loops" de retroalimentación que ayudan a mantener la protuberancia direccional; además, como Rac puede interactuar con la subunidad reguladora de PI3K clase IA p85, se puede estimular más reclutamiento de PI3K en el frente de migración para producir  $PIP_3$  los cuales activan Rac GEFs [102].



PI3Ks contribuyen en varios aspectos de la maquinaria migratoria, incluyendo la detección del gradiente, amplificación de la señal, reorganización de actina y, por ende, la motilidad celular [103, 104, 105]. En contraste con la distribución de los receptores de quimiocinas y proteínas G, los niveles de PIP<sub>3</sub> se vuelven altamente polarizadas en amebas, neutrófilos y líneas celulares parecidas a neutrófilos, los cuales se encuentran cercanos al frente de migración.

Dado que la interacción de las quimiocinas con los GPCRs en linfocitos ha demostrado ser dependiente predominantemente de proteínas G $\alpha_i$ , se supone que estos receptores están acoplados a la isoforma p110 $\gamma$  dependiente de G $\beta\gamma$ , aunque varios GPCRs pueden activar a otras isoformas de PI3K. Estudios recientes revelaron que la migración mediada por quimiocinas de líneas celulares de T y linfocitos T primarios en ensayos *in vitro* es entorpecida por los inhibidores de PI3K. Además, la migración *in vitro* de linfocitos T deficientes de p110 $\gamma$  hacia CXCL12, CCL19 y CCL21 está significativamente disminuida en comparación con las células silvestres [106]. Además, la migración de linfocitos T obtenidos de sangre periférica de humano es inhibida por inhibidores de p110 $\gamma$  pero no por otros inhibidores dirigidos a las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$  [107], aunque la selectividad de muchos de estos inhibidores para con sus blancos no es absoluta.

Sorprendentemente, en ensayos de migración que probablemente representen mejores condiciones fisiológicas, los inhibidores de PI3K tienen un menor efecto en la migración de linfocitos T. Por tanto, la migración de linfocitos T entorpecida por los inhibidores de PI3K es un fenómeno restringido a ensayos *in vitro* a través de membranas en ausencia de células endoteliales.

Al parecer, el estado de activación de la célula ayuda a determinar si PI3K es requerida para la respuesta migratoria hacia los

quimioatrayentes. En consideración con lo anterior, ensayos *in vitro* han revelado que la migración de linfocitos T humanos recién aislados es dependiente de PI3K, pero después de mantenerlos *ex vivo* y activarlos, la respuesta migratoria se vuelve independiente de PI3K [108].

El análisis de ratones deficientes de DOCK2 y/o p110 $\gamma$  ha revelado que, aunque DOCK2 es la molécula predominantemente requerida para la migración de linfocitos T, p110 $\gamma$  puede mantener una respuesta migratoria residual. Por tanto, la migración óptima de linfocitos T *in vivo* es dependiente de la expresión tanto de DOCK2 como de p110 $\gamma$  [109]. Existe también evidencia indirecta de que PI3K puede contribuir a la polimerización de actina dependiente de DOCK2, como en otros tipos celulares PIP<sub>3</sub> puede unir a la proteína adaptadora ELMO por el dominio PH, la cual se asocia con homólogos de DOCK2 y se localiza en las ondas de la membrana [110]. De manera importante, un estudio más reciente reportó que no se observó ningún defecto en la migración de células deficientes de p110 $\gamma$  hacia ganglios linfáticos *in vivo* [111]. La pérdida genética de p110 $\gamma$  o los inhibidores selectivos de PI3K causan reducciones en la respuesta quimiocinética de las células (más que la habilidad para moverse hacia el gradiente) que pueden explicar algunas de las aparentes reducciones en la migración quimiotáctica. A pesar de que los linfocitos T deficientes de p110 $\gamma$  muestran defectos mínimos en la migración *in vitro* e *in vivo*, es notable que los inhibidores de PI3K, como wortmanina o Ly294002, bloquean efectivamente la migración *in vitro* e *in vivo* de linfocitos T vírgenes [106, 107]. Lo anterior puede reflejar la participación de otras isoformas de PI3K en la migración celular.

Por otro lado, un grupo de investigadores revelaron una reducción modesta en la media de velocidad en linfocitos T y B tratados con wortmanina comparados con los controles no tratados [112].

Complementariamente, células deficientes de las subunidades reguladoras ( $p85\alpha$ ,  $p55\alpha$ ,  $p50\alpha$ ,  $p85\beta$ ), deletadas genéticamente, muestran un decremento significativo en la velocidad y una pérdida marcada de la polarización celular. Estos resultados apoyan la participación de las subunidades catalíticas de PI3K; sin embargo, el efecto podría deberse a la inhibición de otras clases de PI3K.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Inicialmente, se había descrito que la actividad de Jak estaba ligada a la fosforilación de los factores de transcripción STAT en respuesta a la unión del ligando con el receptor de citocinas. Sin embargo, recientemente existe gran evidencia, incluyendo la de nuestro laboratorio, que demuestra la participación de Jaks en otros tipos de receptores GPCRs, entre los que se encuentran los receptores de quimiocinas.

En ratones deficientes de Jak 3, una de las características distintivas es la falta de ganglios linfáticos. Se ha demostrado, por medio de quimiotaxis realizadas con linfocitos T deficientes de Jak 3 y por ensayos de transferencia de células Jak 3<sup>-/-</sup> a ratones receptores silvestres, que los linfocitos T son incapaces de migrar a los ganglios periféricos en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21 [63].

PI3K es una molécula que se encuentra ampliamente distribuida en los tipos celulares, en especial la clase IA. Además, ha sido vinculada con el proceso de migración ya que diversas isoformas de PI3K participan en diferentes etapas de la migración, como la detección del gradiente, amplificación de la señal y la reorganización de actina.

Debido a que se desconoce la vía de señalización por la cual Jak 3 puede participar en la respuesta migratoria mediada por el receptor CCR7, el objetivo de este trabajo es conocer si PI3K, específicamente la subunidad reguladora p85 $\alpha$ , puede estar implicada en la señalización río debajo de CCR7 dependiente de Jak 3 en linfocitos T.

### **3. HIPÓTESIS**

PI3K está involucrada en la señalización mediada por CCR7 y la activación de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  de PI3K en respuesta a CCL21 estará afectada en ratones deficientes para Jak 3.

### **4. OBJETIVOS**

Estudiar la participación de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  en la señalización mediada por CCR7 dependiente de Jak3 en linfocitos T.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Evaluar la fosforilación de PI3K (p85 $\alpha$ ) en respuesta a la estimulación con CCL21 en linfocitos T a través del tiempo.
- Determinar y comparar la fosforilación de PI3K (p85 $\alpha$ ) de linfocitos T Jak 3 +/+ y Jak 3 -/- en respuesta a la estimulación con CCL21.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los reactivos que se utilizaron se encuentran descritos en el Anexo A.

### **5.1 Obtención de DNA.**

Se cortaron aproximadamente 0.5 cm de las colas de los ratones Jak3 y se colocaron en tubos ependorff de 1.5mL. Se les añadió 600 $\mu$ L de una solución de NaOH 50mM y se les mantuvo en calentamiento a 90-100 °C durante 1-2 horas, hasta que la cola cortada se disgregara completamente. Después, se incubaron a 4°C durante 10 minutos y se les añadió 50  $\mu$ l de una solución de Tris 1mM pH 8. Enseguida, los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 500 $\mu$ L). Se realizaron dos extracciones a la solución obtenida añadiendo 500 $\mu$ L de la mezcla Fenol:Cloroformo (1:1) y agitando vigorosamente. Los tubos se centrifugan a 13 000 rpm durante 10 minutos y se recupera la fase acuosa. Se realizó una final extracción añadiendo 500 $\mu$ L de Cloroformo, los tubos se centrifugaron igual que en la extracción con Fenol:Cloroformo. Finalmente, se recuperó la fase acuosa y se almacenaron a una temperatura de -20°C para su posterior uso.

### **5.2 Amplificación de los genes Jak 3 y resistencia a Neomicina.**

Mediante el uso de la técnica de PCR, los genes Jak3 y de resistencia a Neomicina se amplificaron. Las mezclas de reacción que se utilizaron se encuentran descritas en el anexo A.

Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C para su uso posterior.

### **5.3 Identificación de los genes Jak 3 y resistencia a Neomicina en geles de Agarosa.**

Se realizaron geles de agarosa 1% en TAE 1x con Bromuro de Etidio. A las muestras se les añadió 3 $\mu$ L de Buffer de carga y se mezclaron perfectamente. Se cargaron 10 $\mu$ L de las muestras al gel. El gel se corrió a 100 volts. Se tomaron fotografías de los geles con es uso de una Gel Cam (Polaroid). Debido a que el gen de Jak 3 se remplazó con el gen de resistencia a Neomicina, los ratones Jak 3 heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) amplifican el gen de resistencia a Neomicina.

### **5.4 Obtención de células.**

Para la curva de tiempo de fosforilación de PI3K $\alpha$  se obtuvieron los ganglios linfáticos de ratones Jak3 +/+, los cuales se disgregaron mecánicamente utilizando en 1mL de RPMI 0.2% Suero Fetal Bovino (SFB) y se colocaron en tubos ependorff 1.5mL. La malla se lavó con 0.5mL de RPMI 0.2% SFB y se agregó al tubo anterior. Se centrifugaron las células a 2 000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1mL de RPMI 0.2% SFB y se dejaron a 4°C hasta su uso.

Para los ensayos de fosforilación de PI3K $\alpha$  se obtuvieron los bazos de ratones Jak3 +/+ y Jak3 -/- de 4 a 6 semanas, los cuales se disgregaron mecánicamente utilizando membranas de nylon de 50 $\mu$ m en 1mL de PBS 1x y se colocaron en tubos de 15mL. La membrana se lavó con 1mL de PBS 1x y se agregó al tubo anterior. Se centrifugaron las células a 1 200 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante para, posteriormente, lisar los eritrocitos.

## **5.5 Lisis de eritrocitos.**

Se añadió 2mL de buffer de lisis ACT a los tubos con el pellet celular, los cuales se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se les agregó 6mL de PBS 1x para detener la reacción y posteriormente se centrifugaron a 1 200 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavaron 2 veces con 6mL de PBS 1x. Finalmente, las células se resuspendieron en 4mL de RPMI 10% SFB.

## **5.6 Panning.**

Como en el bazo hay una gran cantidad de linfocitos B, se requiere enriquecer la población de linfocitos T mediante el procedimiento llamado panning.

Se sensibilizaron placas con 1mL de una solución del anticuerpo B220 durante 1 hora a 37°C para que el anticuerpo se pegara a la superficie de la placa. Posteriormente se retiró la solución y se añadió a otro par de placas para sensibilizarlas. Las primeras placas se lavaron con 1mL de RPMI 10% SFB y se les agregaron las células para realizar el primer panning, se incubaron a 37°C durante 1 hora. En este proceso, los linfocitos B se unen al anticuerpo B220 y, por lo tanto, se quedan en la placa. Posteriormente, a las segundas placas que se sensibilizaron se les retiró la solución del anticuerpo y se lavaron como se dijo anteriormente. A Las placas del primer panning se les retira las células en solución y se lava con 1mL de RPMI 10% SFB, con cuidado para no despegar a los linfocitos B. Las soluciones celulares se colocaron en las placas sensibilizadas para realizar el segundo panning y se incubaron 1 hora a 37°C. Finalmente, se les retira las células en solución y se lava con 1mL de RPMI 10% SFB y se colocan en tubos de 15mL.



## **5.7 Tinción de marcadores de superficie.**

Para identificar a los linfocitos T, las células obtenidas se tiñeron los correceptores CD4 y CD8 en 100 $\mu$ L de medio RPMI 0.2% SFB utilizando los anticuerpos a-CD4 y a-CD8 acoplados a los fluorocromos APC y PECy-5 respectivamente. Se incubaron a 4°C durante 20min en la oscuridad. Se centrifugaron las células para descartar el sobrenadante a 1 200 rpm durante 5min. Se lavaron las células con 100 $\mu$ L de medio RPMI 0.2% SFB.

En el caso de las células obtenidas de bazo, se incorporó el marcador a-CD3 acoplado a FITC ó a-CD25 acoplado a FITC ya que se descartaron los linfocitos activados.

## **5.8 Ensayos de fosforilación.**

Se colocaron de 2 a 3 millones de células por muestra. Dichas células se resuspendieron en 100 $\mu$ L de medio RPMI 0.2% SFB con el estímulo correspondiente, la quimiocina CCL21 100ng/mL y Pervanadato 100 $\mu$ M, y se colocaron a 37°C durante el tiempo indicado. Se detuvo la reacción añadiendo 300 $\mu$ L de buffer Lyse-Fix 1x y se incubaron 10min a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5min y se descartó el sobrenadante. Adicionalmente, las células se lavaron con 1mL de buffer FACS.

En seguida, las células se lisaron con 100 $\mu$ L del buffer de permeabilización (buffer Perm) durante 20min a 4°C en la oscuridad. A continuación, se lavaron dos veces las células con 1mL de buffer FACS.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos de interés, las células fueron bloqueadas con el anticuerpo Fc Block durante 30min a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron como anteriormente se mencionó. Se añadió 5 $\mu$ L del anticuerpo dirigido contra la subunidad

p85 $\alpha$  fosforilada de PI3K (anti-pPI3K $\alpha$ ) y se incubaron durante 30min a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células como antes.

Debido a que el anticuerpo utilizado para marcar a PI3K es obtenido de conejo y no se encuentra acoplado a ningún fluorocromo, fue necesario añadir un anticuerpo acoplado a PE dirigido contra anticuerpos de conejo, el cual se incubó a temperatura ambiente durante 15min. Finalmente las células son lavadas con buffer FACS y se fijaron añadiendo 150 $\mu$ L de una solución de paraformaldehído 0.5% en PBS.

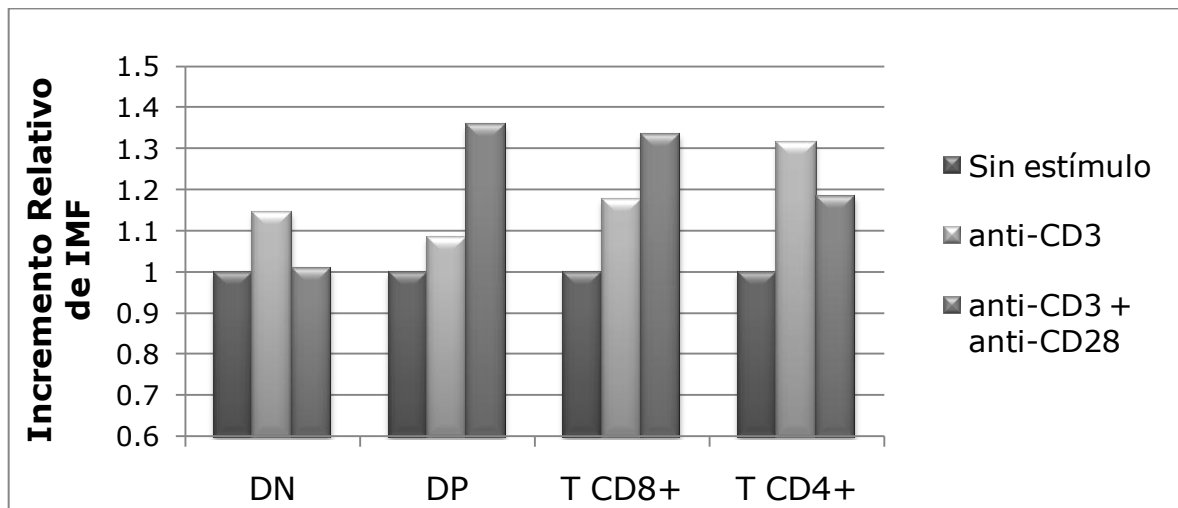
Las muestras fueron capturadas en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton & Dickinson) y analizadas con el programa FlowJo (Tristar Inc.).

## **5.9 Análisis estadístico**

Las gráficas de barras fueron expresadas como la media  $\pm$  error estándar (EE). La comparación entre los grupos se efectuó a través de la prueba T student de una cola. Los valores de  $p \leq 0.05$  implicaron el rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) y por tanto, indican que existe una diferencia significativa entre las medias de los grupos con 95% de confianza.

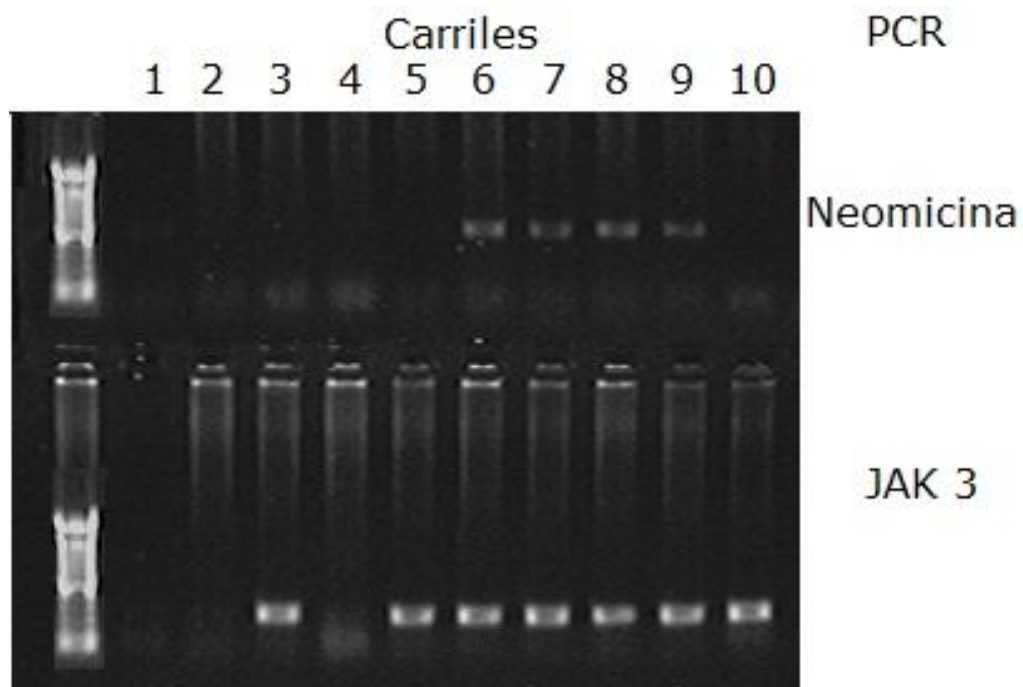
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se realizó la estandarización de la técnica de fosforilación de  $p85\alpha$  en respuesta a estímulos a través del TCR y de CD28 que se ha descrito activan la vía de PI3K. Se estimularon células de timo de ratones C57BL/6 con los anticuerpos anti-CD3 ( $7.5\mu\text{g/mL}$ ) y anti-CD28 ( $7.5\mu\text{g/mL}$ ) (figura 8). Como muestra la figura, el estímulo con anti-CD3 es capaz de inducir una fosforilación significativa de  $p85\alpha$ , que como era de esperar se ve claramente incrementada en presencia de coestimulación (anti-CD3 + anti-CD28).



**Figura 8.  $p85\alpha$  se fosforila en respuesta a la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28.** Timocitos de ratones C57BL/6 fueron estimulados durante 3 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con los siguientes anticuerpos: a) anti-CD3 ( $7.5\mu\text{g/mL}$ ), b) anti-CD3 ( $7.5\mu\text{g/mL}$ ) + anti-CD28 ( $7.5\mu\text{g/mL}$ ), ambos anticuerpos fueron entrecruzados con estreptavidina ( $15\mu\text{g/mL}$ ). Se muestra el incremento relativo de IMF con respecto al basal obtenidos de la intensidad media de fluorescencia de las condiciones mostradas. Experimento representativo.

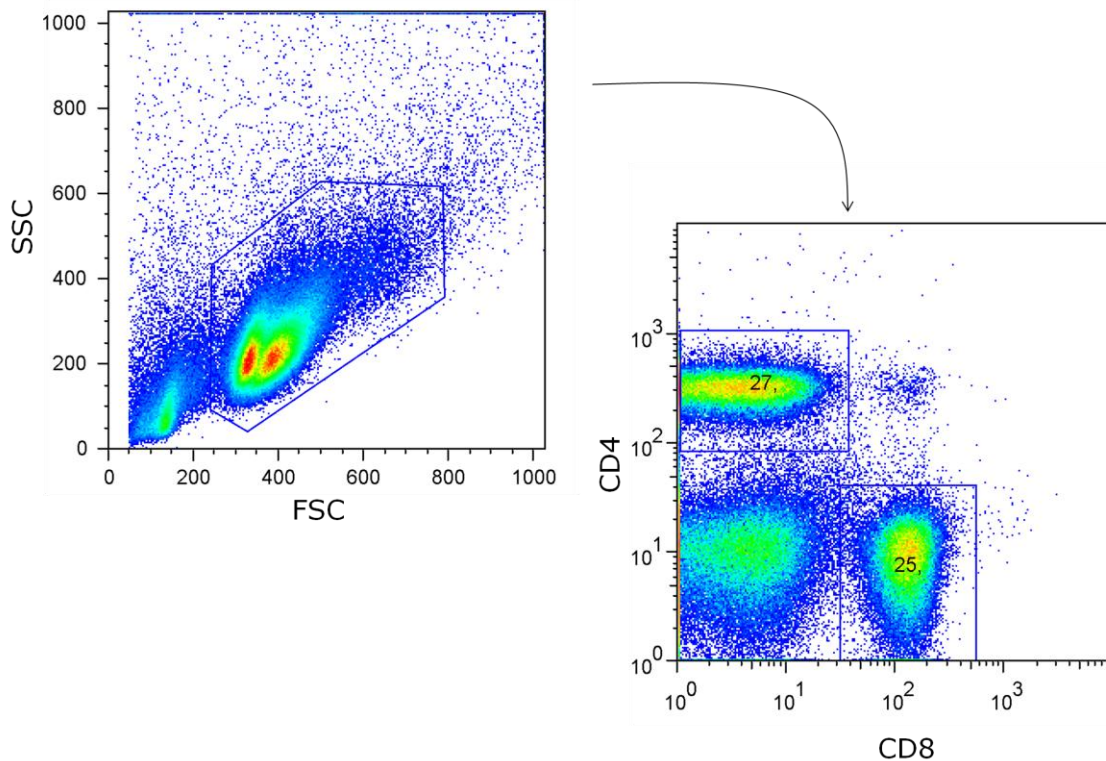
Por otro lado, los ratones de la cepa Jak 3 en fondo C57BL/6 se caracterizaron para obtener a los ratones deficientes de Jak 3 que se utilizaron posteriormente. En la figura 9 se muestra la amplificación de los genes que codifican para la resistencia a Neomicina y Jak 3. La amplificación del gen de resistencia a Neomicina y del gen de Jak 3 corresponde a ratones Jak 3 +/-, por el contrario, la amplificación sólo del gen de resistencia a Neomicina corresponde a los ratones Jak 3 -/- y la amplificación sólo del gen de Jak 3 corresponde a los ratones Jak 3 +/+.



**Figura 9. Caracterización de ratones de la cepa Jak 3.** Se amplificaron los genes de Jak 3 y de resistencia a Neomicina por medio de PCR a partir del ADN extraído de los ratones. Se utilizaron primers específicos para dichos genes (Anexo A). La presencia de los genes indica el genotipo del ratón: Jak 3 +/+, gen Jak 3; Jak 3 +/-, gen Jak 3 y de resistencia a Neomicina; Jak 3 -/-, gen de resistencia a Neomicina. Carriles 3, 5 y 10 corresponden a Jak +/+; 6, 7, 8 y 9 corresponden a Jak +/-; 2 y 4 no amplificaron; carril 1 sin carga. Imagen representativa.

## 6.1 Fosforilación de p85 $\alpha$ a través del tiempo.

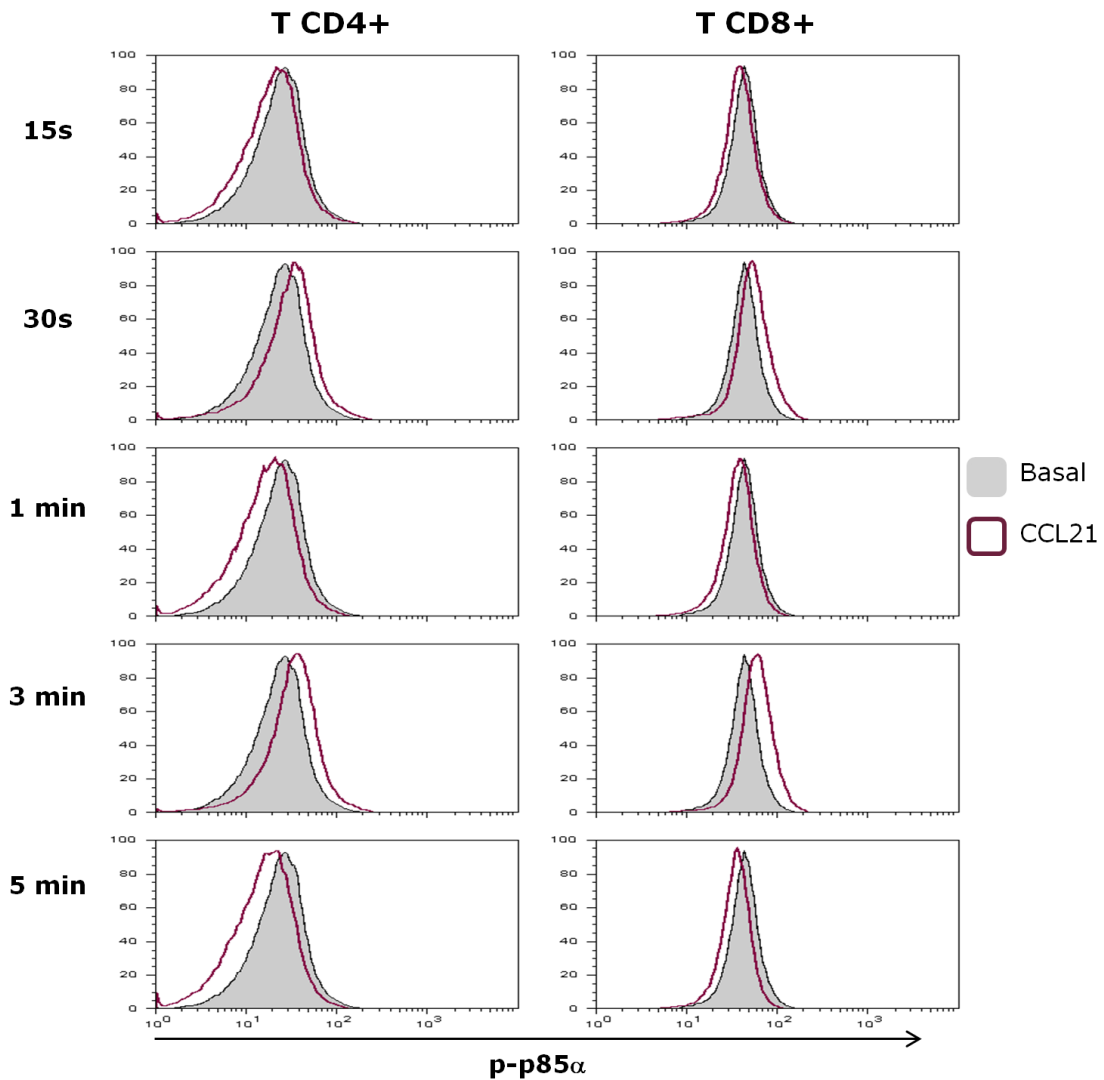
En principio, se realizó una curva de tiempo para determinar el tiempo al cual se observa un incremento en la fosforilación de p85 $\alpha$  con respecto al basal en respuesta a la estimulación con la quimiocina CCL21. Se realizaron ensayos de fosforilación con linfocitos T obtenidos de los ganglios linfáticos de ratones C75BL/6 (Jak 3 +/+), los cuales fueron estimulados con CCL21 a una concentración de 100ng/mL. Los resultados se leyeron por medio de la técnica de citometría de flujo.



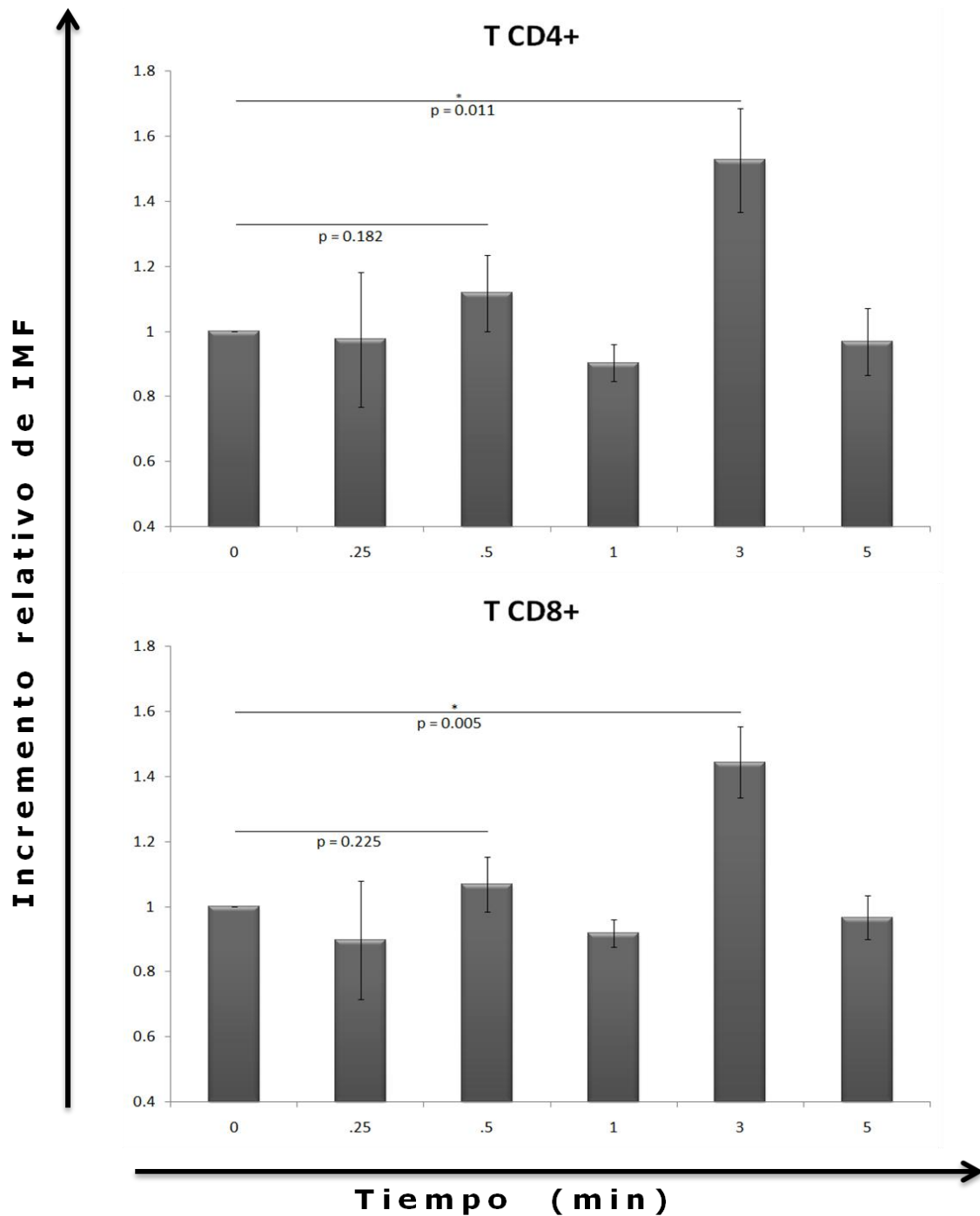
**Figura 10. Identificación de las poblaciones de células de Ganglio.** Las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD4 APC y anti-CD8 PE Cy5. Se muestra la gráfica de FSC (tamaño) contra SSC (granularidad) de donde se seleccionaron las células de tamaño y granularidad características a partir de las cuales se realizó la selección de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Para el análisis de los datos obtenidos, es necesario seleccionar la población de células de interés por lo que en una gráfica de tamaño contra granularidad se selecciona la región que caracteriza a las células que se encontraban en buen estado (vivas, con tamaño y granularidad adecuadas) al momento de ser fijadas (figura 10). En seguida, de esta región de células, se seleccionaron las dos regiones de células correspondientes a los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de acuerdo con la expresión de los correceptores CD4 y CD8.

Los datos obtenidos se representan como histogramas (figura 11) en donde se muestra la intensidad media de fluorescencia en el eje de las X. Se analiza el corrimiento de la curva hacia la derecha, tras el estímulo con la quimiocina a los tiempos correspondientes, indicando un incremento en la fosforilación. Se puede observar que la fosforilación de la subunidad p85 $\alpha$  aumenta en los tiempos correspondientes a 30 segundos y 3 minutos. Como resultado de 6 repeticiones, se realizó la prueba estadística T student obteniendo que existe un incremento significativo en la fosforilación de p85 $\alpha$  a 3 minutos, respecto al basal (figura 12).



**Figura 11. Fosforilación de p85 $\alpha$  por CCL21 en linfocitos T CD4+ Y T CD8+.** Las células fueron estimuladas durante 15s, 30s, 1 min, 3 min y 5 min con CCL21 (100ng/mL). Se utilizaron los anticuerpos anti-pPI3K (p85 $\alpha$ ) y anti-rabbit PE para observar la fosforilación de p85 $\alpha$ . Experimento representativo.



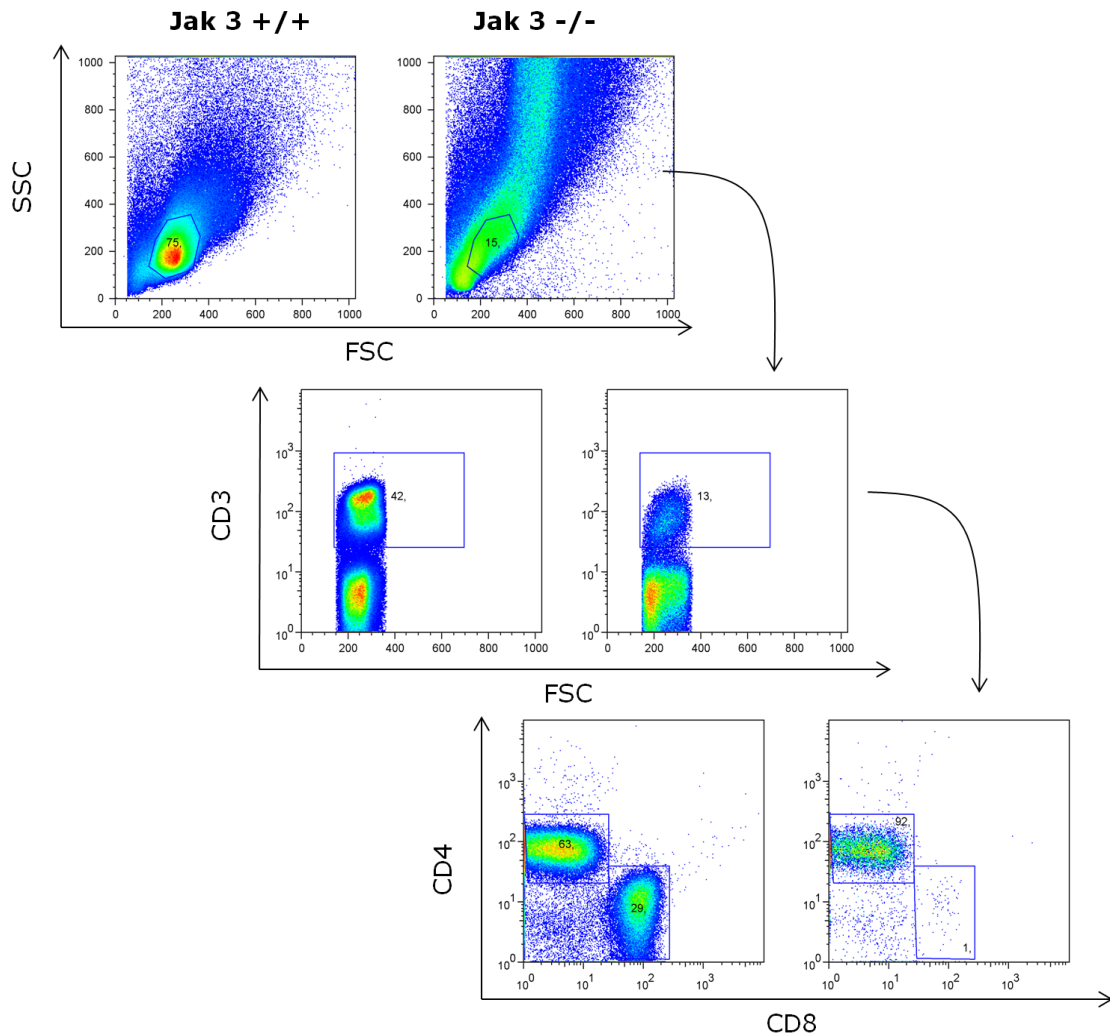
**Figura 12. La fosforilación de p85 $\alpha$  es incrementada significativamente a 3 minutos.** Las células fueron estimuladas durante 15s, 30s, 1 min, 3 min y 5 min con CCL21 (100ng/mL). Se muestra el incremento relativo de IMF con respecto al basal obtenidos de la intensidad media de fluorescencia de las condiciones mostradas. Promedio de 6 experimentos. Estadística realizada por T student de una cola.



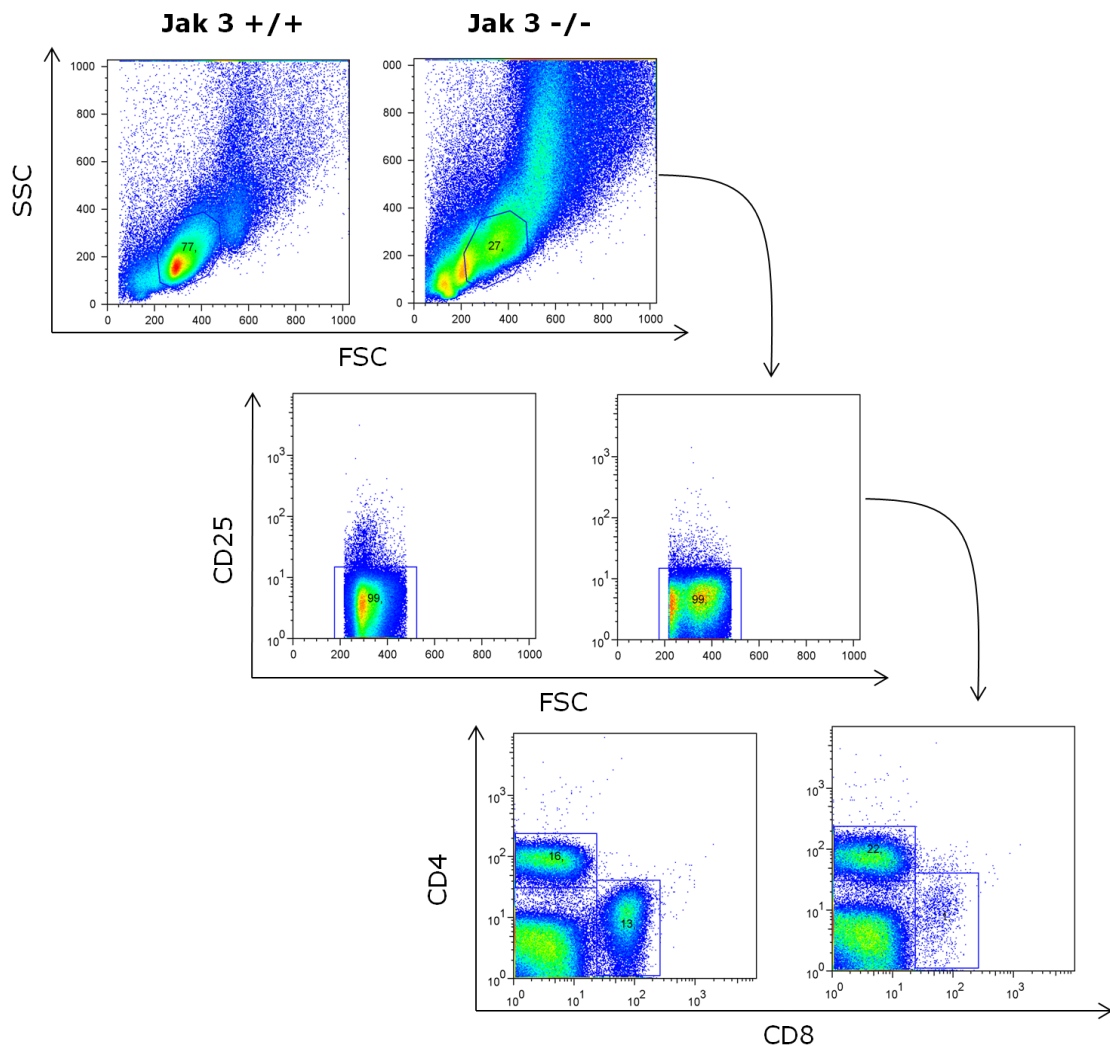
## **6.2 Fosforilación de p85 $\alpha$ en células Jak 3 -/-.**

Se realizaron ensayos de fosforilación con linfocitos T Jak 3<sup>+/+</sup> y Jak 3<sup>-/-</sup> a 3 minutos. Debido a que los ratones deficientes de Jak 3 no presentan ganglios, los linfocitos T se obtuvieron del bazo. Puesto que la población mayoritaria en el bazo normal son linfocitos B, decidimos enriquecer la población de linfocitos T, previo a la selección de esta la población mediante el panning. A continuación se añadió un marcador de superficie para identificar linfocitos T (CD3), y se hizo una región en los CD3<sup>+</sup> (figura 13). A partir de esta región, se seleccionaron las demás regiones como en la selección de linfocitos T obtenidos de ganglios linfáticos.

Debido a que en ratones deficientes de Jak 3 existe una alta población de linfocitos T que se encuentran activados, se decidió marcar a las células contra CD25, el cual es un marcador característico de activación. En este caso, en una gráfica de tamaño contra la expresión de CD25 se seleccionó la población negativa para dicho marcador (figura 14). A partir de esta región, se seleccionaron las siguientes poblaciones como en la selección de poblaciones de células de ganglio linfático.

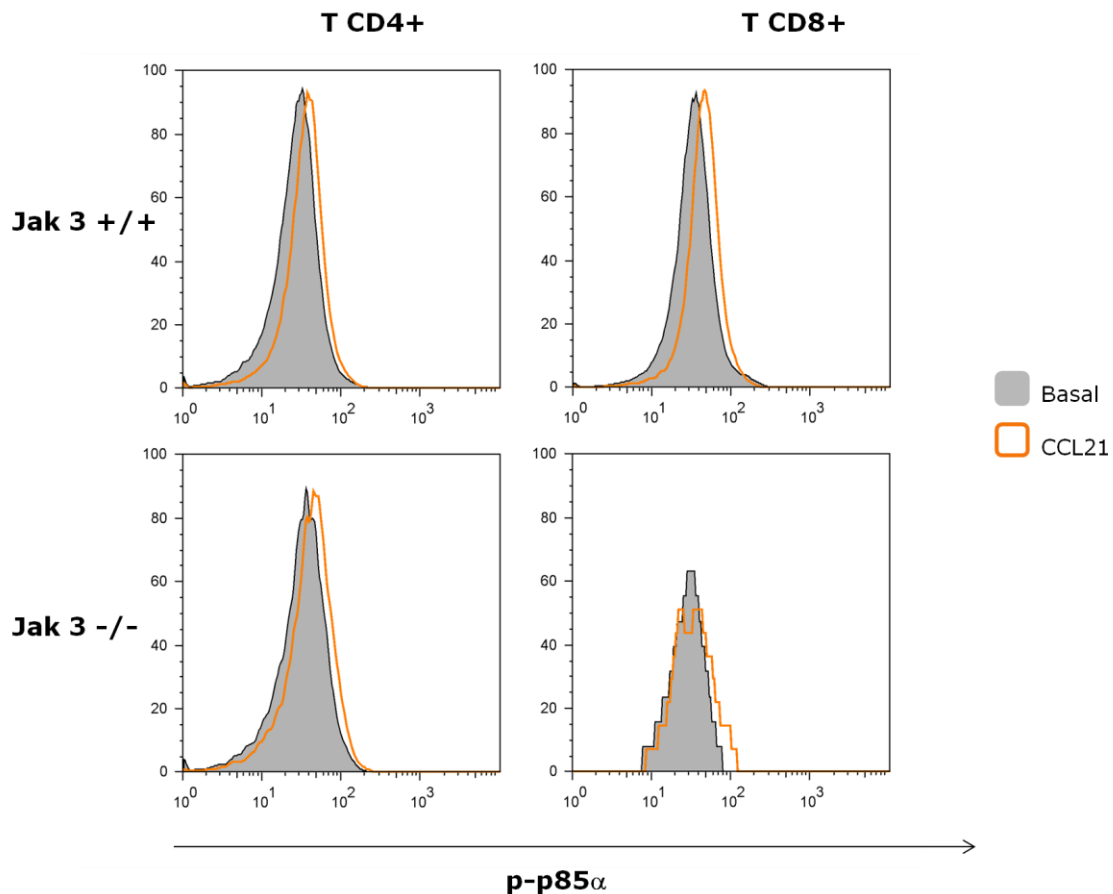


**Figura 13. Identificación de las poblaciones de células de bazo con anti-CD3.** Las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC y anti-CD8 PE Cy5. Se muestra la gráfica de FSC (tamaño) contra SSC (granularidad) de donde se seleccionaron las células de tamaño y granularidad características a partir de la cual se realizó la selección de la población CD3+. Finalmente, se seleccionaron las poblaciones CD4+ y CD8+ a partir de la población CD3+.



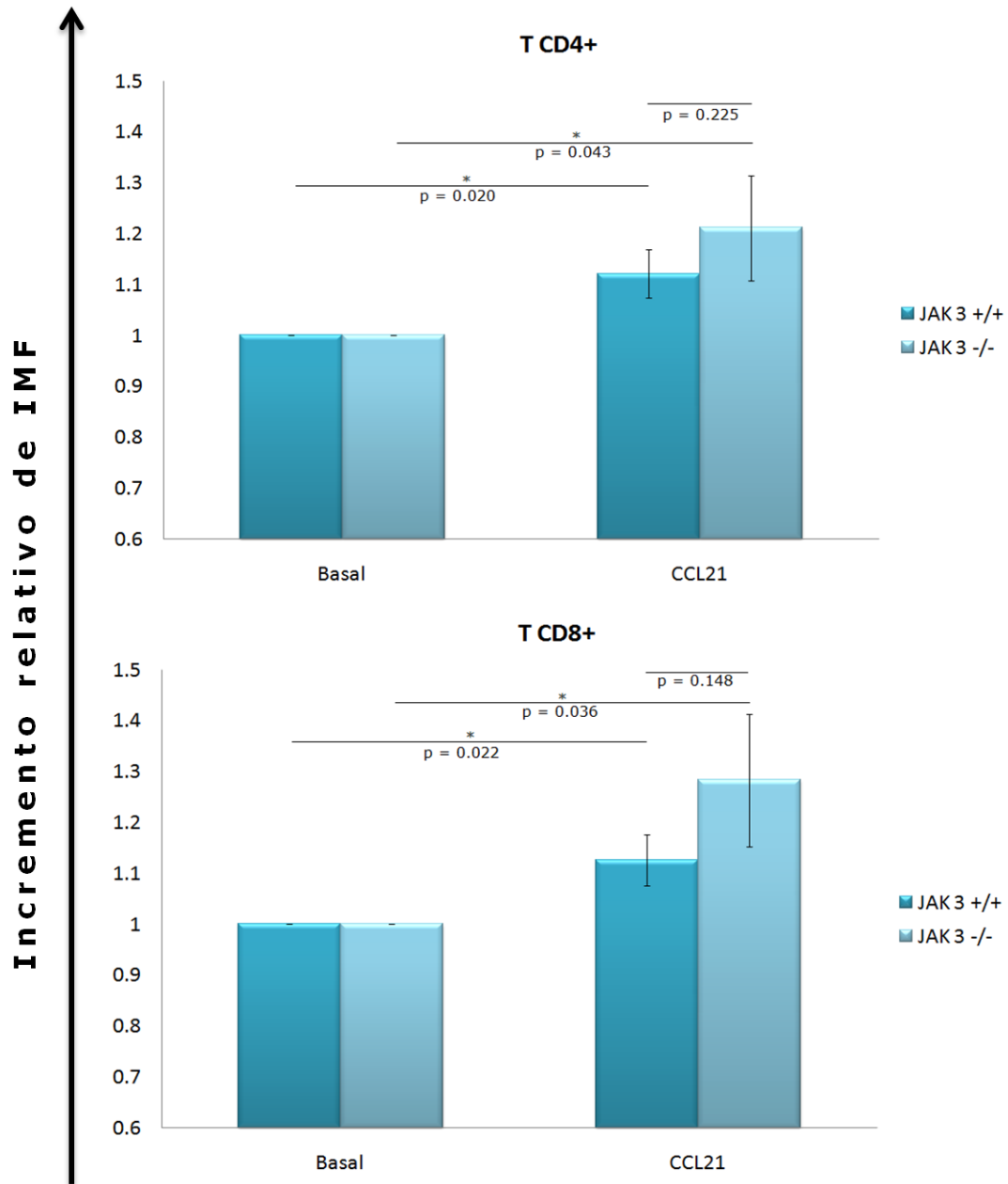
**Figura 14. Identificación de las poblaciones de células de bazo con anti-CD25.** Las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD25 FITC, anti-CD4 APC y anti-CD8 PE Cy5. Se muestra la gráfica de FSC (tamaño) contra SSC (granularidad) de donde se seleccionaron las células de tamaño y granularidad características a partir de la cual se realizó la selección de la población CD25-. Finalmente, se seleccionaron las poblaciones CD4+ y CD8+ a partir de la población CD3-.

A partir de las regiones correspondientes a linfocitos T CD4+ y T CD8+ se realizaron los histogramas correspondientes a la fosforilación de p85 $\alpha$  en respuesta al estímulo con la quimiocina CCL21 (figura 15).



**Figura 15. Fosforilación de p85 $\alpha$  por CCL21 en linfocitos T CD4+ y T CD8+ de ratones Jak 3 +/+ y Jak 3 -/-.** Las células fueron estimuladas durante 3 minutos con CCL21 (100ng/mL). Se utilizaron los anticuerpos anti-pPI3K (p85 $\alpha$ ) y anti-rabbit PE para observar la fosforilación de p85 $\alpha$ . Experimento representativo.

En la figura 16 se observa que p85 $\alpha$  se fosforila en respuesta al estímulo con CCL21 tanto en linfocitos T silvestres como en deficientes de Jak 3 con diferencia significativa respecto al basal; sin embargo, no se observa una diferencia en la fosforilación de p85 $\alpha$  entre linfocitos T silvestres y deficientes de Jak 3. La estadística se realizó mediante la prueba de T student (n=6).



**Figura 16. La fosforilación de p85 $\alpha$  no está afectada en linfocitos T Jak 3 -/-.** Las células fueron estimuladas durante 3 minutos con CCL21 (100ng/mL). Se muestra el incremento relativo de IMF con respecto al basal obtenidos de la intensidad media de fluorescencia. Promedio de 6 experimentos. Estadística realizada por T student de una cola.

Se ha observado la participación de diferentes isoformas de PI3K en migración, especialmente las clases IA y IB. En este trabajo se evaluó la participación de PI3K clase IA por medio de la activación de p85 $\alpha$ , ya que se ha visto que puede ser activada por proteínas G $\beta\gamma$  [76, 77, 78, 79, 80]; además, es una de las subunidades reguladoras de clase IA más abundantes en las células a la cual se le pueden unir todas las subunidades catalíticas de dicha clase.

Por tanto, inicialmente se realizó una curva de tiempo en donde se estimularon linfocitos T Jak 3 +/+ con la quimiocina CCL21 100ng/mL para determinar si p85 $\alpha$  se fosforila en respuesta al estímulo y a qué tiempo se observa el mayor incremento en la activación.

Dado que se utilizó la técnica de citometría de flujo, en principio se determinó la región, en una gráfica de tamaño contra granularidad, en la cual se encuentran las células que se encuentran "viables", es decir, las cuales mantienen tanto el tamaño como la granularidad característica de las células vivas (figura 10). A partir de esta región, se seleccionan las células que expresan los correceptores CD4 y CD8, los cuales se definen como linfocitos T CD4+ y T CD8+. Para el análisis de la fosforilación de p85 $\alpha$ , se realizan gráficas de histogramas (figura 11) de donde se obtiene el valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) para, después, realizar el análisis estadístico de las curvas (figura 12).

Como se muestra en la figura 12, la fosforilación de p85 $\alpha$  aumenta en respuesta al estímulo con CCL21 a los tiempos: 30 segundos y 3 minutos; sin embargo, sólo existe una diferencia significativa con respecto al basal a los 3 minutos de estimulación.

Por otro lado, a diferencia de la curva de tiempo, en los ensayos de fosforilación con células Jak 3 +/+ y Jak 3 -/- se decidió añadir un marcador superficial para aumentar un parámetro de selección de

linfocitos T, anti-CD3, debido a que las células se obtienen del bazo en vez de los ganglios linfáticos, por lo que existe una alta cantidad de células, además de los linfocitos T. Además, el complejo CD3 es altamente expresada en linfocitos T ya que participa en la señalización mediada por TCR. De tal manera, se seleccionó la región correspondiente a las células viables y luego se identificaron los linfocitos T en base a la expresión de CD3. A partir de esta región CD3+ se seleccionaron las poblaciones correspondientes a linfocitos T CD4+ y T CD8+ (figura 13). Sin embargo, gran cantidad de linfocitos T presentan características de células activadas ya que tienen mayor expresión de CD25, CD44 y CD69 [62], lo que implica que la expresión de CCR7 disminuye y, por tanto, son menos susceptibles a la estimulación por CCL21. En consecuencia, se decidió marcar a las células activadas mediante el uso del anticuerpo contra CD25. Entonces, la selección de las poblaciones se realizó de tal manera que primero se seleccionaron las células viables, a continuación se seleccionaron las células CD25-, y finalmente se seleccionaron los linfocitos T CD4+ y T CD8+ (figura 14).

Debido a que la población de linfocitos T ha sido enriquecida después de la realización del panning y a que se utilizan los marcadores de superficie CD4 y CD8, característicos de dichas células, se optó por utilizar solamente el marcador CD25 para descartar a los linfocitos T activados.

Una vez teniendo definidas las poblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+, se realizaron los histogramas para observar la fosforilación de p85 $\alpha$  en respuesta al estímulo de CCL21 durante 3 minutos (figura 15). A partir de los histogramas se obtuvo la IMF para finalmente realizar el análisis estadístico el cual se presenta en la figura 16, en donde se puede observar que tanto linfocitos T CD4+ y T CD8+ Jak 3 +/- como

linfocitos T deficientes de Jak 3 presentan un aumento significativo en la fosforilación de p85 $\alpha$  con respecto al basal correspondiente. Es más, los linfocitos T Jak 3 -/- tienen una tendencia a tener más fosforilación de la subunidad reguladora; sin embargo, ésta diferencia no es significativa, lo cual puede deberse al hecho de que en células deficientes de Jak 3, la expresión del receptor CCR7 está incrementada con respecto a las células silvestres [63], el cual puede deberse a que las células tratan de compensar la falta de señalización expresando más receptor. Consistentemente con lo que se ha reportado en diversos artículos, la subunidad reguladora p85 $\alpha$  se fosforila en respuesta al estímulo con la quimiocina CCL21 a través del GPCR CCR7.

Por eso sería importante repetir estos experimentos incluyendo la tinción en superficie de CCR7. De esta manera se podría intentar correlacionar el nivel de CCR7 con una mayor respuesta de fosforilación de p85. Sin embargo, es interesante recalcar que a pesar del incremento de expresión de CCR7 en linfocitos T de Jak 3-/-, estos linfocitos son incapaces de migrar en respuesta a CCL19 y CCL21, por lo que la deficiente migración se debe a un defecto intrínseco en la señalización mediada por CCR7, aunque nuestros datos sugieren que no sería causado por la activación de la subunidad reguladora p85 $\alpha$ . Sin embargo, la detección de p85 $\alpha$  fosforilada no es prueba final de que la vía de PI3K no se halle afectada en respuesta a CCL21, puesto que se requerirían realizar ensayos de cinasa in vitro para corroborar que la actividad de esta enzima no está alterada en ausencia de Jak 3.

El nivel de PI3K involucrado en la migración parece ser específico del tipo celular, probablemente reflejando contribuciones diferentes a la polarización, protrusión y adhesión. Tal es el caso de los macrófagos y neutrófilos deficientes de p110 $\gamma$ , los cuales son incapaces de migrar a



sitios de inflamación, y de cómo PI3K $\delta$  es importante para la motilidad de neutrófilos.

En los resultados se muestra que p85 $\alpha$  se activa en respuesta al estímulo a través de CCR7 indicando que dicha subunidad reguladora puede activarse con el GPCR. Dado que los GPCRs están acoplados con la proteína G, los resultados concuerdan con los reportes en donde demuestran que p85 $\alpha$  puede ser activado por la subunidad betagamma de la proteína G [76, 77, 78, 79, 80, 81]. Sin embargo, como se muestra en la figura 13, en células deficientes de Jak 3, la subunidad reguladora también es activada después del estímulo con CCL21.

La actividad de las cinasas Jak en relación con la actividad de proteínas G ha sido controversial. Se ha demostrado que CCL2 induce la fosforilación y asociación de Jak 2 al receptor CCR2 en células Mono Mac 1 (línea celular de monocitos humanos) provocando la fosforilación de STAT3; dicho proceso se realiza independientemente de la activación de la proteína G $\alpha_i$ , ya que cuando las células fueron tratadas con la toxina pertusis no se observó algún cambio [66]. También se demostró que la fosforilación de Jak 2 provocada por la unión de la quimiocina CCL3 al receptor CCR5 es independiente de las proteínas G $\alpha_i$  y Gq; además, la inhibición de Jak2 no impide la activación de Gi, por lo que sugieren que CCR5 permite dos vías diferentes, una dependiente de Jak y otra dependiente de proteína G [113]. Por otro lado, Rodríguez-Frade et al reportó la fosforilación de Jak 2 y Jak 3, además de STAT 1, 2, 3, 5, bajo estímulos con CXCL12. Dicha activación es independiente de G $\alpha_i$  ya que el tratamiento con toxina pertusis no fue capaz de bloquear la activación de Jak aunque otras funciones fueron abolidas. Además, cuando inhibieron a la proteína Jak no observaron la asociación de la proteína G al receptor ni las funciones dependientes de G $\alpha_i$  por lo que sugieren que G $\alpha_i$  se encuentra señalizando río abajo de Jak [114]. De

acuerdo con lo anterior, con los resultados obtenidos se puede sugerir que la activación de la clase IA de PI3K pudiera suceder de manera independiente a Jak 3; sin embargo, no se puede descartar que la activación de PI3K sea de manera independiente a la proteína  $G\alpha_i$ .

Datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo (datos no publicados) observan generación de F-actina y activación de AKT (molécula efectora río debajo de PI3K) en tiempos tempranos después de la estimulación, 10 segundos y 30 segundos respectivamente. Lo anterior junto con los resultados obtenidos sugiere que la activación de  $p85\alpha$  no es requerida para la respuesta inmediata, sino que pudiera funcionar como un amplificador de la señal. Esto estaría dado por una primera señalización a través de  $p110\gamma$ , ya que se sabe que es activada por la subunidad  $G\beta\gamma$  después de la disociación de la subunidad  $G\alpha$ , la cual se ha observado estar involucrada en el proceso de migración de varios leucocitos. La generación de  $PIP_3$  debido a  $p110\gamma$  puede reclutar a otras moléculas efectoras involucradas en la migración como Rac y Cdc42, las cuales a su vez, pueden provocar mayor reclutamiento de PI3K y por tanto mayor producción de  $PIP_3$  generando un "loop" de retroalimentación positiva [95]. En este caso,  $p85\alpha$  puede ser reclutado ya que se ha observado que en el sitio SH3 puede unirse con Cdc42 [73].

Para descartar o confirmar que la actividad de  $p85\alpha$  sea dependiente de la proteína  $G\alpha_i$ , se requieren realizar ensayos de fosforilación en donde se utilicen linfocitos T deficientes de Jak 3 los cuales sean inhibidos con la toxina pertusis, ya que las proteínas  $G\alpha$  son sensibles a este tratamiento. De acuerdo con lo que se pueda obtener, se tendrían las siguientes situaciones:

- 1) Que  $p85\alpha$  no se activara en presencia de la toxina pertusis. Este resultado indicaría que la activación de la subunidad reguladora es

dependiente de la proteína  $G_{\alpha i}$ , por lo que también indicaría que Jak 3 no se encuentra río abajo de la proteína G o viceversa debido a que se observa fosforilación de  $p85\alpha$  en células deficientes de Jak 3. Por ende, se sugeriría que la vía de señalización a través de Jak 3 es independiente de la proteína G tal como se observó en células tratadas con toxina pertusis de la línea MonoMac1 estimulando con CCL2 [66].

2) Que  $p85\alpha$  se activara en presencia de la toxina pertusis. Este resultado indicaría que la activación de la subunidad reguladora es independiente tanto de Jak 3 como de la proteína  $G_{\alpha i}$ . Según estos resultados, se tendrían dos vertientes: a) pudieran existir otras vías de señalización totalmente independientes de proteína G y Jak las cuales señalarían a través del receptor y activarían a  $p85\alpha$ . b) la fosforilación de PI3K pudiera estar dada por la participación de un subtipo de proteína G diferente a  $G_{\alpha i}$ .

Siguiendo la línea de que PI3K se activara independientemente de Jak 3 y la proteína G, existen propuestas en las que GPCRs pueden activar, independientemente de proteína G, a las  $\beta$ -arrestinas, las cuales participan en endocitosis y reciclaje de receptores, pero también pueden señalar a través de diferentes vías como la vía de señalización de la familia de cinasas de tirosina Src [115]. Además, se ha demostrado que la activación de PI3K puede estar dada por cinasas de la familia Src, como son Lck y Hck, ya que la disminución en la expresión de dichas cinasas se reduce la actividad de PI3K [116].

Siguiendo la línea de que PI3K sea activada dependiendo de un subtipo de proteína G diferente a  $G_{\alpha i}$ , una de las posibilidades es que se encuentren proteínas G formadas por las subunidades  $G_{\alpha_{12/13}}$  ó Gq con la subunidad  $G_{\beta\gamma}$ . Como se comentó anteriormente,  $PI3K_{\gamma}$  puede activarse por la proteína  $G_{\beta\gamma}$ , generando PIP3 y por consiguiente provocando el "loop" de retroalimentación positiva que lleve a la

activación de p85a. Aunque no se ha descartado confirmado la dependencia ó independencia de la familia Jak, dicha vía puede seguir siendo una posibilidad. Además, Monterrubio et al. proponen una vía de señalización a través del GPCR CXCR4 en donde la activación de PI3K $\gamma$  está dada por la señalización a través de la proteína G $\alpha_{13}$  [117].

En resumen, los resultados de fosforilación de p85 $\alpha$  en linfocitos T deficientes de Jak3 sugieren que la activación de PI3K se lleva a cabo a través de un mecanismo independiente de Jak 3. Dicha activación pudiera ser dependiente de proteína G $\alpha_i$ , dependiente de otras isoformas de G (G $\alpha_{12/13}$ , G1) e independiente de la proteína G.

## 7. CONCLUSIONES

La subunidad reguladora p85 $\alpha$  se fosforila en respuesta a la quimiocina CCL21 en linfocitos T CD4+ y T CD8+ vírgenes; por lo que se encuentra involucrada en la señalización mediada por CCR7.

De manera particular, la fosforilación de p85 $\alpha$  no se encuentra alterada en los linfocitos T CD4+ y T CD8+ vírgenes deficientes de la cinasa Jak 3 en respuesta a CCL21, sugiriendo que la activación de la clase IA de PI3K podría llevarse a cabo a través de un mecanismo independiente de Jak 3. Además, la fosforilación de p85 $\alpha$  no se correlaciona con la capacidad migratoria de los linfocitos T puesto que los linfocitos T Jak 3<sup>-/-</sup> son incapaces de migrar pero continúan fosforilando p85 $\alpha$ .

Finalmente, se requiere investigar si la fosforilación observada de p85 $\alpha$  en ausencia de Jak3 es dependiente de G $\alpha_i$ , de otras isoformas de G (G $\alpha_{12/13}$ , G1) o bien independiente de la proteína G.

## 8. PERSPECTIVAS

- Determinar la expresión de CCR7 de células deficientes o no de Jak 3 en ensayos de fosforilación.
- Realizar ensayos de cinasa para determinar la actividad catalítica de PI3K en respuesta a la estimulación de CCR7.
- Identificar el subtipo de proteína G involucrada en la fosforilación de PI3K mediante la inhibición farmacológica de G $\alpha_i$ , G $\alpha_{12/13}$  y Gq.
- Determinar la participación de otras isoformas de PI3K involucradas en el proceso de migración, como P110 $\delta$  y P110 $\gamma$ , en respuesta a la estimulación de CCR7.

## 9. REFERENCIAS

1. Chaplin, D.D., *1. Overview of the human immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-435.
2. Petrie, H.T. and Zuniga-Pflucker, J.C., *Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 649-679.
3. Ciofani, M. and Zuniga-Pflucker, J.C., *The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 463-493.
4. Speiser, D.E. et al., *Positive and negative selection of T cell receptor V beta domains controlled by distinct cell populations in the thymus*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2165-2170.
5. Sprent, J., Gao, E.K. and Webb, S.R., *T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1357-1363.
6. Starr, T.K., Jameson, S.C. and Hogquist, K.A., *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-176.
7. Weinreich, M.A. and Hogquist, K.A., *Thymic emigration: when and how T cells leave home*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2265-2270.
8. Liu, C. et al., *Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2531-2539.
9. Krueger, A. et al., *CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1906-1912.
10. Taylor, N., *CCR7/CCR9: knockin' on the thymus door*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1861-1862.

11. Misslitz, A. et al., *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 481-491.
12. Norment, A.M. et al., *Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 639-648.
13. Uehara, S. et al., *Premature expression of chemokine receptor CCR9 impairs T cell development*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 75-84.
14. Ueno, T. et al., *Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 205-218.
15. Stein, J.V. and Nombela-Arrieta, C., *Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview*. Immunology, 2005. **116**(1): p. 1-12.
16. Miyasaka, M. and Tanaka, T., *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 360-370.
17. Forster, R., Davalos-Misslitz, A.C. and Rot, A., *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-371.
18. Sharma, M., *Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease*. Crit Rev Biotechnol, 2010. **30**(1): p. 1-22.
19. Ransohoff, R.M., *Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 711-721.
20. Harris, J.G. et al., *Relative contribution of the selectins in the neutrophil recruitment caused by the chemokine cytokine-induced*

- neutrophil chemoattractant (CINC)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(3): p. 692-696.
21. Taub, D.D. et al., *T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1931-1941.
  22. Wolpe, S.D. and Cerami, A., *Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines*. FASEB J, 1989. **3**(14): p. 2565-2573.
  23. Das, A.M., Flower, R.J. and Perretti, M., *Eotaxin-induced eosinophil migration in the peritoneal cavity of ovalbumin-sensitized mice: mechanism of action*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1466-1473.
  24. Ajuebor, M.N. et al., *Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(1): p. 108-116.
  25. Imai, T. et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. **91**(4): p. 521-530.
  26. Chapman, G.A. et al., *The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium*. Eur J Pharmacol, 2000. **392**(3): p. 189-195.
  27. Webb, L.M. et al., *Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7158-7162.
  28. Murdoch, C. and Finn, A., *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-3043.



29. Murphy, P.M., *Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(1): p. 47-64.
30. Schlondorff, D. et al., *Chemokines and renal disease*. Kidney Int, 1997. **51**(3): p. 610-621.
31. Liao, F. et al., *Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1301-1314.
32. Zhang, N. et al., *Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 458-469.
33. Hintzen, G. et al., *Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7346-7354.
34. Worbs, T. et al., *Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 519-527.
35. Nitta, T. et al., *CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 17129-17133.
36. Yoshida, R. et al., *Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 7118-7122.
37. Stein, J.V. et al., *The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 61-76.

38. Friedman, R.S., Jacobelli, J. and Krummel, M.F., *Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1101-1108.
39. Vassileva, G. et al., *The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1183-1188.
40. Carlsen, H.S. et al., *Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules*. Blood, 2005. **106**(2): p. 444-446.
41. Link, A. et al., *Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1255-1265.
42. Bardi, G. et al., *The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3291-3297.
43. Kohout, T.A. et al., *Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23214-23222.
44. Gosling, J. et al., *Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2851-2856.
45. Forster, R. et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
46. Debes, G.F. et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-894.

47. Bromley, S.K., Thomas, S.Y. and Luster, A.D., *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 895-901.
48. Ghoreschi, K., Laurence, A. and O'Shea, J.J., *Janus kinases in immune cell signaling*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 273-287.
49. Yamaoka, K. et al., *The Janus kinases (Jaks)*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. 253.
50. Aaronson, D.S. and Horvath, C.M., *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1653-1655.
51. Zhou, Y.J. et al., *Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 959-969.
52. Hofmann, S.R. et al., *Jak3-independent trafficking of the common gamma chain receptor subunit: chaperone function of Jaks revisited*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 5039-5049.
53. Ragimbeau, J. et al., *The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 537-547.
54. Zhou, Y.J. et al., *Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13850-13855.
55. Cheng, H. et al., *Phosphorylation of human Jak3 at tyrosines 904 and 939 positively regulates its activity*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2271-2282.
56. Kurzer, J.H. et al., *Tyrosine 813 is a site of JAK2 autophosphorylation critical for activation of JAK2 by SH2-B beta*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4557-4570.
57. Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M., *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-465.

58. Johnston, J.A. and O'Shea, J.J., *Matching SOCS with function*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 507-509.
59. Russell, S.M. et al., *Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development*. Science, 1995. **270**(5237): p. 797-800.
60. Li, J. et al., *Impaired IL-7 signaling may explain a case of atypical JAK3-SCID*. Cytokine, 2010. **49**(2): p. 221-228.
61. Roberts, J.L. et al., *Janus kinase 3 (JAK3) deficiency: clinical, immunologic, and molecular analyses of 10 patients and outcomes of stem cell transplantation*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2009-2018.
62. Thomis, D.C. et al., *Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 794-797.
63. Garcia-Zepeda, E.A. et al., *Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs*. Immunology, 2007. **122**(2): p. 247-260.
64. Thomis, D.C., Lee, W. and Berg, L.J., *T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4708-4719.
65. Mayack, S.R. and Berg, L.J., *Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2059-2063.
66. Mellado, M. et al., *The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 805-813.
67. Wong, M. and Fish, E.N., *RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 309-314.

68. Vila-Coro, A.J. et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1699-1710.
69. Soldevila, G. et al., *Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3*. Immunology, 2004. **112**(2): p. 191-200.
70. Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B., *PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 317-330.
71. Cain, R.J. and Ridley, A.J., *Phosphoinositide 3-kinases in cell migration*. Biol Cell, 2009. **101**(1): p. 13-29.
72. Ward, S.G. and Marelli-Berg, F.M., *Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation*. Biochem J, 2009. **418**(1): p. 13-27.
73. Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B., *New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha*. Sci STKE, 2001. **2001**(65): p. pe1.
74. Vanhaesebroeck, B. et al., *Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(4): p. 194-204.
75. Ward, S.G., *Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation?* Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 67-74.
76. Kurosu, H. et al., *Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24252-24256.
77. Maier, U., Babich, A. and Nurnberg, B., *Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29311-29317.

78. Roche, S. et al., *A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7119-7129.
79. Graness, A. et al., *A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase Cepsilon.* J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 32016-32022.
80. Kubo, H. et al., *Specific role for p85/p110beta in GTP-binding-protein-mediated activation of Akt.* Biochem J, 2005. **392**(Pt 3): p. 607-614.
81. Yart, A. et al., *A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid.* J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21167-21178.
82. Guillermet-Guibert, J. et al., *The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(24): p. 8292-8297.
83. Harris, S.J. et al., *Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes.* J Biol Chem, 2008. **283**(5): p. 2465-2469.
84. Backer, J.M., *The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34.* Biochem J, 2008. **410**(1): p. 1-17.
85. Jimenez, C. et al., *Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration.* J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 249-262.
86. Hill, K.M. et al., *N-terminal domains of the class Ia phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit play a role in*

- cytoskeletal but not mitogenic signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16374-16378.
87. Zheng, Y., Bagrodia, S. and Cerione, R.A., *Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 18727-18730.
  88. Nombela-Arrieta, C. et al., *A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 497-510.
  89. Garcia-Bernal, D. et al., *DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5215-5225.
  90. Cronshaw, D.G. et al., *Activation of phosphoinositide 3-kinases by the CCR4 ligand macrophage-derived chemokine is a dispensable signal for T lymphocyte chemotaxis*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7761-7770.
  91. Li, Z. et al., *Regulation of PTEN by Rho small GTPases*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 399-404.
  92. Vielkind, S. et al., *Integrin regulation by RhoA in thymocytes*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 350-357.
  93. Giagulli, C. et al., *RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 25-35.
  94. Zigmond, S.H., *Formin-induced nucleation of actin filaments*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 99-105.
  95. Weiner, O.D. et al., *A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 509-513.

96. Andrews, S., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T., *PI3K class IB pathway in neutrophils*. Sci STKE, 2007. **2007**(407): p. cm3.
97. Andrews, S., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T., *PI3K class IB pathway*. Sci STKE, 2007. **2007**(407): p. cm2.
98. Stambolic, V. and Woodgett, J.R., *Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(9): p. 461-466.
99. Kolsch, V., Charest, P.G. and Firtel, R.A., *The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 5): p. 551-559.
100. Li, J. et al., *Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 663-673.
101. Enomoto, A. et al., *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 389-402.
102. Innocenti, M. et al., *Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 17-23.
103. Ridley, A.J. et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-1709.
104. Merlot, S. and Firtel, R.A., *Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3471-3478.
105. Stephens, L., Milne, L. and Hawkins, P., *Moving towards a better understanding of chemotaxis*. Curr Biol, 2008. **18**(11): p. R485-494.
106. Reif, K. et al., *Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2236-2240.



107. Smith, L.D. et al., *PI3Kgamma is the dominant isoform involved in migratory responses of human T lymphocytes: effects of ex vivo maintenance and limitations of non-viral delivery of siRNA*. Cell Signal, 2007. **19**(12): p. 2528-2539.
108. Smith, A. et al., *A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes*. J Cell Biol, 2005. **170**(1): p. 141-151.
109. Nombela-Arrieta, C. et al., *Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 429-441.
110. Cote, J.F. et al., *A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signalling*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 797-807.
111. Martin, A.L. et al., *Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2081-2088.
112. Matheu, M.P. et al., *Class IA phosphoinositide 3-kinase modulates basal lymphocyte motility in the lymph node*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2261-2269.
113. Mueller, A. and Strange, P.G., *CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins*. FEBS Lett, 2004. **570**(1-3): p. 126-132.
114. Rodriguez-Frade, J.M. et al., *Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 755-765.
115. Sun, Y., McGarrigle, D. and Huang, X.Y., *When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein*. Mol Biosyst, 2007. **3**(12): p. 849-854.
116. Sagan, D., Eckardt-Schupp, F. and Eichholtz-Wirth, H., *Reduced expression of SRC family kinases decreases PI3K activity in NBS1-*

*/- lymphoblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(1): p. 181-186.

117. Monterrubio, M. et al., *PI3Kgamma activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 199-204.

## **10. ANEXO A "REACTIVOS Y SOLUCIONES"**

### **10.1 REACTIVOS**

- i. Ácido Acético, Glacial (Cat. 9507-02, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- ii. Agarosa Ultrapura (Cat. 15510-027, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- iii. Antibiotic-Antimycotic (100x) liquido (Cat. 15240-112, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- iv. Azida de Sodio (Cat. S-2002, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- v. Azul de Bromofenol (Cat. 161-0404, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- vi. Bicarbonato de Sodio, Polvo (Cat. 3506-01, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- vii. Bromuro de Etidio Sol. (10 mg/mL) (Cat. 161-0433, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- viii. Cloroformo (Cat. 9180-02, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- ix. Cloruro de Amonio/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Cat. 0660-01, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- x. EDTA (Cat. 3002E, Research Organics, OH, EUA).
- xi. Fenol Ultrapuro (Cat. 15513-047, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- xii. Fosfato Dibásico de Sodio Heptahidratad ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Cat. 3824, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- xiii. Fosfato Monobásico de Sodio Monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Cat. 3818, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).

- xiv. Glicerol Anhidro (Cat. 2136-03, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- xv. HEPES Buffer Solution (1M) (Cat. 15630-080, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- xvi. Hidróxido de Sodio/NaOH(Cat. 3722, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).
- xvii. L-Glutamine-200 mM (100x) liquid (Cat. 25030-081, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- xviii. Lyse/Fix Buffer 5x (Cat. 558049, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).
- xix. Paraformaldehído (Cat. P6148-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- xx. Perm Buffer II (Cat. 558052, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).
- xxi. RPMI (Cat. 31800-022, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- xxii. Suero Fetal Bovino/SFB (Cat. 16000-044, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- xxiii. Tris base (Cat. 161-0719, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- xxiv. Xylene Cyanol (Cat. 161-0423, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

## 10.2 REACTIVOS BIOLÓGICOS

- i. Anticuerpo B220 fue proporcionado por el Dr. Leopoldo Santos Argumedo (Investigador del CINVESTAV, D.F., Mex).
- ii. Anticuerpo FITC Hamster a-mouse CD3e (Cat. 553061, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- iii. Anticuerpo FITC Rat a-mouse CD4 (Cat. 553047, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- iv. Anticuerpo FITC Rat a-mouse CD25 (Cat. 553072, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- v. Anticuerpo PE a-mouse CD4 (Cat. 553653, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- vi. Anticuerpo PECy-5 a-mouse CD8a (Cat. 553034, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- vii. Anticuerpo APC a-mouse CD4 (Cat. 553051, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA).
- viii. Anticuerpo anti-phospho-PI3-Kinase (p85a) (Tyr 508) Rabbit mAb (Cat. 1292-R, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).
- ix. Anticuerpo R-Phicoerythrin goat a-rabbit IgG (Cat. P2771MP, Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA).
- x. dNTPs Mix (Cat. 10297-018, Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- xi. Kit Taq DNA Polymerase (Cat. 11615-010, Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)

- xii. Oligonucleótidos. Sintetizados bajo pedido por Invitrogen (Ben Harbor, ME, EUA):
- xiii. NEO1 (Casette de Neomicina) hebra sentido  
5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'
- xiv. NEO2 (Casette de Neomicina) hebra antisentido  
3'-GTACGTGCTCGCTCGATGCG-5'
- xv. JAK3 hebra sentido  
5'-GGCAACTTTGGCAGCGTGGAGCTGTGCCGC-3'
- xvi. JAK3 hebra antisentido  
3'-CTGGCCCATAGCTGACTCCCCGGTACTTGA-5'.
- xvii. Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) (Cat. 553141, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- xviii. Quimiocina recombinante murina, Exodus-2/CCL21 (Cat. 250-13, PEPROTECH, New Jersey, NJ, EUA)

## 10.3 SOLUCIONES

### Tipaje de ratones Jak3

i. Mezcla de Reacción para PCR NEO

MgCl <sub>2</sub> (Kit)	1 µL
Buffer 10X (Kit)	2.5 µL
dNTPs 2.5 mM	0.25 µL
Oligonucleótido Hebra Sentido (100 ng/µL)	0.35 µL
Oligonucleótido Hebra Antisentido (100 ng/µL)	0.35 µL
H <sub>2</sub> O bidestilada y estéril	19.55 µL
Taq Polymerase (Kit)	0.07 µL
DNA obtenido de la extracción	1 µL

ii. Mezcla de Reacción para PCR JAK3

MgCl <sub>2</sub> (Kit)	1 µL
Buffer 10X (Kit)	2.5 µL
dNTPs 2.5 mM	0.25 µL
Mix Oligonucleótidos Jak 3 Hebra Sentido y Antisentido (100 ng/µL)	0.35 µL
H <sub>2</sub> O bidestilada y estéril	19.90 µL
Taq Polymerase (Kit)	0.07 µL
DNA obtenido de la extracción	1 µL

iii. Buffer de Carga

Azul de Bromofenol	0.25% (p/v)
Xylene Cyanol	0.25% (p/v)
Glicerol	30% (p/v)

iv. Geles de Agarosa-Bromuro de Etidio

Agarosa	1% (p/v)
Bromuro de Etidio	0.1 µg/mL

v. TAE 50x

Tris base	242 g
EDTA 0.5 M	100 mL
Ácido Acético	57.1 g

Se ajusta el pH a 8.5 y se afora a 1 L con H<sub>2</sub>O bidestilada

Para preparar **TAE 1X**, se diluye 50 veces en H<sub>2</sub>O bidestilada

**Obtención de células**

i. PBS 10X

Fosfato Monobásico de Sodio-Monohidratado	1.28 g
Fosfato Dibásico de Sodio de Sodio-Heptahidratado	11.24 g
Cloruro de Sodio	48.33 g

Ajustar pH 7.3 y aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada

Para preparar PBS 1X se diluye 10 veces en H<sub>2</sub>O bidestilada

ii. Buffer de Lisis ACT

**Solución A**

Cloruro de Amonio	8.3 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	1000 mL



## **Solución B**

Tris base	2.06 g
H2O bidestilada	100 mL

Para preparar el ACT se mezcla 1 volumen de la Solución B con 10 volúmenes de la Solución A

### iii. RPMI sin SFB

RPMI	1 sobre
Antibiotic-Antimycotic (100x)	10 mL
L-Glutamina 200 mM	10 mL
Bicarbonato de Sodio, Polvo	2 g
HEPES Buffer Solution (1M)	12.5 mL
H2O bidestilada	1000 mL

Para preparar el RPMI 10% de SFB (v/v) se añaden 100 mL de SFB por cada 1000 mL de RPMI.

## **Ensayos de fosforilación**

### i. Buffer de FACS

Azida de Sodio	0.02 % (p/v)
PBS 1X	500 mL
SFB	10 mL