



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR
INHIBINAS DURANTE EL
DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T:
PAPEL DE BETAGLICANO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
GERMÁN RODRIGO ALEMÁN MUENCH

TUTORA RESPONSABLE:
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO



MÉXICO D.F

2012



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.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/062/Jur/2012

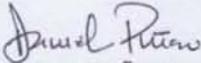
DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

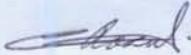
Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **306** del 15 de agosto del 2012, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **GERMAN RODRIGO ALEMAN MUENCH**, con número de cuenta **402069188**, con la tesis titulada: **"SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR INHIBINAS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T: PAPEL DE BETAGLICANO"**, dirigida por la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo.

Presidente: Dr. Enrique Ortega Soto
Vocal: Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso
Vocal: Dr. Ricardo Lazcurain Ledesma
Vocal: Dra. Marina Macías Silva
Secretario: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno con cinco **sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 15 de agosto del 2012


DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR


DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumno

DPD/CRL/aap

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcB.unam.mx> E-mail: pdcB@servidor.unam.mx

Dirección de tesis

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo. Investigadora del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM.

Comité tutor:

Dr. Fernando López Casillas. Investigador del departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM.

Dr. Jesús Chimal Monroy. Investigador del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM.

Este proyecto fue apoyado por los donativos de DGAPA (UNAM) #IN225208 y #IN214411. GA fue apoyado con la beca #208213 proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en el laboratorio A107 del departamento Inmunología del Instituto de investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. Se agradece al Biól. Jesús Ramsés Chávez Rios por su apoyo técnico en la realización del presente proyecto de investigación.

Esta tesis la dedico de manera especial a mis abuelos:

Polidor Aleman y Gloria Farrera

*A los cuales agradezco con mucho amor el apoyarme
y el enseñarme con su ejemplo que la humildad
es una virtud que no hay que dejar atrás en la vida.*

Índice general

I. Introducción	14
I.I. Sistema inmune	15
I.I.I. Inmunidad innata.....	15
I.I.II. Inmunidad adaptativa.....	16
I. II. Ontogenia de linfocitos T	21
I.II.I. Proceso de desarrollo.....	22
I.II.II. Reclutamiento de progenitores al timo y diferenciación temprana.....	23
I.II.III. Diferenciación en el timo.....	24
I.II.IV. Generación de células T reguladoras en el timo.....	27
I.II.V. Señalización mediada por Notch durante el desarrollo de células T	29
I.III. Señalización inducida por el complejo del TCR/CD3	30
I.III.I. Vía de las MAP cinasas.....	32
I.III.II. Vía de movilización de calcio.....	33
I.III.III. Vía PI3K/AKT.....	34
I.III.IV. Vía de rearreglo de citoesqueleto.....	34
I.IV. Señalización mediada por la Superfamilia del TGF-β	35
I.IV.I. Ligandos.....	36
I.IV.II. Receptores.....	39
I.IV.II.I. Activación de receptores.....	41
I.IV.II. II. Activación de Smads.....	43
I.IV.III. Regulación de la señal de TGF β	45
I.V. Betaglicano (TβRIII): co-receptor central de los miembros de la Superfamilia de TGF-β	47
I.V.I. Estructura.....	48
I.V.II. Funciones del dominio citoplásmico de T β RIII.....	50
I.V.III. Regulación de la señalización de los ligandos de la superfamilia del TGF β mediada por T β RIII	51
I.V.IV. Funciones de la forma soluble de T β RIII.....	53

I.V.V. Inhibinas y betaglicano como par molecular.....	53
I.V.VI. Expresión del TβRIII en células del sistema inmune.....	57
I.VI. Papel de los miembros de TGF-β durante el desarrollo	
de linfocitos T.....	57
I.VI.I. TGF-βs.....	57
I.VI.II. BMPs.....	61
I.VI.III. Inhibinas y activinas.....	63
II. Justificación.....	67
III. Hipótesis.....	69
IV. Objetivos.....	71
V. Diseño experimental.....	73
VI. Materiales y métodos.....	75
VII. Resultados.....	83
VII.I. El ARN mensajero de TβRIII se expresa en timocitos y en células estromales timicas.....	84
VII.II. La expresión de TβRIII está regulada durante la ontogenia de células T.....	86
VII.III. El bloqueo de TβRIII induce en un retraso del desarrollo de linfocitos T.....	91
VII.IV. El desarrollo de células T está alterado en embriones deficientes de TβRIII.....	95
VII.V. La deficiencia de TβRIII repercute en un incremento en apoptosis.....	100
VII.VI. TβRIII se expresa en células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ periféricas	103
VII.VII. La señalización inducida por el TCR incrementa la expresión de TβRIII en células T.....	106
VII.VIII. Las células T reguladoras “naturales” expresan bajas cantidades de TβRIII en superficie.....	108

VII.IX. El empleo de T β RIII soluble recombinante disminuye la generación de células T reguladoras F $\text{oxp}3^+$ promovida por TGF β 1.....	110
VIII. Discusión.....	113
IX. Conclusiones.....	127
X. Perspectivas.....	130
XI. Referencias.....	137
XII. Publicaciones.....	156

Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Especialización de células T CD4 ⁺ periféricas en la inducción y/o control de una respuesta inmune.....	19
Figura 1. Desarrollo de linfocitos T en el timo.....	23
Figura 2. Estructura molecular de los complejos del pre-TCR y TCR.....	25
Figura 3. Vías de señalización inducidas por el complejo TCR/CD3.....	31
Figura 4. Versatilidad en el uso de receptores por los ligandos del TGF β	40
Figura 5. Mecanismo general de activación de receptores y proteínas smads de la superfamilia del TGF- β	43
Figura 6. Estructura del T β RIII	50
Figura 7. Funciones del T β RIII en la regulación de las señales del TGF β	52
Figura 8. Participación del T β RIII en el antagonismo mediado por inhibinas sobre la señal de las activinas.....	54
Figura 9. Efectos de los TGF β s en el desarrollo de linfocitos T.....	59
Figura 10. Efectos de las BMPs en el desarrollo de linfocitos T.....	62
Figura 11. Efectos de las activinas/inhibinas en el desarrollo de linfocitos T.....	65

Figura 12. Diseño experimental.....	74
Figura 13. El ARN mensajero del T β RIII es expresado en timo murino fetal y adulto.....	85
Figura 14. T β RIII se expresa en células linfoides de timo, bazo y ganglios.....	86
Figura 15. Análisis de la especificidad del antisuero anti-T β RIII.....	87
Figura 16. T β RIII se expresa diferencialmente en las principales subpoblaciones de timocitos.....	88
Figura 17. Los timocitos inmaduros DN2 y DN3 expresan más T β RIII en superficie.....	89
Figura 18. La expresión del T β RIII se incrementa en timocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ terminalmente diferenciados.....	90
Figura 19. Análisis del desarrollo de timocitos inmaduros DN en presencia de anticuerpos anti-T β RIII.	92
Figura 20. El bloqueo del ectodominio del T β RIII en FTOCs conlleva una disminuída transición de timocitos DN a DP.	94
Figura 21. Validación a nivel de proteína de la ausencia del T β RIII en cultivos de timos fetales previamente amplificados para el cassette Neo en el gen del T β RIII.....	96
Figura 22. Los timos fetales T β RIII ^{-/-} presentan un desarrollo de células T alterado	97
Figura 23. El desarrollo de las subpoblaciones DNs no está alterado en timos fetales T β RIII ^{-/-}	99
Figura 24. La deficiencia del T β RIII repercute en un incremento en la apoptosis de timocitos en desarrollo.....	101
Figura 25. La deficiencia del T β RIII repercute en un incremento en la apoptosis (anexina V ⁺) en timocitos DP y CD4 ⁺	102
Figura 26. Expresión del T β RIII en células linfoides circulantes y de órganos linfoides periféricos.....	104
Figura 27. Expresión del T β RIII en poblaciones de células T periféricas en homeostasis.....	105
Figura 28. La expresión del T β RIII es incrementada por las señales de activación del TCR.....	107
Figura 29. Las células T reguladoras Foxp3 ⁺ expresan bajos niveles del T β RIII en superficie.....	109
Figura 30. La adición del T β RIII disminuye la generación in vitro de células T reguladoras Foxp3 ⁺ mediada por TGF β	111

Figura 31. Fosforilación de smad2/3 inducida por ligandos de TGF β en las subpoblaciones de timocitos murinos.....	132
Figura 32. La activación de smads mediada por inhibinas depende de la actividad de un receptor tipo I.....	133
Figura 33. El ARNm de ALK7 se expresa en los tejidos linfoide y estromal del timo.....	135

RESUMEN

El receptor tipo III de TGF β (T β RIII) es un co-receptor que une con alta afinidad a miembros de la superfamilia del TGF β como son los TGF β s, las BMPs y las inhibinas potenciando así sus funciones en diversos tipos celulares. TGF β (1-3), BMP2/4 e inhibinas (A y B) regulan importantes puntos de control en la diferenciación de linfocitos T. Además, la función de ciertos miembros de la superfamilia del TGF β como son BMPs puede ser regulada por las señales inducidas a través del receptor de célula T (TCR). Aunque T β RIII está expresado en células hematopoyéticas, el papel de este co-receptor en el sistema inmune ha sido pobremente caracterizado. En el presente trabajo, se caracterizó la expresión de T β RIII en el timo, siendo esta expresión diferencial en los timocitos en desarrollo. El bloqueo y la ausencia de T β RIII induce un retraso en la transición DN-DP durante el desarrollo *in vitro* de linfocitos T, mostrando el mismo patrón de alteración anteriormente descrito en timos deficientes de inhibinas, lo cual sugiere que ambos componentes podrían funcionar como un par molecular en el control del desarrollo de timocitos. Además, la deficiencia de T β RIII en timos fetales repercute en una disminución significativa de los números absolutos de timocitos, la cual es debida a un incremento en los niveles de apoptosis. El análisis de las poblaciones de células T periféricas muestra que T β RIII está mayormente expresado en células T CD4⁺. En condiciones de homeostasis, las células T “naive” presentan más T β RIII en superficie en comparación a las poblaciones de memoria central y memoria/efectora. El análisis de la activación de linfocitos T *in vitro* mediante entrecruzamiento de los complejos TCR/CD28 muestra una expresión temprana de T β RIII y una correlación con la adquisición de los marcadores de activación CD25 y CD44. Por otro lado, T β RIII parece no expresarse en células T reguladoras “naturales” Foxp3⁺, mientras que las células T reguladoras generadas *in vitro* por la señal de TGF β presentan una expresión de T β RIII incrementada. Finalmente, el empleo de la forma soluble de T β RIII (T β RIII_s) reduce la generación de células T reguladoras *in vitro*. Este hallazgo sugiere el uso potencial de T β RIII *in vivo*, por ejemplo en modelos de tumores, donde se requiere controlar el número de células T reguladoras y aumentar la respuesta inmune específica hacia células cancerígenas.

I. Introducción

I.I Sistema Inmune

El sistema inmune es una red de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa hacia infecciones basada en la capacidad de distinguir entre antígenos propios y no propios. El sistema inmune se clasifica en dos tipos diferentes de respuestas: la respuesta innata y la adaptativa. Ambos tipos de respuestas innata y adaptativa trabajan juntas con el fin de montar una respuesta inmune efectiva hacia agentes ajenos a nuestro organismo.

I.I.I Inmunidad innata

Una característica fundamental de la respuesta inmune innata es que ésta ocurre en la misma intensidad independientemente del número de veces en que un agente infeccioso es encontrado. Todos los mecanismos moleculares de esta respuesta constituyen la primera barrera de defensa frente a agentes extraños. La respuesta innata se compone de células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, y macrófagos), de células especializadas en liberar mediadores inflamatorios (basófilos, células cebadas y eosinófilos) y células encargadas de la inducción de apoptosis de manera selectiva de células infectadas o transformadas como son las NK (“Natural Killer”). Los componentes moleculares de la respuesta innata incluyen el complemento, proteínas de fase aguda, citocinas y ciertos interferones. A diferencia de la inmunidad adaptativa, la respuesta innata se desencadena con el reconocimiento de un limitado número de estructuras ó patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) así como aquellos asociados a daño (DAMPs). Este reconocimiento está mediado por el sistema de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), el cual es altamente conservado en la evolución y se caracteriza por desencadenar una variedad de mecanismos moleculares y respuestas dependiendo del PRR activado (1).

En conjunto, la activación de los receptores de la inmunidad innata como son por ejemplo los TLRs (Toll-like receptors), no solo desencadenan mecanismos efectores de ataque hacia el agente infeccioso sino incluso inducen la fagocitosis,

procesamiento y presentación de péptidos derivados de antígenos ajenos al organismo. Esta última función induce la activación y diferenciación de linfocitos generándose respuestas específicas cuando son requeridas. Las células que son capaces de realizar la presentación antigénica de manera especializada son las células dendríticas y en menor grado macrófagos y linfocitos B. Las células dendríticas en particular desempeñan un papel crucial en el establecimiento de la inmunidad adaptativa, induciendo tolerancia ó la inmunidad específica hacia antígenos (1).

I.I.II Inmunidad adaptativa

A diferencia de la respuesta innata, la inmunidad adaptativa es antígeno específica y presenta la propiedad de generar una memoria inmunológica, lo que promueve que la respuesta montada sea más eficaz y rápida en presencia de un segundo reto antigénico. A la luz de la teoría de la selección clonal de Burnett (2), el concepto de la inmunidad adaptativa se sustenta en la generación en cada individuo de un largo repertorio de receptores con gran diversidad en especificidad y una expansión selectiva de clonas con receptores específicos hacia antígenos. Esta propiedad permite que cada individuo posea un único repertorio de receptores inmunes con especificidad única dependiendo de su historia de vida. De tal manera, que la experiencia inmunológica obtenida por un individuo, es decir, la selección de receptores específicos determinado por los tipos de antígenos experimentados, no puede ser heredable y por lo tanto tampoco sujeta a evolucionar.

En la escala evolutiva, desde vertebrados mandíbulados como tiburones hasta humanos, los receptores para antígenos de células T y B (TCR y BCR respectivamente) son codificados como segmentos génicos, los cuáles son sujetos al rearrreglo genético mediante la recombinación llevada a cabo por las proteínas RAG1 y 2, las cuáles también son indicadoras de la emergencia en la evolución de la inmunidad adaptativa (3, 1).

La inmunidad adaptativa comprende a la inmunidad humoral, o mediada por anticuerpos, y a la inmunidad mediada por células. Ambos tipos de respuesta se llevan a cabo mediante un amplio repertorio de receptores altamente específicos, los cuales se originan por una serie de eventos de recombinación genética durante los estados tempranos de desarrollo de los linfocitos B y T, lo cuál ocurre en la médula ósea y en el timo, respectivamente.

La inmunidad humoral está mediada por linfocitos B, células especializadas en la producción de anticuerpos. De manera general los anticuerpos están conformados por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas covalentemente, y presentan una región de reconocimiento específico hacia antígenos. En vertebrados superiores existen 5 clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La diversificación en nuevos isotipos de anticuerpos de BCRs rearrreglados previamente en médula ósea es generada por conversión génica, recombinación de cambio de isotipo e hipermutación somática, procesos que ocurren en órganos linfoides periféricos (1, 4).

La unión de los anticuerpos al patógeno, denominada opsonización, facilita la fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos. Los anticuerpos pueden ser reconocidos directamente o mediante el sistema de complemento. De manera paralela, anticuerpos como la IgE están involucrados en la regulación de diversos procesos inflamatorios que se presentan en reacciones alérgicas como el asma (4).

La inmunidad adaptativa mediada por células es llevada a cabo por los linfocitos T. Los linfocitos T se caracterizan por presentar en su superficie un receptor de célula T denominado TCR (T cell receptor). El TCR es un heterodímero compuesto por cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Existen dos tipos de linfocitos T $\alpha\beta$ definidos por la expresión del co-receptor CD4 o CD8: los linfocitos T CD4⁺ o ayudadores (Th) y los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos (4). Por otro lado, también existen linfocitos que expresan un TCR compuesto de cadenas $\gamma\delta$, los cuáles tienen particularidad de ser capaces de reconocer antígenos no proteícos, tales como glicolípidos presentados por moléculas de MHC no convencionales como CD1 (5).

Como regla general, los linfocitos T CD4⁺ mediante su TCR reconocen antígenos acoplados en moléculas de MHC-II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II), mientras que los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos acoplados en moléculas de MHC-I. Ambos linfocitos T desencadenan respuestas altamente específicas hacia antígenos no propios, propiedad obtenida mediante los procesos de selección en el timo (6). A diferencia de los linfocitos T CD8⁺, los linfocitos T CD4⁺ mantienen una amplia red de regulación inmune mediante la secreción de moléculas solubles que actúan sobre otros tipos celulares durante la polarización de la respuesta inmune. De manera interesante, esta subpoblación tiene la característica de poseer una alta plasticidad funcional (7, 8). Las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en las clásicas Th1 y Th2, y recientemente en Th17, en células T ayudadoras “helper” foliculares (Tfh), en células T reguladoras naturales (nTreg) e inducibles (iTreg) Foxp3⁺, en células Tr1, Th3 y en células Th9 (tabla 1).

Las células Th1 se caracterizan por la producción de IFN γ y están involucrados en la inmunidad contra patógenos intracelulares. La polarización Th1 requiere de la influencia de la citocina IL-12 secretada por células de la inmunidad innata y de IFN- γ producido por NKs y células T, las cuáles programan la diferenciación hacia Th1 mediante la activación de Stat4, Stat1 y el factor de transcripción T-bet (4). En el caso de una respuesta Th2, las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13 y son requeridas en la inmunidad humoral para controlar patógenos como helmintos y otros organismos extracelulares. La diferenciación de células Th2 requiere de las señales de IL-4 mediadas por Stat6 y la activación de GATA3 (4). Las células Th3 producen específicamente TGF β y están relacionadas con el establecimiento de la tolerancia oral, la producción de anticuerpos IgA y suprimen respuestas de tipo Th1 y Th2. La diferenciación *in vitro* de estas células requiere de las señales de TGF β , IL-4, IL-10 y el bloqueo de las señales inducidas por IL-12 (9).

	Marcadores en superficie	Señales requeridas/factores de transcripción	Moléculas secretadas	Funciones
Th1	IL-12R, IFN γ R, CXCR3	T-bet, STAT4, STAT1	IFN γ , IL-2, LT α	Protección hacia patógenos intracelulares
Th2	IL-4R, IL-33R, CCR4, IL-17RB, CRTH2	GATA3, STAT6, DEC2, MAF	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10	Inducción de respuestas humorales y defensa contra parásitos extracelulares.
Th3	Desconocidos	TGF β , IL-4, IL-10	TGF β	Promueve producción de IgA y suprime respuestas Th1 y Th2. Involucrada en tolerancia oral.
Th9	Desconocidos	PU.1, IRF4	IL-9, IL-10, IL-4	Defensa contra parásitos extracelulares principalmente nemátodos.
Th17	IL-23R, CCR6, IL-1R,	ROR γ t, STAT3, ROR α	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, CCL20	Inmunidad contra patógenos extracelulares y hongos en mucosas.
Tfh	CXCR5, SLAM, OX40L, CD40L, ICOS, IL-21R, PD1	BCL-6, STAT3	IL-21	Promueven protección inmediata bajo reto antigénico
Tr1	Desconocidos	TGF β , IL-27	IL-10	Immunosupresión mediada por IL-10.
iTregs Foxp3 ⁺	CD25, CTLA4, GITR, CD5	FOXP3, FOXO1, FOXO3, STAT5, SMAD2, SMAD3, SMAD4	IL-10, TGF β	Promueven inmunosupresión y respuestas tolerogénicas
nTregs Foxp3 ⁺	CD25, CTLA4, GITR, CD5	FOXP3, STAT5, FOXO1, FOXO3	IL-10, TGF β , IL-35	Promueven inmunosupresión y respuestas tolerogénicas

Tabla 1. Especialización de células T CD4⁺ periféricas en la inducción y/o control de una respuesta inmune. Información obtenida de la revista Nature Reviews of Immunology (<http://www.nature.com/nri/posters/tcellsubsets/index.html>) y enriquecida con cada una de las citas referidas en el texto.

Las células Th17 se caracterizan por producir IL-17A, IL-17F e IL-22, las cuáles juegan un papel importante en la eliminación de bacterias extracelulares y hongos, especialmente en mucosas. La diferenciación hacia el fenotipo Th17 requiere de la activación del factor de transcripción ROR γ t, el cuál es inducido por TGF β en combinación con citocinas proinflamatorias IL-6, IL-21 e IL-23 (10, 11). Otro

fenotipo Th son las células T_{fh}, las cuáles regulan la maduración de las respuestas de células B induciendo una protección inmediata tras un reto antigénico. La diferenciación de estas células requiere de la citocina IL-21(12).

Existen ocasiones donde se dan respuestas aberrantes y/o exacerbadas lo que da lugar a respuestas autoinmunes específicas a órganos como es en el caso de respuestas Th1 y Th17, mientras que una respuesta crónica de Th2 puede dar lugar a alergias y asma. Recientemente, se ha descrito una nueva población de células Th denominadas Th9 caracterizadas por expresar altas cantidades de IL-9 e IL-10. Estas células son generadas con la activación mediada por células presentadoras de antígenos y en presencia de TGFβ e IL-4 (13). Aunque se ha asociado a las células Th9 en dirigir patología como asma alérgica y enfermedades inflamatorias intestinales, hasta la fecha todavía es necesaria un mayor esclarecimiento acerca del papel de estas células en estas condiciones (13).

Existen subpoblaciones de células T CD4⁺ conocidas como células T reguladoras que presentan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune, regulando las respuestas efectoras y previniendo la potencialidad de estas a desencadenar efectos patógenicos mediante distintos mecanismos (14, 15). Las células T reguladoras son conocidas por expresar el factor de transcripción Foxp3, el cual juega un papel crítico en la especificación y mantenimiento de un fenotipo regulador (16). Existen dos tipos principales de células T reguladoras Foxp3⁺: las células T reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺ (nTreg) que surgen del timo y aquellas inducidas en periferia por la señal de TGFβ1 (iTreg) (17, 18). Ambos tipos de células Treg Foxp3⁺ mantienen la tolerancia periférica mediante el empleo de una diversidad de mecanismos como la producción de citocinas inhibitorias, inducción de citolisis, disrupción metabólica y regulación de la maduración y función de células dendríticas (14, 15).

Una de las similitudes entre células Th17 y iTregs es la dependencia en su diferenciación de las señales de TGFβ1. Evidencia acumulada sugiere que las

iTregs y células Th17 presentan una alta plasticidad entre estas, debido a la inestabilidad en expresión de Foxp3 por las iTreg o de IL-17 por las células Th17, lo cuál se relaciona a una gran flexibilidad en sus opciones de diferenciación (19). Esta flexibilidad se ha descrito que puede ser explicada por cambios epigenéticos que influyen en los programas de expresión génica durante la polarización y expansión de células T CD4⁺ (20).

I. II. Ontogenia de linfocitos T

La generación de células T auto tolerantes en vertebrados es llevada a cabo en el timo, el cuál es un órgano bilobulado localizado en un compartimento central de la cavidad torácica, en la parte superior al corazón y por detrás del esternon. Estudios de desarrollo embrionario han demostrado que el timo tiene un origen en común con las glándulas paratiroides y tiroides, todos ellos derivados del tubo intestinal endodermal (21, 22). En ratón, el primordio tímico se genera a partir del tercer saco faríngeo endodérmico entre los días embrionarios E10.5 y 11.5 y requiere de la acción coordinada de los factores de transcripción Hoxa3, Pax1, Ella 1, Pax 9 y six 1 que participan en el posicionamiento, iniciación y diferenciación del primordio tímico (21). El primordio tímico totalmente indiferenciado alberga a progenitores tímicos epiteliales (K5⁺, K8⁺, MTS20⁺ y MTS24⁺) que entran al primordio a través de la región corticomedular con el fin de diferenciarse a células epiteliales de corteza y médula (21, 22). Se ha establecido que el factor de transcripción Foxn1 es el responsable de este proceso debido a que la deficiencia de este factor en ratón repercute en un bloqueo de la generación de células epiteliales tímicas afectando así la diferenciación de células T (23-25). Además, se ha observado que la definición anatómica de la médula y la corteza requiere de forma esencial de la interacción bidireccional entre células epiteliales tímicas inmaduras y de los timocitos en desarrollo (26-28).

Estructuralmente el timo se caracteriza por dos tejidos: un tejido de naturaleza linfoide y un tejido estromal. Además el timo comprende regiones anatómicas bien diferenciadas; la médula constituida por timocitos, células epiteliales medulares, macrófagos y células dendríticas, y una región externa, denominada corteza, que alberga a timocitos inmaduros que requieren de la interacción con células epiteliales corticales para su desarrollo (figura 1).

I.II.I. Proceso de desarrollo

En el timo adulto, las distintas etapas en diferenciación de los timocitos pueden ser identificadas con base a la expresión de los co-receptores CD4 y CD8: dobles negativos o DN ($CD4^-CD8^-$), dobles positivos o DP ($CD4^+CD8^+$) y simples positivos o SP ($CD4^+$ o $CD8^+$). Los timocitos dobles negativos a su vez se pueden dividir con base a la expresión de los marcadores CD44 y CD25 en las subpoblaciones DN1 ($CD44^+CD25^-$), DN2 ($CD44^+CD25^+$), DN3 ($CD44^-CD25^+$) y DN4 ($CD44^-CD25^-$) (figura 1). Dentro de la subpoblación DN1 se encuentran progenitores que presentan la capacidad de generar poblaciones de linfocitos α/β y γ/δ , células dendríticas y células naturales asesinas (NKs). Por último estos progenitores presentan la potencialidad de generar células de linaje mieloide y hacia linfocitos B(29).

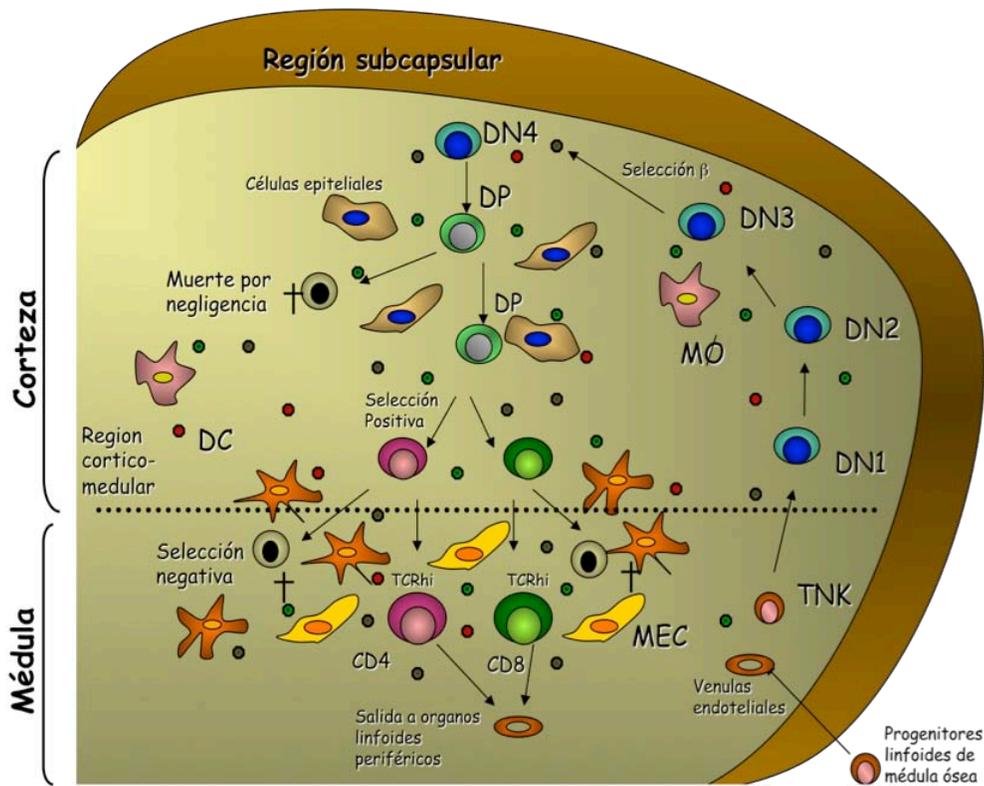


Figura 1. Desarrollo de linfocitos T en el timo. El desarrollo de células T inicia con la entrada de precursores al timo por la vénula del alto endotelio (HEV), posteriormente ocurren una serie de estadios celulares identificados por la expresión de los marcadores CD4 y CD8 (DN: CD4⁻CD8⁻, DP: CD4⁺CD8⁺, y SP: CD4⁺ o CD8⁺). El timo presenta 2 regiones especializadas denominadas corteza y médula. En el timo ocurren los procesos de selección positiva, negativa y muerte por negligencia, todos ellos consecuencia de la presentación de péptidos endógenos en contexto de un tipo de MHC a los TCR recién formados por recombinación genética. TEC: Célula Epitelial Tímica; MEC: Célula Epitelial Medular. (Imagen cortesía de Soldevila).

I.II.II. Reclutamiento de progenitores al timo y diferenciación temprana.

El desarrollo de timocitos inicia con la entrada de progenitores (Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺) provenientes de la médula ósea por medio de las venulas localizadas en la región cortico-medular. Se ha descrito que distintas subpoblaciones de progenitores tienen la potencialidad de diferenciarse al linaje T, sin embargo, se ha propuesto que los principales progenitores reclutados al timo son: progenitores multipotentes Flt3^{hi} (LMPPs, lymphoid primed-multipotent progenitors) que expresan el gen de activación de la recombinación (RAG) y progenitores linfoides comunes (CLPs, Common lymphoid progenitors) (6, 30, 31). Sin embargo, el reclutamiento o “homing” de estos depende de la expresión de varias moléculas en su superficie,

dentro de los que destacan los receptores de quimiocinas CCR7 (expresado por algunos LPMPPs y altamente expresados en CLPs), CCR9 (expresado por una subpoblación de LPMPPs y CLPs) y el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL1) (expresado por todos los progenitores) (32-34). Otros receptores que contribuyen a este “homing” al timo son CXCR4, CCR5 y el receptor 2 tipo B de efrinas (EPHB2) (35-37).

I.II.III. Diferenciación en el timo.

Una vez dentro del timo, los progenitores inician su diferenciación y eventualmente el compromiso de manera irreversible al linaje T. Estos progenitores migran como timocitos dobles negativos a la región subcapsular y luego entran a la corteza externa donde se diferencian en timocitos dobles positivos (38). Esta migración de la región cortico-medular hacia la zona subcapsular esta gobernada por interacciones con integrinas, proteínas de matriz extracelular y facilitada por señalización de receptores de quimiocinas como CXCR4, CCR7 y CCR9 (39-41). El compromiso al linaje T ocurre en el estadio DN3 que coincide con el rearreglo de los segmentos V(D)J de los genes que codifican a la cadena β (TCR β), cadena γ (TCR γ) y cadena δ (TCR δ). El rearreglo productivo de las cadenas TCR γ y TCR δ generará linfocitos T $\gamma\delta$ (42). Por otro lado, el rearreglo productivo de las cadenas TCR β producirá la expresión en la superficie de células DN3 de una cadena α invariante (pre-T α) (figura 1 y 2). El complejo resultante se denomina pre-TCR, e induce una señalización autónoma (selección β) que da pauta al rearreglo de la cadena α (dada por RAG1 y 2), el término del rearreglo de la cadena β , la disminución de la expresión de CD25, proliferación celular y avance hacia el estadio doble positivo (CD4⁺CD8⁺) (figura 2) (43, 44). Se ha descrito que la señalización inducida por el pre-TCR incrementa la expresión de CCR9 en timocitos DN3, lo cuál es importante para la localización de estas células en la zona subcapsular (45, 40). Por otro lado, CXCR4, funciona como un coestimulador junto con el pre-TCR en la selección β induciendo señales de sobrevivencia, proliferación celular y quimiotaxis (46).

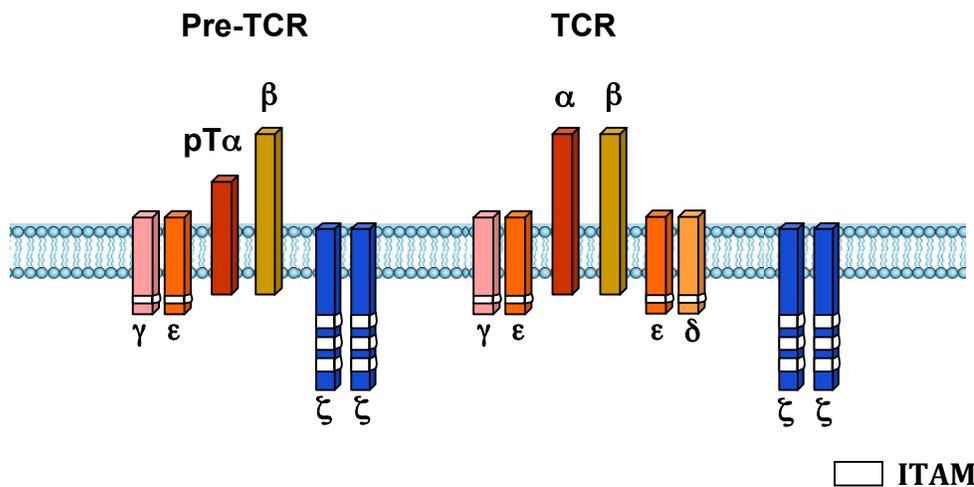


Figura 2. Estructura molecular de los complejos del pre-TCR y TCR. El complejo del Pre-TCR se conforma de la cadena no polimórfica pT α acoplada a una cadena β , dímeros de CD3 $\gamma\epsilon$ y de CD3 $\zeta\zeta$. Por su parte, el complejo del TCR maduro se conforma de una cadena α acoplada a una cadena β , dímeros de CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\zeta\zeta$. Los dominios ITAM (YXXL/IX_{e-8}YXXL/I) son mostrados en los tallos citoplásmicos del complejo CD3.

Los timocitos ya en el estadio DN4 migran hacia la corteza para diferenciarse en timocitos DP (CD4⁺CD8⁺). Aunque los timocitos DP expresan CXCR4 y CCR9 siendo capaces de responder a las quimiocinas CXCL12 y CCL25, se sugiere que esta translocación de células desde la zona capsular a la corteza está dirigida por las proliferativas inducidas en el estadio DN3 (47). Durante la etapa doble positiva (CD4⁺CD8⁺) los timocitos coexpresan en su superficie los co-receptores CD4 y CD8 y presentan bajos niveles de expresión de TCR $\alpha\beta$ ensamblados con complejos de proteínas CD3 (figura 1 y 2) (48, 49).

Los timocitos dobles positivos constituyen aproximadamente el 90% del total de los timocitos del compartimento tímico, y experimentan cuatro procesos importantes dependiendo de la presentación de péptidos endógenos por células tímicas estromales por parte de moléculas MHC: muerte por negligencia, selección negativa, selección positiva y elección de un linaje específico (CD4⁺ o CD8⁺) (figura 1) (48, 49). La mayoría de los timocitos dobles positivos ($\approx 90\%$) no son capaces de reconocer complejos de MHC con péptidos propios y mueren por negligencia. Una pequeña fracción ($\approx 5\%$) continúan su proceso de diferenciación

gracias a que reconocen péptidos endógenos con una avidéz baja/intermedia y son rescatados de la muerte celular programada y seleccionados positivamente. Los timocitos seleccionados positivamente culminan su diferenciación hacia CD4⁺ ayudadores o CD8⁺ citotóxicos y salen del timo hacia los órganos linfoides periféricos a ejercer su función (figura 1) (48, 49). Los timocitos seleccionados positivamente disminuyen su expresión de CXCR4 (50) y aumentan CCR7 y CCR4 (51-53). Resulta interesante que timocitos DP seleccionados migran dirigidamente hacia la médula en respuesta a ligandos de CCR7 y CCR9 (51, 54, 55). Sin embargo, CCR7 parece ser determinante de la entrada de timocitos SP inmaduros hacia la médula, aunque esta dependencia de las señales de CCR7 es más observada para timocitos SP CD8⁺ (56, 52, 57, 53).

Los timocitos cuyos TCRs presentan una alta afinidad/avidéz al complejo MHC-péptido, son dirigidos a apoptosis, a través de un proceso denominado selección negativa, que constituye el mecanismo principal de la tolerancia central en linfocitos T, asegurando la eliminación de la mayoría de células T autoreactivas involucradas en patologías autoinmunes (48, 49). La selección negativa es mediada por la presentación de antígenos propios por células epiteliales medulares tímicas (58). Esta expresión de antígenos propios es controlada por la actividad del factor regulador autoinmune AIRE, el cuál es expresado por células epiteliales tímicas medulares (59, 58).

Los timocitos SP muestran una diferenciación terminal a partir de un fenotipo semi-maduro activado (CD69^{hi}CD62L^{low}CD24^{hi}) a uno maduro en reposo (CD69^{low}CD62L^{hi}CD24^{lo}). Durante esta transición los timocitos todavía están sujetos a señales pro-apoptóticas características de la selección negativa(60-62). Una vez diferenciados, la salida de los timocitos SP a periferia es controlada por diversos factores. Entre los más importantes esta la señalización inducida por el TCR, y la consecuente expresión de CD69, como marcador de una activación reciente a través del TCR. Un modelo del control del exporte de timocitos a periferia propone que en timocitos SP CD69⁺ que han sido recientemente

activados por antígenos propios, AKT (activado por las señales del TCR) mantiene fosforilado a FOXO1 reduciendo su actividad transcripcional. Esta reducción de la actividad de FOXO1 (Forkhead box 1) lleva a la disminución de la transcripción de KLF2 (Krüppel-like transcription factor), el cual es requerido para la expresión de S1PR1 (sphingosine phosphate receptor 1), dando en consecuencia la retención de los timocitos SP en el timo. De manera contraria, los timocitos SP maduros CD69⁻, los cuales no han sido recientemente activados a través del TCR, incrementan la transcripción de S1PR1 y KLF2 promoviendo la salida de timo a periferia (6, 63-67). De forma interesante, FOXO1 también controla la expresión de CD62L y CCR7 (63). Otro mecanismo propuesto para el exporte de timocitos es la inhibición recíproca entre CD69 y S1P1. Se ha observado que CD69 se asocia con S1P₁ e inhibe la función de su receptor (S1P1r) induciendo su internalización y degradación (68, 69). Por otro lado, la señalización inducida por S1P1 inhibe la expresión de CD69 en la superficie de los timocitos SP (70), por lo que la expresión de CD69 inducida por las señales del TCR en timocitos SP semimaduros inhibe la expresión en superficie de S1P1R, inhibiendo la salida de timocitos a periferia (68, 69).

I.II.IV. Generación de células T reguladoras en el timo.

El timo también es responsable de la producción de las células T reguladoras “naturales”, las cuales mantienen la tolerancia hacia lo propio mediante diversos mecanismos. Se ha descrito que las células T reguladoras “naturales” son importantes en la prevención de enfermedades autoinmunes (71), en la supresión de respuestas a alo-injertos y tumores (72), y en el restablecimiento de la homeostasis una vez desencadenada una respuesta inmune efectora, previniendo así la exarcebación de una respuesta que conlleve a inmunopatologías severas (73). Existe controversia acerca de las señales moleculares requeridas para la generación de células T reguladoras en el timo. Sin embargo, varios estudios en modelos transgénicos que condicionan la generación de células T específicas a un antígeno han mostrado que las células T reguladoras naturales requieren de una señal de alta avidéz mediada por el TCR y la expresión del antígeno por células

estromales tímicas para ser seleccionadas (74, 75). Cabe mencionar que esta alta avidéz es muy cercana a aquella que desencadena la selección negativa de los timocitos. De hecho, se ha observado que la reducción de las señales inducidas por el TCR se correlaciona con una disminución de las células T reguladoras, mientras que el aumento de la intensidad de la señal de TCR favorece su generación (76). Por ejemplo, la ausencia o disfunción de componentes de la vía del TCR como son LAT/PLC- γ 1 (77) o de la vía Raf/Mek/Erk (78) repercuten en la disminución o ausencia de las células T reguladoras, respectivamente. En contraste, la ausencia de reguladores negativos del TCR como SHP-1 (79) o una actividad reducida de GITR (80), promueve un enriquecimiento de células T reguladoras.

Aunado al mecanismo anterior, se han propuesto señales adicionales a las del TCR que participan en la generación de las células T reguladoras naturales. Se propone que la generación de estas células ocurre en un proceso de 2 pasos: el primero dependiente de la alta avidéz de las señales del TCR que da lugar a la generación de células precursoras CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁻, y la siguiente fase donde estas células precursoras expresan Foxp3 en respuesta a citocinas IL-2 e IL-15 que inducen señales a través de la cadena gamma común (γ c) y activan a la vía Jak/Stat (81). Adicionalmente, se ha propuesto un mecanismo alternativo que propone que el enriquecimiento de las células T reguladoras en modelos de alta avidéz por el TCR es debido a un cambio en la proporción entre las células T reguladoras y las células T vírgenes (no reguladoras) dada por la muerte preferencial de estas últimas, mientras que las reguladoras muestran una mayor resistencia a la apoptosis (82). En este sentido, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la ausencia de CD5, una glicoproteína membranal de tipo I (67kDa), repercute en la generación de novo de las células T reguladoras naturales y una reducción selectiva de timocitos vírgenes CD4⁺CD25⁻ debido a una apoptosis incrementada y posiblemente a la disminución de las señales de sobrevivencia mediada por Akt (83). Recientemente, se ha demostrado que la protección de la apoptosis en células T reguladoras naturales puede también estar

mediada por la señal de TGF β , manteniendo un balance adecuado de proteínas pro-apotóticas (Bim, Bax y Bak) y anti-apoptóticas (Bcl-2) (84). Finalmente, otras señales involucradas en la generación y/o mantenimiento de células T reguladoras naturales incluyen las moléculas coestimuladoras CD28 y B7 (85, 86), citocinas como IL-7 (87) y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) (88).

I.II.V. Señalización mediada por Notch durante el desarrollo de células T

La señalización mediada por Notch es una de las más conservadas en la evolución y opera sobre distintos tipos celulares y en varias etapas durante el desarrollo embrionario (89, 90). En mamíferos podemos encontrar 4 receptores Notch (Notch 1-4) y 2 familias de ligandos conocidos como “delta-like” (Dll1, Dll3 y Dll4) y Jagged (Jagged1 y Jagged2) (89-91). Notch es un receptor heterodimérico anclado a la superficie celular y está involucrado en una variedad de procesos celulares. Este receptor se compone por un dominio extracelular de unión a ligando, el cual está asociado de forma no-covalente de un dominio simple transmembranal. La vía canónica es iniciada con la unión del ligando al dominio extracelular, lo cual desencadena cortes secuenciales del receptor, el primero mediado por la familia de proteasas ADAM que corta la región extracelular (a disintegrin and metalloproteinase) y el segundo por el complejo de la γ -secretasa, el cual está constituido por presenilina 1 y presenilina 2, que cortan la región intramembranal (91). El corte del ectodominio induce la liberación del dominio intracelular (Notch-IC) de la membrana celular y su posterior translocación al núcleo donde se asocia con el factor de unión a DNA RPBJ (recombination-signal-binding protein for immunoglobulin- κ J region) y con el co-activador MAML1 (Mastermind-like 1) con el fin de activar la transcripción de diversos genes. La actividad del dominio intracelular de Notch es terminada por eventos de poliubiquitinación y la subsecuente degradación proteosomal (91). Se ha demostrado que la señalización de Notch en el timo es importante en la determinación del linaje T versus el linaje B en progenitores colonizadores (92). Por ejemplo, se ha observado que los progenitores deficientes de Notch 1 son capaces de diferenciarse en células T pero mantienen su potencialidad al linaje B

(93). Por otro lado el epitelio tímico expresa los ligandos DLL1 y DLL4, principalmente (94, 95). Se ha establecido que la activación de Notch es necesaria para mantener la sobrevivencia de progenitores (ETP) con potencialidad $\alpha\beta/\gamma\delta$ y de progenitores con potencialidad $\alpha\beta$ (42). Sin embargo, la decisión del compromiso hacia $\alpha\beta$ o a $\gamma\delta$ no depende de la activación de Notch. De forma interesante, en células comprometidas al linaje $\alpha\beta$, la señal inducida a través del pre-TCR en el estadio DN3 sinergiza con la activación de Notch y promueve la proliferación y maduración hacia el estadio DP (42).

I.III. Señalización inducida por el complejo del TCR/CD3

Es bien sabido que la señalización mediada por el TCR requiere de la interacción entre el timocito o célula T madura y una célula presentadora de antígeno (APC). La estructura generada de la interacción entre ambas células se conoce como sinapsis inmune, evento sumamente importante en la transmisión bidireccional de señales que permiten el buen funcionamiento inmunológico, ejerciendo tolerancia hacia antígenos propios y respondiendo hacia agentes extraños o infecciosos para generar eventualmente la memoria inmune (96). Es por ello que el resultado de la señalización del TCR durante el desarrollo de los linfocitos T es determinante en los procesos de selección negativa, selección positiva y el compromiso a un linaje específico T CD4⁺ o CD8⁺, debido a que la magnitud en la activación de diferentes vías intracelulares que éstas desencadenan dictará el destino de los timocitos dobles positivos y en consecuencia el repertorio de células T de un individuo.

El umbral de afinidad/avidez con el cuál un TCR reconoce a un péptido acoplado a un MHC desencadena la fosforilación de dominios denominados ITAMS (Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif) localizados en los tallos citoplásmicos de las cadenas del complejo TCR/CD3, los cuales suman 10 ITAMS en total (figura 2). Esta fosforilación está mediada por miembros de la familia de cinasas Src como Lck (p56^{lck}) y Fyn (p59^{fyn}) permitiendo el reclutamiento de ZAP-70 (Zeta-associated protein of 70kDa) por medio de su dominio SH2. ZAP-70 fosforila a la

proteína adaptadora LAT (Linker for Activated T cells), la cual recluta a otras proteínas adaptadoras y efectoras dando como resultado el establecimiento de una plataforma de señalización donde se activan diferentes vías intracelulares, dentro de las cuales destacan la vía de las MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos), la vía de movilización de calcio y las vías que llevan al rearrreglo del citoesqueleto (figura 3) (97).

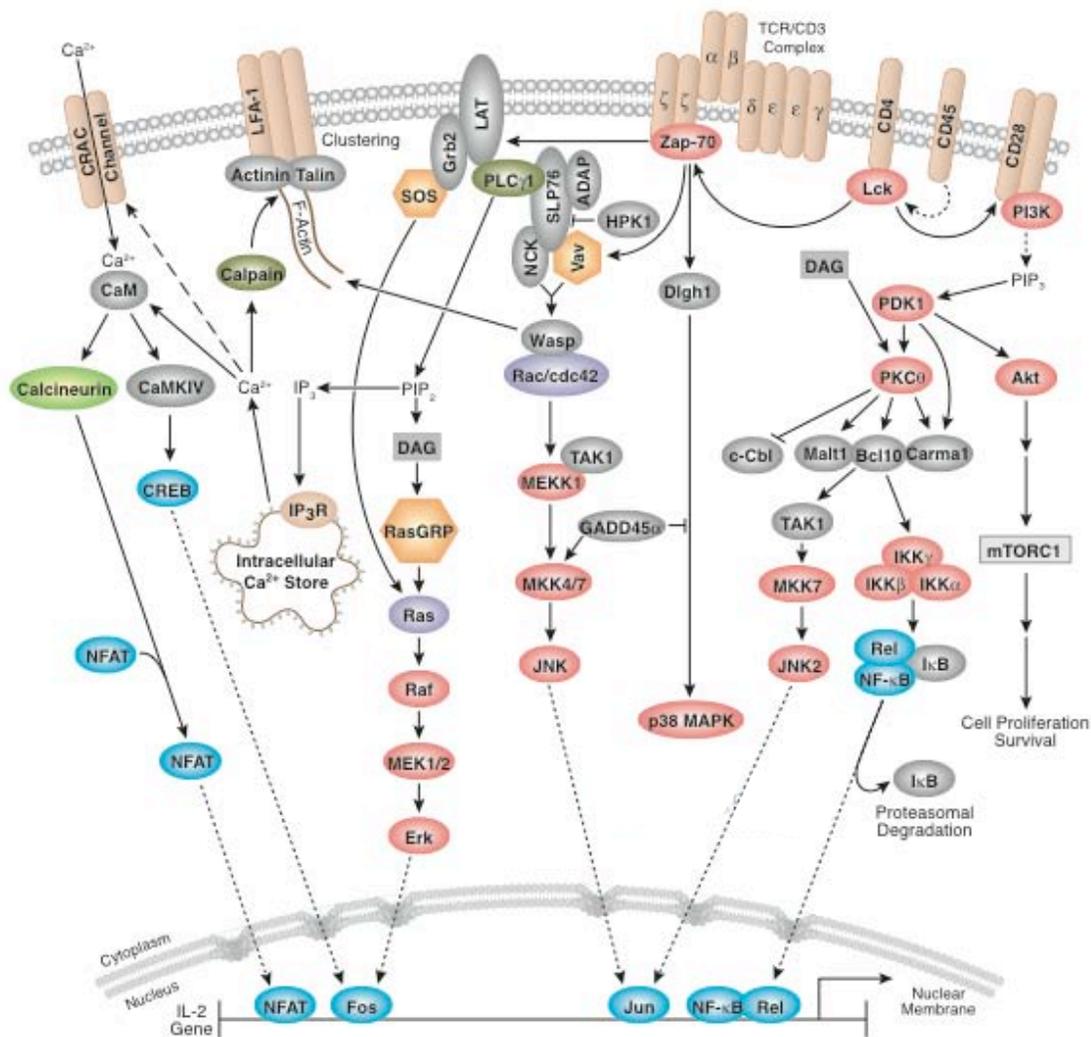


Figura 3. Vías de señalización inducidas por el complejo TCR/CD3. La interacción del complejo MHC-péptido/TCR desencadena una activación de diferentes vías intracelulares que promueven la transcripción y expresión de genes involucrados en supervivencia, apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Las vías intracelulares desencadenadas incluyen MAP cinasas (ERK1/2, p38 y JNK), vías que participan en el rearrreglo del citoesqueleto y en la movilización de Ca^{2+} intracelular. Adaptado de Lin y Weiss, 2001.

I.III.I. Vía de las MAP cinasas

La familia de las MAP cinasas incluye a ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38, JNK, ERK3/4 y ERK5 (98). Las MAP cinasas son activadas por fosforilación en residuos de tirosina y treonina por MKKs (cinasas de las MAP cinasas). La señalización de ERK1/2 inicia con el reclutamiento de Sos (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) mediante la proteína adaptadora Grb2, dando como resultado la activación de Ras. Ras es una GTPasa que al ser activada (Ras-GTP) puede unirse a diferentes moléculas efectoras reclutándolas a la membrana, como son las cinasas Raf, PI3K (Cinasa de Fosfatidil Inositol Trifosfato) y PKC (Proteína cinasa C). El principal sustrato de Ras es la cinasa Raf que presenta varias isoformas (A-Raf, B-Raf y Raf1), todas pueden fosforilar y activar a MEK (cinasa de ERK). MEK presenta 2 isoformas MEK1 y MEK2. MEK activa a ERK mediante la fosforilación de residuos de tirosina y treonina. La cinasa ERK es considerada el principal efector de esta vía y presenta varios sustratos como factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto y proteínas involucradas en señalización intracelular (99).

En la familia de la MAP cinasa p38 se han identificado cuatro miembros: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Las isoformas p38 α y p38 β se encuentran ampliamente expresados, mientras que la expresión de p38 γ está restringida a músculo esquelético y p38 δ al páncreas, intestino delgado y a células T CD4⁺. La activación de p38 también es inducida por ciertos estímulos como son hormonas, radiación ultravioleta, citocinas como IL-1, TNF- α , choque osmótico y calor. Estos estímulos inducen la activación de GTPasas de Rho (Rac1 y Cdc42), las cuales activan a las cinasas MAPKKKS (MTK1, TAK1 y ASK1). Estas cinasas activan a MAPKKs (MKK3, MKK4 y MKK6) mediante fosforilación en residuos de serina y treonina, permitiendo a su vez la activación de p38 (100).

La familia JNK(c-Jun N-terminal Kinase) incluye a JNK1, JNK2 y JNK3, aunque pueden originarse varias isoformas por “splicing alternativo”. JNK1 y JNK2 son ampliamente expresados en diversos tejidos, mientras que la expresión de JNK3

se restringe a cerebro, corazón y testículo. La cinasa JNK es activada mediante fosforilación por MKK7 y MKK4 que a su vez activan a p38. MKK4 es activado principalmente por estrés ambiental, mientras que MKK7 es activado por citocinas como TNF- α e IL-1. JNK fosforila a diversos factores de transcripción como junB, JunD, ATF-2, AP-1, miembros de la familia NFAT, y sustratos involucrados en apoptosis como Bcl-2 y Bcl-xl (101).

I.III.II. Vía de movilización de calcio

Inicia con el reclutamiento de PLC γ a LAT y la activación por parte de cinasas de las familias de Src, Syk y TEC como Lck, ZAP-70 e Itk/Rlk, respectivamente. La principal función de PLC γ es hidrolizar a la molécula lipídica fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para convertirlo en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y en diacilglicerol (DAG). IP₃ permite la liberación de calcio por parte del retículo endoplásmico mediante su interacción con receptores específicos (IP₃R) localizados en estos organelos celulares. El aumento de la concentración de calcio intracelular permite la apertura de canales CRAC (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels) en la membrana plasmática, que a su vez incrementan la concentración intracelular de este ión (102, 103).

El Ca²⁺ induce cambios en expresión génica mediante la activación de varias cinasas y fosfatasas, por ejemplo el Ca²⁺ regula la actividad de los miembros de la familia de CaMK. Estas cinasas fosforilan a varios factores de transcripción como CREB (Cyclic-AMP Response Element-Binding protein). La fosfatasa Calcineurina activada por Ca²⁺ es la responsable de defosforilar al factor de transcripción NFAT induciendo su translocación al núcleo (102, 103).

I.III.III. Vía PI3K/AKT

Otra vía que se activa mediante la estimulación del TCR es la iniciada por la cinasa PI3K, que es una cinasa de lípidos y de residuos de serina y treonina en blancos proteicos. PI3K cataliza la conversión de PIP₂ a PIP₃, el lípido PIP₃ generado activa a efectores “río abajo” como AKT. AKT puede inactivar factores pro-apoptóticos como BAD y pro-caspasa 9, y a su vez induce la activación de

factores de transcripción como CREB que regula la expresión de genes anti-apoptóticos. La activación de IKK (I κ B Kinase) es mediado también por PI3K; IKK activado fosforila al represor I κ B- α permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo (104).

La activación de la familia de PKC que presenta 9 isoformas (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ , PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η y PKC μ /PKD) es dependiente de Ca²⁺ y ésteres de forbol. En linfocitos T, DAG recluta a PKC θ en membrana donde es fosforilado por Lck. PKC θ está involucrado en la activación de algunos miembros de las MAP cinasas y en la estabilización la estabilidad de la sinapsis inmunológica (105). PKC θ y PKC α han sido involucradas en la activación de la vía de NF- κ B mediante la fosforilación de I κ B- α , marcándolo para la degradación por el proteosoma y permitiendo así la translocación de NF- κ B al núcleo (106).

I.III.IV. Vía de rearreglo de citoesqueleto

El rearreglo del citoesqueleto de actina está en parte mediado por la actividad de las GTPasas Rho. Esta actividad se modula por el intercambio entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo(unido a GDP). La transición entre estos dos estados conformacionales es regulada por tres clases de proteínas: GAPs (GTPase Activating Proteins) que estimulan la actividad de GTPasa; GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), que mantienen a la GTPasa en su estado inactivo unido a GDP, y GEFs (Guanine Exchange Factors) que facilitan el intercambio de GDP por GTP, activando a las GTPasas Rho, Rac y Cdc42 (107, 108).

En la interacción del complejo MHC/péptido-TCR se desencadenan una serie de cambios morfológicos que repercuten en la estabilidad de la sinapsis inmunológica que se está llevando a cabo. Cinasas de la familia Src (Lck y Fyn) activan a Vav mediante el reclutamiento de éste a través de las proteínas adaptadoras SLP-76 y LAT. La proteína Vav es un GEF que activa a las GTPasas Rho. Vav se asocia a vinculina y talina en la membrana permitiendo el acople de F-actina a la membrana celular y mediante la actividad de GEF activa a la GTPasa Rac y Cdc42. Esta última activa a su vez a la proteína WASP (Wiskott-Aldrich

Syndrome Protein), la cual forma un complejo con Arp2 (Actin Related Protein 2) y Arp3, permitiendo la polimerización de actina (109, 108). La remodelación del citoesqueleto de actina inducida por las señales del TCR constituye un mecanismo regulador del reclutamiento de receptores y proteínas intracelulares a la zona de contacto entre un linfocito T y una célula presentadora de antígenos (APC).

I.IV. Señalización mediada por la Superfamilia del TGF β

Varias funciones básicas de todos los organismos multicelulares o metazoarios, como son proliferación, diferenciación, integración de tejidos, metabolismo y muerte, son controladas por una compleja red de comunicación celular dada por diversos factores de crecimiento, dentro de los cuales los ligandos de la superfamilia del TGF- β (Transforming Growth Factor β) juegan un papel prominente (110, 111). Esta superfamilia comprende una variedad de factores de crecimiento polipeptídicos relacionados estructuralmente, capaces de regular gran diversidad de funciones celulares dependiendo del tejido en el cual actúen. Además, estos factores juegan un papel crucial en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento funcional de diversos tejidos en organismos adultos. En este sentido no resulta sorprendente que alteraciones en la señal de los ligandos de TGF β estén implicados en diversas enfermedades como cáncer, fibrosis, autoinmunidad y diversas condiciones hereditarias como hipertensión pulmonar y telangiectasia hemorrágica (112).

Estos factores multifuncionales son clasificados en subfamilias dependiendo de su homología estructural y funcional. En mamíferos, la superfamilia de TGF- β está dividida en tres subfamilias: TGF- β , Activinas/Inhibinas y BMPs/GDFs (Bone Morphogenetic Proteins/Growth differentiation factors) (112).

I.IV.I. Ligandos

Los ligandos de la superfamilia de TGF- β se expresan de manera monomérica y adquieren una naturaleza dimerica a través de uniones disulfuro cuando son secretados. Las isoformas de TGF- β en mamíferos son TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, los cuales son codificados por distintos genes y a nivel de proteína presentan un 80% de homología (110, 112).

Las isoformas de TGF- β son secretadas en forma de moléculas precursoras latentes (LTGF- β) con una longitud de 390 a 414 aminoácidos y contienen una región hidrofóbica en el extremo amino terminal denominada "péptido señal", una región denominada LAP (Latent-Associated Peptide) y en el extremo carboxilo terminal una región bioactiva que contiene 112 aminoácidos por monómero (110, 112). La región LAP permite la unión covalente con la proteína denominada proteína de unión a LTGF β (LTBP), la cual permite el anclaje de este complejo proteico a la matriz extracelular, promoviendo la proteólisis de la región LAP por varias proteasas como son plasmina, trombina y endoglicosilasas ó mediante interacciones físicas de LAP con otras proteínas, dando como resultado la liberación de la forma madura de TGF- β (110, 112).

Los ligandos de la familia de BMPs presentan la propiedad de inducir la formación de cartilago y hueso *in vivo*, y estudios *in vitro* han confirmado la regulación del crecimiento y diferenciación de linajes de condroblastos y osteoblastos. Además de estas funciones, presentan actividades biológicas en otros tipos celulares como son monocitos, timocitos, células epiteliales, células de mesénquima y neuronas. Estos factores regulan apoptosis, crecimiento, quimiotaxis y procesos de morfogénesis de varios tejidos y órganos (113). Esta familia puede ser dividida en varios subgrupos en base a su estructura y a la función que realizan. BMP-2 y BMP-4 son las proteínas mayormente estudiadas, juegan un papel importante en los procesos de morfogénesis que se presentan en el desarrollo embrionario. BMP-2 y BMP-4 se encuentran relacionados estructuralmente con el producto

génico Dpp de *Drosophila*, la cual regula los procesos de establecimiento del eje dorso-ventral, morfogénesis de intestino y formación de las venas de las alas (113).

Otro subgrupo está representado por las proteínas BMP-7, BMP-8, BMP-8B, BMP-5 y BMP-6. Los animales que son deficientes de miembros de este subgrupo no mueren en la etapa de desarrollo embrionario pero si presentan defectos en varios tejidos incluyendo tejidos esqueléticos. BMP-7 induce la formación de cartílago y hueso *in vitro*, y se ha relacionado a la morfogénesis de ojos y riñones. BMP-8 se ha visto relacionada a la regulación de procesos de espermatogénesis, mientras que BMP-5 se ha relacionado a la morfogénesis del cráneo y al establecimiento de partes axiales del esqueleto. El último subgrupo está conformado por los ligandos GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5), GDF-6 y GDF-7. Este subgrupo está involucrado en los procesos de condrogénesis como la formación de tendones, ligamentos y extremidades. La señalización por BMPs está regulada por inhibidores extracelulares que se unen a estas proteínas con alta afinidad, de manera que inhiben su interacción con los receptores en membrana. Los inhibidores de BMP-2 y BMP-4 son Noguina, Cordina y Tsg (Twisted gastrulation). Tsg de manera particular puede unir directamente a BMP-4 o unir cordina mejorando la inhibición (113, 114).

Los ligandos de la familia de Activinas/Inhibinas se expresan en subunidades monoméricas; las isoformas expresadas son β_A , β_B , β_C , β_E y α . Las Activinas son dímeros conformados por subunidades β , y por lo tanto se utiliza cierta nomenclatura para definirlos: Activina A (β_A - β_A), Activina B (β_B - β_B), Activina AB (β_A - β_B), etc. La subunidad β_A se expresa en diversos tejidos y se encuentra junto con la subunidad β_B en las gónadas. La expresión de la subunidad β_C ha sido identificada en el hígado. La nomenclatura de los ligandos de Inhibina se basa en la formación de heterodímeros entre las subunidades β y α : Inhibina A (α - β_A) e Inhibina B (α - β_B) (115, 116).

Antagonismo de las funciones de Activinas

Antagonismo de la Inhibina: La proteína Inhibina fue identificada como un inhibidor de la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) en cultivos de glándula pituitaria. Posteriormente, se identificó a las activinas como dímeros de subunidades β que promovían la producción de FSH en la pituitaria, antagonizando así la función de las Inhibinas. Otras funciones en procesos reproductivos donde se presenta el antagonismo de activinas e inhibinas son el control de la esteroidegénesis en las gónadas, la síntesis de andrógenos en células de la teca, la proliferación de células de la granulosa y la secreción de hormonas en la placenta. También se ha observado antagonismo en los procesos de condrogénesis de extremidades de pollos y en proliferación de timocitos de rata (115).

Se han propuesto varios modelos para el antagonismo de activinas e inhibinas. El primero de ellos se refiere a la producción de las subunidades α y β , ya que si se presentan diferentes niveles de expresión de éstas, la disponibilidad de activinas ó inhibinas en forma de dímeros funcionales será también diferente. Por ejemplo, en los folículos generados por la acción de FSH, la expresión de la subunidad α es de 10 a 20 veces más que la producción de la subunidad β , esto asegura la biosíntesis de proteínas involucradas en el crecimiento del folículo, deteniendo los efectos de arresto en la maduración folicular promovidos por activina (117).

Otros niveles de regulación del antagonismo de estos ligandos se centran en la unión a los receptores de Tipo II (ActRII). Las activinas se unen con alta afinidad a ActRII, mientras que la afinidad de estos receptores por las inhibinas es baja. Esto puede explicar de alguna manera el requerimiento de una alta producción de subunidades α en los folículos para poder ejercer alguna función antagonista. También se ha descrito que las inhibinas pueden utilizar co-receptores como el betaglicano ($T\beta$ RIII), del cual trataremos en extenso más adelante. Se ha observado que las inhibinas pueden formar un complejo con moléculas de $T\beta$ RIII y

ActRIIs, excluyendo a los receptores de tipo I de este complejo. La proteína T β RIII y su RNAm se expresan en tejidos de cerebro de rata, pituitaria y gónadas confirmando su papel modulador de la actividad de las inhibinas en estos tejidos (118).

Antagonismo de Folistatina: Folistatina es una glicoproteína que se une con alta afinidad a activina A (119) enmascarando los residuos indispensables para la interacción con ActRII y ALK4. Folistatina posee una alta afinidad de unión a Activina A, mientras que para Activina B es diez veces más baja. La actividad antagonista de folistatina por lo tanto dependerá en gran medida de qué isoforma de Activina esté actuando (118). Un miembro de la familia de Folistatina denominado FLRG (Follistatin-Related Gene) une a Activinas con una alta afinidad. FLRG es una proteína circulante y actúa secuestrando a Activina, impidiendo la unión a sus receptores de la misma forma que folistatina. Otras proteínas relacionadas al antagonismo de las funciones de Activinas son la proteína Cripto y la proteína transmembranal BAMBI, las cuáles actúan compitiendo por los receptores (118).

I.IV.II. Receptores

Los ligandos de esta superfamilia señalizan mediante la activación de receptores transmembranales que presentan actividad de cinasa en residuos de serina y treonina. Estos receptores se agrupan en dos subfamilias: los receptores Tipo I y los receptores Tipo II. Ambos tipos de receptores pueden formar diferentes heterodímeros entre sí y unir con diferentes afinidades a más de un ligando, lo cual confirma su alta versatilidad en señalización (figura 4). Otros receptores denominados tipo III son endoglina y betaglicano (T β RIII) que, aunque no presentan actividad de cinasa de manera intrínseca, regulan el acceso de los ligandos a los receptores tipo II y I (110, 112).

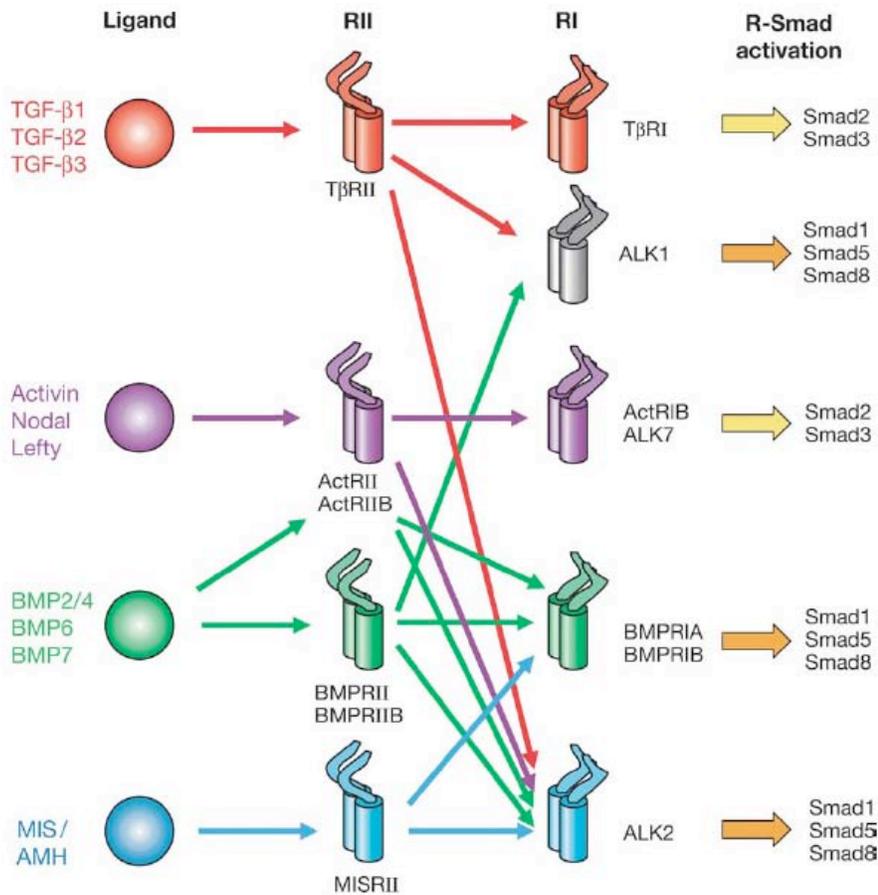


Figura 4. Versatilidad en el uso de receptores por los ligandos del TGF β . Los ligandos de la superfamilia del TGF β son capaces de formar un complejo con diferentes combinaciones de heterodímeros aumentando la variedad de inducción en vías de señalización dependiente de smads, Smad2/3 ó Smad1/5/8.

Los receptores Tipo I de vertebrados incluyen tres grupos: el grupo de T β R-I, ActR-IB y ALK7 (Activin receptor-Like Kinase); el segundo incluye BMPR-IA y BMPR-IB; y por último en el tercer grupo se encuentran los receptores ALK1 y ALK2. La subfamilia de receptores Tipo II incluyen T β R-II, BMPR-II y AMHR (Anti-Müllerian Hormone Receptor), los cuales unen específicamente TGF- β , BMPs y MIS (Müllerian Inhibiting Substance), respectivamente. Por otro lado, ActR-IIA y ActR-IIB unen activinas en presencia y ausencia de receptores tipo I (110).

Los receptores de Tipo I y II son glicoproteínas transmembranales que presentan en su región extracelular 10 o más cisteínas que confieren el plegamiento de esta región. Tres de estas cisteínas forman un grupo cerca de la secuencia transmembranal y las otras cisteínas se encuentran de manera más

espaciada en receptores Tipo I que en Tipo II. La región transmembranal no presenta características únicas en ambas familias de receptores. Sin embargo, en la región intracelular, los receptores tipo I presentan una secuencia altamente conservada que precede al dominio de cinasa. Esta región se denomina dominio GS, por la secuencia característica SGS₂GS₂ que contiene, la cual es fosforilada por receptores tipo II (110).

Se ha descrito receptores accesorios que intervienen en la unión del ligando a los receptores Tipo I y Tipo II. Uno de ellos es la glucoproteína unida a membrana denominada betaglicano (T β R_{III}), la cual porta cadenas de heparan sulfato y glucosaminoglucanos de condroitin sulfato (GAG). Betaglicano une a las tres formas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), BMPs (2/4) e inhibinas (A y B) con diferente afinidad y facilita la unión de éstos al receptor de Tipo II, formándose un complejo heterotrimerico. Otra molécula en superficie que funciona como un receptor accesorio es la endoglina. Esta proteína regula la unión de TGF- β 1 y TGF- β 3 a los receptores Tipo II formando un complejo, aunque cabe señalar que la afinidad de la endoglina por TGF- β es menor en comparación con la que presenta T β R_{III}. Es así que T β R_{III} parece predominar en la regulación de las señales de varios miembros de TGF- β , particularidad que se abordará en extenso más adelante (120).

I.IV.II.I. Activación de receptores

Se han descrito dos mecanismos de unión del ligando a los receptores Tipo I y II. El primero es denominado secuencial, es decir, el ligando se une primero al receptor tipo II formando un complejo, el cual posteriormente induce el reclutamiento del receptor Tipo I formando así un heterotetramero en superficie. Esta forma de unión secuencial se ha descrito para los receptores de TGF- β y Activinas. La otra manera de unión es la denominada cooperativa y es típica de los receptores de BMPs. Este tipo de unión involucra a ambos receptores para unir al ligando con una alta afinidad cuando son expresados juntos (110, 112).

Independientemente de la manera de unión del ligando a los receptores, los receptores Tipo II son activados mediante su autofosforilación en residuos de serina y treonina. El receptor Tipo II mediante su dominio de cinasa fosforila así mismo al receptor Tipo I en el dominio GS (figura 5). El dominio GS es una región reguladora de la actividad señalizadora de los receptores Tipo I. El penúltimo residuo en este dominio (serina o glutamina) es substancial en esta actividad puesto que, si este residuo es mutado, se presenta una elevada actividad de cinasa. Cercano al dominio GS se localiza el motivo Leu-Pro que mantiene unida a la inmunofilina FKBP12, la cual en condiciones basales actúa como un regulador negativo de la señal inducida por los receptores Tipo I y II; cuando los receptores Tipo I y II son activados formando un complejo, FKBP12 es liberado del motivo Leu-Pro (110, 112).

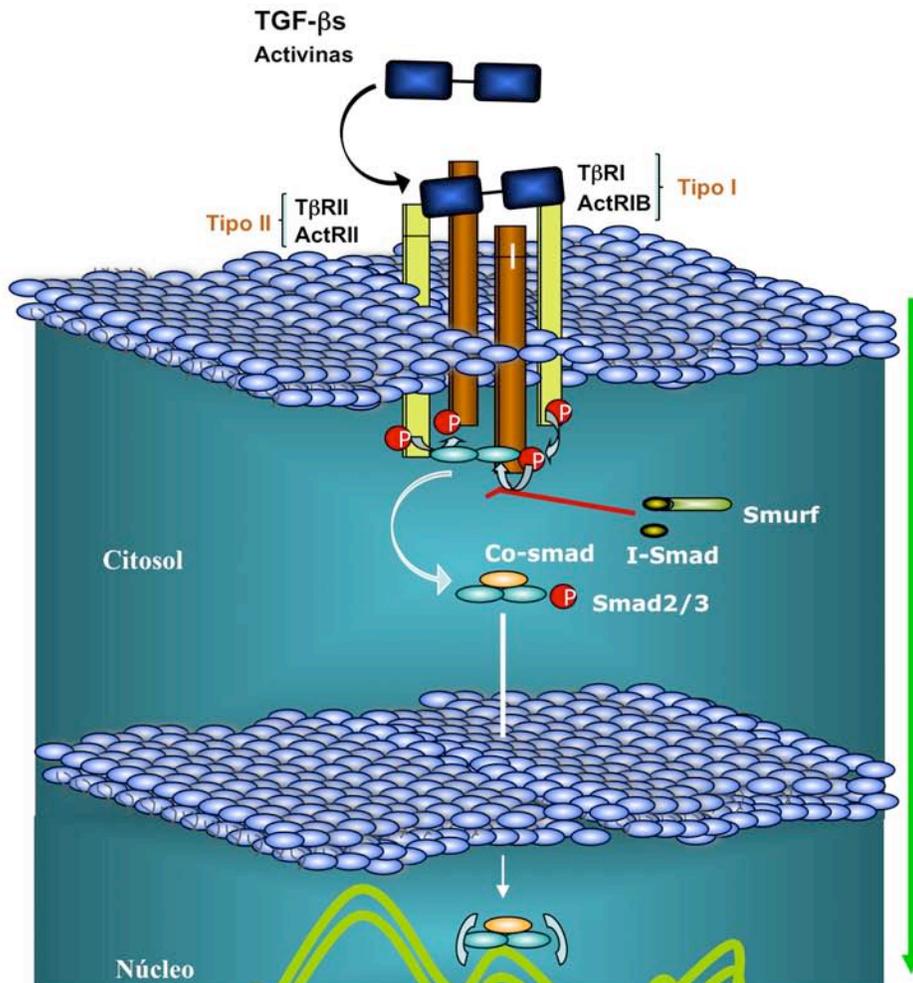


Fig.ura 5. Mecanismo general de activación de receptores y proteínas Smads de la superfamilia del TGF- β . Los ligandos de naturaleza dimérica se unen a pares de receptores Tipo II desencadenando su autofosforilación, una vez que están activos estos fosforilan al receptor tipo I promoviendo su actividad de cinasas en serina. El receptor Tipo I fosforila a las proteínas R-smads en el motivo SSXS de la región carboxilo terminal induciendo su activación. R-Smads se unen a Smad4 ó co-Smad formando un complejo, este complejo transloca a núcleo e induce la transcripción de diversos genes de manera directa o reclutando a co-activadores y factores de transcripción. I-smads inhiben de manera directa el reclutamiento de R-Smads a los receptores Tipo I, o pueden promover la degradación de R-Smads por el proteosoma mediante su asociación con la ligasa de ubiquitina Smurf1/2.

I.IV.II. II. Activación de Smads

Los receptores Tipo I activados fosforilan a mediadores proteicos denominados Smads (SMA/MAD related). Estas Smads fosforiladas por el receptor Tipo I se denominan R-Smads (receptor-Smads). Además, existen Smads que inhiben la señal de las R-Smads denominadas inhibidoras o antagonistas (i-Smads) y

también una co-Smad (Smad común) Smad4, que se asocia con las R-Smads formando un complejo, el cual transloca al núcleo (figura 5) (112).

En vertebrados existen ocho R-Smads descritas: Smad2 y Smad3 son activadas por receptores Tipo I de TGF- β y Activinas, mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 son activados por los receptores ALK-1, ALK-2, BMPR-IA/ALK-3 y BMP-RIB/ALK6 en respuesta a BMP y otros ligandos. Las proteínas Smads presentan en su estructura dominios de interacción con otras proteínas, dominios de unión a DNA y sitios de fosforilación mediados por receptores de Tipo I y por otras proteínas de señalización (112).

Las R-Smads son activadas por los receptores Tipo I mediante la fosforilación en el motivo SSXS del extremo carboxilo terminal de estas proteínas cuya interacción es altamente específica. Los dominios MH1 de R-Smads y Smad4 confieren la capacidad de unión a DNA (excepto Smad2) y a factores de transcripción. Los dominios MH2, además de interactuar con factores de transcripción, permiten la interacción específica con el co-activador transcripcional CBP/p300, la oligomerización de Smads y su interacción con receptores Tipo I. Ambos dominios se encuentran estructuralmente unidos por medio de una región denominada linker (121).

La translocación al núcleo del complejo de R-Smads/Smad4 es llevada a cabo mediante el reconocimiento de las secuencias de localización nuclear (NLS) que presentan. Por ejemplo Smad3 une a importina- β 1 a través de NLS en el dominio MH1. Por otro lado Smad4 usa la vía clásica de importación nuclear mediada por importina- α 1. Una vez dentro del núcleo la co-Smad puede regresar a citosol mediante el reconocimiento de sus secuencias de exporte nuclear a reclutar otro complejo de R-Smads. Este exporte nuclear mediado por co-Smad4 depende de la interacción con exportina-1, aunque también depende de la interacción con exportina-4. Esta regulación de la actividad de R-Smads por parte de la co-Smad es importante para mantener disponible complejos proteicos en el núcleo que

lleven a cabo la transcripción genética directamente o en cooperación con factores de transcripción (122).

I.IV.III. Regulación de la señal de TGF β

Existen varias proteínas que regulan negativamente la vía de TGF β y actúan a varios niveles: regulación de la expresión y actividad de receptores y complejos de R-smad/sm4. Los receptores tipo I y II pueden ser internalizados mediante 2 rutas, la dependiente de clatrina y la dependiente de caveolina. La primera es la responsable de promover la señalización de los receptores guiándolos hacia endosomas tempranos enriquecidos con SARA (smad anchor for receptor activation). Se ha observado que estos receptores pueden ser de nuevo expresados en la membrana celular. De manera contraria, la internalización de receptores vía vesículas de balsas de lípidos con caveolina-1, las cuales contienen receptores acoplados a complejos I-smads-Smurf que promueven la poli-ubiquitinación y degradación de los receptores y de i-smads. Ambas i-smads (Smad 6 y 7), las cuáles no poseen dominios MH1, a través de sus dominios MH2 se unen a los receptores Tipo I inhibiendo el reclutamiento y activación de las R-smads. Por ejemplo, bajo la señal de TGF β complejos de Smurf2-Smad7 se unen a los receptores activos promoviendo la degradación proteosomal de receptores y de Smad7. Las proteínas Smurf1 y Smurf2 pertenecen a la familia de ligasas de ubiquitina E3: su función principal es promover la degradación de proteínas mediante la unión de grupos de ubiquitina. Se ha observado que independientemente de la interacción con Smad7, Smurf1 y Smurf2 regulan directamente los niveles de R-Smads. Otras proteínas como TGIF and NEDD4 también promueven la degradación de los receptores Tipo I y smads (123).

Otro nivel de regulación de la vía de TGF β es la defosforilación de receptores Tipo I. Esta defosforilación es mejorada en presencia de SARA, la cual se une a Smad7 y con el complejo de fosfatasa GADD34 y PP1c. Otra fosfatasa que se ha visto reclutada por Smad7 es PP1 α , la cual defosforila a ALK1 en células endoteliales. De forma interesante, Smad7 puede ser inducido a degradación proteosomal

mediante una ligasa de ubiquitina E3 denominada arkadia promoviendo una amplificación de las señales de TGF β y Nodal en células somáticas (124, 123).

Otra proteína involucrada en la inactivación de la señal de TGF β es BAMBI, la cual inhibe la formación de complejos de receptores Tipo II/I. De forma similar, el receptor con actividad de cinasa en tirosina Ror2 a través de la interacción directa con el receptor BMPRII inhibe la señal de Smad 1/5 indicando que receptores con actividad de cinasas en tirosina pueden antagonizar directamente a receptores con actividad de cinasas en serina y treonina (123).

Además de que las R-smads pueden ser inactivadas mediante degradación proteosomal, recientemente se ha observado que este complejo puede ser defosforilado en serinas por fosfatasas específicas en el dominio carboxilo terminal. PPM1A es una fosfatasa nuclear que directamente defosforila el carboxilo terminal de Smad1/2 y 3 promoviendo el transporte nuclear de estas proteínas. Es así que en ausencia de esta fosfatasa las respuestas mediadas por TGF β son mejoradas. Otras pequeñas fosfatasas (SCP1, 2 y 3) se han descrito en la defosforilación en las regiones linker de Smad2 y 3, lo cual se traduce en un aumento de las señales de TGF β (125, 123).

Otro nivel de regulación de la vía de TGF β es la localización subcelular de smads, lo cual compromete la formación de complejos R-smad/Smad4. SnoN citoplásmico, un co-represor transcripcional, es capaz de secuestrar a las smads en citoplasma interrumpiendo la generación de complejos de smads heterotriméricos. Man1, una proteína integral de la membrana nuclear interna inhibe la señal de TGF β secuestrando a las R-smads en la membrana nuclear interna. Recientemente, se ha identificado a TIF1 γ como un compañero transcripcional de las R-smads activas compitiendo con Smad4. Se ha sugerido que el balance de la señal mediada de TGF β a través de complejos R-smad/TIF1 γ y R-smad/Smad4 es crítico en el destino celular de las células madre hematopoyéticas (126, 123).

A nivel transcripcional, las smads pueden reclutar a co-represores como SnoN, Ski y TGIF para inhibir la actividad de smads o asociarse con deacetilasas de histonas para reprimir la transcripción de genes específicos. Ski y SnoN pueden ser reclutados a elementos de unión a smad en una manera dependiente de Smad4 inhibiendo la expresión de genes regulados por TGF β como es el caso de Smad7. SnoN es altamente expresado en líneas celulares cancerosas pero se ha encontrado que tiene un papel dual en tumorigénesis (123, 127).

I.V. Betaglicano (T β RIII): co-receptor central de los miembros de la Superfamilia de TGF- β

El gen que codifica para betaglicano (T β RIII), el gen TGF β R3 está localizado en el cromosoma 1p31-32 y consta de 16 exones y es controlado por 2 promotores, uno proximal y otro distal que generan 2 especies distintas de mRNA (128, 129). No obstante, en la mayoría de los tejidos el promotor proximal es el más utilizado (128, 129). Aunque no se tiene conocimiento de mutaciones asociadas a enfermedades en humanos, el locus cromosómico para el gen de TGFBR3 se encuentra frecuentemente eliminado en cáncer. Adicionalmente, la pérdida de heterocigosidad para el gen de TGFBR3 ha sido reportado en cáncer de mama, prostata y pulmón (130-132).

T β RIII se expresa de forma abundante en diversos tejidos con al menos 200, 000 receptores por célula comparado a los 5000-10000 cuantificados para receptores tipo II y tipo I de TGF β (133-135, 128). Sin embargo, algunos tipos celulares como células endoteliales no expresan T β RIII (136).

La expresión de T β RIII puede ser regulada a distintos niveles y durante distintos procesos de diferenciación. Por ejemplo, la señal mediada por TGF β regula negativamente la expresión de T β RIII a través de la inhibición de la actividad del

promotor distal, evento común en múltiples tipos celulares (137, 138, 129). Se ha observado que la expresión de T β RIII disminuye durante la transdiferenciación de células esteladas hepáticas a miofibroblastos (139) y durante el proceso de transición de epitelio a mesénquima (140). Otras señales como dexametasona, aldosterona e hidrocortisona incrementan la transcripción de T β RIII en células esteladas hepáticas, miofibroblastos y osteoblastos (137, 138). Además, otros estímulos como MyoD y ácido retinoico incrementan la expresión de T β RIII en miofibroblastos (141). Por su parte, la hormona estimuladora de folículos (FSH), estrógenos, y la hormona luteinizante (LH) regulan positivamente la expresión de T β RIII en células de la granulosa (142, 143). Adicionalmente, la expresión de T β RIII es incrementada durante la diferenciación músculo esquelético (141). La expresión de T β RIII es también regulada a nivel epigenético, puesto que puede ser afectada por la adición de inhibidores de metiltransferasas y de deacetilasas de histonas en células cancerosas de ovario y prostata (144, 131). Recientemente, se ha descrito que en la progresión de carcinomas renales, la disminución de la expresión de T β RIII durante se debe a la falta de control transcripcional por el factor GATA3, el cual es silenciado a nivel epigenético (145). Finalmente, alteraciones metabólicas tales como la hipoxia crónica, están involucradas en la reducción de la expresión de T β RIII (146).

I.V.I. Estructura

T β RIII es un proteoglucano transmembranal de 851 aa expresado en la superficie celular como un homodímero con uniones no covalentes. Estructuralmente, T β RIII consiste de una larga región extracelular de 766 aa, un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio citoplásmico corto de 42 aa, el cual no presenta ninguna actividad enzimática (147, 148, 128, 149). El dominio extracelular de T β RIII presenta un dominio amino terminal con ninguna homología conocida, un dominio denominado zona pelucida (ZPD) involucrado en la oligomerización del receptor y 2 dominios independientes de unión a ligandos: uno distal cerca del amino terminal (similar a endoglina) y uno proximal cerca del extremo carboxilo terminal (similar a uromodulina), los cuales están separados por una región *linker* no

estructurada (148, 128, 150-154). La región extracelular de T β RIII también contiene 2 sitios de unión (serina 535 y 546) a cadenas glicosaminoglucanos (GAGs) compuestos por sulfatos de condroitina y heparina (147, 150). Mutaciones en estos sitios no alteran la estabilidad del receptor ni la habilidad de unión a los ligandos (135, 149, 151, 155). La proteína medular tiene una masa molecular aproximada de 100 kDa, sin embargo, la presencia de glicosaminoglucanos promueve que el betaglicano migre electroforéticamente en un intervalo de 280 a 330kDa(128, 151). Aunado a lo anterior, moléculas de T β RIII de alto peso molecular, dada por una abundancia de cadenas GAGs, previenen la asociación de los receptores tipo I y tipo II repercutiendo en la inhibición de las señales mediadas por TGF β (156). Por otro lado, se ha descrito que modificaciones postranscripcionales en GAGs contribuyen a la capacidad de T β RIII en regular migración celular (157).

Otro nivel de regulación de la expresión de T β RIII es el corte de su ectodominio, el cual ocurre en un sitio proximal del dominio extracelular cercano al dominio transmembranal liberando la forma soluble de este receptor (T β RIII_s). Este T β RIII_s puede ser detectado en la matriz extracelular y en suero (158, 148). El corte de T β RIII puede ser modulado por pervanadato, un inhibidor de fosfatasa en tirosina, y puede ser mediado por metaloproteasas de matriz extracelular (MT-MMP) MT1-MMP y /o MT3-MMP y plasmina, una proteinasa en serina que se ha visto involucrada en el corte de otras proteínas transmembranales (159, 160).

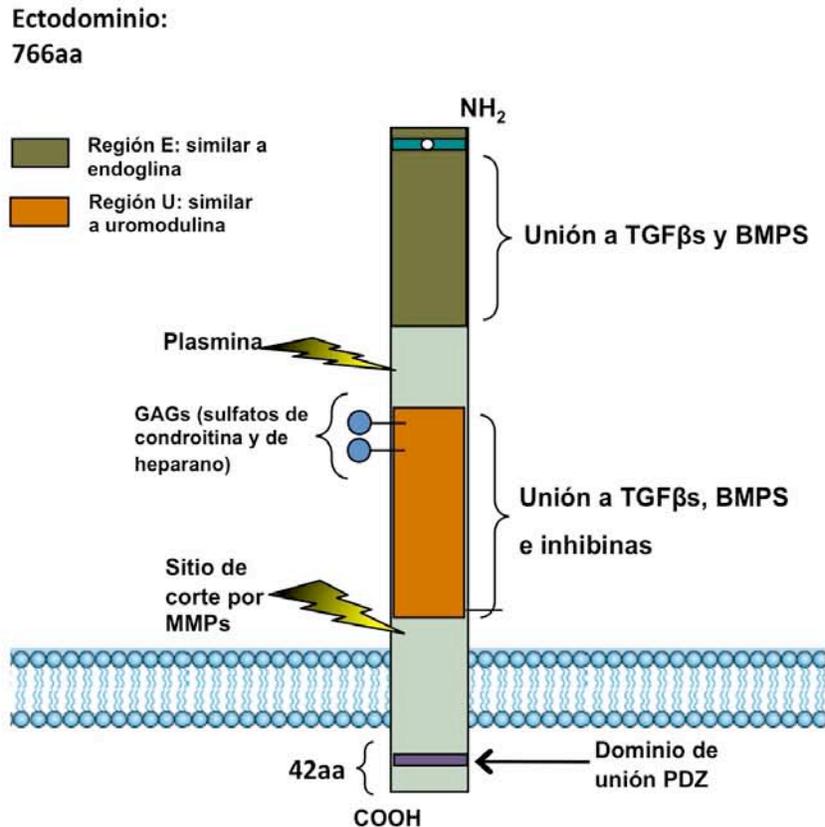


Figura 6. Estructura del TβRIII. La proteína medular de TβRIII betaglicano es un polipéptido de 853 aminoácidos, el cuál presenta un péptido señal en el extremo amino terminal, un largo dominio extracelular, una región transmembranal y un pequeño dominio citoplásmico rico en serina y treoninas. El dominio extracelular de TβRIII presenta 2 regiones importantes: una en el extremo amino terminal con similitud a endoglina y con sitios de unión a TGFβs y BMPs, y otra región hacia el extremo carboxilo terminal con similitud a uromodulina con sitios de unión a TGFβs, BMPs e Inhibinas. Además, el ectodominio de TβRIII presenta dos sitios de anclaje a cadenas de GAGs.

I.V.II. Funciones del dominio citoplásmico de TβRIII.

TβRIII presenta un dominio citoplásmico que carece de actividad enzimática intrínseca pero presenta un motivo clase I de unión a PDZ (148, 161, 162). Sin embargo, se ha descrito que el dominio de TβRIII es capaz de unirse a la forma autofosforilada del receptor Tipo II, lo cual promueve la formación de un complejo TβRII/TβRI activo seguido de una disociación de TβRIII de este complejo (162). Recientemente, se ha descrito que el dominio citoplásmico tienen la capacidad de regular señales mediadas por TGFβ y BMPs. En el caso de TGFβs, el dominio citoplásmico de TβRIII es fosforilado por el receptor TβRII en la treonina 841

permitiendo el reclutamiento de la proteína de andamiaje β -arrestina 2 (163). Esta interacción induce la internalización del complejo β -arrestina2/T β RII/T β RIII en vesículas endocíticas y la subsecuente disminución de las señales mediadas por TGF β (163, 164). En el caso de BMPs, la interacción con β -arrestina2 promueve la generación de un complejo con T β RIII y el receptor ALK6, lo cual repercute en su endocitosis y la estimulación de las señales mediadas por BMPs (165). Por último, esta interacción de T β RIII con β -arrestina2 regula negativamente la señal de NF κ B en cáncer de mama (166) y suprime la migración celular de células epiteliales ováricas ya sea cancerígenas o normales vía activación de Cdc42 (157). El dominio citoplásmico de T β RIII también presenta la capacidad de interactuar con la proteína GIPC (GAIP-interacting proteína C-terminus), una proteína que contiene un dominio PDZ. Esta interacción con GIPC promueve la estabilización del receptor en la membrana celular mejorando las señales mediadas por TGF β (161). Por otro lado, se ha descrito que la interacción entre GIPC y T β RIII juega un papel importante en inhibir migración celular e invasión durante la progresión a cáncer de mama (167). Recientemente, se ha descrito que después del corte del ectodominio de T β RIII inducido por activación, el dominio transmembranal-citoplásmico resultante es cortado por el complejo de la γ -secretasa acumulándose en citosol (168). Sin embargo, este estudio no descarta la posibilidad de que el dominio citoplásmico del T β RIII transloque a núcleo interactuando con otras proteínas (168).

I.V.III. Regulación de la señalización de los ligandos de la superfamilia del TGF β mediada por T β RIII.

La principal función de T β RIII es el de orquestar las señales mediadas por TGF β s, activinas/inhibinas y BMPs en diferentes tipos celulares. El T β RIII mejora la unión de las tres isoformas de TGF β s al complejo de receptores Tipo I y II siendo especialmente requerido para la unión de alta afinidad y actividad funcional de TGF- β 2 (figura 7) (169, 170, 141). Se ha descrito que las isoformas de TGF β s se unen a las 2 regiones caracterizadas en el ectodominio de T β RIII, en la porción del

extremo amino terminal (región con similitud a endoglina) (151) y la otra hacia el carboxilo terminal (región con similitud a uromodulina) (171). La dependencia de TGF β 2 en mediar sus señales a través de T β RIII ha sido claramente observado en modelos de transición epitelio-mesénquima *in vitro* donde la ausencia ó bloqueo de T β RIII conlleva una disminución de la generación de mesénquima (172, 173). Por ejemplo, se ha descrito que T β RIII es esencial en la transformación cojín atrioventricular *in vitro*, el cuál es el primer paso en la formación de válvulas cardíacas (172). De hecho, los embriones deficientes de T β RIII, los cuales mueren entre el día 13.5 y 18.5 de gestación, presentan defectos cardiovasculares como la formación de dobles válvulas en ventrículo derecho y defectos en los septos ventrículos causados por una alteración en el proceso de transformación epitelio-mesénquima mediado por TGF- β 2 (173). Por otro lado, el T β RIII potencia la unión de BMP2, BMP4, BMP7 y GDF5 a BMPR1 promoviendo un incremento en la fosforilación de Smad1 y en consecuencia los efectos funcionales mediados por estos ligandos (174). De hecho se ha propuesto que las BMPs se unen a los dos motivos de ligandos (el similar a endoglina y el similar a uromodulina) presentes en el ectodominio de T β RIII siguiendo el modelo bivalente de la unión de TGF β s (174). Alternativamente, varios estudios apoyan el papel determinante de T β RIII en las funciones mediadas por inhibinas (175) (ver más adelante).

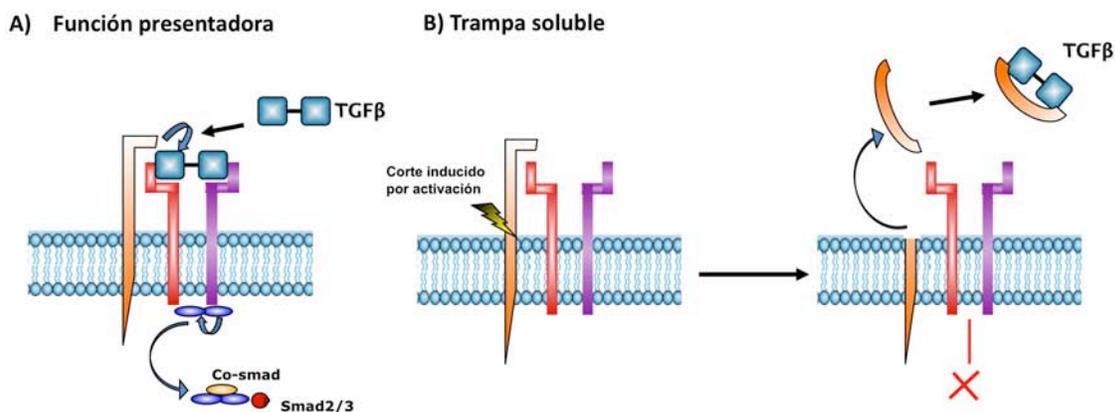


Figura 7. Funciones del T β RIII en la regulación de las señales del TGF β . (A) El T β RIII membranal potencia los efectos del TGF β , BMPs e inhibinas, presentando los ligandos a receptores Tipo II. (B) La forma soluble del T β RIII generada por corte proteolítico inducido por activación celular, es capaz de secuestrar al TGF β previniendo su unión a receptores Tipo I y II e inhibiendo la actividad de este factor.

I.V.IV. Funciones de la forma soluble del T β RIII

De forma alternativa, a diferencia del T β RIII unido a membrana, la forma soluble de éste resulta ser un potente agente neutralizador de las isoformas de TGF β s (figura 7). Sin embargo, el T β RIII soluble se une con distinta afinidad a sus ligandos siendo en el orden TGF β 2>TGF β 3>TGF β 1 (176). El T β RIII soluble es 10 veces mas potente en la inhibición a TGF β 2 que inhibiendo a TGF β 1. Se ha descrito que las dos regiones de unión a ligandos de TGF β , el distal y el proximal, son requeridos para la neutralización de la actividad de TGF β (154). Sin embargo, T β RIII soluble une a TGF β 1 con una afinidad (K_d 3.5nM) que es comparable al T β RIII soluble encontrado en fuentes naturales (158). Esta actividad neutralizadora del T β RIII se ha utilizado como tratamiento de diferentes condiciones inflamatorias caracterizadas por señales de TGF β exacerbadas. Por ejemplo, el T β RIII soluble es capaz de prevenir el daño renal en el modelo de ratón obeso diabético (db/db) (177). Además, T β RIII soluble invierte el patrón de respuesta inmune de Th2 a Th1, incrementando la producción de iNOS y disminuyendo la fibrosis y carga parasitaria en un modelo de tuberculosis experimental (178). Interesantemente, el uso del T β RIII soluble reduce la progresión de tumores y la angiogénesis en modelos con injertos de células transformadas derivadas de cáncer de prostata y mama (179-181).

I.V.V. Inhibinas y betaglicano como par molecular

Las inhibinas han sido ampliamente estudiadas como antagonistas de la señal de activinas principalmente en estirpes celulares del sistema reproductivo. Independientemente de los modelos de antagonismo que se han planteado, el modelo que incluye la interacción con T β RIII ha sido el más apoyado debido a la base estructural-mecanística que esta implica (figura 8). Este mecanismo consiste en la unión de alta afinidad de inhibinas al ectodominio de betaglicano y la formación de un complejo heterotrimérico con ActRIIs. La formación de este complejo conduce a la exclusión de los receptores Tipo I de activinas (ALK4 y ALK2) del complejo de receptores llevando a la inhibición de la activación de

smads y por lo tanto de la transcripción génica en núcleo (figura 8) (182, 170, 183, 184).

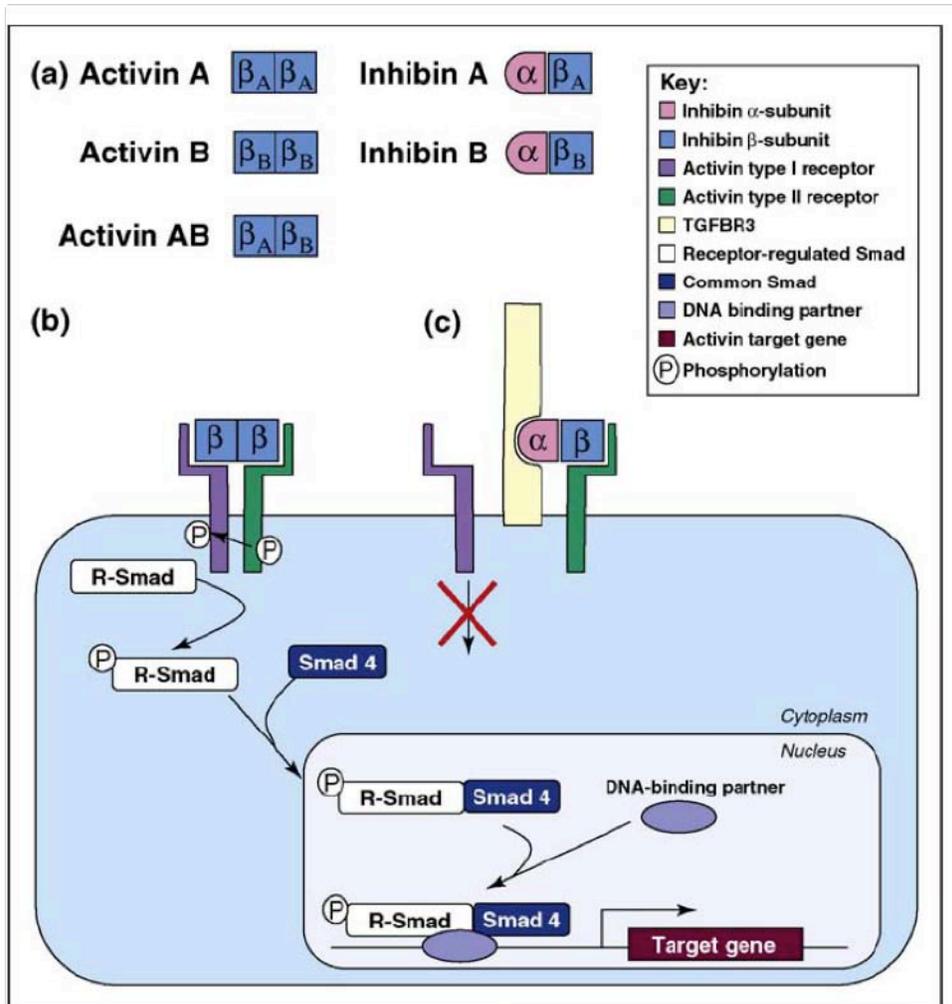


Figura 8. Participación del TβRIII en el antagonismo mediado por inhibinas sobre la señal de las activinas. (A) Dímeros de activinas e inhibinas. Las activinas están compuestas de subunidades β y las inhibinas de α y β . Los ligandos existentes son activina A ($\beta_A\beta_A$), activina B ($\beta_B\beta_B$), activina AB ($\beta_A\beta_B$), inhibina A ($\alpha\beta_A$) e inhibina B ($\alpha\beta_B$). (B) En la vía canónica de la superfamilia del TGF β , activinas se unen a receptores tipo II y I desencadenando su actividad de cinasas en serina, lo cuál promueve la activación de las smads intracelulares. (C) La presencia de TβRIII mejora la unión de inhibinas a los receptores Tipo II promoviendo la exclusión del receptor Tipo I (ALK4) potenciando así el antagonismo de la inhibinas en las funciones de activinas.

Estudios estructurales han detallado que la interacción de inhibinas con TβRIII es altamente específica, la cual es dada por un epítipo específico (Tyr50, Val108, Thr111, Ser112, Phe118, Lys119 y Tyr120) de la subunidad α (184). Además, la inhibina B es más potente que la inhibina A antagonizando la clásica secreción de

FSH inducida por activinas en células primarias gonadotrópicas y en células L β T2 (185). Aunado a lo anterior, la bioactividad de las inhibinas está determinada por el patrón de glucosilación de la subunidad α , el cual influye en la afinidad de unión de estos ligandos al T β RIII. Ambas isoformas inhibina A e Inhibina B pueden ser glucosiladas solo en el sitio Asn268 ó en 2 sitios simultáneamente, Asn268 y Asn302, produciendo así las isoformas de 31kDa y 34kDa, respectivamente (186). De estas, las isoformas de 31kDa son más bioactivas que las de 34kD debido a que presentan una mayor afinidad a T β RIII indicando que la glucosilación en la Asn302 reduce significativamente la unión de inhibinas a T β RIII (186). Esta dependencia de las inhibinas de mediar sus acciones a través de T β RIII se puede inferir analizando el patrón de expresión de estos componentes. Por ejemplo, se ha observado que células de la hipófisis anterior que responden a la señal de inhibinas expresan altas cantidades de T β RIII, mientras que en células corticotrópicas de la hipófisis, las cuales responden a inhibinas no expresan T β RIII (187, 188). Finalmente, varios estudios demuestran que el T β RIII endógeno en células primarias gonadotrópicas y en la línea L β T2 es esencial para el antagonismo de inhibinas en la producción de la FSH inducida por activinas(189, 185, 190).

A diferencia de TGF β s que se unen a 2 regiones en el ectodominio del T β RIII, las inhibinas solo son capaces de unirse en la región próxima al carboxilo terminal (con similitud a uromodulina) (170), indicando un solapamiento parcial de sitios de unión a TGF β s e inhibinas en el ectodominio de T β RIII (figura 6). Para inhibinas los sitios en el ectodominio de T β RIII que son requeridos son Ser608, Val614, Ala615, His619, y Val620 (191). De estos Val614 y Ala615 son críticos para la unión de TGF- β 1 (191). De manera interesante, este solapamiento de los sitios de unión de TGF β s e inhibinas en el ectodominio de T β RIII se ha traducido en una regulación funcional entre estos ligandos. Por ejemplo, inhibina A es capaz de reducir las señales de TGF- β 2 a través de la internalización del T β RIII en superficie (192). De forma alternativa, TGF β 1 y 2 son también capaces de atenuar las funciones de inhibinas a través de la reducción de la expresión y de unión de

inhibinas a T β RIII (193, 194). Por último, T β RIII confiere la capacidad a las inhibinas de competir con BMPs en la unión BMPRII y actRIIs excluyendo a receptores Tipo I e inhibiendo la señal de smads inducida por BMPs (195). Esta competencia de unión a T β RIII es explicada por la región común de unión de estos ligandos en el extremo carboxilo terminal (similar a uromodulina) del ectodominio de T β RIII (figura 6). Estos hallazgos sugieren en gran medida que las inhibinas, mediante T β RIII, son capaces de restringir y regular el amplio espectro de funciones de los ligandos de TGF β s y BMPs.

Finalmente, varios estudios resaltan la asociación de inhibinas y T β RIII como genes supresores de tumores epiteliales indicando su importancia como reguladores homeostáticos de la integridad y función de ciertos tejidos, principalmente reproductivos. Un ejemplo de asociación entre estos componentes se ha dilucidado analizando la tumorigénesis en células de la granulosa, encargadas de secretar estrógenos en el ovario. Se ha observado que en presencia de estos tumores se observan niveles incrementados de inhibinas circulantes, y este incremento se asocia a un mecanismo compensatorio de la falta de responsividad de estos tumores a los efectos mediados por inhibinas (196). De acuerdo con estas observaciones, el 53% de los tumores de células de la granulosa presenta una expresión reducida de T β RIII, justificando la pérdida de respuesta a inhibinas en estos tumores (197). Estudios con el empleo de construcciones de T β RIII con mutaciones específicas que limitan la unión de ligandos y con el uso del silenciamiento de inhibinas se demostró que las inhibinas actúan a través de T β RIII para regular de manera negativa la migración e invasión de tumores de células de la granulosa (197). Por último, la pérdida de la capacidad de respuesta a inhibinas se asocia a un fenotipo más agresivo de líneas epiteliales de cáncer ovárico (198). De manera interesante, la sobreexpresión de T β RIII resulta en una significativa reducción de la migración de estas células, mientras que, en cambio, el silenciamiento de la expresión de inhibinas mejora la migración e invasión celular (144).

En conjunto, estos datos sustentan la asociación funcional entre inhibinas y T β RIII como par molecular en el control de funciones celulares en homeostasis.

I.V.VI. Expresión de T β RIII en células del sistema inmune.

Debido a su naturaleza, T β RIII ha sido ampliamente estudiado como un regulador de las señales de TGF β y como un componente esencial en el desarrollo y función de diversos tejidos. Por lo tanto, no es sorprendente que la mayoría de los estudios hechos hasta el momento acerca de la biología de T β RIII se hayan realizado en varios tipos celulares como células epiteliales (199-202), miocitos (172, 203), células de ovario y testículo (187, 204), fibroblastos (205, 199), entre otros. Sin embargo, algunos estudios reportan la expresión de T β RIII en tipos células del sistema inmune como son neutrófilos (206), células dendríticas (207), macrófagos (208) e inclusive en células T (209, 210). La mayoría de estos estudios no se centran directamente en T β RIII ni tampoco abordan un posible papel funcional en estas células. El único reporte que aborda un papel de T β RIII en el sistema inmune es en células dendríticas, el cuál propone al T β RIII expresado en estas células como un regulador determinante de la acción supresora de TGF β 1 en la capacidad aloestimuladora de linfocitos T (207). De tal forma es importante señalar que se desconoce en gran medida el papel de T β RIII en células del sistema inmune como los linfocitos T, los cuales veremos a continuación que son sujetos a las señales mediadas por ligandos de T β RIII como son TGF β s, BMPs e inhibinas.

I.VI. Papel de los miembros de TGF- β durante el desarrollo de linfocitos T.

I.VI.I. TGF- β s

De las tres isoformas de TGF- β (1-3), TGF- β 1 es considerado el factor inmunológico por excelencia debido a su requerimiento en la regulación del desarrollo de linfocitos T, mantenimiento de la homeostasis de las células T

periféricas y su papel en la diferenciación de células T durante una respuesta inmune (211). El papel crucial de este factor queda evidenciado en el fenotipo del ratón deficiente de TGF- β 1, el cual muestra un 50% de letalidad intrauterina y una excesiva inflamación en diversos tejidos (212-214). El timo de estos ratones presenta una celularidad reducida, una médula hiperplásica y una corteza reducida (213). Además, los timocitos presentan una respuesta proliferativa muy reducida a la estimulación *in vitro* con diversos mitógenos (213). Por otro lado, los ratones deficientes de TGF- β 1 jóvenes muestran un defecto en la selección y maduración de la subpoblación de timocitos DP y un incremento de timocitos DN y CD4 cuando son comparados con ratones recién nacidos (214). Por otro lado, se ha observado la expresión de todas las isoformas de TGF- β en el timo. TGF- β 1 y TGF- β 2 son expresadas en células epiteliales de la corteza y de la zona subcapsular de timos fetales y adultos de ratón, las cuáles regulan la progresión a ciclo celular y diferenciación de timocitos CD4⁻CD8^{lo} a timocitos DP (figura 9) (215).

Existe gran evidencia que apoya la idea de que la acción coordinada de TGF β s en los tejidos linfoides y estromales es importante para un óptimo desarrollo de linfocitos T. Se ha descrito que TGF- β 3 y TGF- β 1 regulan la secreción de citocinas en células epiteliales tímicas humanas (figura 9)(216). De hecho, se ha observado que la subpoblación triple negativa (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) expresa la forma latente de TGF β que puede ser activada tras la interacción de esta subpoblación con células CD3⁺CD8⁺ y así regular de manera autócrina su proliferación en respuesta a citocinas como IL-2, IL-4 e IL-7(216). Así mismo, TGF- β 1 puede inducir la expresión de CD8 en la subpoblación CD25⁺ triple negativa (TN: CD3⁻CD8⁻CD4⁻) cultivada en presencia de IL-7 (figura 9) (217). Esta expresión de CD8, previa a la expresión de CD3 y CD4, origina una subpoblación intermedia (CD3⁻CD4⁻CD8 α^+ β^-) que continúa su diferenciación a timocitos DP (218).

De manera paralela, TGF- β 1 y TGF- β 3 regula la expresión de las citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y LIF (Leukemia Inhibitory Factor) inducidas por EGF (Epidermal Growth Factor) en TECs humanas (figura 9) (219). En cultivos de timos fetales,

TGF- β 1 y TGF- β 2 agregado al medio de cultivo induce una disminución del 90% en el crecimiento de los timocitos, de manera dosis dependiente. Las dos isoformas modifican en número las subpoblaciones en desarrollo: los timocitos DN, DP y CD4⁺ disminuyen considerablemente, mientras que los números absolutos de timocitos CD8⁺ se mantienen normales (220) . En el caso de las subpoblaciones de DN, los timocitos DN1 incrementan en gran proporción, mientras que los timocitos DN3 y DN4 disminuyen de manera considerable, sugiriendo que TGF- β induce un bloqueo importante en el estadio DN1 (figura 9). De manera contraria, los timocitos CD8⁺ generados por el tratamiento de TGF- β presentan un fenotipo maduro CD3⁺CD8 α^+ β^+ . Además, mediante un análisis de ciclo celular se observó que TGF- β puede participar de manera directa en el compromiso de células DP hacia el fenotipo CD8⁺ o inhibiendo la diferenciación hacia células T CD4⁺ (figura 9) (220).

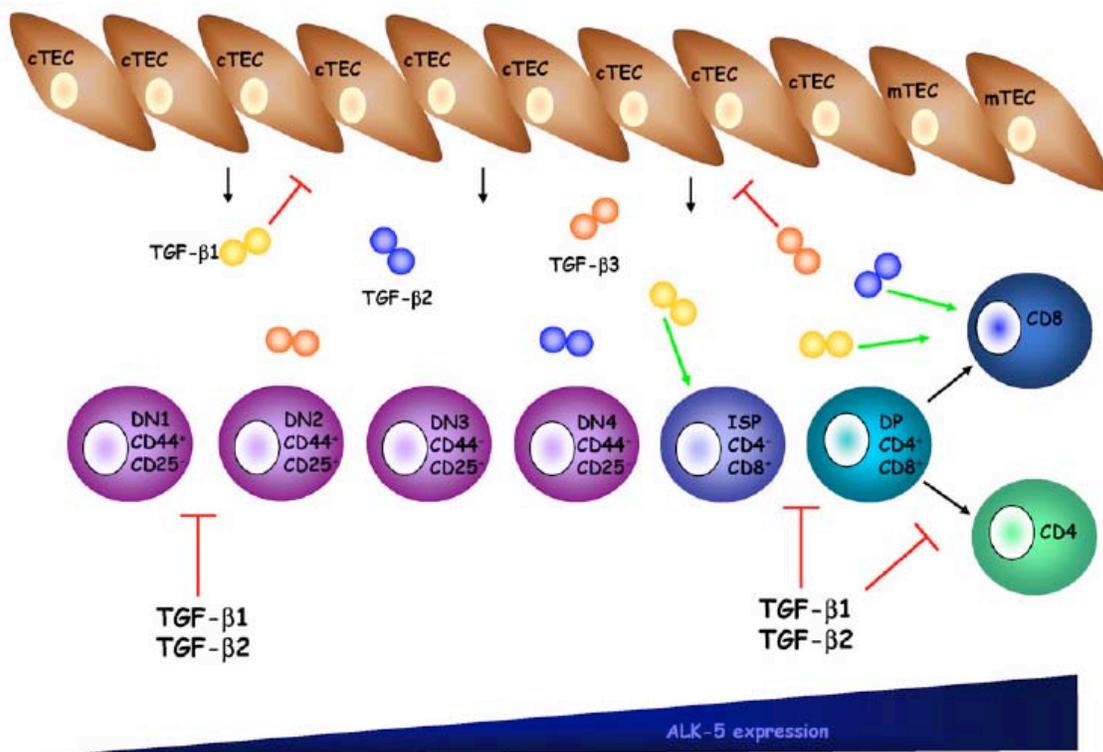


Figura. 9. Efectos de los TGF β s en el desarrollo de linfocitos T. TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 son producidos por células epiteliales dentro del timo. TGF β 1 y TGF β 2 afectan el desarrollo de timocitos en los estados de DN1, DP y SP CD4⁺. TGF β 1 promueve maduración a ISP (intermediate single positive) y al igual que TGF β 2 induce la maduración hacia SP CD8⁺. Por su parte TGF β 1 y TGF β 3 bloquean la secreción de citocinas por células estromales. El receptor tipo I ALK5 es preferencialmente expresado por células SP. Tomado de Licona-limon P & Soldevila G, 2007.

Recientemente, se ha caracterizado la expresión de receptores Tipo I y II, la proteína Smad2 así como su forma fosforilada en los distintos compartimentos del timo. La expresión del receptor ALK5 (T β RI) y el receptor Tipo II es alta en médula, mientras que en la corteza ALK5 se expresa considerablemente y de manera heterogénea. Por último, el receptor Tipo II se expresa a bajos niveles en todo el timo (221). La expresión de Smad2 así como su forma fosforilada se presenta importantemente en la médula y la región subcapsular, y en la corteza se presenta de manera heterogénea. Los timocitos DN y SP expresan Smad2, mientras que en timocitos DP la expresión es muy baja. La estimulación de timocitos *in vitro* con TGF- β induce una mayor fosforilación de Smad2 en timocitos SP mientras que en timocitos DN es menor. Este patrón de fosforilación inducido por TGF- β conforme al avance de los distintos estadios de diferenciación en el timo, es compatible con la distribución celular de los receptores T β RIIB y ALK5 (figura 9) (221). No obstante, el hecho de que la estimulación del TCR en linfocitos T induzca una mayor cantidad de Smad2 fosforilada (222) sugiere una potencial interacción entre las vías de TGF- β y las desencadenadas por el TCR.

Finalmente, el ratón transgénico que expresa una forma dominante negativa de T β RII bajo el control del promotor para el receptor CD4 manifiesta varias respuestas autoinmunes causadas por una disfunción en la actividad de células T, aunque los porcentajes de timocitos en desarrollo son similares a los de un ratón normal (223). Sin embargo en ratones deficientes de T β RII, se demostró que TGF- β no es necesario para que la transición de los estadios en desarrollo ocurra normalmente pero si importante en regular la entrada a ciclo celular de timocitos CD8⁺ (224). Se ha propuesto que TGF- β podría regular el compromiso de timocitos DP al fenotipo CD8⁺, modulando la proliferación celular de esta subpoblación diferenciada (figura 9). Otra función importante del TGF β 1 en el timo es la capacidad de proteger a las células T reguladoras naturales y convencionales de la apoptosis promovida por los eventos de selección en el timo(84), el cuál es un mecanismo distinto al observado por TGF β en la diferenciación de células T reguladoras periféricas.

I.VI.II. BMPs

El papel de la familia de BMPs ha sido poco descrito en el desarrollo de células T. Sin embargo, BMP-2 y BMP-4 son expresados preferencialmente en el estroma tímico. Los receptores BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II así como las Smads (1, 5 y 8) son expresados en el estroma tímico y en los timocitos (figura 10) (225-227). Los reguladores negativos de la señalización de BMP2/4 como Noguina, Cordina y Tsg también son expresados en el timo de manera diferencial. La proteína Noguina se expresa en bajas cantidades por el estroma (226), Cordina es expresada en el estroma y en menor grado en timocitos (225, 226), mientras que en el estroma y en timocitos se expresa Tsg (twisted gastrulation) (figura 10) (225).

Se ha descrito que la señalización mediada por BMP2/4 regula la diferenciación de timocitos en varios estadios. Por ejemplo, BMP2/4 disminuye los porcentajes de timocitos DN2, DN3 y DN4, debido a que inhibe la proliferación de timocitos DN1 (figura 10). Este efecto puede ser revertido al agregar Noguina de manera exógena en FTOCs (226). Por otro lado, la expresión de Tsg inducida por la señalización del pre-TCR permite el avance hacia el estadio DP en timocitos CD25⁺CD44⁻RAG1^{-/-} estimulados con un anticuerpo anti-CD3 (figura 10). De manera paralela, Tsg revierte la inhibición de la diferenciación de timocitos DN a DP mediada por BMP-4, sugiriendo que la señalización del pre-TCR induce la expresión de Tsg para contrarrestar el efecto inhibitorio de BMP-4 y continuar con la diferenciación hacia el estadio DP (figura 10) (225).

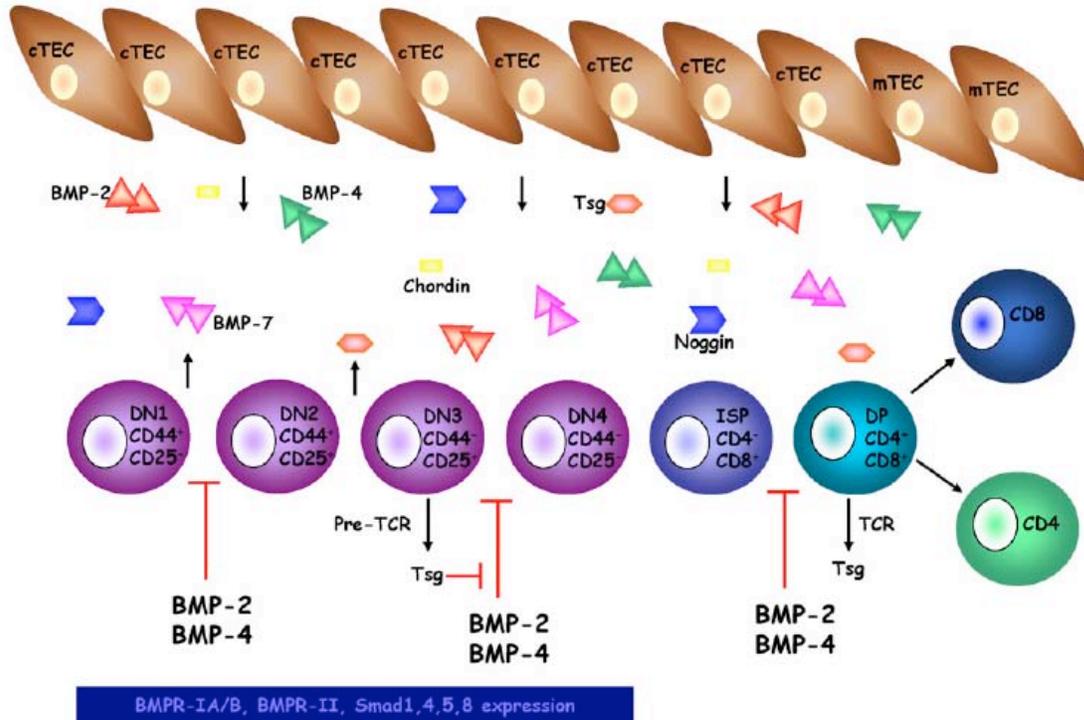


Figura. 10. Efectos de las BMPs en el desarrollo de linfocitos T. BMPs regulan la transición DN-DP durante el desarrollo. BMP2, BMP4, cordina y nogina son producidos por células estromales. BMP2 y BMP4 regulan negativamente la transición de DN1 a DN2 y de DN3 a DN4. BMP7 and Tsg son también producidos por los timocitos. La señalización inducida por el pre-TCR y el TCR promueve la secreción de Tsg, el cual revierte el arresto promovido por BM2 y BMP4 permitiendo que la diferenciación continúe hacia células SP. Tomado de Licona-limon P. & Soldevila G, 2007.

Interesantemente, el factor de transcripción Schnurri-2 (Shn-2) es requerido en el proceso de la selección positiva. Shn-2 junto con Mad-Medea son parte de la vía de señalización de Dpp (Decapentaplegic) que se presenta en *Drosophila*, las cuales son representantes ortólogos de las vías de TGF- β , Activinas/Inhibinas y BMPs en vertebrados. En el ratón deficiente de Shn-2 se presenta una disminución considerable de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, además la condición heterocigota de este factor (Shn-2^{+/-}) conlleva una disminución de estas subpoblaciones, pero en menor grado (228).

De manera contraria, se ha descrito que las señales de BMPs son requeridas para el mantenimiento celular del estroma tímico y no para el desarrollo normal de

timocitos, debido a que mediante la expresión transgénica de Noguina bajo el control de un promotor de Foxn1 que especifica esta expresión a la células epiteliales del estroma, los timocitos se desarrollan normalmente comparado con un ratón silvestre, mientras que el estroma tímico se observa displásico y reducido en tamaño (229). Aunque este resultado contradice el papel de BMPs en regular la diferenciación en DN1 y desde DN3 hacia DP aún es necesario realizar más estudios que aclaren los papeles funcionales que desempeñan la familia de BMPs en el desarrollo de linfocitos T.

I.VI.III. Inhibinas y activinas

Hasta la fecha, se han realizado muy pocos estudios que investiguen el papel de la subfamilia de activinas/inhibinas en el desarrollo de células T. Sin embargo, se ha observado que activina A inhibe la proliferación de timocitos de rata estimulados a la par con los mitógenos ConA (Concanavalin A) y PHA (Phytohaemagglutinin) antagonizando la señal de Inhibina, la cual promueve proliferación celular (230). La activina A puede ejercer funciones diferentes dependiendo del ambiente de citocinas que regulen la respuesta proliferativa de células T. Por ejemplo, activina A disminuye el crecimiento de los timocitos mediante la inhibición de la producción de IL-6, sin embargo al agregar IL-6 de manera exógena, activina A es capaz de aumentar la proliferación celular inducida por esta citocina (231).

Recientemente se ha reportado que las subpoblaciones de timocitos se encuentran bajo influencia de activinas/inhibinas. En el timo se expresan los receptores ALK4, ActRIIA, ActRIIB y las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4 (figura 11). El receptor ALK4 se expresa moderadamente en la médula y en niveles bajos en la corteza. A diferencia de ActRIIB, la expresión de ActRIIA es alta en médula y corteza (221). La expresión de ALK4 es mayor en la subpoblación DN y disminuye durante la maduración a timocitos SP (figura 11) (221, 232). Mediante un análisis cuantitativo, nuestro laboratorio demostró que la expresión de ActRIIA se restringe principalmente al estroma del timo, mientras que en timocitos esta expresión es

muy baja. Por su parte, la expresión de ActRIIB es mayoritaria en la subpoblación DN y en el estroma tímico, mientras que en timocitos DP se expresa en menor grado (232).

La expresión de Smad2 así como su forma fosforilada es alta en médula y en la región subcapsular, mientras que en la corteza la expresión es heterogénea (221). Sin embargo, un análisis más detallado de la expresión, no solo de Smad2 sino de Smad3 y Smad4, indicó que la mayor expresión de estas proteínas ocurre en la subpoblación DN y disminuye en los siguientes estadios de diferenciación (figura 11) (232). Aunado a lo anterior, todas las subpoblaciones de timocitos responden a la estimulación *in vitro* con Activina A, presentando mayor fosforilación de Smad2 en las subpoblaciones DN1 y DN2 (figura 11). Cabe señalar que esta fosforilación decrece con el avance en los estadios de desarrollo correlacionando con la disminución de la expresión del receptor tipo I ALK4 (figura 11) (221).

Las subunidades β A, β B y α que conforman a los ligandos de la familia de Activinas/Inhibinas también se expresan en el timo (figura 11). De todas ellas la subunidad α de inhibinas es la más expresada por el estroma de timo fetal y adulto, comparado con los niveles detectados de β A y β B. Por otro lado, en timocitos, la expresión de la subunidad β A es baja, mientras que la subunidad β B y la subunidad α no son detectadas (232).

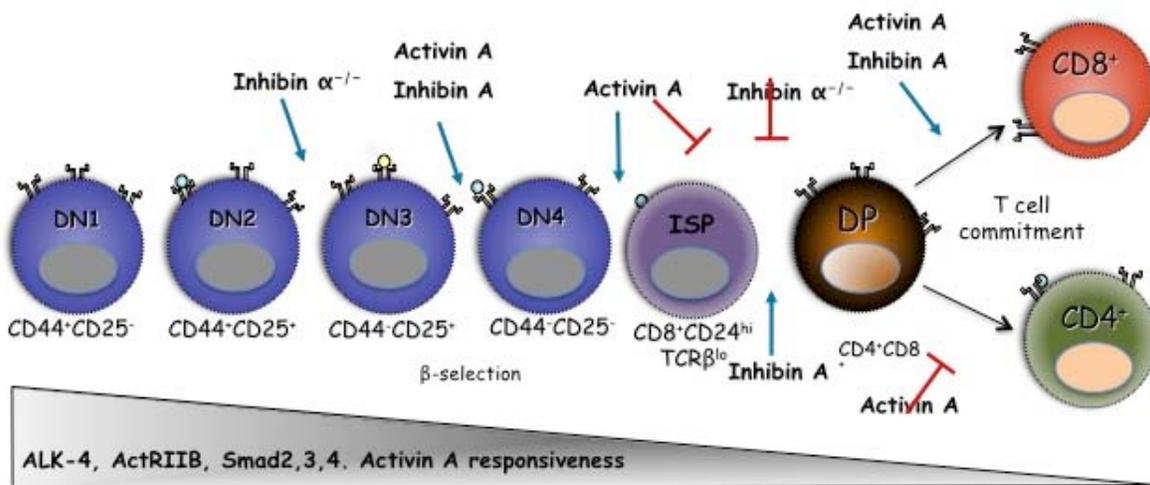


Fig. 11. Efectos de las activinas/inhibinas en el desarrollo de linfocitos T. Los componentes ALK4, ActRIIB y smads (2, 3 y 4) son expresados en timo fetal y adulto, preferencialmente en estados de desarrollo más tempranos correlacionando con la responsividad de estas células hacia activina A. La subunidad α de inhibinas es más abundante que las β s que conforman a las activinas. En FTOCs, ambas activinas e inhibinas regulan la transición de DN a DP, y de DP a $CD4^+$ y $CD8^+$. Análisis de FTOCs deficientes de inhibinas muestran un retraso en la diferenciación de timocitos, específicamente en la transición DN2-DN3 y de DN a DP. Tomado de Aleman-Muench GR & Soldevila G, 2012.

En el laboratorio hemos demostrado que las señales de activinas e inhibinas regulan puntos de control específicos durante el desarrollo de las células T (233, 234). A pesar del antagonismo funcional reportado en células del sistema reproductivo, ambas activina A e inhibina A agregadas en FTOCs promueven la transición de DN3 a DN4 (figura 11) (233). Este hallazgo sugiere un papel positivo durante el proceso de la selección β . Sin embargo estos factores regulan diferencialmente la transición DN4-DP. Por su parte activina A induce una acumulación de una población intermedia entre DN4 y DP caracterizada fenotípicamente como $CD8^+HSA^{hi}TCR^{lo}$, mientras que inhibina A en cambio promueve la transición directa de DN4 a DP (figura 11). Por otro lado, ambos ligandos promueven la diferenciación hacia SP $CD8^+$, lo cual sugiere un papel potencial en el compromiso hacia SP $CD8^+$ (figura 11) (233). De manera interesante, datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que las

inhibinas, son capaces de inducir la fosforilación de Smad2/3 en timocitos murinos y en una línea celular de linfocitos T humanos. Sin embargo, se requiere de un estudio más detallado acerca del mecanismo molecular con el cual ocurre esta fosforilación. Finalmente, en el laboratorio hemos descrito que las inhibinas endógenas, expresadas en abundancia en el timo, regulan positivamente la transición en desarrollo de DN a DP y mantienen los números de forma normal de los timocitos en desarrollo indicando una posible regulación de las señales de sobrevivencia presentes en el timo (figura 11) (233, 234).

II. Justificación

“Dado que los miembros de la superfamilia del TGF β , incluidas las inhibinas, regulan importantes puntos de control durante el desarrollo de linfocitos T, y considerando la unión de alta afinidad de estos ligandos con T β RIII, es necesario investigar si este proteoglucano está expresado diferencialmente en timocitos y si actúa como un componente regulador del desarrollo y diferenciación de los linfocitos T. Puesto que la función de otros miembros de la superfamilia del TGF β , tales como BMPs, puede ser modulada por la señalización inducida por el pre-TCR en timocitos, es posible que la expresión y/o función de T β RIII esté regulada por vías de señalización inducidas por la activación del TCR”.

III. Hipótesis

- T β RIII se expresa diferencialmente en el timo y regula el proceso de desarrollo de linfocitos T.
- La expresión de T β RIII está regulada por señales transducidas por el TCR.

IV. Objetivos

Objetivo general

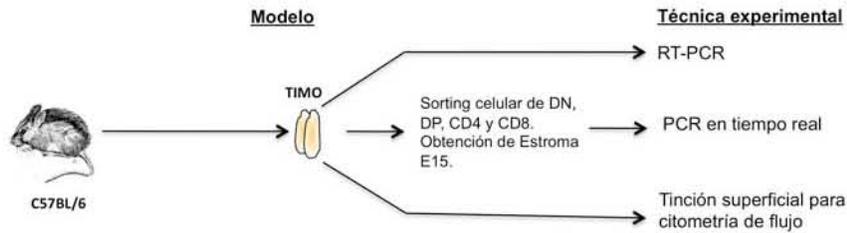
Investigar la expresión y función de T β RIII durante el desarrollo en timo y diferenciación de linfocitos T en periferia.

Objetivos particulares

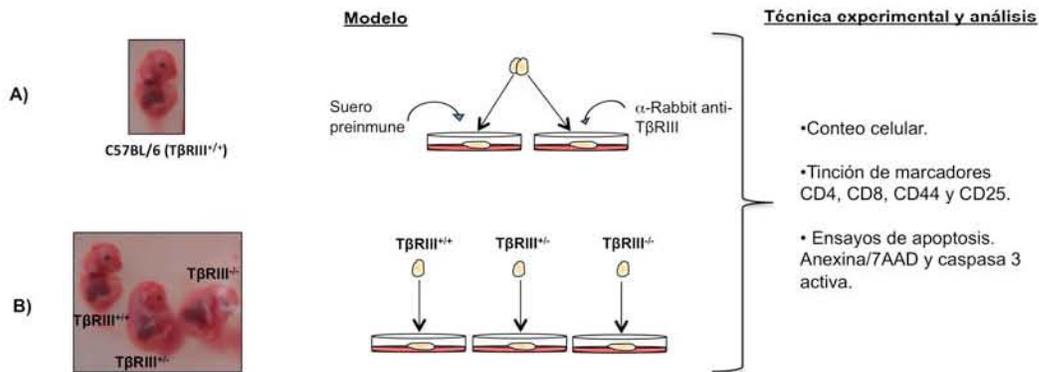
- Caracterizar la expresión de T β RIII en el timo y en las diferentes subpoblaciones de timocitos.
- Investigar la función de T β RIII durante el desarrollo de los linfocitos T.
- Determinar la expresión de T β RIII en linfocitos T periféricos.
- Investigar si las señales derivadas de la activación del TCR regulan la expresión de T β RIII.
- Investigar la función del T β RIII durante la diferenciación de linfocitos T dependiente de TGF β , dentro de los que destacan las células T reguladoras.

V. Diseño experimental

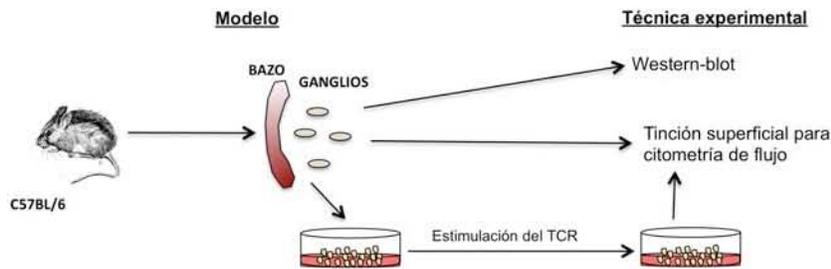
1. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BETAGLICANO EN TIMO



2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE BETAGLICANO EN EL DESARROLLO DE LINFOCITOS T



3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BETAGLICANO EN LINFOCITOS T PERIFÉRICOS



4. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE BETAGLICANO EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS PERIFÉRICAS

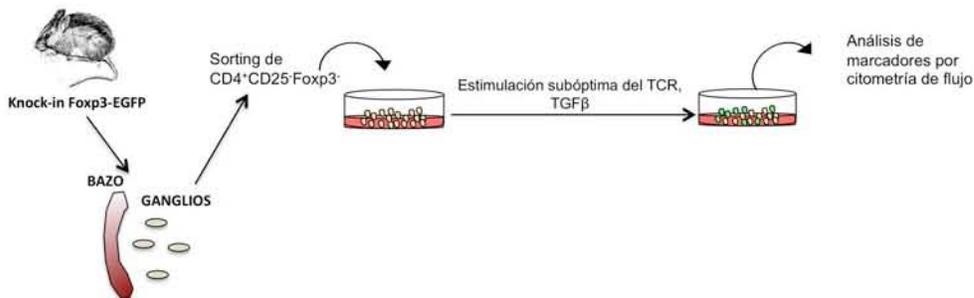


Figura 12. Diseño experimental. Los diseños 1 y 2 abarcan la caracterización de la expresión y función de TβRIII en timo, mientras que los diseños 2 y 4 se enfocan en la descripción de la expresión y función de TβRIII en células T periféricas.

VI. Materiales y métodos

Ratones

En este estudio se utilizaron ratones de 4 a 6 semanas de edad en fondo genético C57BL/6. En el caso de experimentos con embriones deficientes para betaglicano (T β RIII) los ratones híbridos 129/sv con C57BL/6 fueron retrocruzados por más de 4 generaciones al fondo C57BL/6. Una vez obtenidas en este fondo genético, se obtuvieron embriones T β RIII^{+/+}, T β RIII^{+/-} y T β RIII^{-/-} de hembras heterocigotas embarazadas al día 14 de desarrollo (173). Además, también se realizaron experimentos con ratones knock-in Foxp3-EGFP (235), los cuales fueron obtenidos del laboratorio de Jackson. Todos los procedimientos en el manejo de animales fueron realizados de acuerdo a las reglas éticas institucionales.

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: líneas de miocitos L6E9 (negativa para T β RIII) y BG22 (positiva para betaglicano), la línea de linfoma humano CD4⁺ Jurkat E6 y la línea de timoma murino EL4.

Aislamiento de RNA y RT-PCR

Se extrajo ARN total a partir de timos fetales y adultos, de células estromales de timos fetales del día 15 de desarrollo, de las líneas celulares de mioblastos L6E9 (control negativo de expresión de T β RIII) y de la línea BG22 (control positivo). De forma alternativa, se extrajo ARN de testículo y cerebro como controles positivos. Las células estromales fueron purificadas después del tratamiento de timos fetales durante 5 días a 37°C y a 5% CO₂ con 1.35mM de 5'-deoxiguanosina.

Para analizar la expresión del ARN mensajero de T β RIII en las principales subpoblaciones de timocitos en desarrollo (DN, DP, CD4⁺ y CD8⁺) suspensiones de timocitos fueron teñidos con anticuerpos anti-CD4PE y anti-CD8PE-Cy5. Posteriormente se sortearon 5-10 x 10⁶ timocitos por cada subpoblación (DN, DP, CD4⁺ y CD8⁺) en un cell sorter del citómetro FACs ARIA. Una vez purificadas las poblaciones, se extrajo el ARN de cada una de ellas usando el reactivo RNA-STAT60 de acuerdo al protocolo estándar proporcionado por la compañía.

Posteriormente se trataron de 5 a 10µg de ARN con el reactivo de “DNA-free” con el fin de remover los restos de ADN presentes en las muestras. La calidad e integridad del ARN obtenido fue evaluado mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa y cuantificación por espectrofotometría. Una vez evaluado el ARN se procedió con la síntesis de ADN complementario mediante una reacción de retrotranscripción reversa usando la enzima RT M-MLV en presencia de oligo dT durante 50 minutos a 37°C. Por último, con el fin de confirmar la ausencia del exon 2 del gen TGFBR3 (TβRIII) también se extrajo ARN y se generó ADNc de embriones derivados de cruces con ratones heterocigotos para el gen TGFBR3 (173).

PCR en tiempo real

La cuantificación de la expresión de TβRIII a nivel de mensajero fue llevada a cabo mediante PCR en tiempo real. Los oligos fueron diseñados con el fin de obtener productos pequeños ideales para la reacción en tiempo real, el producto obtenido fue de 64 pares de bases. Los siguientes oligos fueron usados: TβRIII sentido 5´ - GCCAGACGGCTACGAAGATTT- 3´, TβRIII anti-sentido 5´ - AACACTACCACTCCAGCACGG- 3´, β -Actina sentido 5´ - TGG AATCCTGTGGCATCCATGAAAC- 3´ y β -Actina anti-sentido 5´ - TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG- 3´. La medición y análisis de la expresión génica fue realizada mediante la amplificación de ADNc con el kit de “SYBR green PCR” para posteriormente ser analizado en el software de detección de secuencias ABI PRISM 7000. La condiciones de amplificación para betaglicano y β-actina fueron un paso inicial de 5 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 min a 58°C y 1 min a 61.3°C. las reacciones fueron realizadas en triplicado incluyendo los controles negativos. Posteriormente, se corrió un programa de amplificación obteniendo perfiles por cada amplificación realizada. El contenido de ADNc fue normalizado substrayendo el número de copias del gen endógeno de referencia β-Actina del número de copias del gen blanco ($\Delta Ct = Ct \text{ of target gene} - Ct \text{ of } \beta\text{-Actin}$). La expresión específica de cada gen fue calculada usando la formula $2^{-\Delta Ct}$. La expresión normalizada fue corroborada con los

valores de amplificación calculados de los diagramas que muestran la eficiencia de amplificación para cada gen. Por último, los productos obtenidos después de la reacción fueron analizados mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 2% (gr/v) con el fin de corroborar pureza y tamaños de los productos.

Análisis por citometría de flujo

Suspensiones de células se obtuvieron a partir del disgregado de timo, bazo y ganglios, y en algunos casos se obtuvieron células circulantes de sangre periférica. La sangre periférica fue sujeta a lisis de eritrocitos con solución ACT durante 8 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear la unión inespecífica de inmunoglobulinas se incubó con anti-CD16/CD32 (2.4G2) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, diferentes juegos de anticuerpos fueron utilizados para identificar las distintas subpoblaciones de timocitos y linfocitos T. Los anticuerpos usados fueron: anti-CD4FITC (RM4-5), anti-CD44PE (Pgp-1, Ly-24), anti-CD4PE (L3T4), anti-CD8PE (Ly-2), anti-CD19PE (1D3), anti-CD25 conjugado a biotina (7D4), anti-CD4PeCy5 (L3T4), anti-CD8PE-Cy5 (Ly-2), anti-CD4APC (RM4-5) and anti-caspasa 3 activa acoplada a PE, todos ellos de BD Biosciences. Para detectar la expresión de T β RIII por citometría de flujo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-T β RIII (proporcionado por el Dr Casillas del IFC, UNAM) y un anti-T β RIIIAPC. También se utilizaron anticuerpos secundarios anti-rabbit IgG conjugado a FITC, un anti-rabbit conjugado a PE y una estreptavidina conjugada a APC. Las tinciones se llevaron a cabo a 4°C durante 20-30 minutos y posteriormente fueron fijadas en buffer con paraformaldehído al 4%. Las muestras fijadas fueron capturadas en los citómetros FACs Calibur, FACs ARIA (BD Biosciences) y en el citómetro Atunne (Life Technologies). Los datos generados fueron analizados con el software FlowJo (Tree Star).

Tipificación de genotipos por PCR

Se obtuvieron muestras de colas de ratones adultos y embriones, las cuáles fueron digeridas con NaOH (1M) durante 3 horas a 100°C y posteriormente tratadas con Tris 1M (pH 8.0) y centrifugadas durante 10 minutos a 100°C. El

sobrenadante fue recuperado y tratado con fenol-cloroformo para extraer el ADN. La amplificación de los alelos mutantes y silvestres de T β RIII de embriones del día 14 de desarrollo fue llevada a cabo con los siguientes oligos: P1 5'-ATTGTGTTTCATAGGTCCAGA-3', wt 5-CCTAGTCCTTGGTCTGTACT-3', y Neo 5'-TAGGGTTCCGATTTAGTGCT-3'. El siguiente programa de amplificación fue usado: 1 minuto de desnaturalización inicial de 94°C, 35 ciclos que comprenden 1 minuto de desnaturalización a 94°C, un paso de alineación de 1 minuto a 53°C, un paso más de elongación de 1 minuto a 72°C, y 1 ciclo final de 72°C durante 5 minutos. Los productos obtenidos fueron analizados en geles convencionales de agarosa al 1%.

Western-blot

Se obtuvieron lisados celulares a partir de 10×10^6 células y posteriormente centrifugados durante 10 minutos a 15,000 x g a 4°C y los sobrenadantes fueron separados de las pastillas celulares y mantenidos en hielo por una hora antes de ser usados. Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 10% dependiendo de la proteína de interés a ser detectada. Después de haber corrido las muestras mediante electroforesis, se llevó a cabo la transferencia en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), y posteriormente las membranas fueron bloqueadas usando albumina sérica bovina en polvo al 4% en tween 20 al 1%. Las membranas fueron hibridizadas usando el anticuerpo primario anti-T β RIII (Cell signaling) y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) antes de ser visualizado por quimioluminiscencia. Como control de carga, se llevó a cabo un inmunoblot con el anticuerpo anti- β actina (provisto por la Dra. Isaura Meza, Cinvestav).

Cultivos de timos fetales (FTOC).

La extracción de timos fetales de embriones fueron obtenidos de ratones hembras T β RIII^{+/-} embarazadas al día 14 de desarrollo. Después de que fueron genotipados mediante PCR como anteriormente se describe, los timos fetales se cultivaron en cajas de 6 pozos sobre membranas millicell de un poro con un tamaño de 8 μ m en

un volumen de 1 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino al 10%, 20mM HEPES, 0.1mM MEM de aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2mM, 0.05 mM 2-mercaptoetanol y 1% de penicilina/estreptomicina (todos los reactivos de Invitrogen). El medio de cultivo fue refrescado cada tercer día. En cultivos de timos fetales en condiciones de bloqueo para betaglicano, los anticuerpos fueron colocados al día 0 y refrescados al día 3 de cultivo. Los timos fetales fueron disgregados al día 0, 3 y 7, y los timocitos fueron contados y teñidos con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 y anti-CD44 para su posterior captura y análisis en los citómetros FACs Calibur y FACs ARIA I.

Ensayos de estimulación *in vitro* de linfocitos T

Se realizaron ensayos de estimulación de linfocitos T primarios mediante el entrecruzamiento *in vitro* con anticuerpos anti-CD3CD28 a distintos tiempos. Se extrajeron ganglios periféricos (excepto los meséntericos) y células de bazo mediante disgregado mecánico. Las suspensiones de células de bazo fueron sujetas a lisis de eritrocitos con buffer ACT durante 8 minutos a temperatura ambiente. En algunos experimentos se procedió teñir las suspensiones celulares marcando CD62L, CD44 y CD25 para su posterior purificación mediante "sorting" celular en el citómetro FACs ARIA. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), se contaron y se evaluó la viabilidad de estas por exclusión de tripano. Previo a la estimulación, se prepararon placas de 48 pozos y 96 pozos con anticuerpos anti-CD3CD28 de la siguiente manera. Primero se pegó a placa un anticuerpo goat anti-syrian hamster (5µg/ml) en buffer de carbonatos durante 1 hora a 37°C, se realizó un lavado con PBS y se procedió a la incubación de los anticuerpos anti ratón CD3 (2C11) y anti-CD28 (37.51) ambos a una concentración de 5µg/ml durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se recuperaron las soluciones de anticuerpos y se guardaron para su posterior reuso y los pozos se mantuvieron en PBS a 4°C hasta iniciar la estimulación. Se repartieron las células en cada pozo a una densidad de 0.5×10^6 por cada mililitro y cada condición de estímulo se

realizó por triplicado. Como control de estímulo y de evaluación de la responsividad de las células, estas se estimularon con PMA (20nM) e ionomicina (200ng/ml). Los análisis se llevaron a cabo cada 24 horas hasta el día 7 de cultivo. En cada tiempo las células se recuperaron y se tiñeron con anticuerpos dirigidos a CD4, CD8, CD3, CD25, CD62L, CD44 y betaglicano. Las muestras fueron fijadas con PBS 4% de paraformaldehído y capturadas en el citómetro FACs calibur (BD).

Ensayos de apoptosis

En esta tesis se realizaron dos aproximaciones para evaluar los niveles de apoptosis en cultivos de timos fetales: tinción con anexina-V/7AAD, y tinción intracelular para caspasa 3 activa. Para el análisis con anexina-V/7AAD, las suspensiones de timocitos fueron teñidos con anti-CD4, anti-CD8, anexina V y 7AAD en el buffer específico de anexina-V durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas con el buffer de anexina-V y finalmente resuspendidas en buffer de fosfatos para su captura inmediata en un citómetro. En el caso de la tinción para caspasa 3 activa las células fueron teñidas inicialmente para marcadores de superficie en un buffer que consiste de PBS 2%SFB durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron permeabilizadas con 100 microlitros de buffer fix/perm (BD biosciences) durante 2 hrs a 4°C. Las células permeabilizadas fueron lavadas dos veces en un buffer de permeabilización (BD biosciences) y después incubadas con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa acoplado a PE durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces en el buffer de permeabilización y fijadas con un buffer de paraformaldehído al 4% para su posterior captura en un citómetro de flujo.

Generación *in vitro* de células T reguladoras Foxp3⁺.

Para la conversión *in vitro* de células T reguladoras Foxp3⁺ se obtuvieron células de ganglios y bazo de 4-6 ratones knock-in Foxp3-EGFP. Por cada ratón se mezclaron las células obtenidas de ganglios y bazo y posteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 y anti-TβRIII durante 20 minutos a 4°C en medio RPMI completo suplementado con 10% de SFB. Posteriormente se

hizo un lavado con PBS estéril sin SFB y se resuspendieron las células de cada ratón en 2 ml de PBS y se filtraron a un nuevo tubo en mallas de 150 micras con el fin de eliminar los restos de tejidos presentes. La población CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ fue electrónicamente purificada usando el cell sorter del citómetro FACs ARIA. Las células fueron recuperadas en medio RPMI 10% SFB, centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm y resuspendidas en 1 ml de medio completo para su posterior conteo y evaluación de viabilidad. De forma simultánea se preparan las condiciones de conversión con los estímulos de anti-CD3 (10µg/ml) previamente pegado a placa y de forma soluble anti-CD28 (2µg/ml) y TGFβ1 (5ng/ml). Como controles, se prepararon condiciones de solo anti-CD3 (10µg/ml, pegado a placa) y anti-CD28 (2µg/ml) soluble, y alternativamente estímulos óptimos de anti-CD3 (10µg/ml) y anti-CD28 (10µg/ml), ambos pegados a placa. Las células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ fueron cultivadas por triplicado durante 5 días a una densidad 2 x 10⁶ células por cada mililitro de medio RPMI completo. Al día 5 de cultivo, las células se recuperaron, lavadas y teñidas con anti-CD25PE-Cy5 y anti-TβRIII-APC para su posterior captura y análisis del Foxp3-EGFP en el citómetro FACs Calibur (BD).

Análisis estadísticos.

Todos los resultados son mostrados como promedios y con valores de error estándar. Para los análisis de timos fetales bajo bloqueo usando el anticuerpo anti-TβRIII, una prueba T de student pareada fue realizada para comparar lóbulos controles y lóbulos tratados por cada timo fetal. Para el resto de experimentos, una prueba T de student no pareada fue realizada. Se consideraron diferencias significativamente estadísticas todos los valores de p que estuvieran debajo de 0.05. En las gráficas los números de asteriscos son mostrados como p ≤0.05(*) y p ≤0.01(**). Todos los análisis fueron realizados con el programa Prisma V4.0.

VII. Resultados

VII.I. El ARN mensajero de T β RIII se expresa en timocitos y en células estromales tímicas

Dado que las inhibinas, TGF β s y BMPs se expresan en el timo, el primer paso de este proyecto fue averiguar la expresión de T β RIII en el timo a nivel de mensajero. Datos obtenidos por una RT convencional muestran que T β RIII se expresa abundantemente en timo completo (estroma y timocitos) y en timocitos aislados (Figura 13A). Esta expresión detectada en timo es comparable con los niveles observados en cerebro y testículo, los cuales son tejidos donde se ha reportado expresión abundante de este proteoglicano (figura 13A).

Considerando que los primeros eventos de desarrollo de linfocitos T inicia con la entrada de progenitores linfoides al rudimento tímico al día 13.5 de desarrollo y dado que los miembros de la superfamilia del TGF β regulan la diferenciación temprana de linfocitos T, se analizó la expresión de T β RIII en timos en etapa fetal. Para llevar a cabo este análisis, se generó ADN complementario a partir de ARN mensajero obtenido de timos fetales del día 14, 15 y 16 de desarrollo. Como se muestra en la figura 13B, la expresión de T β RIII muestra una tendencia a incrementar al día 15 fetal (1.38 ± 0.17 ; $p=0.06$) comparado con los niveles observados en los días 14 (0.92 ± 0.06), 16 (0.96 ± 0.08) de desarrollo y timo adulto (1.05 ± 0.22).

Con el fin de determinar si los timocitos y células estromales podrían expresar diferencialmente el ARN mensajero para T β RIII, se generó ADNc a partir de poblaciones de timocitos (DN, DP, SP CD4 y CD8) purificadas por sorting celular y a partir de células estromales purificadas después de un tratamiento con 5'-deoxiguanosina. El análisis de PCR en tiempo real muestra que las células estromales tímicas expresan niveles elevados del ARNm de T β RIII (2.00 ± 0.37) (figura 13C). Adicionalmente, los datos muestran que el ARNm de T β RIII se expresa abundantemente en la subpoblación SP CD4⁺ (1.71 ± 0.22), mientras que

las subpoblaciones DN (0.42 ± 0.03), DP (0.38 ± 0.14) y SP $CD8^+$ (0.39 ± 0.006) expresan niveles disminuidos del ARNm de $T\beta RIII$ (figura 13C).

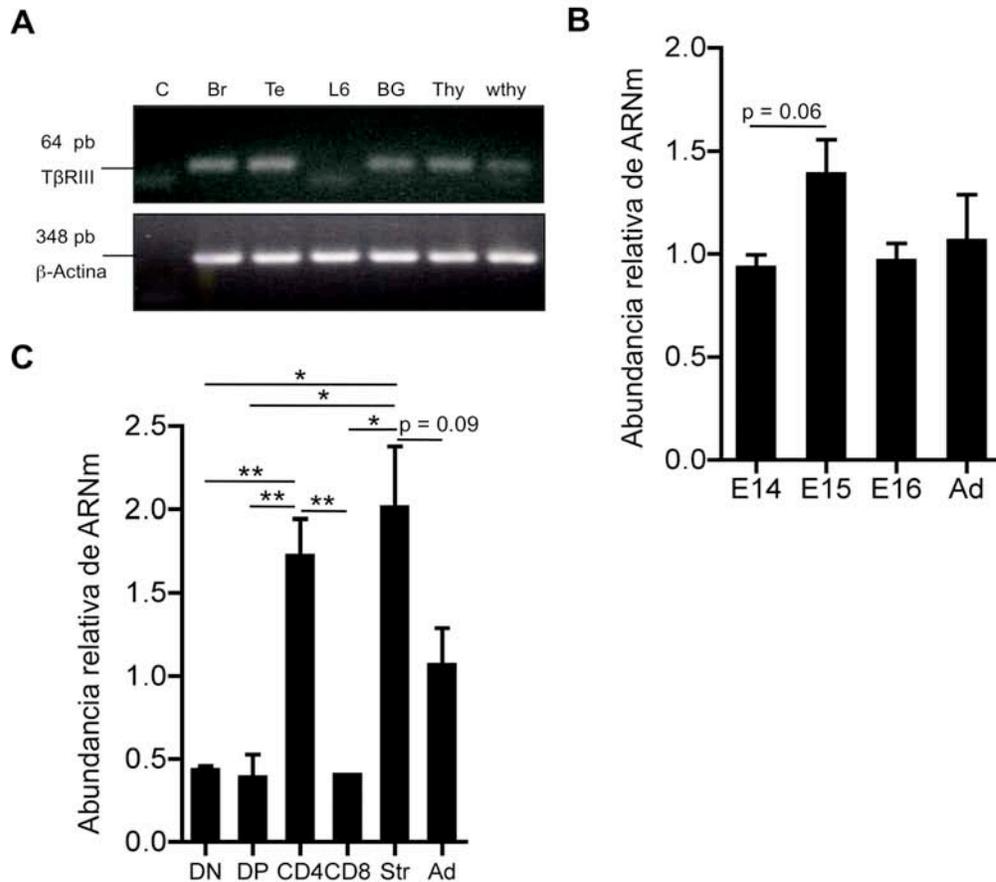


Figura 13. El ARN mensajero del $T\beta RIII$ es expresado en timo murino fetal y adulto. (A) RT-PCR utilizado para amplificar un producto de 64 pares de bases del ADNc de timocitos y timo entero adulto. Como muestras control se utilizó cerebro (Br), testículo (Te), una línea de miocitos establemente transfectada con $T\beta RIII$ (BG), y como controles negativos se utilizó la línea parental de miocitos L6E9 (L6). (B) Cuantificación de la expresión de $T\beta RIII$ mediante PCR cuantitativa en tiempo real a partir de muestras de ADNc obtenido de timos adultos y timos fetales del día 14, 15 y 16 de desarrollo. (C) Cuantificación de la expresión de $T\beta RIII$ por PCR en tiempo real en poblaciones de timocitos sorteadas DN ($CD4^+CD8^-$), DP ($CD4^+CD8^+$), $CD8^+$ y $CD4^+$. Str (estroma tímico del día 15 de desarrollo) y Ad (timo adulto). Los valores representan la expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) \pm SEM de tres muestras analizadas por triplicado representativas de tres experimentos independientes.

Finalmente estos datos de la expresión de $T\beta RIII$ en timo fueron confirmados a nivel de proteína, donde se observó que los timocitos de ratones adultos expresan una banda de 100kDa correspondiente a la proteína medular del $T\beta RIII$ murino, la cual también está presente en células de ganglios linfáticos y bazo (figura 14)

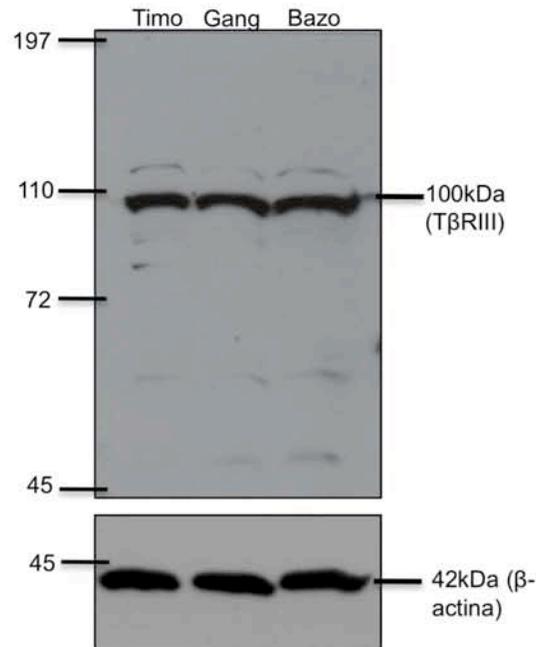


Figura 14. TβRIII se expresa en células linfoides de timo, bazo y ganglio. Lisados celulares de 10×10^6 fueron obtenidos a partir suspensiones celulares de timo, ganglios y bazo, los cuales fueron separados en geles SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidos a membranas PVDF. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina en polvo al 4% en tween 20 al 1%. Posteriormente, se realizó un western-blot para TβRIII utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TβRIII y posteriormente, un anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) para ser visualizado por quimioluminiscencia. Como control de carga se muestra la detección de la proteína β-actina.

En resumen el ARNm de TβRIII está diferencialmente expresado en timocitos adultos y en etapa fetal, lo cual sugiere que este proteoglicano podría tener un papel durante el desarrollo de linfocitos T.

VII.II. La expresión de TβRIII está regulada durante la ontogenia de células T.

Se ha reportado que la expresión diferencial de los receptores Tipo I y II de TGFβ en las subpoblaciones de timocitos está asociadas a la capacidad de respuesta de cada subpoblación en desarrollo a los ligandos de la superfamilia del TGFβ (221). Por esta razón, se investigó si TβRIII está diferencialmente expresado durante la ontogenia de linfocitos T. Para llevar a cabo tal objetivo se realizaron tinciones de

los marcadores de CD4 y CD8 con el fin de visualizar la expresión de T β RIII en cada una de las subpoblaciones de timocitos. Para la detección de T β RIII se utilizó un antisuero que fue previamente evaluado y validado mediante la tinción del T β RIII en la superficie de los timocitos en presencia de la forma soluble de T β RIII (T β RIII_s). Como se muestra en la figura 15, la tinción de T β RIII dada por el antisuero fue disminuida conforme el incremento de la dosis empleada de T β RIII_s.

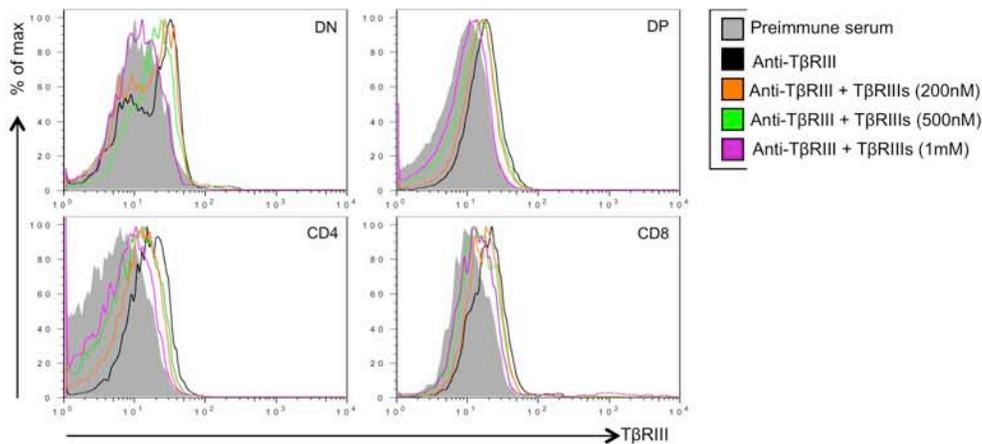


Figura 15. Análisis de la especificidad del antisuero anti-T β RIII. Lobúlos tímicos obtenidos de ratones adultos (8 semanas de edad) fueron disgregados, contados y teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8 y anti-T β RIII. Previo a la tinción se incubó el antisuero anti-T β RIII durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de T β RIII_s y posteriormente esta mezcla fue incubada con los timocitos durante 30 minutos a 4°C.

Los datos obtenidos de la tinción de timocitos con el antisuero anti-T β RIII muestran que todas las subpoblaciones expresan T β RIII en su superficie celular (Figura 16). De forma interesante, los datos muestran que dentro de las subpoblaciones SP CD4 (32.12% \pm 0.85) y SP CD8 (30.82% \pm 0.67) un mayor porcentaje de timocitos fueron positivos para T β RIII comparado con el menor porcentaje observado en las subpoblaciones DN (23.60% \pm 1.54) y DP (23.88% \pm 1.51) (Figura 16A y B). Sin embargo, el análisis de la intensidad media de fluorescencia para el marcaje de betaglicano muestra que este co-receptor presenta niveles elevados en el subpoblación DN, decae en DP y aumenta ligeramente en las subpoblaciones avanzadas en desarrollo SP CD4 y CD8 (Figura 16C).

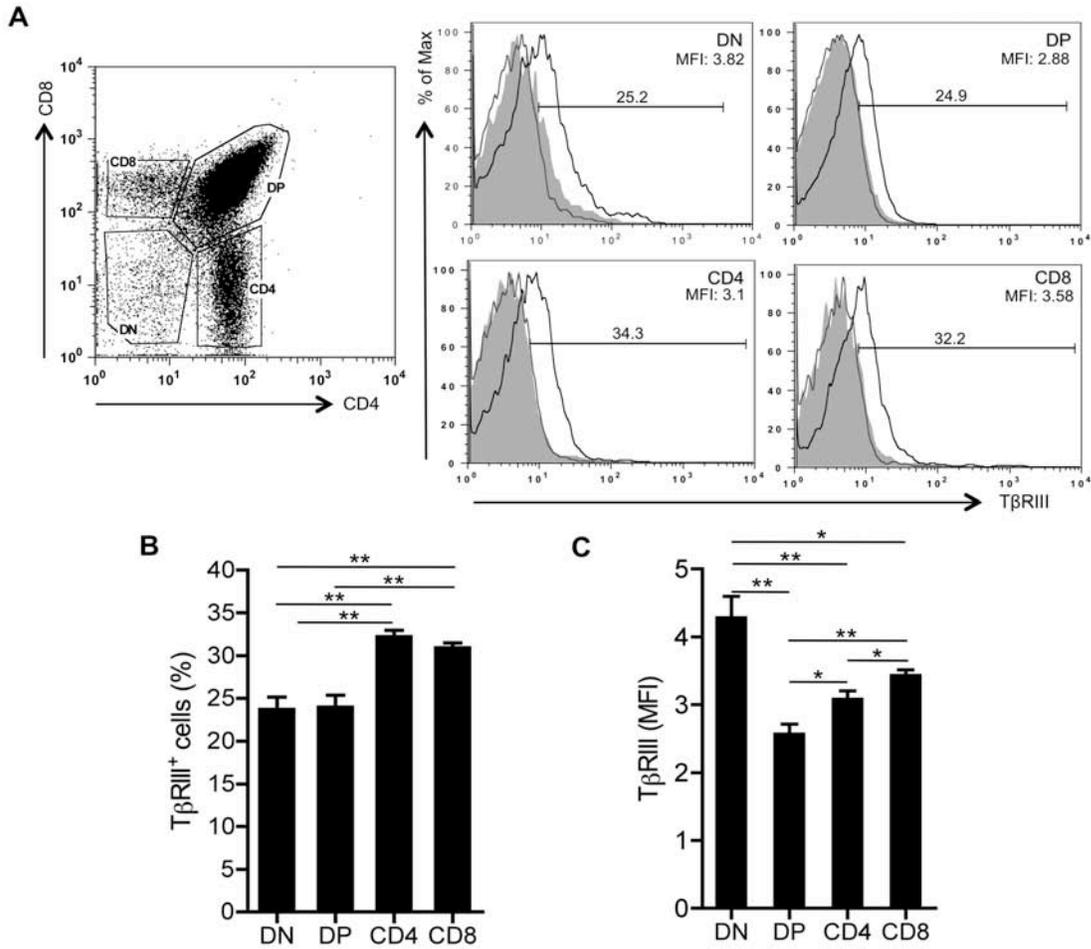


Figura 16. TβRIII se expresa diferencialmente en las principales subpoblaciones de timocitos.

Suspensiones de timocitos de 4 a 6 semanas de edad fueron teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8 y TβRIII. Suero pre-inmune fue usado como control interno de tinción. (A) Histogramas representativos muestran el porcentaje de células positivas para TβRIII derivados de los "gates" mostrados en el panel izquierdo. Gráficas muestran el porcentaje de timocitos positivos para TβRIII (B) y la IMF geométrica (C) de TβRIII, los cuáles fueron calculados substrayendo la tinción de fondo para cada subpoblación. Células sin tinción (curva rellena en gris), suero pre-inmune (línea gris) y anti-TβRIII (línea negra). Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos independientes. Valores promedio \pm SEM son mostrados (n = 5 por grupo). Asteriscos indican significancia de ** $p \leq 0.05$ y *** $p \leq 0.01$.

El hecho de la subpoblación más inmadura DN expresara cantidades notables de TβRIII nos llevó a caracterizar a este co-receptor en las subpoblaciones DN1-DN4, las cuáles son reportadas a ser reguladas por TGFβs, activinas/inhibinas y BMPs(236). Para este propósito, se realizaron tinciones con un juego de anticuerpos (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 y anti-CD25) con el fin de identificar las subpoblaciones DN1, DN2, DN3 y DN4 (figura 17A). El análisis del porcentaje de células positivas para TβRIII muestra un incremento desde DN1(15.90% \pm

3.61) a DN2 (35.67% \pm 9.06; $p=0.08$), alcanzando un pico en la etapa DN3 (54.99% \pm 5.80) y posteriormente disminuido significativamente en DN4 (10.06% \pm 2.27) (figura 17A y B). Adicionalmente, los análisis obtenidos de la intensidad media de fluorescencia para T β RIII confirman esta disminución significativa en la etapa DN4 sugiriendo una regulación dependiente de la señalización del pre-TCR (figura 17C).

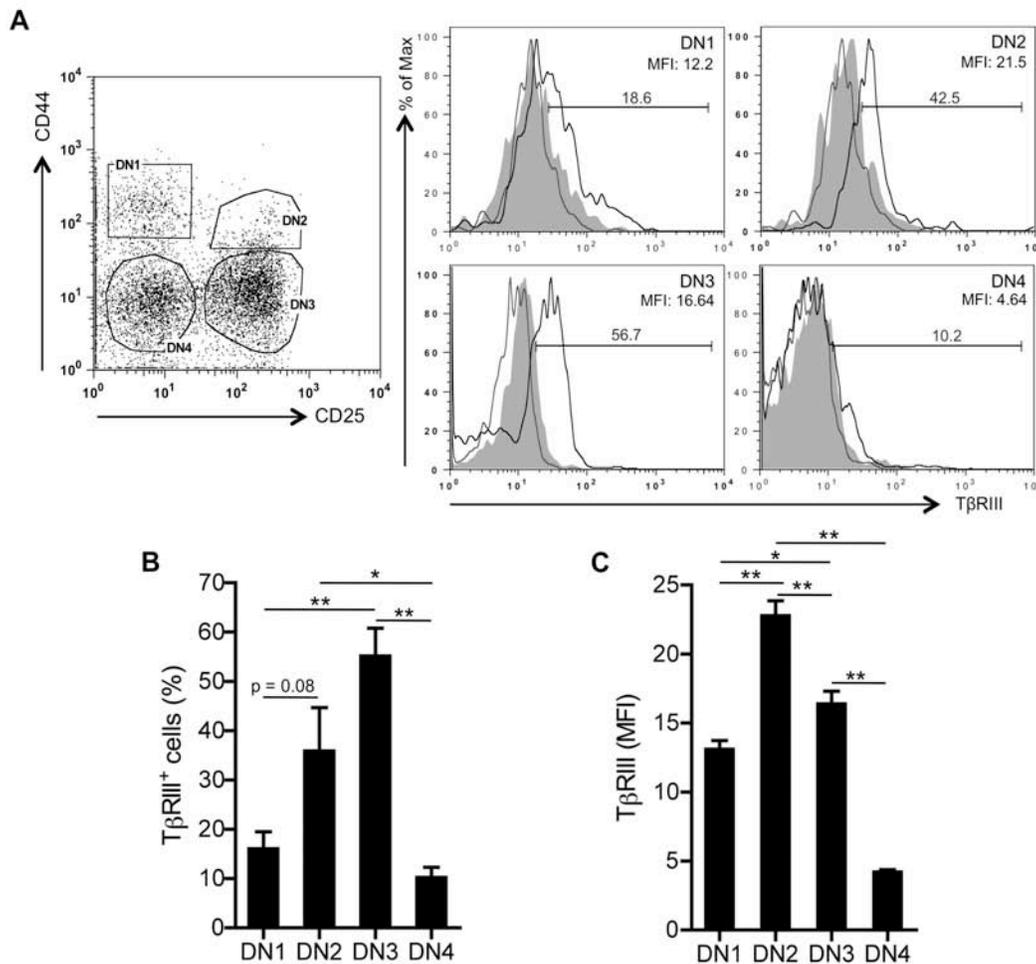


Figura 17. Los timocitos inmaduros DN2 y DN3 expresan más T β RIII en superficie.

Suspensiones de timocitos de 4 a 6 semanas de edad fueron teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8, CD44, CD25 y T β RIII. Suero pre-inmune fue usado como control interno de tinción. (A) Histogramas representativos muestran el porcentaje de células positivas para T β RIII derivados de los "gates" mostrados en el panel izquierdo. Gráficas muestran el porcentaje de timocitos positivos para T β RIII (B) y la IMF geométrica (C) de T β RIII, los cuáles fueron calculados substrayendo la tinción de fondo para cada subpoblación. Células sin tinción (curva rellena en gris), suero pre-inmune (línea gris) y anti-T β RIII (línea negra). Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos independientes. Se muestran valores promedios \pm SEM (n = 5 por grupo). Asteriscos indican significancia de ** $p \leq 0.05$ y *** $p \leq 0.01$.

Dado que la expresión de T β RIII está incrementada en timocitos SP, quisimos averiguar si la expresión de betaglicano estaría relacionada con el estado de maduración terminal de estos timocitos.

El análisis de timocitos SP muestra que el T β RIII es incrementado en timocitos CD4⁺CD69⁻ comparado con CD4⁺CD69⁺ (figura 18A y B), y se encuentra mayormente expresado en CD4⁺CD62L^{hi} y CD8⁺CD62L⁺ comparado con timocitos SP CD62L⁻ (figura 18C y D).

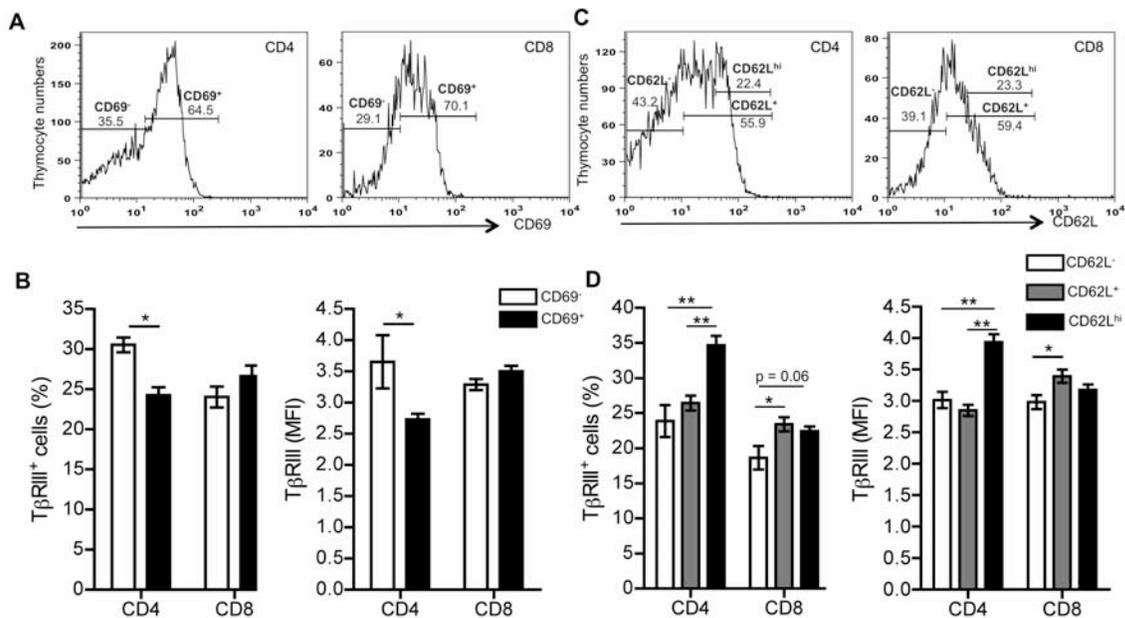


Figura 18. La expresión del T β RIII se incrementa en timocitos CD4⁺ y CD8⁺ terminalmente diferenciados. Las suspensiones de timocitos de 4 a 6 semanas de edad fueron teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8, CD44, CD25 y T β RIII. Suero pre-inmune fue usado como control interno de tinción. (A) Histogramas muestran las regiones definidas como CD69⁻ y CD69⁺ en timocitos CD4⁺ y CD8⁺. (B) Gráficas muestran el porcentaje de células positivas para T β RIII y la IMF geométrica para T β RIII en las regiones definidas en histogramas superiores. (C) Histogramas muestran las regiones definidas como CD62L⁻, CD62L⁺ y CD62L^{hi} en timocitos CD4⁺ y CD8⁺. (D) Gráficas muestran el porcentaje de células positivas para T β RIII y la IMF geométrica para T β RIII en las regiones definidas en histogramas superiores. Se muestran valores promedios \pm SEM (n = 5 por grupo). Asteriscos indican significancia de * p \leq 0.05 y **p \leq 0.01.

En conclusión, estos datos muestran que la expresión de T β RIII está asociada con la diferenciación terminal de timocitos debido a que es preferencialmente expresado en los timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo funcional y maduro (CD69⁻ CD62L^{+/hi}).

VII.III. El bloqueo de T β RIII induce un retraso del desarrollo de linfocitos T.

Una vez determinada la expresión de T β RIII en timo, nos dedicamos a investigar el requerimiento de T β RIII en mediar las señales de TGF β s, inhibinas y BMPs en timo, ligandos descritos en regular la diferenciación de linfocitos T (236, 234). Para investigar este requerimiento durante el desarrollo se agregó un antisuero específico que reconoce el ectodominio de T β RIII a cultivos de timos fetales (FTOCs). Esta estrategia del bloqueo de T β RIII ha sido previamente validado para evaluar el requerimiento de este proteoglicano en la formación de mesénquima (promovida por TGF β 2) en un modelo *in vitro* (172). Adicionalmente, el uso del antisuero anti-T β RIII *in vitro* es capaz de revertir la capacidad de células dendríticas (suprimidas por TGF β) de estimular la proliferación de linfocitos T (207).

Por tal motivo, timos fetales de día 14 de desarrollo fueron extraídos y cultivados en presencia de anticuerpos anti-T β RIII o antisuero pre-inmune como control. Los cultivos de timos fetales fueron analizados al día 3 y 7 de cultivo haciendo tinciones para las subpoblaciones de timocitos en desarrollo. Como se muestra en la figura 19A, no se encontraron diferencias significativas en los números absolutos al día 3 y 7 entre los lóbulos tímicos tratados con anticuerpos anti-T β RIII y los controles, pero cabe señalar que se observa una ligera disminución aunque no significativa en los lóbulos tratados al día 7 de cultivo. Los análisis de los timocitos inmaduros DNs no mostraron ninguna diferencia en los porcentajes y números absolutos de timocitos DN1, DN2, DN3 and DN4 entre los lóbulos tratados y controles al día 3 de cultivo (figura 19B-D). Por otro lado, los análisis de FTOCs al día 7 revelaron una disminución significativa del porcentaje de la subpoblación DN2 (de 3.99% \pm 0.41 a 3.05% \pm 0.34) en condiciones de bloqueo, aunque este efecto no se reflejó en los números absolutos (figura 19C y D).

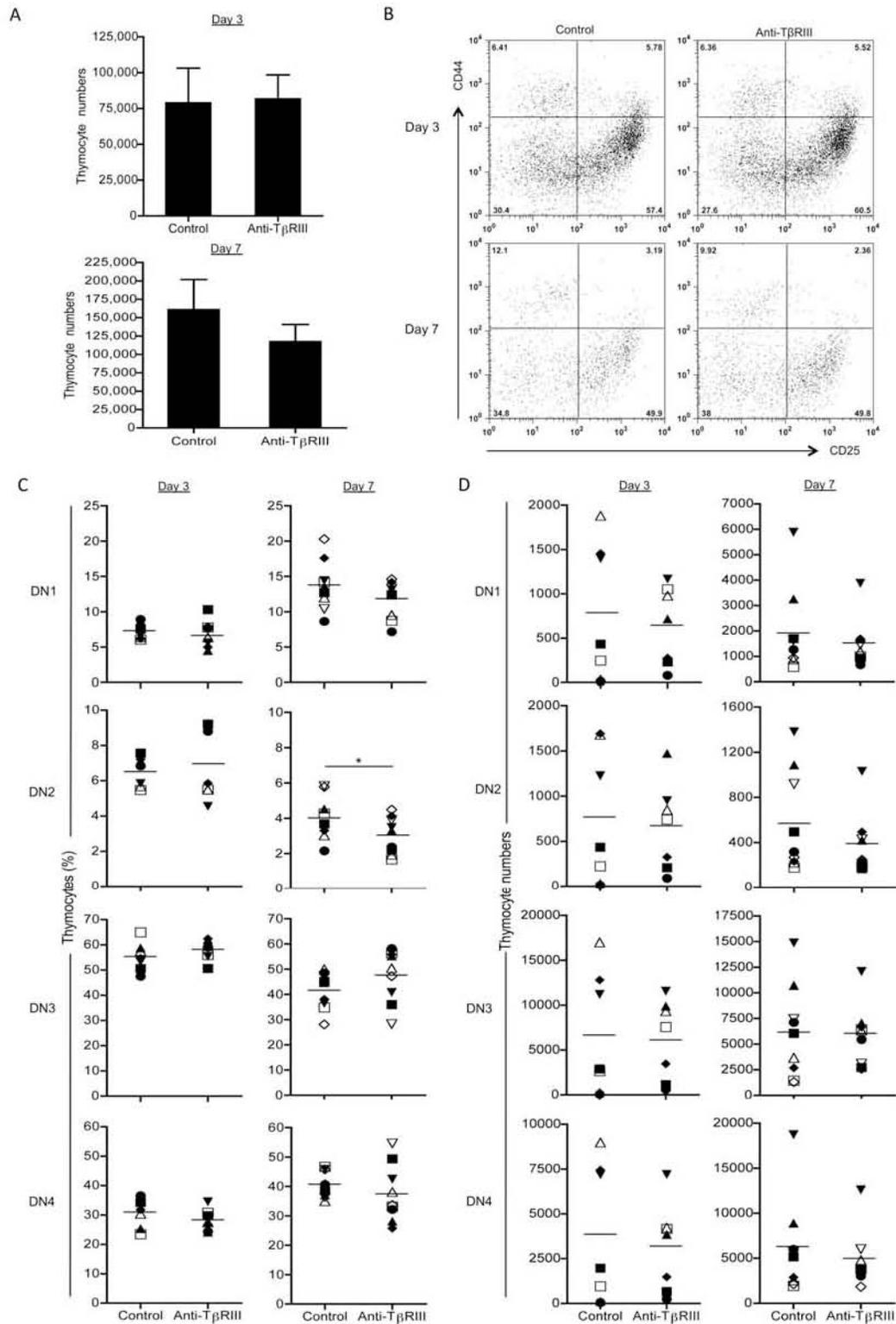


Figura 19. Análisis del desarrollo de timocitos inmaduros DN en presencia de anticuerpos anti-TβRIII. Lobúlos tímicos obtenidos de embriones del día 14 de desarrollo fueron cultivados en presencia de anticuerpos anti-TβRIII o en presencia de suero pre-inmune (control). Al día 3 y al día 7 del cultivo de timos fetales, estos

fueron disgregados, contados y teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8, CD44 y CD25. A) Gráficas comparativas que muestran el número de timocitos viables obtenidos al día 3 y al día 7 de cultivo de timos fetales del día 14 en ambos tratamientos. Gráficas que muestran el resultado del análisis de los porcentajes (C) y números absolutos (D) de timocitos DN1, DN2, DN3 y DN4 obtenidos al día 3 y 7 de cultivo, tratados con anticuerpos anti-T β RIII (anti-T β RIII) y anticuerpo control (control). Se muestran valores promedios \pm SEM, n = 9 por grupo. Asteriscos indican significancia de * p \leq 0.05.

Sin embargo, el análisis de las principales subpoblaciones de timocitos al día 3 de cultivo mostró una reducción significativa del porcentaje de timocitos DP (34.75% \pm 3.60 en lóbulos controles contra 26.14% \pm 2.20 en lóbulos tratados) a expensas de una disminución de timocitos DN (de 47.55% \pm 3.57 en controles a 55.9% \pm 2.72 en tratados) (figura 20).

Consistentemente, la alteración observada al día 3 de cultivo fue corroborada al día 7 donde se observó una disminución significativa del porcentaje de timocitos DP en desarrollo (de 67.1% \pm 2.50 a 59.55% \pm 2.82) y un incremento de timocitos DN (de 16.93% \pm 1.62 a 22.06% \pm 2.56) en lóbulos tímicos tratados con anti-T β RIII) (figura 20). Estos datos sugieren que T β RIII regula la transición de timocitos DN a DP, jugando un papel importante en las señales derivadas del preTCR, punto de control importante en el desarrollo de células T.

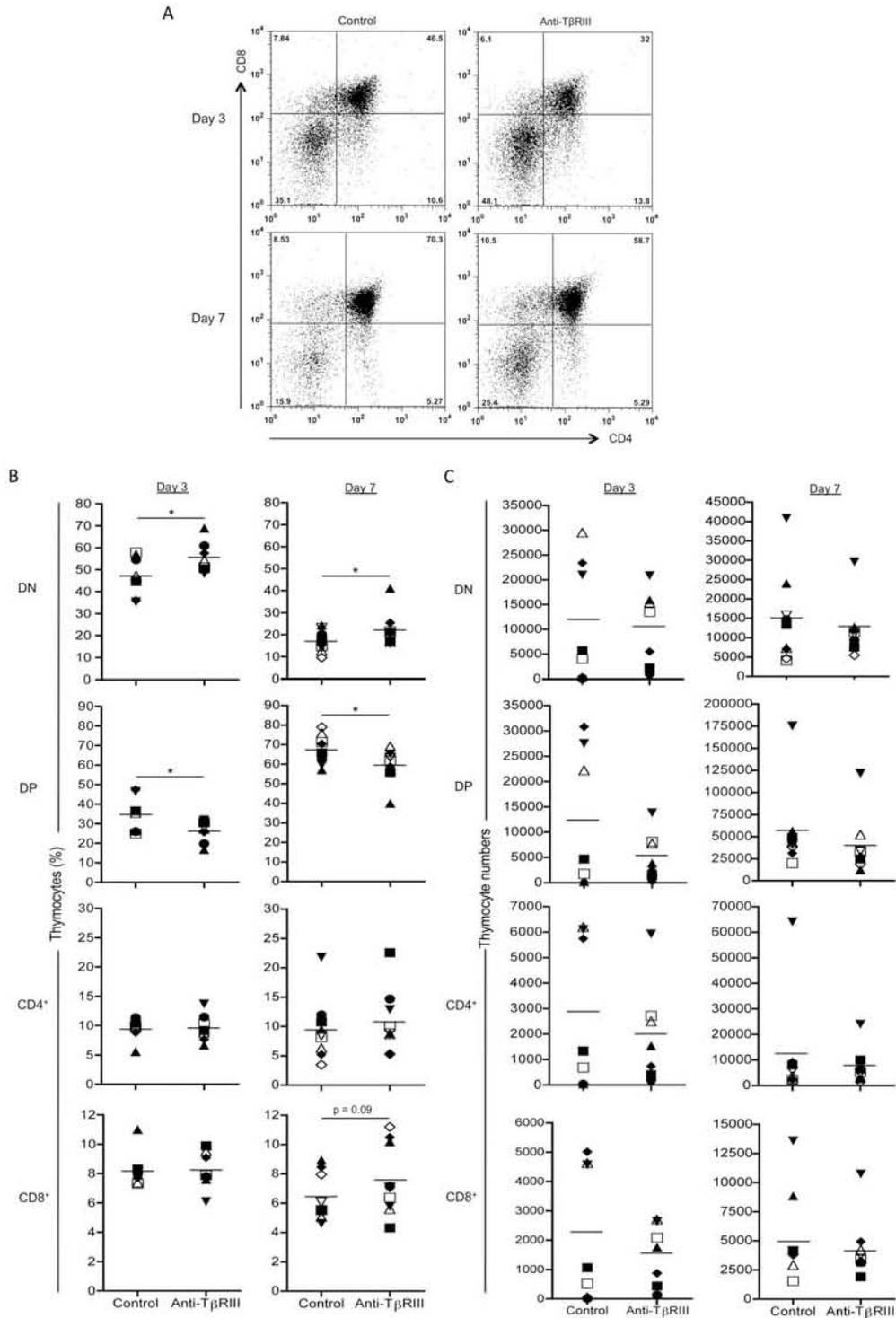


Fig. 20. El bloqueo del ectodominio del TβRIII en FTOCs conlleva una disminuida transición de timocitos DN a DP. Lobúlos tímicos obtenidos de embriones del día 14 de desarrollo fueron cultivados en presencia de anticuerpos anti-TβRIII o en presencia de suero pre-inmune (control). Al día 3 y al día 7 del cultivo de timos fetales, estos fueron disgregados, contados y teñidos con anticuerpos que reconocen CD4 y CD8 . (A) Diagramas

representativos de la tinción con CD4 y CD8 para comparar los tratamientos. Gráficas comparativas de ambos tratamientos resultado del análisis de los porcentajes (B) y números absolutos (C) de timocitos DN, DP, CD4⁺ y CD8⁺ obtenidos al día 3 y 7 de cultivo. Asteriscos indican significancia de * p≤0.05.

VII.IV. El desarrollo de células T está alterado en embriones deficientes de TβRIII.

La otra estrategia empleada para evaluar el papel de TβRIII durante el desarrollo de linfocitos T fue realizar FTOCs a partir de embriones deficientes de TβRIII. Los ratones deficientes de TβRIII^{-/-} muestran una letalidad intrauterina debido a varios defectos proliferativos en corazón y apoptosis en hígado fetal, los cuales inician al día 13.5 mostrándose a la alta al día 16.5 de desarrollo(173). Sin embargo, la mortalidad es muy baja en los períodos 13.5-14.5 siendo de 1.78%-4%, al día E15.5 es de un 10%, mientras que inicia a incrementarse al día 16.5 (30.9%) alcanzando una mayor mortalidad entre los tiempos E17.5-E18.5 (55.81%) (173). Considerando lo anterior, decidimos aislar los timos fetales al día 14 a partir de embriones TβRIII^{-/-} con el fin de analizar el impacto de la deficiencia de TβRIII en el desarrollo de linfocitos T, y reduciendo la influencia de los posibles defectos sistémicos reportados en estos embriones. Con el fin de corroborar el fenotipo TβRIII^{-/-} en embriones tipados mediante amplificación del cassette Neo realizamos tinciones en timos fetales con el antisuero específico para TβRIII. Como se muestra en la figura 21, no se detectó la presencia de TβRIII en cultivos de timos fetales TβRIII^{-/-} al día 3 y 7, validando a nivel de proteína la ausencia de este co-receptor.

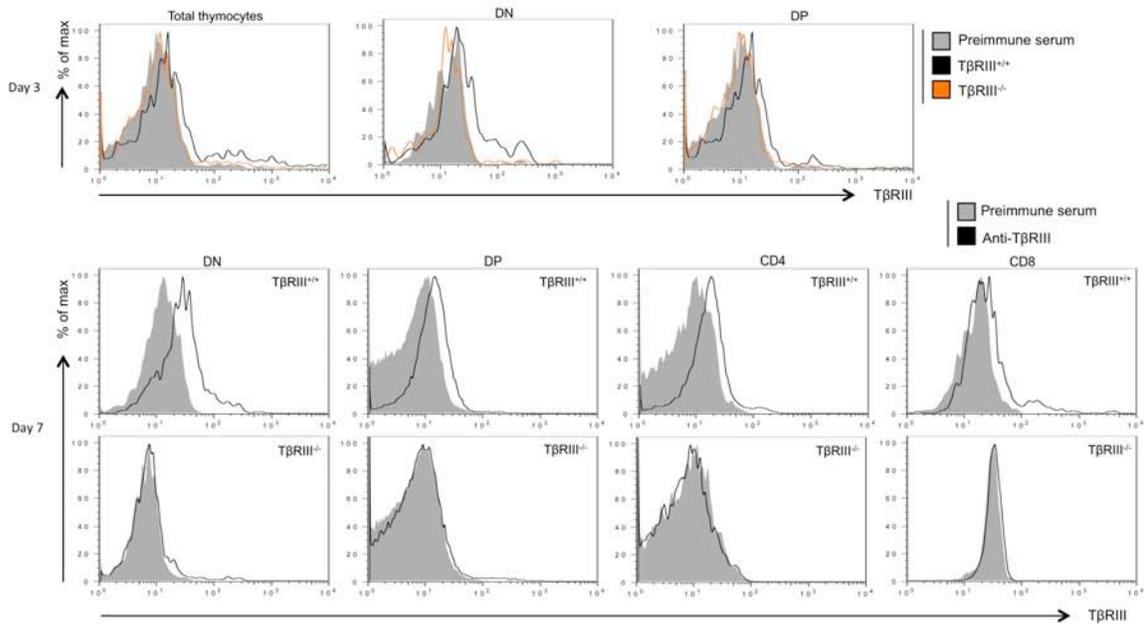


Figura 21. Validación a nivel de proteína de la ausencia del TβRIII en cultivos de timos fetales previamente amplificados para el cassette Neo en el gen del TβRIII. Lobúlos tímicos TβRIII^{+/+} y TβRIII^{-/-} obtenidos de embriones del día 14 de desarrollo fueron puestos en cultivo durante 7 días. Al día 3 y al día 7 del cultivo de timos fetales, estos fueron disgregados, contados y teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8 y TβRIII. Panel superior, histogramas que muestran la tinción de TβRIII en timocitos totales y en las subpoblaciones DN y DP al día 3 de cultivo. Panel inferior, histogramas que muestran la tinción de TβRIII en las subpoblaciones DN, DP, SP CD4 y CD8 al día 7 de cultivo.

Una vez verificada la ausencia de TβRIII se procedió a analizar el desarrollo *in vitro* de los linfocitos T. Primero decidimos analizar si la deficiencia de TβRIII repercutía en los números absolutos de los timocitos en desarrollo. Análisis de los números al día 0 muestra que no hubo diferencias entre los genotipos evaluados (figura 22A). Sin embargo, los números de timocitos en FTOCs deficientes de TβRIII muestran una discreta reducción al día 3 que se acentúa de manera significativa al día 7 (de $1.31 \pm 0.21 \times 10^5$ a $0.77 \pm 0.13 \times 10^5$) de cultivo (figura 22A). Ahora bien, cuando examinamos los porcentajes de las principales subpoblaciones de timocitos en desarrollo obtenidos al día 3 de cultivo, no observamos diferencias entre lóbulos TβRIII^{-/-} y TβRIII^{+/+} (figura 22B). Sin embargo, el análisis al día 7 de cultivo muestra una reducción significativa en el porcentaje de los timocitos DP (de $64.22\% \pm 3.62$ a $52.55\% \pm 5.26$) a expensas de un incremento de la subpoblación DN (de $18.31\% \pm 3.10$ a $28.06\% \pm 4.46$), lo cual

correlaciona con la disminución en números de timocitos totales observada en este día (figura 22A).

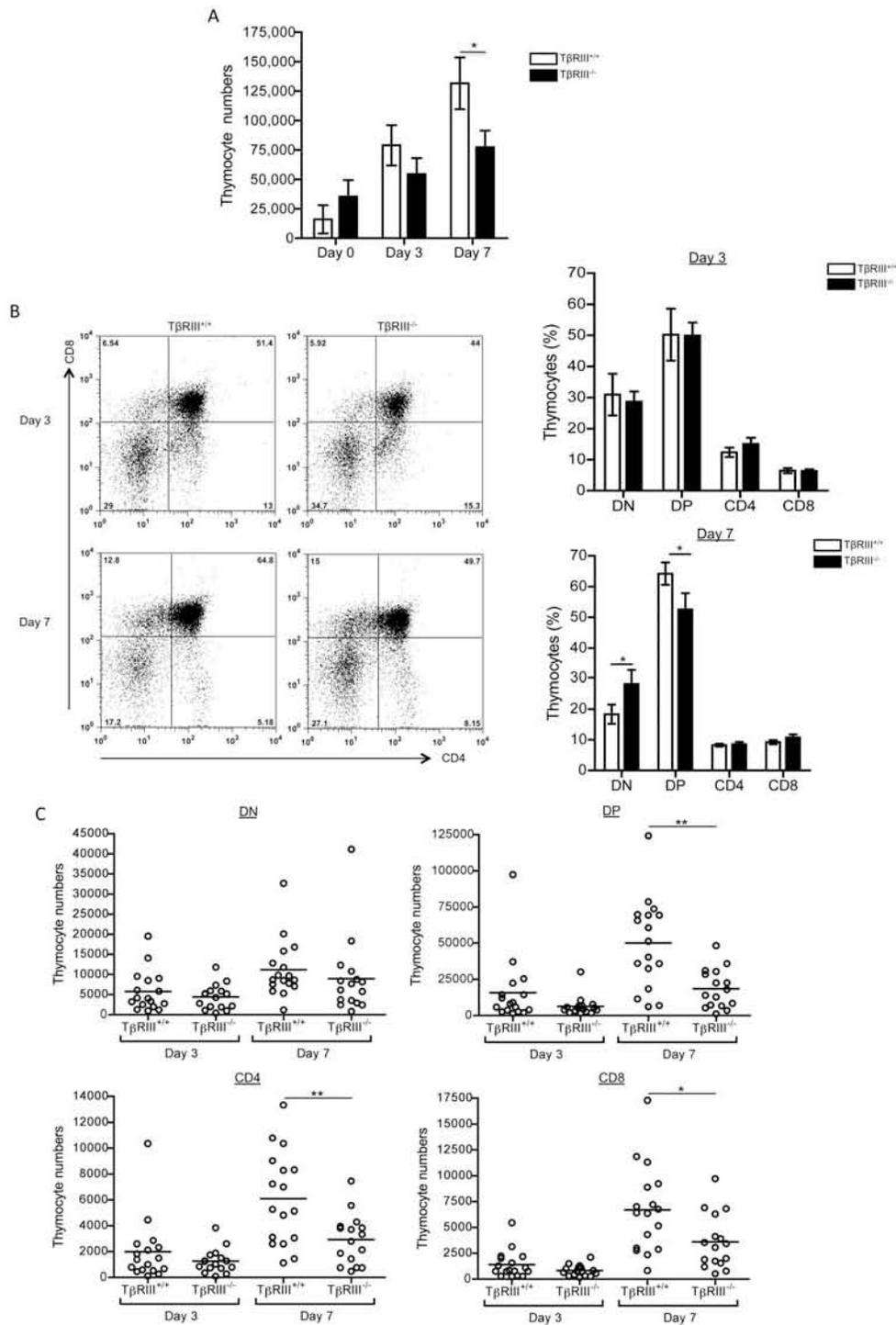


Figura 22. Los timos fetales TβRIII^{-/-} presentan un desarrollo de células T alterado. Lóbulos tímicos T βRIII^{+/+} y TβRIII^{-/-} obtenidos de embriones del día 14 de desarrollo fueron puestos en cultivo durante 7 días. (A) Números absolutos de timocitos al día 0, 3 y 7 de cultivo. (B) Panel izquierdo, diagramas representativos de la tinción CD4 y

CD8 en lóbulos tímicos fetales T β RIII^{+/+} y T β RIII^{+/-} al día 3 y 7 de cultivo. Panel derecho, resumen de experimentos que muestran el promedio del porcentaje de cada una de las subpoblaciones de timocitos derivados de embriones T β RIII^{+/+} y T β RIII^{-/-} al día 3 y 7. C) Análisis de números absolutos de cada una de las subpoblaciones de timocitos en desarrollo T β RIII^{+/+} y T β RIII^{-/-} al día 3 y 7. Se muestran valores promedios \pm SEM, T β RIII^{+/+} n = 17 y T β RIII^{-/-} n = 16. Asteriscos indican significancia de * p \leq 0.05 y **p \leq 0.01.

Posteriormente para tener una mayor comprensión del impacto de la deficiencia de T β RIII en timo se realizó el análisis de los números absolutos por cada una de las subpoblaciones de timocitos en desarrollo. Los datos muestran que la disminución en la transición de DN a DP se debe a la disminución significativa de los números absolutos de timocitos DP (de $0.50 \pm 0.07 \times 10^5$ a $0.185 \pm 0.03 \times 10^5$), CD4⁺ (de $0.06 \pm 0.008 \times 10^5$ a $0.029 \pm 0.04 \times 10^5$) y CD8⁺ (de $0.066 \pm 0.01 \times 10^5$ a $0.035 \pm 0.006 \times 10^5$) únicamente al día 7 de cultivo (figura 22C), lo cual se correlaciona con la disminución de números totales en este día y con el incremento en porcentaje de la subpoblación DN (figura 22A y 22B).

En conclusión, estos resultados muestran que la alteración en el desarrollo de linfocitos T en ausencia de T β RIII parece iniciar con la disminución preferencial de timocitos DP impactando en consecuencia los números de timocitos SP CD4 y CD8 (figura 22C).

Por su parte, el análisis del desarrollo de las subpoblaciones inmaduras DN (DN1-DN4) no mostró ninguna diferencia en porcentajes entre los genotipos evaluados al día 0, 3 y 7 de cultivo (figura 23A). Sin embargo, solo fue detectable una disminución en los números absolutos de la subpoblación DN1 en timos deficientes de T β RIII al día 7 de cultivo (figura 23B).

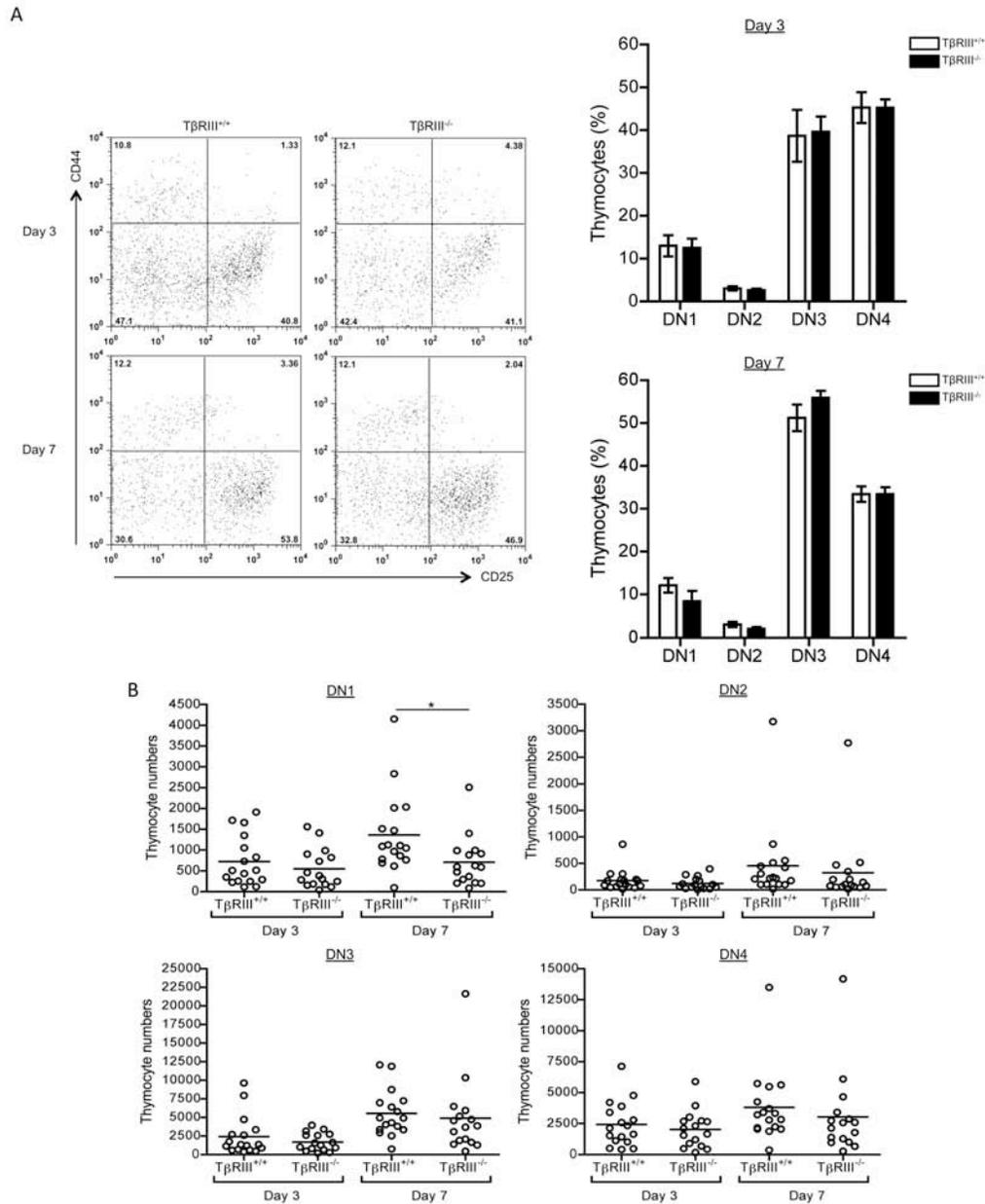


Figura 23. El desarrollo de las subpoblaciones DNs no se encuentra alterado en timos fetales $T\beta RI II^{-/-}$. Lobúlos tímicos T $T\beta RI II^{+/+}$ y $T\beta RI II^{-/-}$ obtenidos de embriones del día 14 de desarrollo fueron puestos en cultivo durante 7 días. Al día 3 y al día 7 del cultivo de timos fetales, estos fueron disgregados, contados y teñidos con anticuerpos que reconocen CD4, CD8, CD44 y CD25. (A) Panel izquierdo, diagramas representativos de la tinción CD44 y CD25 en lóbulos tímicos fetales $T\beta RI II^{+/+}$ y $T\beta RI II^{-/-}$ en ambos días de cultivo. Panel derecho, las gráficas muestran los porcentajes de timocitos DNs obtenidos de timos $T\beta RI II^{+/+}$ y $T\beta RI II^{-/-}$ al día 3 y 7 de cultivo. (C) Análisis de los números absolutos en cada uno de los timocitos inmaduros DNs (DN1-DN4). Se muestran valores promedios \pm SEM, $T\beta RI II^{+/+}$ n = 17 y $T\beta RI II^{-/-}$ n = 16. Asteriscos indican significancia de * p \leq 0.05.

VII.V. La deficiencia de T β RIII repercute en un incremento en apoptosis.

Con el fin de investigar el mecanismo responsable que explique la alteración en la transición DN-DP y la reducida celularidad observada durante la diferenciación *in vitro*, se realizaron ensayos de detección de apoptosis en timos fetales deficientes de T β RIII. Este abordaje del problema surge del estudio del hígado fetal de embriones T β RIII^{-/-}, el cual presenta niveles incrementados de apoptosis y una reducción significativa de su celularidad (173). El análisis de apoptosis se llevó a cabo al día 7 debido a que en este tiempo observamos una reducción significativa de los números absolutos y de la transición DN-DP en lóbulos deficientes de T β RIII. La estrategia empleada fue la detección de la caspasa 3 activa en cada una de las subpoblaciones de timocitos mediante tinción intracelular para citometría de flujo. De forma interesante, los datos muestran un incremento significativo del porcentaje de células positivas para la caspasa 3 activa en la subpoblación DN (77.56 ± 2.45 contra 68.56 ± 1.28), DP (34.70 ± 2.57 contra 28.33 ± 0.28) y CD4 SP (37.96 ± 1.47 contra 32.43 ± 1.40) en lóbulos tímicos T β RIII^{-/-} comparados con los timos normales (figura 24A y B). Además, el análisis de la intensidad media de fluorescencia para la caspasa 3 activa muestra un incremento significativo de este mediador apoptótico en timocitos DP (23.18 ± 2.72 contra 15.02 ± 2.55) y un ligero incremento en la subpoblación DN (51.95 ± 5.57 contra 43.43 ± 4.14) en lóbulos T β RIII^{-/-}, aunque este último no alcanza una significancia estadística (figura 24C).

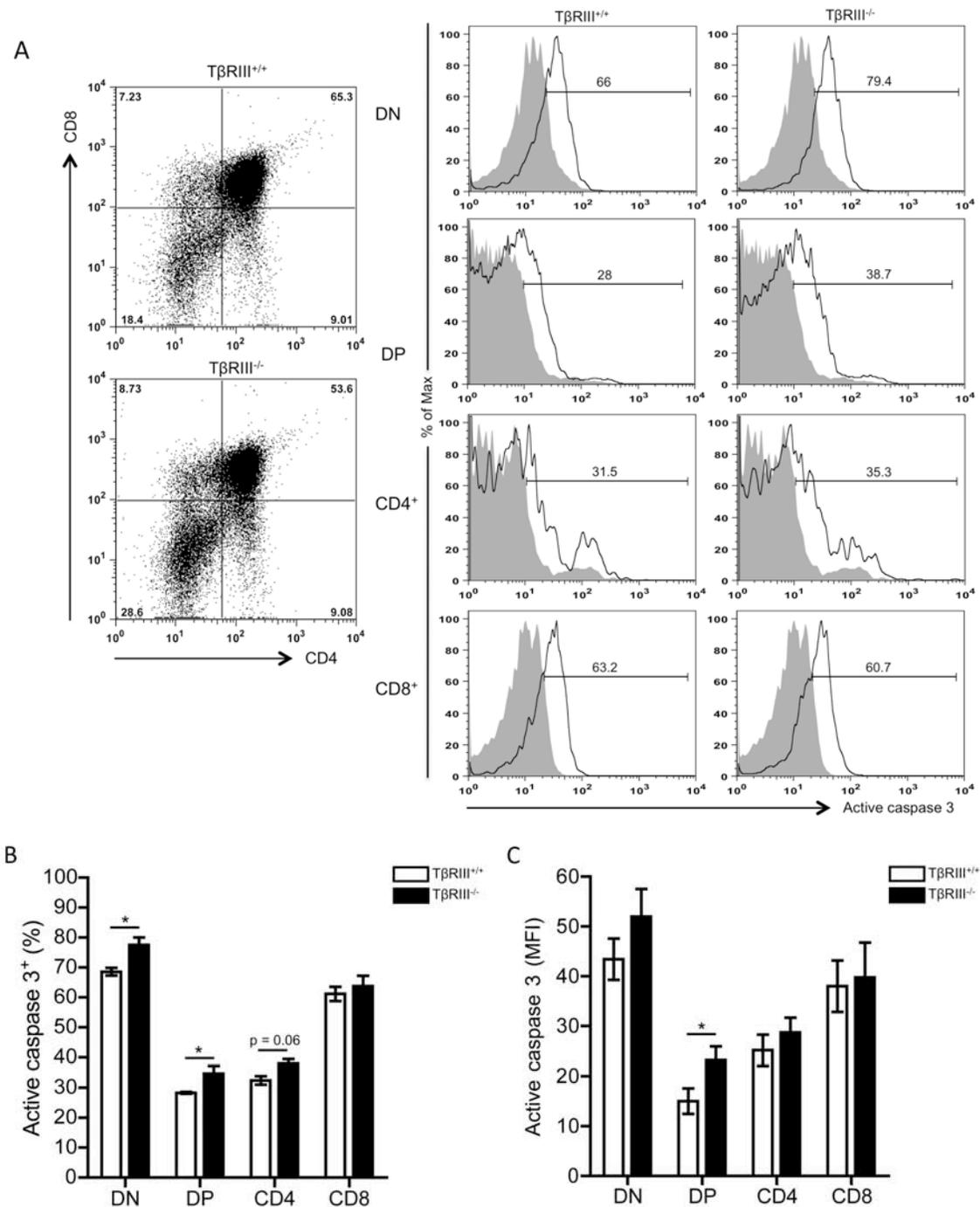


Fig. 24. La deficiencia del TβRIII repercute en un incremento en la apoptosis de timocitos en desarrollo. (A) En panel izquierdo, diagramas representativos de la tinción de CD4 y CD8 de lóbulos fetales TβRIII^{+/+} y TβRIII^{-/-} al día 3 y 7 de cultivo. En el panel derecho, se muestran histogramas representativos de la tinción intracelular de caspasa 3 activa en timocitos. Las gráficas muestran el porcentaje de las células positivas para caspasa 3 activa (B) y los niveles de expresión de la caspasa 3 (C) expresados como IMF geométrica en las subpoblaciones de timocitos. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Valores promedios ± SEM son mostrados, TβRIII^{+/+} n = 3 y TβRIII^{-/-} n = 3. Asteriscos indican significancia de * p≤0.05.

Otra estrategia empleada para evaluar la apoptosis fue la tinción con anexina-V, la cual identifica la superficie de células apoptóticas. El análisis del marcaje de timocitos indica un incremento de la apoptosis en timocitos DP y SP CD4 de lóbulos $T\beta RIII^{-/-}$ comparado con lóbulos fetales normales (figura 25). En conjunto, los análisis de la caspasa 3 activa y la tinción de anexina V indican que la subpoblación mayormente afectada es la correspondiente a los timocitos DP (figura 24 y 25).

En conjunto, estos resultados apoyan un papel protector de apoptosis mediado por $T\beta RIII$ a través de la regulación de las señales involucradas en la sobrevivencia de los timocitos en desarrollo.

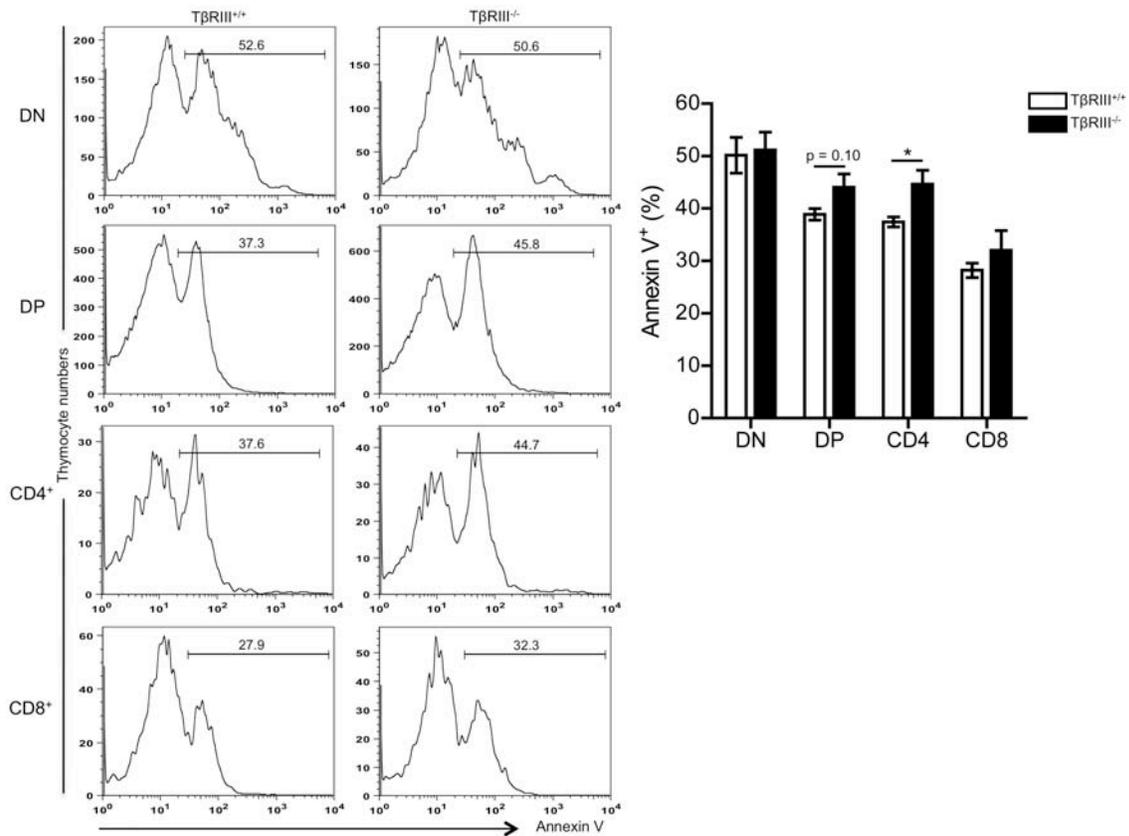


Figura 25. La deficiencia del $T\beta RIII$ repercute en un incremento en la apoptosis (anexina V⁺) en timocitos DP y CD4⁺. En el panel izquierdo, los histogramas representativos muestran el porcentaje de células positivas para anexina-V en timocitos $T\beta RIII^{+/+}$ y $T\beta RIII^{-/-}$ al día 7 de cultivo. En el panel derecho, la gráfica muestra el análisis del porcentaje de células positivas anexina-V en ambos genotipos. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM son mostrados, $T\beta RIII^{+/+}$ n = 3 y $T\beta RIII^{-/-}$ n = 3. Asteriscos indican significancia de $* p \leq 0.05$.

Los datos encontrados en este estudio demuestran que un proteoglicano que ha sido considerado de origen epitelial se expresa en linaje de linfocitos T. Como habíamos visto anteriormente, T β RIII incrementa su expresión en timocitos SP terminalmente diferenciados CD69⁻CD62L^{+hi} (figura 18), los cuales migran posteriormente a órganos linfoides periféricos. Estos resultados nos llevaron de forma obligada a hacernos las siguientes preguntas: ¿qué expresión presenta T β RIII en las distintas poblaciones de células T periféricas? y ¿esta expresión puede ser regulada por la activación del TCR?. Para responder a estas procedimos a la caracterización de la expresión de T β RIII en condiciones de homeostasis y bajo activación del TCR *in vitro* (descrito en detalle en la figura 12).

VII.VI. T β RIII se expresa en células T CD4⁺ y CD8⁺ periféricas.

Con el fin de investigar si la expresión de timocitos SP CD4 y CD8 terminalmente diferenciados mantienen la expresión de T β RIII en órganos linfoides periféricos, se obtuvieron suspensiones celulares de ganglios, bazo y de sangre periférica y se realizó una tinción con un juego de anticuerpos que nos permitió identificar las células T CD4⁺, T CD8⁺ y células B CD19⁺. El análisis de esta tinción nos muestra que las células T CD4⁺ mantiene la expresión de T β RIII de forma similar a lo observado en timo, sin embargo los linfocitos T CD8⁺ disminuyen la expresión de T β RIII superficie y las células B expresan niveles bajos (figura 26). Cabe señalar que la mayor contribución de la expresión de T β RIII en células T CD4⁺ lo aportan las células positivas para el marcador de CD25 pero negativas para Foxp3. Este dato lo abordaremos más adelante.

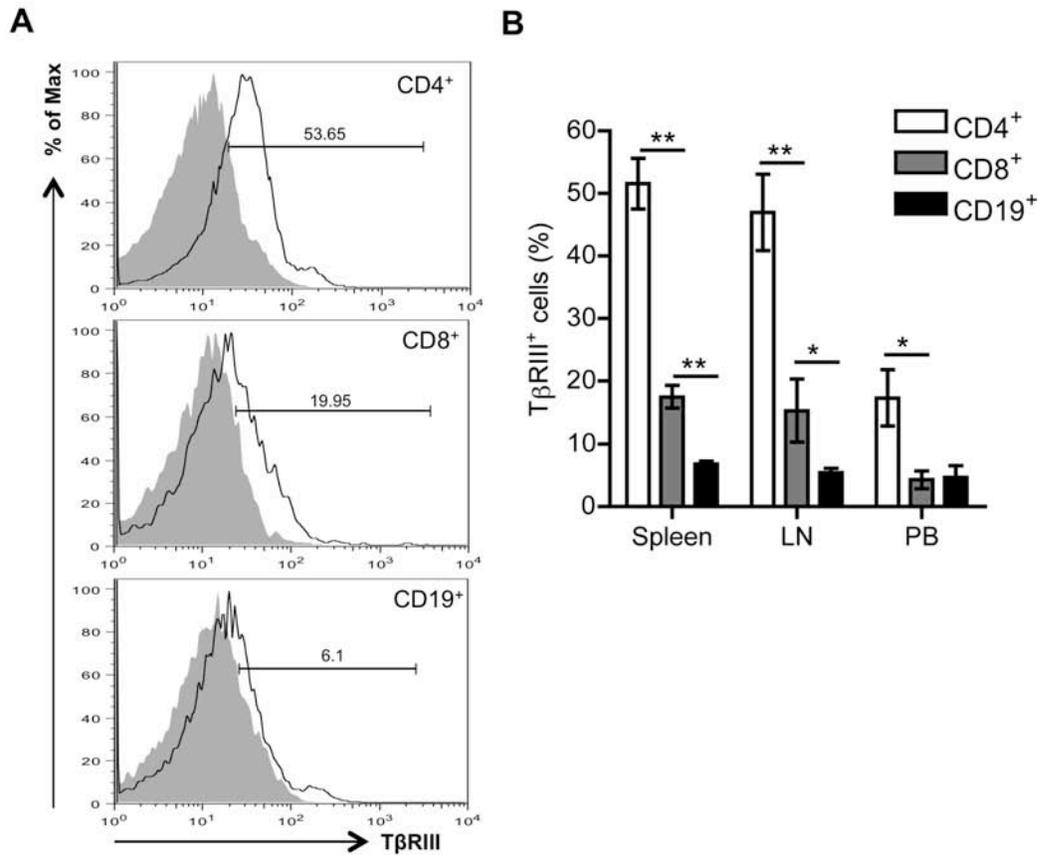


Figura 26. Expresión del TβRIII en células T y células B circulantes y de órganos linfoides periféricos. Suspensiones celulares obtenidas de ganglios, bazo y de sangre periférica fueron teñidos con anticuerpos dirigidos a CD3, CD4, CD8, CD19 y a TβRIII. (A) Histogramas representativos de la expresión de TβRIII en células T positivas para CD4, CD8 y en células B positivas para CD19 de bazo. (B) Gráfica que muestra el promedio en porcentaje de células positivas para TβRIII en bazo, ganglios y sangre periférica. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestran los valores promedios ± SEM (n = 4). Los asteriscos indican significancia de * p≤0.05 y ** p≤0.001.

El siguiente paso fue averiguar si TβRIII está diferencialmente expresado en células T efectoras, efectoras/memoria y vírgenes. Una forma de identificar estas poblaciones es utilizar los marcadores CD44 y CD62L, los cuales identifican a células T vírgenes (CD44^{lo}CD62L^{hi}), efectoras (CD44^{hi}CD62L^{lo}) y células efectoras de memoria central (CD44⁺CD62L⁺) (figura 27A). Como se muestra en la figura 27B y C, un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron positivos para TβRIII es observado en la subpoblación CD44^{lo}CD62L^{hi} que corresponden en su mayoría a linfocitos T vírgenes. Es necesario resaltar que las diferencias entre

poblaciones celulares fueron más evidentes en células T CD4⁺ periféricas que en células T CD8⁺ (figura 27B y C). Por otro lado, en células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria central/efectora (CD44⁺CD62L^{hi}) y efectoras (CD44⁺CD62L^{lo}) la expresión de TβRIII está disminuida significativamente (figura 27B y C). Estas diferencias fueron más evidentes en células T CD4⁺ periféricas que en células T CD8⁺ (figura 27B y C). Cabe señalar que en linfocitos T circulantes de sangre periférica el patrón de regulación de la expresión de TβRIII es diferente a aquellos residentes de ganglios y bazo. A diferencia de los niveles observados de TβRIII en linfocitos T vírgenes de bazo y ganglio, los linfocitos CD44^{lo}CD62L^{hi} circulantes expresan menos betaglicano en superficie (figura 27B y C).

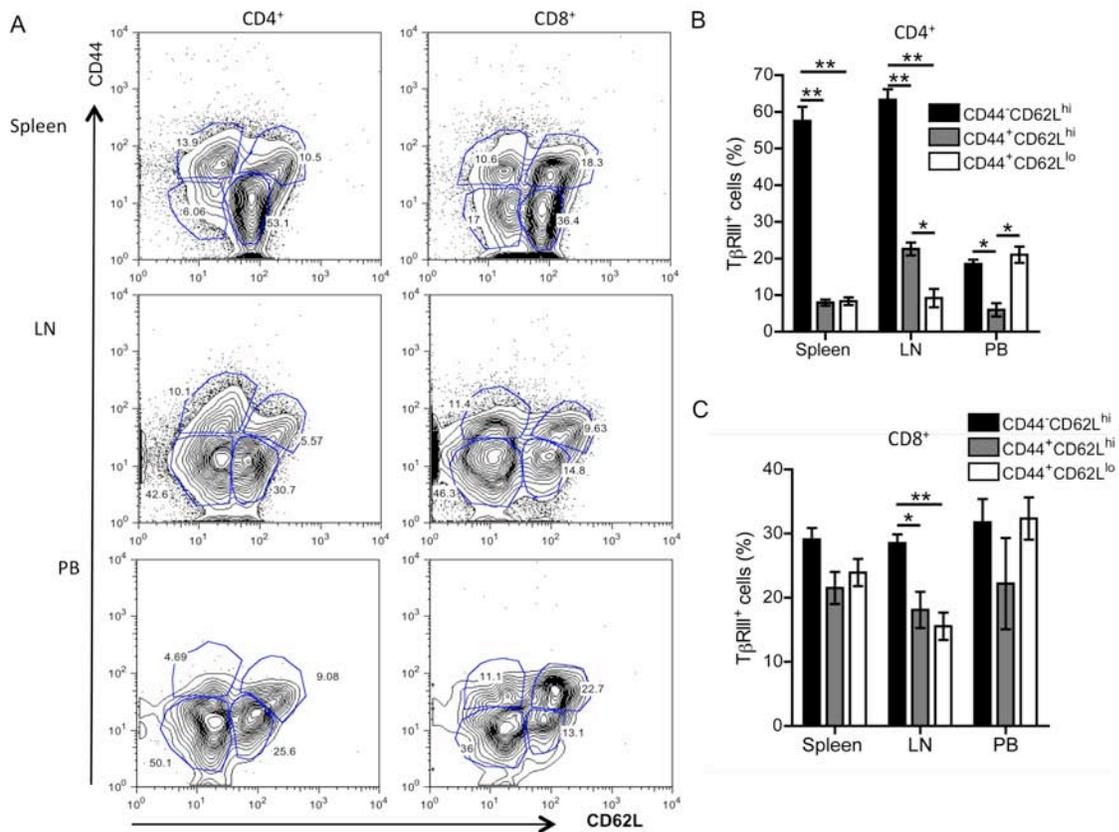


Figura 27. Expresión del TβRIII en poblaciones de células T periféricas en homeostasis.

Suspensiones celulares obtenidas de ganglios, bazo y de sangre periférica fueron teñidas con anticuerpos dirigidos a CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L y a TβRIII. (A) Diagramas representativos que muestran la tinción de CD44 y CD62L con el fin de visualizar las poblaciones efectoras, efectoras/memoria y vírgenes. Las gráficas muestran el promedio del porcentaje de células positivas para TβRIII en bazo, ganglios y sangre periférica en células T CD4⁺ (B) y en células T CD8⁺ (C). Valores promedios ± SEM son mostrados (n = 4). Asteriscos indican significancia de * p≤0.05 y ** p≤0.001.

Esta diferencia en la expresión de T β RIII entre células T vírgenes y las poblaciones de efectoras y de memoria/efectoras indica una potencial modulación de la expresión de T β RIII por las señales de activación derivadas de la activación antigénica. Un punto importante a señalar es que la adquisición de altos niveles del marcador de CD44 (CD44^{hi}) en un linfocito T es un evento tardío durante la activación y polarización de una respuesta inmune. En la figura 27, habíamos observado que T β RIII es expresado abundantemente en linfocitos T vírgenes identificados como CD44^{lo}CD62L^{hi}, sin embargo, no podemos excluir la posibilidad que algunos linfocitos con activación temprana identificados con la positividad para CD25 se encuentren dentro de esta población.

VII.VII. La señalización inducida por el TCR incrementa la expresión de T β RIII en células T.

Por lo tanto, para poder definir si la expresión de T β RIII durante la activación de un linfocito T es un evento temprano o tardío se decidió realizar cultivos de linfocitos T y analizar el efecto de la estimulación del TCR y de señales co-estimuladoras *in vitro*. Como se muestra en la figura 28, la coestimulación del TCR y CD28 en células T naive induce la expresión de T β RIII de manera significativa. De hecho, esta expresión de T β RIII es incrementada por ambos tipos de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ mostrándose un pico en expresión a las 72hrs (figura 28A). Adicionalmente, cuando analizamos la expresión de T β RIII en aquellas células CD25⁺ inducidas en linfocitos T CD4⁺ naive por la activación del TCR se observa que este receptor se incrementa paulatinamente desde las primeras 24hrs hasta las 168hrs (figura 28B). De forma similar, la expresión de T β RIII también es incrementada de manera importante en la generación de células positivas para CD44 (las cuáles en porcentaje son menores que las CD25⁺ debido a su emergencia en gran medida tardía), el cual muestra también una cinética mostrándose un primer pico las 24hrs y un segundo pico a las 72hrs (figura 28C).

En resumen, la señalización inducida por la activación del TCR promueve la expresión de T β RIII en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ indicando un papel potencial de este proteoglicano en células T periféricas.

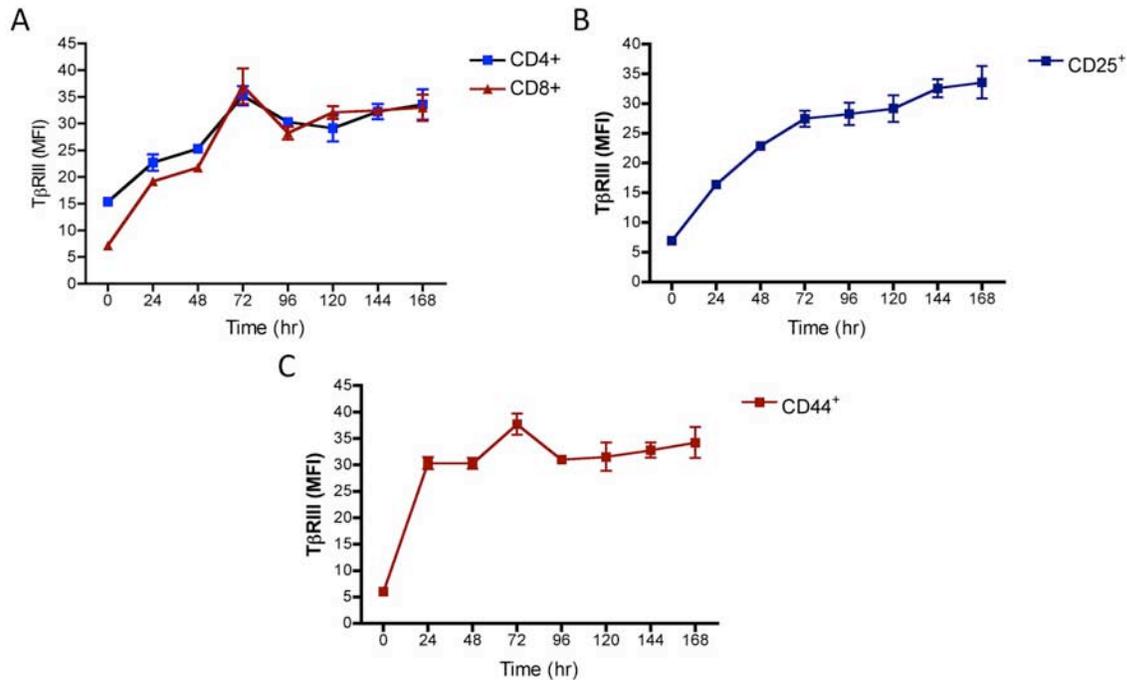


Figura 28. La expresión del T β RIII es incrementada por las señales de activación del TCR.

Suspensiones celulares obtenidas de ganglios y bazos fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD44 y posteriormente se sorteó la población naive (CD25⁺CD44⁺CD62L^{hi}), contadas y puestas en cultivo en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 pegados a placa, ambos a una concentración de 5 μ g/ml. (A) Las gráficas muestran la expresión temporal de T β RIII inducida por la activación del TCR en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, en linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ y en linfocitos T CD4⁺ CD44⁺ (n = 3, por triplicado).

VII.VIII. Las células T reguladoras “naturales” expresan bajas cantidades de TβRIII en superficie.

Dado que ligandos de TβRIII como TGFβ1 están involucrados en el desarrollo y/o generación de las células T reguladoras Foxp3⁺ durante una respuesta inmune, quisimos averiguar si TβRIII puede ser diferencialmente expresado en esta población. Para ello realizamos una serie de tinciones de células derivadas del ratón knockin Foxp3EGFP, el cual permite la caracterización de células T reguladoras sin necesidad de permeabilizar las células para detectar intracelularmente el factor de transcripción Foxp3. Interesantemente, en condiciones de homeostasis TβRIII está expresado en la superficie de células T CD4⁺Foxp3⁻ mientras que en la células T CD4⁺Foxp3⁺ dicha expresión se ve considerablemente reducida a niveles casi nulos en timo, bazo y ganglios (figura 29A y B). El análisis global de ambas subpoblaciones muestra una clara disminución de TβRIII⁺ en linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (figura 29C). Estos datos indican que en condiciones de homeostasis las células Treg Foxp3⁺, las cuales en su mayoría son naturales, es decir que provienen del timo, expresan de bajas cantidades o niveles incluso indetectables de TβRIII.

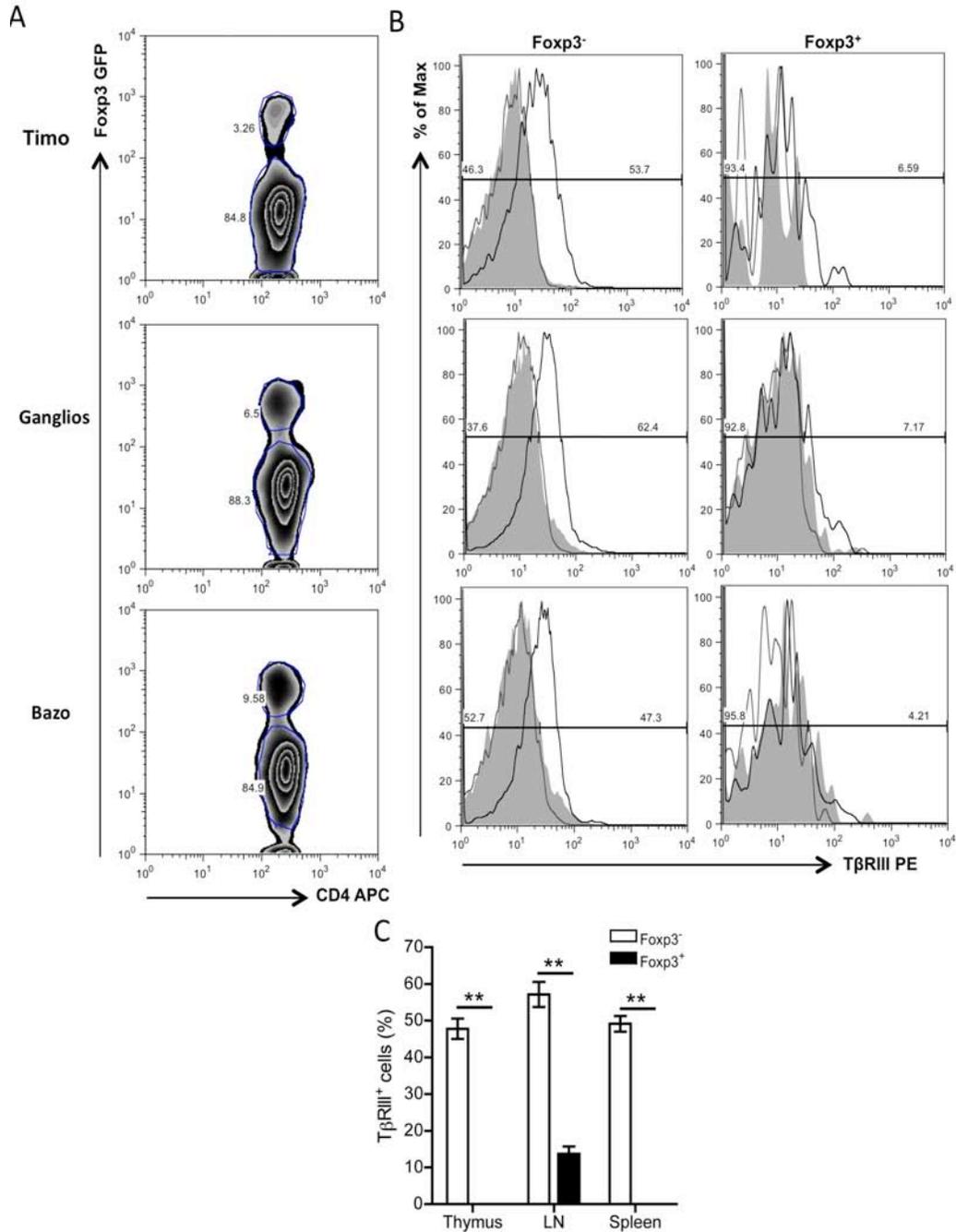


Figura 29. Las células T reguladoras Foxp3⁺ expresan bajos niveles del TβRIII en superficie.

Suspensiones celulares obtenidas de timos, ganglios, bazos fueron teñidos con anticuerpos dirigidos a CD3, CD4, CD8, CD25 y a TβRIII. (A) Diagramas representativos que muestran la señal de CD4 y Foxp3 con el fin de visualizar las poblaciones Foxp3⁻ y Foxp3⁺. (B) Los histogramas muestran la expresión de TβRIII en linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ y Foxp3⁺. (C) Gráfica muestra el análisis de los porcentajes de TβRIII⁺ en células T CD4⁺Foxp3⁻ T CD4⁺ y Foxp3⁺. (n = 4). Los asteriscos indican significancia de ** p≤0.001.

VII.IX. El empleo de T β RIII soluble recombinante disminuye la generación de células T reguladoras F oxp3^+ promovida por TGF β 1.

Estos datos nos llevaron a investigar si la expresión de betaglicano es similar en las células Treg F oxp3^+ inducidas en periferia (iTregs), las cuales muestran características diferentes a las naturales en relación a su estabilidad en el fenotipo regulador. TGF β 1 es considerado el inductor esencial de la generación de células T reguladoras F oxp3^+ periféricas y se une también a betaglicano en otros tipos celulares, sin embargo, se desconoce si el betaglicano expresado en una célula T naive CD25 $^-$ F oxp3^- tiene la capacidad de regular la generación de células T reguladoras F oxp3^+ . Por lo tanto decidimos investigar este posible requerimiento poniendo a competir la unión de TGF β 1 entre el T β RIII unido a membrana en una célula T naive y con el T β RIII soluble agregado en cultivos de conversión a F oxp3^+ *in vitro*.

El análisis de la generación *in vitro* de células T reguladoras muestra la inducción alrededor de un 25% de células T reguladoras F oxp3^+ en presencia de TGF β 1 y de una estimulación subóptima del TCR durante 5 días de cultivo a partir de linfocitos T CD4 $^+$ CD25 $^-$ F oxp3^- (figura 30A y B). El análisis de la competencia de la unión de TGF β 1 con T β RIII soluble reduce la generación de células F oxp3^+ inducida por TGF β 1 conforme a la dosis empleada (figura 30A y B). Sin embargo, esta disminución fue menor a la observada en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-TGF β 1 (figura 30A y B). El análisis de la expresión de T β RIII al día 5 de la conversión a células T reguladoras *in vitro* muestra que este proteoglicano es expresado de forma similar en las poblaciones CD25 $^+$ F oxp3^- y CD25 $^+$ F oxp3^+ (figura 30C). Cabe señalar que esta expresión de T β RIII está controlada por la señal de TGF β 1 debido a que en condiciones de bloqueo con anti-TGF β 1 la expresión de T β RIII está aumentada en ambas poblaciones CD25 $^+$ F oxp3^- y CD25 $^+$ F oxp3^+ (figura 30C).

En resumen T β RIII se expresa en linfocitos T periféricos CD4 $^+$ y CD8 $^+$. En homeostasis esta expresión parece ser mayormente expresada en células T naive

ó activadas tempranamente, dado que en subpoblaciones de memoria y efectoras tardía esta expresión se encuentra disminuida. Sin embargo, ambas poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incrementan la expresión de TβRIII cuando son activados mediante entrecruzamiento del TCR y CD28 sugiriendo un papel potencial en en células T tempranamente activadas. Además, TβRIII parece no ser expresado por células T reguladoras naturales mientras que en células T reguladoras inducidas por TGFβ1 este proteoglicano se expresa a niveles similares que un células T activada de forma subóptima.

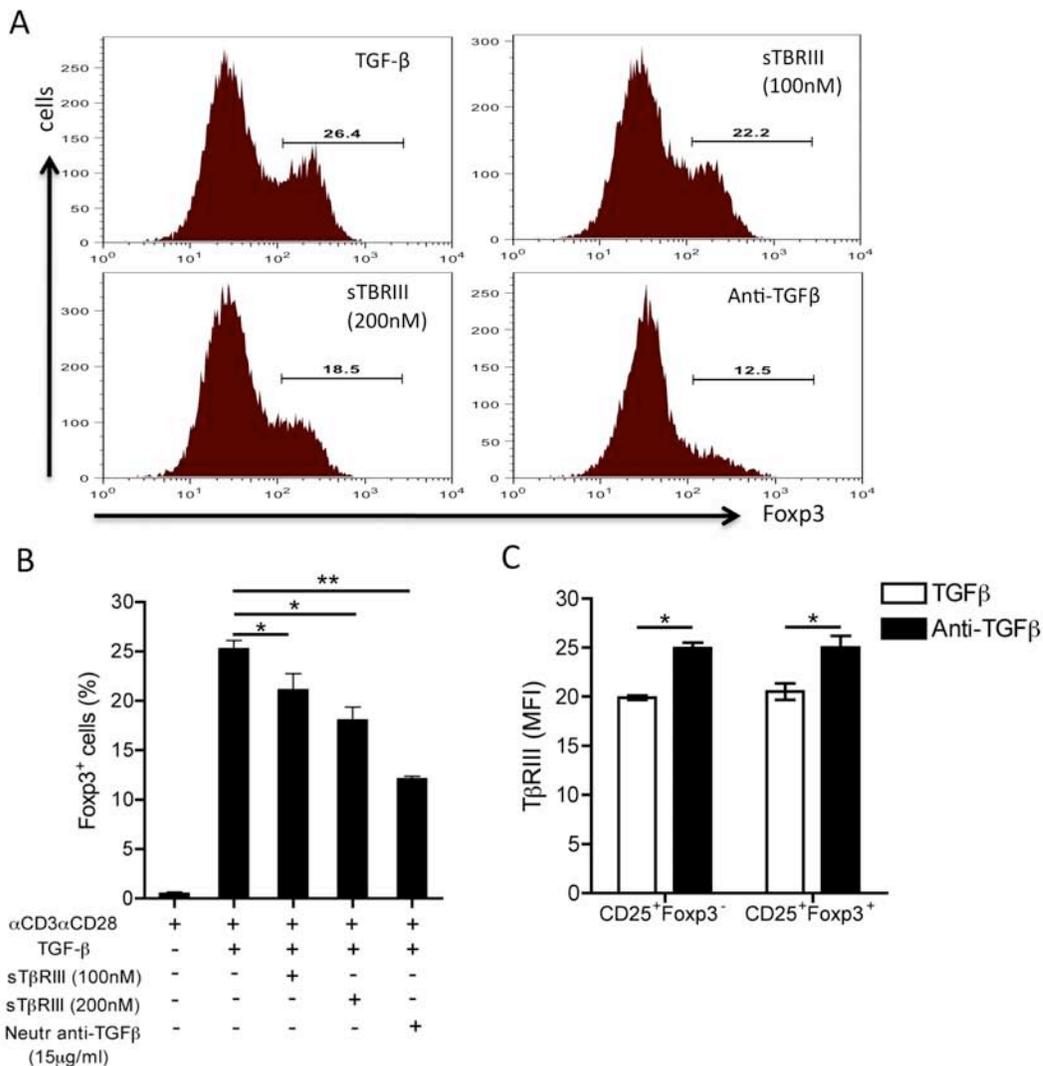


Figura 30. La adición del TβRIII disminuye la generación *in vitro* de células T reguladoras Foxp3⁺ mediada por TGFβ. Se purificaron las células T vírgenes CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ mediante purificación por sorting celular y posteriormente se cultivaron durante 5 días en presencia de TGFβ1 (5ng/ml) como control, con concentraciones crecientes de sTβRIII y como control negativo de conversión en presencia de un anticuerpo neutralizante. (A) Histogramas que muestran la adquisición del factor Foxp3 en los distintos tratamientos indicados. (B) Análisis de la

generación *in vitro* de células T CD4⁺ Foxp3⁺ en presencia de sTβRIII. (C) Efecto de la neutralización del TGFβ1 sobre la expresión de betaglicano después del cultivo de generación de células T reguladoras Foxp3⁺. Experimento representativo de 3 independientes. Asteriscos indican significancia de * p≤0.05 y ** p≤0.001.

VIII. Discusión

La principal aportación de esta tesis es el hecho de que un proteoglicano considerado de origen epitelial es también expresado en el linaje linfóide. Este trabajo demuestra que la expresión de T β RIII está regulada durante el desarrollo de linfocitos T y contribuye al mantenimiento de las señales de supervivencia de los timocitos en desarrollo.

En esta sección primero discutiremos varios aspectos importantes acerca de la expresión de T β RIII en el linaje linfóide. Muchos de los estudios acerca de T β RIII se han enfocado en su expresión y función principalmente en células no hematopoyéticas tales como fibroblastos (205, 199), células epiteliales (199-202), células endoteliales (169, 237), miocitos (172, 203), células de ovario y células de testículo (187, 204), entre otros. Varios reportes sustentan el papel de T β RIII como regulador esencial de varios procesos de desarrollo y señales homeostáticas que participan en la integridad y función de diferentes tejidos. Este requerimiento se ve claramente ilustrado con el fenotipo de los embriones deficientes de T β RIII, los cuales fallecen de defectos en corazón e hígado fetal debido a un proceso alterado de transición epitelio-mesénquima y a eventos de apoptosis, respectivamente(173). Recientemente, se ha descrito que la deficiencia de T β RIII en embriones compromete la formación del cordón seminífero, la función de células de Leydig (238) y conlleva una alteración del desarrollo de riñones(239). De hecho, la pérdida de la expresión de T β RIII se asocia con la progresión y metástasis de cáncer de páncreas, colon, pulmón, ovario, próstata y de mama soportando su papel como gen supresor de tumores(175).

Es importante mencionar que existen pocos reportes que muestren la expresión de T β RIII en células hematopoyéticas como macrófagos (208), neutrófilos (206), megacariocitos (240), células dendríticas (207) y células T (209, 210), aunque la mayoría de éstos abordan pobremente una posible función de T β RIII en estas células. Sin embargo, hay algunas excepciones; por ejemplo se ha descrito que el T β RIII expresado en células dendríticas es importante en la unión de TGF β 1 y en consecuencia de la supresión de la capacidad de éstas de estimular respuestas

alógenas (207). En el caso de células T, un estudio de la década de los 90's reporta que el incremento de la expresión de T β RIII se asocia con la progresión de linfomas cutáneos de células T, lo cual indica una modulación de este co-receptor bajo señales presentes de manera crónica que promueven la transformación celular (209). Por último, un estudio que aborda la expresión de los proteoglicanos en células T de sangre periférica humana muestra que T β RIII es uno de los proteoglicanos expresados en la población considerada de memoria CD4⁺CD45RO⁺ (210). Sin embargo, en este estudio no se evalúa la expresión de betaglicano en otras subpoblaciones de linfocitos T, ni aborda la posible implicación funcional de esta expresión.

En este trabajo demostramos que el linaje linfoide T expresa T β RIII en superficie, el cual es regulado durante el desarrollo y bajo señales de activación/maduración. Es por ello que proponemos que betaglicano es capaz de regular potencialmente los efectos de miembros de la superfamilia del TGF β en estirpes celulares del sistema inmune, incluidos los linfocitos T. En relación a esta idea, resulta atractivo investigar la posible regulación que pueda ejercer T β RIII en las señales desencadenadas por TGF β 1 en el sistema inmune, siendo este factor el regulador por excelencia de los linfocitos T (211). De la misma forma, T β RIII podría ser capaz de regular las funciones de inhibinas en otros tipos celulares del sistema inmune como son las células dendríticas, las cuales han sido recientemente descritas ser sujetas a la acción de las inhibinas y expresar T β RIII (207, 234). De hecho, resultados preliminares obtenidos en el laboratorio muestran que células dendríticas deficientes de inhibinas presentan defectos en maduración en respuesta lipopolisacárido (LPS) y en la capacidad de migrar en respuesta a la quimiocina CCL19 (Roxana Olguin, tesis de maestría).

Este trabajo aporta la primera evidencia de la expresión de T β RIII en el tejido estromal y linfoide que conforman el timo. Esta expresión está sustentada por la detección del mensajero de T β RIII y a nivel de proteína. Sin embargo, ciertas diferencias son notables en los datos generados por estas técnicas. Por ejemplo,

los datos obtenidos de la cuantificación del ARN mensajero muestran que los timocitos SP CD4⁺ y células estromales expresan más TβRIII (figura 13C), mientras que la intensidad media de fluorescencia para TβRIII indica que la subpoblación DN expresa los niveles más altos, seguido de los timocitos SP (CD4 y CD8) y en menor grado los timocitos DP (figura 16C). Estas diferencias pueden ser explicadas por el procesamiento diferencial de TβRIII en estas poblaciones: por ejemplo, el corte y la generación de TβRIII soluble inducido por señales de activación (160), el cual podría ocurrir en timocitos DP bajo la activación del TCR. Por otro lado, tal y como ocurre en timocitos CD8⁺, los niveles de ARNm no siempre se correlacionan con los detectados a nivel de proteína, lo cual implica que señales adicionales regulan la expresión de TβRIII en esta subpoblación. Una posibilidad serían las señales mediadas por TGFβ , las cuales han sido descritas que son capaces de regular la expresión de TβRIII (241, 194) y promover la diferenciación de timocitos CD8⁺ *in vitro* (220, 236).

Otra observación a mencionar, resulta del análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para TβRIII, donde la subpoblación DN presentó una mayor intensidad de expresión de TβRIII, aunque un menor porcentaje de esta subpoblación fue positiva para TβRIII (figura 16 B y C). Este aumento de la IMF para TβRIII en la subpoblación DN podría deberse a la contribución en IMF de los timocitos inmaduros DN2 y DN3 (figura 16C y 17C) que expresan niveles muy altos de TβRIII.

Por otro lado, TβRIII parece estar regulado por las señales derivadas del pre-TCR (selección β). Es bien sabido que entre los efectos promovidos por la señalización inducida por el pre-TCR en timocitos DN3 son el rearreglo de la cadena α y término del de la cadena β, así como la disminución de la expresión de CD25 y el avance hacia el estadio doble positivo (CD4⁺CD8⁺) (6). De forma notable, los timocitos DN3 no solo presentan un alto porcentaje de positividad para TβRIII sino también altos niveles de este co-receptor en superficie, mientras que disminuye considerablemente en timocitos DN4 (figura 17B yC). Sin embargo, cabe señalar

que este incremento en expresión de T β RIII inicia en el estadio DN2 acompañándose de la expresión de CD25, característico de los timocitos DN2 y DN3 (figura 17B yC). Esta observación indica que T β RIII puede ser potencialmente regulado por las señales derivadas del pre-TCR. Así mismo, estos datos sugieren que T β RIII es capaz de regular el acceso de ligandos de TGF β a sus receptores en timocitos DN3 influenciando la transición a timocitos DP. Por ejemplo, en el laboratorio se ha descrito que inhibina A, ligando de alta afinidad de betaglicano, promueve la transición en desarrollo de DN3 a DN4 en cultivos de timos fetales (233). Por otro lado, un mecanismo interesante en la acción de BMPs en timocitos DN3 ha sido descrita de ser regulada por las señales del pre-TCR. Las isoformas de BMP2/4 arrestan la transición en desarrollo de DN3 a DN4, sin embargo, este arresto puede ser revertido por la inducción de Tsg (“twisted gastrulation”) inducida por el pre-TCR(225). Tsg funciona como trampa soluble de los ligandos de BMP2/4 en este estadio DN3 promoviendo el avance en diferenciación hacia timocitos DP(225). Sin embargo, aún se requieren experimentos que discriminen la contribución de T β RIII en cada de la funciones mediadas por los ligandos de TGF β .

Con el fin de evaluar el papel de T β RIII durante el desarrollo de linfocitos T se emplearon dos estrategias experimentales: bloqueo de T β RIII con anticuerpos monoclonales y T β RIII soluble y análisis de timos T β RIII^{-/-} en cultivos de timos fetales (FTOCs). Como vimos en la sección de resultados ambas estrategias muestran el mismo resultado que indica que T β RIII regula la transición DN-DP (figura 20 y 22). Sin embargo, es necesario mencionar que existen ciertas diferencias en estos datos; por ejemplo en experimentos con el bloqueo de T β RIII la reducción de la transición de DN a DP es establecida desde el día 3 siendo marcado al día 7 (figura 20A y B). En contraste, en cultivos de timos fetales T β RIII^{-/-} esta reducción de la transición DN a DP solo fue observada al día 7 de cultivo, correlacionándose con una disminución de la celularidad tímica observada con la ausencia de este co-receptor (figura 22A y B). Esta alteración en los números absolutos en timos fetales T β RIII^{-/-} se podría atribuir a una disminución

preferencial de los números de timocitos DP, repercutiendo en consecuencia en la disminución de los números de timocitos SP CD4 y CD8 (figura 22C). De manera contraria, no se observaron diferencias significativas en los números de timocitos en condiciones de bloqueo de T β RIII (figura 19A). Este fenotipo más acentuado de los timos T β RIII^{-/-} puede ser debida a la ausencia de las funciones dependientes e independientes de ligandos por T β RIII que se traducen en un incremento de la apoptosis, mientras que en condiciones de bloqueo, únicamente aquellas funciones independientes de ligandos se mantienen funcionales. Además, el hecho de presentarse una alta variabilidad en los embriones usados en estos ensayos pueden repercutir en la falta de diferencias en los números absolutos entre las condiciones de bloqueo y sin bloqueo de T β RIII. Sin embargo, una cierta tendencia es observable en los números absolutos de DP y SP a disminuir en condiciones de bloqueo de T β RIII (figura 20C). Aunado a lo anterior, es posible que el antisuero anti-T β RIII no haya bloqueado de forma completa el T β RIII disponible en timo.

En apoyo al fenotipo acentuado de los timos T β RIII^{-/-}, ya se ha demostrado que el tallo citoplásmico de T β RIII puede presentar funciones independientes de la unión de ligandos como migración y apoptosis(242, 157). Por tal motivo, existe la posibilidad de que el dominio citoplásmico de T β RIII presente funciones adicionales durante el desarrollo de linfocitos T. De hecho, datos recientes han demostrado después del corte del dominio extracelular de T β RIII el dominio resultante intracelular es cortado por la proteasa γ -secretasa influenciando la señalización mediada por TGF β (168). Esta proteólisis intramembranal es también observada en otros miembros de la superfamilia de proteoglicanos compuestos de sulfatos de heparano como sindecan 3, donde el dominio intracelular regula la distribución subcelular de proteínas con dominios con PDZ como CASK (243). Sin embargo, aún se desconoce si el dominio citoplásmico de T β RIII es capaz de desencadenar una transducción de señales de forma similar al dominio intracelular de Notch, el cual presenta un papel crucial en el desarrollo de las células T, activación de linfocitos T periféricos y diferenciación de células T efectoras (90).

En este sentido, a pesar de que el dominio citoplásmico de T β RIII no presente una secuencia señal de localización nuclear no podemos descartar que pueda translocar a núcleo mediante la interacción con otras proteínas.

Ahora bien, es importante discutir los hallazgos que sustentan el papel de T β RIII como un regulador de la apoptosis. El análisis de los cultivos de timos fetales T β RIII^{-/-} al día 7 muestra un retraso en la transición DN-DP y una disminución significativa de la celularidad (figura 22). Aunque los datos muestran apoptosis en timocitos DN, DP y CD4⁺, la disminución de la celularidad en timos T β RIII^{-/-} puede ser explicada por los niveles incrementados de apoptosis, preferencialmente en timocitos en DP, los cuales representan la mayor proporción de timocitos en desarrollo y parecen ser los más susceptibles a la apoptosis en base a su positividad para caspasa 3 activa y anexina-V (figura 24 y 25).

Varios hallazgos resaltan el papel de T β RIII como regulador importante de la apoptosis. Por ejemplo, los embriones deficientes de T β RIII presentan alteraciones asociadas con eventos apoptóticos causados por altos niveles de caspasa 3 activa así como a una disminución de la expresión del factor mediador de sobrevivencia Akt en hígado fetal (173). De hecho, esta apoptosis es muy evidente al día 15.5 de desarrollo, lo que repercute en una notable reducción de células hígado fetal (173). Sin embargo, en estos estudios no es muy claro si esta apoptosis repercute en la hematopoyesis fetal. Este estudio reporta que al día 14.5 fetal se observó una disminución significativa de eritrocitos maduros dada por incremento de apoptosis en eritrocitos inmaduros (173). Sin embargo, en este mismo estudio otros linajes como macrófagos, linfocitos T y B no se encontraron alterados, aunque cabe señalar que este análisis no se llevo a cabo al día 15.5 de desarrollo donde la apoptosis general fue más evidente. Por otro lado, otro estudio muestra que la sobre-expresión de betaglicano trae como consecuencia la protección de la apoptosis inducida por hipoxia en fibroblastos de corazón mediante la disminución de la activación de la caspasa 3, disminución del factor pro-apoptótico del factor Bax y aumento del mediador de sobrevivencia Bcl-2 (244).

Considerando que T β RIII es capaz de unir varios ligandos de TGF β de forma simultánea en el timo, resulta difícil discriminar la contribución T β RIII en los efectos mediados por cada uno de los ligandos en el desarrollo de linfocitos T. Sin embargo, es importante señalar que el fenotipo del timo de T β RIII^{-/-} es similar al de inhibinas^{-/-}, ya que ambos muestran una reducción significativa del número de timocitos y un retraso en la transición en desarrollo DN-DP (233). Esta similitud observada sugiere que T β RIII e inhibinas podrían funcionar como un par molecular durante el desarrollo de linfocitos T, una asociación funcional que ha sido observada en otros tipos celulares (175).

Sin embargo, es importante señalar que no solo la unión de inhibinas a T β RIII antagoniza las funciones de activinas, sino también aquellas ejercidas por BMPs y TGF β 2. Por ejemplo, T β RIII permite a las inhibinas antagonizar la activación de Smad1 inducida por BMP2/4/7 en varios tipos celulares (195). Por otro lado, se ha propuesto que inhibinas y TGF β s pueden competir a través de T β RIII regulando distintas funciones como es el caso de la secreción de la FSH en células gonadotrópicas. La inhibina A puede reducir las señales de TGF β 2 mediante la internalización de T β RIII (192) y, de forma inversa, TGF β 1 y 2 pueden atenuar las funciones de inhibinas mediante la reducción de la expresión y unión a betaglicano (193, 194). Sin embargo, ninguno de estos mecanismos se han descrito *in vivo*. Esta interacción cruzada entre TGF β s e inhibinas puede ser explicada en parte por el solapamiento de sitios de unión en la región próxima al carboxilo terminal del ectodominio de T β RIII. De forma interesante, varios reportes demuestran que la pérdida de la expresión y/o función de inhibinas y T β RIII de forma independiente está asociada a la progresión de la tumorigénesis y metastásis, sustentando su importancia biológica como par molecular (175).

En un sentido crítico, los datos presentados en esta tesis no son suficientes para discriminar la contribución de betaglicano en los efectos de cada uno de sus ligandos. Para llevar a cabo tal propósito, es necesario implementar nuevas

estrategias experimentales que permitan responder esta pregunta. Una alternativa, es la reconstitución de ratones previamente irradiados subletalmente con progenitores de médula ósea transducidos con construcciones que porten la secuencia codificante del gen de T β RIII con mutaciones puntuales en los sitios de unión de cada uno de sus ligandos. Esta estrategia sería de gran ayuda para distinguir diferencialmente los efectos de los ligandos de TGF β s mediados por T β RIII durante el desarrollo de linfocitos T y en la homeostasis de células T periféricas.

Ahora bien, en la siguiente sección discutiremos la relevancia de la expresión de T β RIII en células T periféricas y el papel potencial de este proteoglicano en mediar las señales de TGF β . Los datos que dieron pauta al siguiente abordaje fue el hecho de que los timocitos SP CD4 y CD8 generados en timo, los cuales egresan a órganos periféricos expresando niveles considerables de T β RIII. En específico, aquellos timocitos terminalmente diferenciados (CD62L⁺/CD69⁻) listos para ser exportados a periferia incrementan T β RIII en superficie (figura 18). Considerando que la disminución del marcador CD69 y la adquisición de CD62L depende del cese de las señales inducidas por la activación del TCR (65), es factible sugerir que la expresión de T β RIII este siendo controlada por las señales del TCR durante la transición de timocitos SP a un fenotipo maduro. En este sentido, no podemos tampoco descartar que la expresión de T β RIII pueda ser controlada por la actividad transcripcional de factores relacionados con la permisividad de timocitos maduros a ser exportados a periferia como el es el caso de FOXO1, el cual esta involucrado en la adquisición de CD62L, S1PR1 y el receptor de quimiocinas CCR7 (67).

Considerando lo anterior, las preguntas a responder de manera obligada en esta tesis fueron: ¿la expresión de T β RIII se mantiene en células T periféricas?, ¿Esta expresión puede ser regulada por la activación del receptor de célula T? Y por último ¿Puede el T β RIII regular alguna función mediada por TGF β 1 en linfocitos T?. Los datos muestran que T β RIII se expresa diferencialmente en linfocitos T

periféricos, y que la mayor expresión encontrada fue en linfocitos T CD4⁺, mientras que linfocitos T CD8⁺ expresan bajas cantidades y los linfocitos B niveles casi nulos. Por otro lado, en este trabajo se demostró que la expresión de TβRIII es controlada por las señales inducidas por el entrecruzamiento del TCR, siendo un evento muy temprano durante la activación *in vitro* de linfocitos T y correlacionándose con la adquisición de los marcadores CD25 y CD44.

El hecho que los linfocitos T CD4⁺ expresen más TβRIII en superficie sugiere un posible papel en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia algún fenotipo “ayudador” (Th). Con relación a esta idea, un estudio reciente demuestra que la expresión de TβRIII está controlada por la actividad transcripcional del factor GATA-3 (GATA binding protein 1) en un modelo de carcinoma renal (145). Este factor de transcripción está involucrado en la diferenciación de células T CD4⁺ al fenotipo Th2, el cual se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. De forma interesante, la secreción de activina A es inducida durante durante la diferenciación de células T CD4⁺ hacia el fenotipo Th2, requiriendo de la actividad transcripcional de los factores c-Maf y NFAT (245), aunque cabe señalar que en este estudio no se evaluó la expresión de TβRIII e inhibinas durante la diferenciación hacia el fenotipo Th2.

Sin embargo, a nivel de homeostasis, las subpoblaciones de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mostró que las células T naive (CD62L^{hi}CD44^{lo}) expresan más cantidades de TβRIII en superficie mientras que linfocitos T de memoria central (CD44⁺CD62L⁺) y de memoria/efectoras (CD44⁺CD62L^{lo}) expresan menos cantidades en superficie. Este patrón de la expresión de TβRIII en células T indica una asociación con el estado de activación y diferenciación de los linfocitos en condiciones de homeostasis. Así mismo, dadas las evidencias de la función de TβRIII en regular la migración celular de otros tipos celulares(157, 166), resulta atractivo investigar si la expresión diferencial en las subpoblaciones de células T en homeostasis contribuye a un “homing” selectivo a órganos linfoides periféricos o inclusive hacia órganos no linfoides. Es por este motivo que es indispensable

contar con un modelo murino que presente una delección condicional de T β RIII en células T, el cual permita analizar la repercusión de la ausencia de este coreceptor en la circulación homeostática de linfocitos T.

Como sabemos, una de las funciones cruciales de TGF β 1 en el sistema inmune adaptativo es el de regular homeostasis, tolerancia a antígenos propios y la diferenciación de células T periféricas durante una respuesta inmune (211). Esta plasticidad funcional de TGF β 1 mantiene una influencia importante en células T activadas durante una respuesta inmune. En esta tesis decidimos abordar la expresión y función de T β RIII en células T reguladoras Foxp3⁺ como uno de los tipos celulares regulados por TGF β . Las células T reguladoras Foxp3⁺ juegan un papel importante en la prevención de enfermedades autoinmunes y en la modulación de respuestas inmunes hacia transplantes y en ciertas infecciones (18). En condiciones de homeostasis, la mayor proporción de células T reguladoras Foxp3⁺ provienen del timo. Una vez que una respuesta inmune es desencadenada se generan nuevas poblaciones Foxp3⁺ denominadas iTregs bajo la acción de las señales de TGF β (18).

En este trabajo encontramos que en condiciones de homeostasis las células T reguladoras Foxp3⁺ tímicas (naturales) no expresan T β RIII mientras aquellas periféricas presentan un bajo o indetectable nivel de expresión de T β RIII (figura 29). Es posible que esta pobre detección de T β RIII en células T reguladoras Foxp3⁺ residentes de ganglios se deba a una baja proporción de poblaciones Foxp3⁺ que son inducidas (iTregs) por la señal de TGF β 1. Este razonamiento lo obtenemos de los datos obtenidos en los ensayos de generación de células T reguladoras *in vitro*, en los cuales la expresión de T β RIII se ve incrementada por la activación subóptima del TCR/CD28 y controlada por las señales de TGF β 1 en las poblaciones Foxp3⁻ y Foxp3⁺ obtenidas al final del cultivo (figura 30C). Este control de la expresión de T β RIII mediado por TGF β 1 ya ha sido previamente caracterizado. Se ha demostrado que la señal mediada por TGF β regula negativamente la expresión de T β RIII a través de la inhibición de la actividad de su

promotor distal representando un mecanismo común en múltiples tipos celulares(137, 138, 129). Así mismo, se ha descrito que el TGFβ1 secretado de forma autocrina es esencial durante la conversión de células T naive a células T reguladoras Foxp3⁺ (246). Por lo tanto, es factible proponer que en nuestro modelo *in vitro* de generación de células T reguladoras, el TGFβ1 liberado de forma autocrina por las señales derivadas del entrecruzamiento subóptimo del TCR/CD28 actúe regulando de forma negativa la expresión de TβRIII. Sin embargo, para confirmar tal hipótesis, es necesario realizar experimentos adicionales como la inhibición del receptor tipo I (ALK5) específico para TGFβ a distintos tiempos durante la conversión de células T naive a células T reguladoras Foxp3⁺.

Finalmente, a diferencia de las iTregs Foxp3⁺, es muy evidente que dentro del programa de expresión genética de las células T reguladoras “naturales” TβRIII parece no estar incluido. Un punto importante a considerar es que quizás esta diferencia entre ambos tipos de células T reguladoras reside en el distinto requerimiento de señales involucradas en la generación de las células T reguladoras naturales, las cuales son seleccionadas en presencia de señales del TCR con mayor avidéz, cercanos a los que presentan los TCR autoreactivos que son eliminados por la selección negativa (76). En contraste, para que se lleve a cabo la diferenciación de las células iTregs se requieren de bajas concentraciones de antígeno en periferia y de la transducción de señales inducida por TGFβ1, la cual es determinante en la transcripción de Foxp3 (247). La generación de células T reguladoras Foxp3⁺ naturales no requieren de TGFβ1 para la transcripción de Foxp3 sino más bien este es esencial en la protección de la apoptosis promovida por la selección negativa en el timo (84).

Muchos reportes basados en el estudio de la biología de células T reguladoras Foxp3⁺ se han enfocado en tratar de controlar su generación y/o mantener el fenotipo regulador mediante diferentes estrategias en ciertas condiciones inflamatorias. Un caso relevante es el de disminuir la generación de células T

reguladoras Foxp3⁺ en condiciones de tumorigénesis con el fin de potenciar la respuesta inmune hacia células transformadas. En este trabajo evaluamos si la adición de la forma soluble del ectodominio de TβRIII en cultivos de conversión hacia células T reguladoras Foxp3⁺ podría disminuir la generación de estas células. Los datos muestran que la adición del TβRIII soluble reduce significativamente la generación de células Foxp3⁺ de manera dosis dependiente, aunque cabe señalar que esta disminución no es comparable con la observada en presencia de anticuerpos neutralizantes para TGFβ1 (figura 30A y B. En conjunto estos datos sugieren que el empleo de la forma soluble de TβRIII en modelos *in vivo* de tumorigénesis pueden reducir la inducción de células T reguladoras Foxp3⁺ potenciando la respuesta inmune específica hacia células cancerígenas.

Varias preguntas faltan por responder acerca del posible papel de TβRIII en la generación y función de las células T reguladoras Foxp3⁺. Por ejemplo, hasta el momento desconocemos si la proporción disminuida de células T reguladoras generadas *in vitro* en presencia del TβRIII soluble siguen siendo capaces de mantener tolerancia periférica, es decir, si se comportan como iTregs convencionales empleando los diversos mecanismos de supresión conocidos como la secreción de citocinas inhibitorias, disrupción metabólica, inducción de citolisis, y la regulación de la maduración y función de células dendríticas (14, 15). Aunado a lo anterior, es necesario averiguar si el TβRIII es relevante en integrar las señales de otros miembros de TGFβ como son inhibinas y BMP2/4 para la generación de células iTregs Foxp3⁺, ya que recientemente se ha descrito que activinas y BMP2/4 son capaces de potenciar la generación de iTregs promovida por TGFβ1 (248, 246).

Finalmente, los datos obtenidos en esta tesis aportan los fundamentos suficientes para explorar el papel de TβRIII en las distintas facetas funcionales de la biología de los linfocitos T. En primera instancia, es necesario averiguar la función de TβRIII en otras poblaciones de células T CD4⁺ que dependan de las señales de TGFβ1 para su generación y mantenimiento durante una respuesta inmune. Por

ejemplo, es atractivo investigar en modelos de diferenciación *in vitro* si T β RIII es requerido para la generación de las células Th17, Th9 y Tr1, las cuáles requieren en común de la acción de TGF β y de la cooperación de otras citocinas (10, 13, 9). Por otro lado, dada la evidencia de que GATA3, factor de transcripción característico de células Th2, es capaz de promover la expresión de T β RIII en células tumorales (145), es necesario explorar esta posibilidad en ensayos de diferenciación *in vitro* hacia el fenotipo Th2, involucradas en la inmunidad humoral hacia patógenos como helmintos y otros organismos extracelulares, y distinguidas por la cronicidad en la respuesta que desencadenan en alergias y asma(4).

IX. Conclusiones

Considerando los datos obtenidos en este estudio las conclusiones son las siguientes:

1. T β RIII se expresa en los tejidos estromal y linfoide del timo murino.
2. T β RIII se expresa en timos fetales y de ratón adulto.
3. Existe una expresión diferencial de T β RIII en timocitos dependiendo de su estado de desarrollo y maduración terminal: \uparrow DN- \downarrow DP- \uparrow SP.
4. La disminución de la expresión de T β RIII observada en la transición de timocitos DN3 hacia DN4 y DP indica que la expresión de este proteoglicano puede estar regulada por las señales mediadas por el pre-TCR.
5. Existe un incremento en expresión de T β RIII en timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺ terminalmente diferenciados, lo cual se relaciona al cese de la señales inducidas por el TCR y sugiere un posible papel de T β RIII en el exporte de timocitos maduros a periferia.
6. El bloqueo de la función co-receptora y la ausencia de T β RIII disminuyen la transición en desarrollo de DN a DP relacionándose con el fenotipo deficiente de inhibinas en el timo.
7. T β RIII regula las señales que permiten la sobrevivencia de los timocitos en desarrollo, lo cual es evidenciado con el incremento de la apoptosis, principalmente en timocitos DP, en ausencia de T β RIII.
8. Las moléculas de T β RIII expresadas en la superficie de timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺ se mantiene en linfocitos T circulantes y en órganos linfoides periféricos, siendo menor la expresión de éste en linfocitos T CD8⁺.
9. En condiciones de homeostasis, T β RIII es mantenido en la superficie de linfocitos T vírgenes mientras que en poblaciones que han sido activadas, expandidas y diferenciadas a un fenotipo de memoria presentan menos moléculas de T β RIII en su superficie.
10. Las células T reguladoras Foxp3⁺, siendo la mayoría “naturales” en condiciones de homeostasis, expresan de bajos a indetectables niveles de T β RIII en superficie.

11. La activación temprana de linfocitos T vírgenes mediante entrecruzamiento del TCR *in vitro* muestra un incremento de la expresión de T β RIII.
12. El uso de la forma soluble de T β RIII regula negativamente la diferenciación inducida por TGF β de linfocitos hacia el fenotipo regulador Foxp3⁺.

X. Perspectivas

Una de las preguntas abiertas sobre el papel de las inhibinas en el sistema inmune, es si éstas son capaces de iniciar señales independientes, dada la evidencia obtenida en nuestro laboratorio, de que no siempre antagonizan las señales de las Activinas, es necesario investigar el posible mecanismo molecular involucrado en su señalización.

Para ello, se evaluó la señal de inhibinas inducida en cada una de las subpoblaciones de timocitos, el requerimiento de esta señal a nivel de receptores y por último la expresión de los receptores en timo. Como ya he mencionado anteriormente, las inhibinas son considerados a ser antagonistas claves de las señales de activinas, siendo mecanísticamente la interacción con T β RIII, la exclusión del receptor Tipo I y la inhibición de la activación de smads intracelulares (182, 170, 183). Sin embargo en nuestro laboratorio hemos observado que las inhibinas, principalmente la isoforma B, son capaces de inducir la fosforilación de Smad2 en timocitos a niveles comparables de estímulos controles de TGF β y activina A (figura 31). De manera resaltante la inhibina A induce una fosforilación menor de smad2 comparado con inhibina B en todas las supoblaciones en timocitos (figura 31).

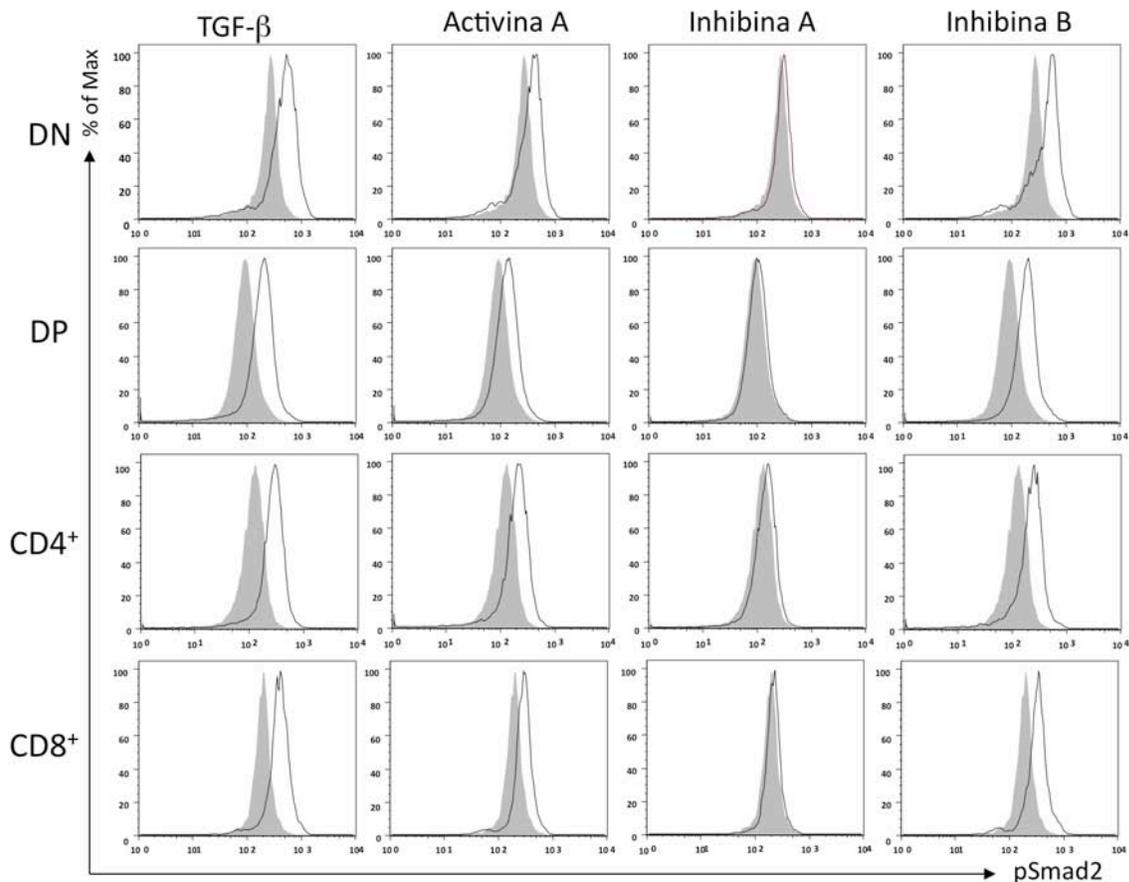


Figura 31. Fosforilación de smad2/3 inducida por ligandos de TGFβ en las subpoblaciones de timocitos murinos. Se realizó tinción de los marcadores CD4 y CD8 en timocitos murinos y se estimuló con TGFβ1 (10ng/ml), activina A (500ng/ml), Inhibina A (500ng/ml), e inhibina B (500ng/ml) durante 30 minutos a 37°C, Posteriormente se permeabilizaron a la células y se tiñeron intracelularmente con anti-psmad2/3. Los histogramas muestran la fosforilación de smad2/3 inducida por los ligandos de TGFβ en las diferentes subpoblaciones de timocitos.

Estos datos hacen replantear el mecanismo reportado para inhibinas en la inhibición de señales de las activinas sobre tipos celulares del sistema reproductivo. En consecuencia, el siguiente paso fue el indagar si la activación de smads depende de la actividad de un receptor Tipo I. Para ello, decidimos evaluar este requerimiento utilizando el fármaco SB431542, el cuál inhibe la actividad de 3 receptores tipo relacionados filogenéticamente entre si ALK4 (ActRIB), ALK5 (TβRI) y ALK7 (ActRIc) (249). Como se muestra en la figura 32A, la actividad de este inhibidor (SB) es eficaz en atenuar la señal inducida por una concentración óptima de TGFβ (10ng/ml), el cual señala a través del receptor Tipo I ALK5. Esta misma concentración de inhibidor (SB) es capaz atenuar la fosforilación

mediada de inhibinas a una concentración de 500ng/ml y a una concentración de 1000ng/ml, indicando claramente la dependencia de la actividad de un receptor Tipo I (Figura 32B).

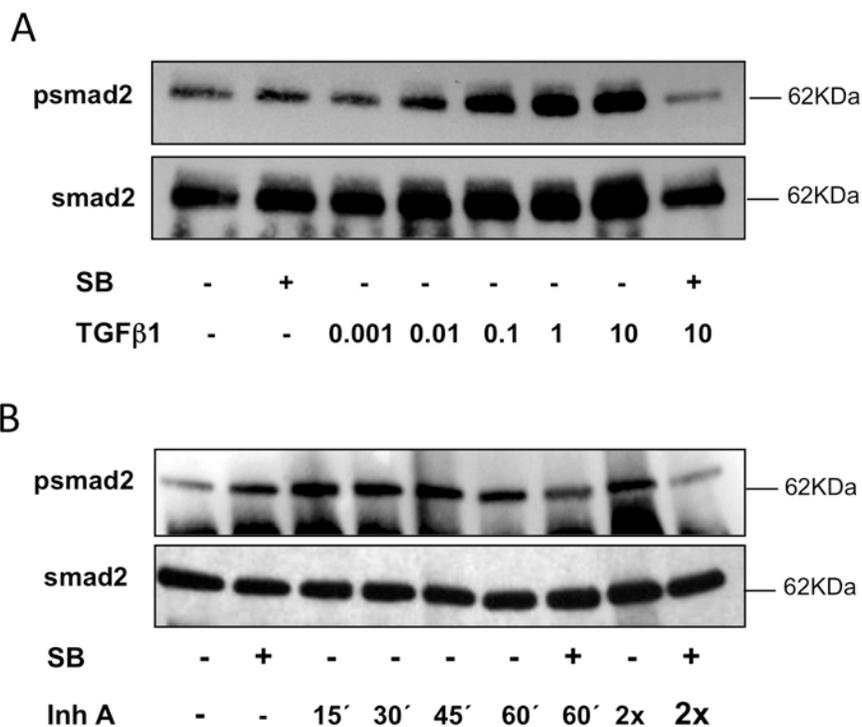


Figura 32. La activación de smads mediada por inhibinas depende de la actividad de un receptor tipo I. 10×10^6 células de la línea jurkat E6 fueron previamente incubados con el inhibidor con SB431542 durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente las células fueron estimulados durante 30 minutos con los ligandos señalados. Se lisaron las células y se realizó una inmunoprecipitación de smad2 y posteriormente los blots para la forma fosforilada de smad2. (A) Curva dosis respuesta de la estimulación de la línea jurkat E6 con TGFβ1 (10ng/ml) durante 30 minutos a 37°C, en la última columna se muestra la fosforilación inducida por TGFβ1 en presencia del inhibidor SB431542. (B) Curva temporal de la estimulación de la línea jurkat E6 con el ligando de inhibina A (500ng/ml). En la última columna se muestra la fosforilación inducida por inhibina (100ng/ml) en presencia del inhibidor SB431542.

De los tres receptores tipo I que resultar ser inhibidos por el fármaco SB431532 ALK4, ALK5 y ALK7, en el laboratorio sospechamos que esté último es el potencial en la unión de inhibinas. Esta sospecha tiene una lógica estructural, ya que la subunidad β y la α son capaces de unirse a receptores de activinas manteniendo la hipótesis de un mecanismo alternativo de inhibición de señales. ALK7 se ha descrito que es activado por subunidades β de activinas,

principalmente la subunidad β B (250, 251), la cual en este estudio forma parte de la inhibina B que, de manera interesante, indujo una mayor activación de smads en timocitos (figura 31). Independientemente del mecanismo posible de transducción de señales, varios artículos sustentan la correlación de la expresión de ALK7 y de inhibinas en varios tipos celulares(252-254, 251, 255, 256).

Considerando lo anterior, el siguiente paso fue investigar la expresión de ALK7 en timo utilizando las técnicas de RT-PCR y cuantificación por PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura 33A, ALK7 se expresa en timo completo y en estroma tímico mientras que en bazo no se detectó. Esta expresión en timo se dio preferencialmente en la subpoblación $CD4^+$ y en menor medida en el estroma tímico, en timocitos DN, DP y $CD8^+$, aunque cabe señalar que se observa un incremento progresivo con el avance en la diferenciación de timocitos (figura 33B). Adicionalmente, cuando evaluamos la expresión de ALK7 en la diferenciación temprana de linfocitos en timos fetales, este receptor se expresa en niveles incrementados el día 14 y 15 disminuyendo significativamente al día 16 de desarrollo (figura 33C).

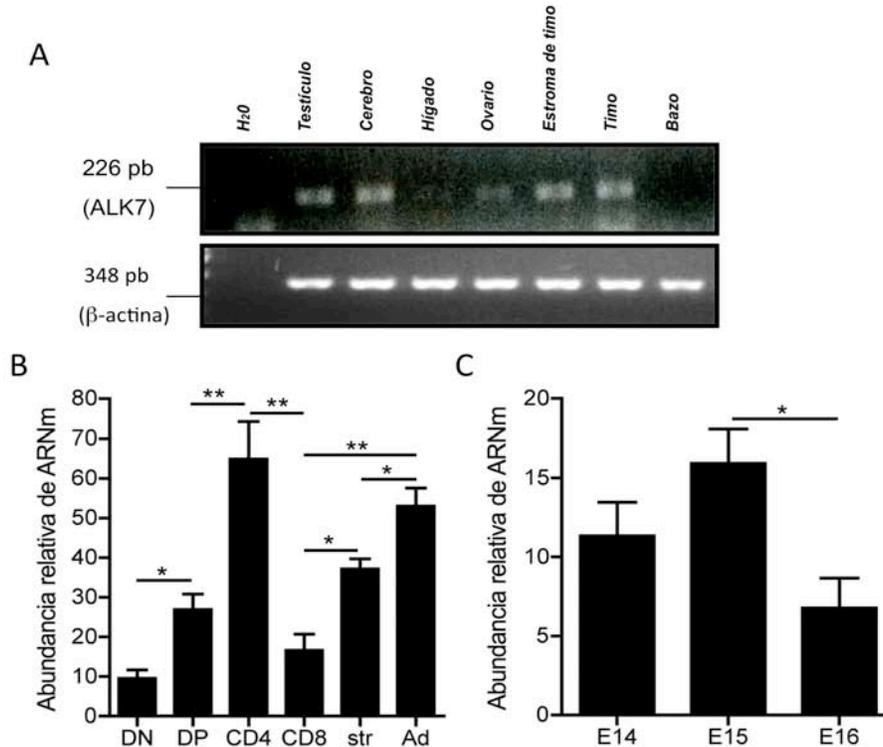


Figura 33. El ARNm de ALK7 se expresa en los tejido linfoide y estromal del timo. Se extrajó ARN total de diversos tejidos y posteriormente se generó ADN complementario mediante la reacción de RT. Los tejidos que sirvieron como controles positivos de ALK7 son testículo, cerebro, hígado y ovario. (A) RT-PCR convencional de la amplificación de ALK7 en timo, estroma de timo y bazo. (B) Cuantificación de la expresión de ALK7 por PCR en tiempo real en poblaciones de timocitos sorteadas DN ($CD4^-CD8^-$), DP ($CD4^+CD8^+$), $CD8^+$ y $CD4^+$. Str (estroma tímico del día 15 de desarrollo). Cuantificación de la expresión de ALK7 mediante PCR cuantitativa en tiempo real a partir de muestras de ADNc obtenido de timos adultos y timos fetales del día 14, 15 y 16 de desarrollo. (C) Cuantificación de la expresión de ALK7 mediante PCR cuantitativa en tiempo real a partir de muestras de ADNc obtenido de timos adultos y timos fetales del día 14, 15 y 16 de desarrollo.

En resumen estos datos apoyan la hipótesis de que ALK7 es un componente potencial en mediar la señal de activación de smads por inhibinas y que es expresado diferencialmente en timocitos. Sin embargo, es necesario señalar que debido al reciente descubrimiento de este receptor en cerebro (257), todavía no existen anticuerpos disponibles específicos para el receptor murino que nos permitan evaluar la expresión de ALK7 en la superficie de las distintas subpoblaciones de timocitos en desarrollo. Por tal motivo, no fue posible una mayor caracterización de este receptor a nivel de proteína en este estudio.

Uno de los proyectos abiertos a futuro será identificar el receptor responsable de la señalización mediada por inhibinas mediante experimentos de binding con ligandos iodinados y confirmar, si en efecto ALK7 podría estar participando de las señales inducidas por inhibinas.

XI. Referencias

1. Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343:37-49.
2. Hodgkin, P. D., W. R. Heath, and A. G. Baxter. 2007. The clonal selection theory: 50 years since the revolution. *Nature immunology* 8:1019-1026.
3. Danilova, N. The evolution of adaptive immunity. *Advances in experimental medicine and biology* 738:218-235.
4. Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 343:108-117.
5. Holtmeier, W., and D. Kabelitz. 2005. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 86:151-183.
6. Love, P. E., and A. Bhandoola. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature reviews* 11:469-477.
7. Hirahara, K., G. Vahedi, K. Ghoreschi, X. P. Yang, S. Nakayamada, Y. Kanno, J. J. O'Shea, and A. Laurence. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology* 134:235-245.
8. Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
9. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182:207-214.
10. Dong, C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. *Experimental & molecular medicine* 43:1-6.
11. Zygmunt, B., and M. Veldhoen. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Advances in immunology* 109:159-196.
12. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology* 29:621-663.
13. Stassen, M., E. Schmitt, and T. Bopp. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247:56-68.
14. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews* 8:523-532.
15. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
16. Zheng, Y., and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology* 8:457-462.
17. Xu, L., A. Kitani, and W. Strober. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal immunology* 3:230-238.
18. Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
19. Lee, Y. K., R. Mukasa, R. D. Hatton, and C. T. Weaver. 2009. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current opinion in immunology* 21:274-280.
20. Kanno, Y., G. Vahedi, K. Hirahara, K. Singleton, and J. J. O'Shea. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annual review of immunology* 30:707-731.
21. Gordon, J., and N. R. Manley. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 138:3865-3878.

22. Blackburn, C. C., and N. R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nature reviews* 4:278-289.
23. Nehls, M., B. Kyewski, M. Messerle, R. Waldschutz, K. Schuddekopf, A. J. Smith, and T. Boehm. 1996. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science (New York, N.Y)* 272:886-889.
24. Su, D. M., S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie, and N. R. Manley. 2003. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nature immunology* 4:1128-1135.
25. Bleul, C. C., T. Corbeaux, A. Reuter, P. Fisch, J. S. Monting, and T. Boehm. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441:992-996.
26. Ritter, M. A., and R. L. Boyd. 1993. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunology today* 14:462-469.
27. Anderson, G., and E. J. Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature reviews* 1:31-40.
28. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews* 6:127-135.
29. Bhandoola, A., H. von Boehmer, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26:678-689.
30. Allman, D., A. Sambandam, S. Kim, J. P. Miller, A. Pagan, D. Well, A. Meraz, and A. Bhandoola. 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature immunology* 4:168-174.
31. Schwarz, B. A., A. Sambandam, I. Maillard, B. C. Harman, P. E. Love, and A. Bhandoola. 2007. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 178:2008-2017.
32. Krueger, A., S. Willenzon, M. Lyszkiewicz, E. Kremmer, and R. Forster. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 115:1906-1912.
33. Zlotoff, D. A., A. Sambandam, T. D. Logan, J. J. Bell, B. A. Schwarz, and A. Bhandoola. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 115:1897-1905.
34. Liu, C., F. Saito, Z. Liu, Y. Lei, S. Uehara, P. Love, M. Lipp, S. Kondo, N. Manley, and Y. Takahama. 2006. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* 108:2531-2539.
35. Calderon, L., and T. Boehm. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:7517-7522.
36. Stimamiglio, M. A., E. Jimenez, S. D. Silva-Barbosa, D. Alfaro, J. J. Garcia-Ceca, J. J. Munoz, T. Cejalvo, W. Savino, and A. Zapata. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *Journal of leukocyte biology* 88:483-494.

37. Robertson, P., T. K. Means, A. D. Luster, and D. T. Scadden. 2006. CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Experimental hematology* 34:308-319.
38. Lind, E. F., S. E. Prockop, H. E. Porritt, and H. T. Petrie. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194:127-134.
39. Plotkin, J., S. E. Prockop, A. Lepique, and H. T. Petrie. 2003. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171:4521-4527.
40. Benz, C., K. Heinzl, and C. C. Bleul. 2004. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *European journal of immunology* 34:3652-3663.
41. Misslitz, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H. T. Petrie, and R. Forster. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *The Journal of experimental medicine* 200:481-491.
42. Guidos, C. J. 2006. Synergy between the pre-T cell receptor and Notch: cementing the alphabeta lineage choice. *The Journal of experimental medicine* 203:2233-2237.
43. Zuniga-Pflucker, J. C., and M. Ciofani. 2006. Pre-T cell receptor's clashing signals: "should I stay or should I go". *Immunity* 24:669-670.
44. Yamasaki, S., and T. Saito. 2007. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends in immunology* 28:39-43.
45. Norment, A. M., L. Y. Bogatzki, B. N. Gantner, and M. J. Bevan. 2000. Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *J Immunol* 164:639-648.
46. Trampont, P. C., A. C. Tosello-Trampont, Y. Shen, A. K. Duley, A. E. Sutherland, T. P. Bender, D. R. Littman, and K. S. Ravichandran. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nature immunology* 11:162-170.
47. Petrie, H. T. 2003. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nature reviews* 3:859-866.
48. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.
49. Bommhardt, U., M. Beyer, T. Hunig, and H. M. Reichardt. 2004. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* 61:263-280.
50. Suzuki, G., Y. Nakata, Y. Dan, A. Uzawa, K. Nakagawa, T. Saito, K. Mita, and T. Shirasawa. 1998. Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *International immunology* 10:1049-1056.
51. Campbell, J. J., J. Pan, and E. C. Butcher. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* 163:2353-2357.
52. Ueno, T., F. Saito, D. H. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 200:493-505.

53. Davalos-Miszlitz, A. C., T. Worbs, S. Willenzon, G. Bernhardt, and R. Forster. 2007. Impaired responsiveness to T-cell receptor stimulation and defective negative selection of thymocytes in CCR7-deficient mice. *Blood* 110:4351-4359.
54. Uehara, S., K. Song, J. M. Farber, and P. E. Love. 2002. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol* 168:134-142.
55. Witt, C. M., S. Raychaudhuri, B. Schaefer, A. K. Chakraborty, and E. A. Robey. 2005. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS biology* 3:e160.
56. Kwan, J., and N. Killeen. 2004. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol* 172:3999-4007.
57. Kurobe, H., C. Liu, T. Ueno, F. Saito, I. Ohigashi, N. Seach, R. Arakaki, Y. Hayashi, T. Kitagawa, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama. 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24:165-177.
58. Kyewski, B., and J. Derbinski. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature reviews* 4:688-698.
59. Ramsey, C., O. Winqvist, L. Puhakka, M. Halonen, A. Moro, O. Kampe, P. Eskelin, M. Pelto-Huikko, and L. Peltonen. 2002. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Human molecular genetics* 11:397-409.
60. Kishimoto, H., and J. Sprent. 1997. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *The Journal of experimental medicine* 185:263-271.
61. McCaughy, T. M., M. S. Wilken, and K. A. Hogquist. 2007. Thymic emigration revisited. *The Journal of experimental medicine* 204:2513-2520.
62. Fabre, S., F. Carrette, J. Chen, V. Lang, M. Semichon, C. Denoyelle, V. Lazar, N. Cagnard, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Mangeney, D. A. Fruman, and G. Bismuth. 2008. FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181:2980-2989.
63. Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442:299-302.
64. Calnan, D. R., and A. Brunet. 2008. The FoxO code. *Oncogene* 27:2276-2288.
65. Weinreich, M. A., and K. A. Hogquist. 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 181:2265-2270.
66. Gubbels Bupp, M. R., B. Edwards, C. Guo, D. Wei, G. Chen, B. Wong, E. Masteller, and S. L. Peng. 2009. T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs. *European journal of immunology* 39:2991-2999.
67. Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho, and S. M. Hedrick. 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature immunology* 10:176-184.

68. Bankovich, A. J., L. R. Shiow, and J. G. Cyster. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *The Journal of biological chemistry* 285:22328-22337.
69. Shiow, L. R., D. B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L. L. Lanier, J. G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440:540-544.
70. Rosen, H., C. Alfonso, C. D. Surh, and M. G. McHeyzer-Williams. 2003. Rapid induction of medullary thymocyte phenotypic maturation and egress inhibition by nanomolar sphingosine 1-phosphate receptor agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10907-10912.
71. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. *J Immunol* 186:3808-3821.
72. Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thornton. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunological reviews* 212:60-73.
73. Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2:816-822.
74. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* 3:756-763.
75. Hori, S., M. Haury, A. Coutinho, and J. Demengeot. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8213-8218.
76. Hsieh, C. S., H. M. Lee, and C. W. Lio. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews* 12:157-167.
77. Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell development. *The Journal of experimental medicine* 203:119-129.
78. Willoughby, J. E., P. S. Costello, R. H. Nicolas, N. J. Robinson, G. Stamp, F. Powrie, and R. Treisman. 2007. Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J Immunol* 179:6836-6844.
79. Carter, J. D., G. M. Calabrese, M. Naganuma, and U. Lorenz. 2005. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 174:6627-6638.
80. Stephens, G. L., and L. Ignatowicz. 2003. Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4⁺ T cells toward a regulatory (CD4⁺CD25⁺) lineage. *European journal of immunology* 33:1282-1291.
81. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.

82. van Santen, H. M., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 200:1221-1230.
83. Ordonez-Rueda, D., F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E. A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2009. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *European journal of immunology* 39:2233-2247.
84. Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, and M. O. Li. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32:642-653.
85. Salomon, B., and J. A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual review of immunology* 19:225-252.
86. Sansom, D. M., and L. S. Walker. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological reviews* 212:131-148.
87. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological reviews* 212:114-130.
88. Jiang, Q., H. Su, G. Knudsen, W. Helms, and L. Su. 2006. Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC immunology* 7:6.
89. Andersson, E. R., R. Sandberg, and U. Lendahl. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development (Cambridge, England)* 138:3593-3612.
90. Yuan, J. S., P. C. Kousis, S. Suliman, I. Visan, and C. J. Guidos. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annual review of immunology* 28:343-365.
91. Amsen, D., A. Antov, and R. A. Flavell. 2009. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nature reviews* 9:116-124.
92. Jenkinson, E. J., W. E. Jenkinson, S. W. Rossi, and G. Anderson. 2006. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nature reviews* 6:551-555.
93. Wilson, A., H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2001. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *The Journal of experimental medicine* 194:1003-1012.
94. Anderson, G., J. Pongracz, S. Parnell, and E. J. Jenkinson. 2001. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *European journal of immunology* 31:3349-3354.
95. Schmitt, T. M., M. Ciofani, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200:469-479.
96. Fooksman, D. R., S. Vardhana, G. Vasiliver-Shamis, J. Liese, D. A. Blair, J. Waite, C. Sacristan, G. D. Victora, A. Zanin-Zhorov, and M. L. Dustin. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology* 28:79-105.

97. van der Merwe, P. A., and O. Dushek. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nature reviews* 11:47-55.
98. Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Current opinion in immunology* 13:339-345.
99. Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:827-837.
100. Ashwell, J. D. 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews* 6:532-540.
101. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2001. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *Journal of clinical immunology* 21:253-257.
102. Winslow, M. M., J. R. Neilson, and G. R. Crabtree. 2003. Calcium signalling in lymphocytes. *Current opinion in immunology* 15:299-307.
103. Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews* 7:690-702.
104. Hennessey, B. T., D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, and G. B. Mills. 2005. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:988-1004.
105. Zanin-Zhorov, A., M. L. Dustin, and B. R. Blazar. PKC-theta function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends in immunology* 32:358-363.
106. Becker, K. P., and Y. A. Hannun. 2005. Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 62:1448-1461.
107. Van Hennik, P. B., and P. L. Hordijk. 2005. Rho GTPases in hematopoietic cells. *Antioxidants & redox signaling* 7:1440-1455.
108. Tybulewicz, V. L., and R. B. Henderson. 2009. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews* 9:630-644.
109. Hornstein, I., A. Alcover, and S. Katzav. 2004. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cellular signalling* 16:1-11.
110. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67:753-791.
111. Kitisin, K., T. Saha, T. Blake, N. Golestaneh, M. Deng, C. Kim, Y. Tang, K. Shetty, B. Mishra, and L. Mishra. 2007. Tgf-Beta signaling in development. *Sci STKE* 2007:cm1.
112. Schmierer, B., and C. S. Hill. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:970-982.
113. Bragdon, B., O. Moseychuk, S. Saldanha, D. King, J. Julian, and A. Nohe. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular signalling* 23:609-620.
114. Zeng, S., J. Chen, and H. Shen. Controlling of bone morphogenetic protein signaling. *Cellular signalling* 22:888-893.
115. Phillips, D. J., and T. K. Woodruff. 2004. Inhibin: actions and signalling. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22:13-18.
116. Xia, Y., and A. L. Schneyer. 2009. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *The Journal of endocrinology* 202:1-12.
117. Thompson, T. B., R. W. Cook, S. C. Chapman, T. S. Jardetzky, and T. K. Woodruff. 2004. Beta A versus beta B: is it merely a matter of expression? *Molecular and cellular endocrinology* 225:9-17.

118. Harrison, C. A., P. C. Gray, W. W. Vale, and D. M. Robertson. 2005. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:73-78.
119. Mather, J. P., P. E. Roberts, and L. A. Krummen. 1993. Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner. *Endocrinology* 132:2732-2734.
120. Bilandzic, M., and K. L. Stenvers. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Molecular and cellular endocrinology* 339:180-189.
121. Heldin, C. H., and A. Moustakas. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell and tissue research* 347:21-36.
122. Hill, C. S. 2009. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell research* 19:36-46.
123. Itoh, S., and P. ten Dijke. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current opinion in cell biology* 19:176-184.
124. De Boeck, M., and P. ten Dijke. Key role for ubiquitin protein modification in TGFbeta signal transduction. *Upsala journal of medical sciences* 117:153-165.
125. Lin, X., X. Duan, Y. Y. Liang, Y. Su, K. H. Wrighton, J. Long, M. Hu, C. M. Davis, J. Wang, F. C. Brunicardi, Y. Shi, Y. G. Chen, A. Meng, and X. H. Feng. 2006. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125:915-928.
126. He, W., D. C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. Moore, and J. Massague. 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125:929-941.
127. Deheuninck, J., and K. Luo. 2009. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell research* 19:47-57.
128. Wang, X. F., H. Y. Lin, E. Ng-Eaton, J. Downward, H. F. Lodish, and R. A. Weinberg. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 67:797-805.
129. Hempel, N., T. How, S. J. Cooper, T. R. Green, M. Dong, J. A. Copland, C. G. Wood, and G. C. Blobe. 2008. Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta. *Carcinogenesis* 29:905-912.
130. Dong, M., T. How, K. C. Kirkbride, K. J. Gordon, J. D. Lee, N. Hempel, P. Kelly, B. J. Moeller, J. R. Marks, and G. C. Blobe. 2007. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 117:206-217.
131. Turley, R. S., E. C. Finger, N. Hempel, T. How, T. A. Fields, and G. C. Blobe. 2007. The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer research* 67:1090-1098.
132. Finger, E. C., R. S. Turley, M. Dong, T. How, T. A. Fields, and G. C. Blobe. 2008. TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29:528-535.
133. Massague, J. 1985. Subunit structure of a high-affinity receptor for type beta-transforming growth factor. Evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 260:7059-7066.

134. Massague, J., and B. Like. 1985. Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines. *The Journal of biological chemistry* 260:2636-2645.
135. Cheifetz, S., B. Like, and J. Massague. 1986. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 261:9972-9978.
136. Bernabeu, C., J. M. Lopez-Novoa, and M. Quintanilla. 2009. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1792:954-973.
137. Nakayama, H., F. Ichikawa, J. L. Andres, J. Massague, and M. Noda. 1994. Dexamethasone enhancement of betaglycan (TGF-beta type III receptor) gene expression in osteoblast-like cells. *Experimental cell research* 211:301-306.
138. Ji, C., Y. Chen, T. L. McCarthy, and M. Centrella. 1999. Cloning the promoter for transforming growth factor-beta type III receptor. Basal and conditional expression in fetal rat osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 274:30487-30494.
139. Wickert, L., M. Abiaka, U. Bolkenius, and A. M. Gressner. 2004. Corticosteroids stimulate selectively transforming growth factor (TGF)-beta receptor type III expression in transdifferentiating hepatic stellate cells. *Journal of hepatology* 40:69-76.
140. Gordon, K. J., M. Dong, E. M. Chislock, T. A. Fields, and G. C. Blobe. 2008. Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis* 29:252-262.
141. Lopez-Casillas, F., C. Riquelme, Y. Perez-Kato, M. V. Ponce-Castaneda, N. Osses, J. Esparza-Lopez, G. Gonzalez-Nunez, C. Cabello-Verrugio, V. Mendoza, V. Troncoso, and E. Brandan. 2003. Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 278:382-390.
142. Liu, J., T. Kuulasmaa, V. M. Kosma, R. Butzow, T. Vanttinen, C. Hyden-Granskog, and R. Voutilainen. 2003. Expression of betaglycan, an inhibin coreceptor, in normal human ovaries and ovarian sex cord-stromal tumors and its regulation in cultured human granulosa-luteal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:5002-5008.
143. Omori, Y., K. Nakamura, S. Yamashita, H. Matsuda, T. Mizutani, K. Miyamoto, and T. Minegishi. 2005. Effect of follicle-stimulating hormone and estrogen on the expression of betaglycan messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 146:3379-3386.
144. Hempel, N., T. How, M. Dong, S. K. Murphy, T. A. Fields, and G. C. Blobe. 2007. Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer research* 67:5231-5238.
145. Cooper, S. J., H. Zou, S. N. Legrand, L. A. Marlow, C. A. von Roemeling, D. C. Radisky, K. J. Wu, N. Hempel, V. Margulis, H. W. Tun, G. C. Blobe, C. G. Wood, and J. A. Copland. Loss of type III transforming growth factor-beta receptor

- expression is due to methylation silencing of the transcription factor GATA3 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 29:2905-2915.
146. Vicencio, A. G., O. Eickelberg, M. C. Stankewich, M. Kashgarian, and G. G. Haddad. 2002. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 93:1123-1130.
 147. Cheifetz, S., J. L. Andres, and J. Massague. 1988. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 263:16984-16991.
 148. Lopez-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massague. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67:785-795.
 149. Moren, A., H. Ichijo, and K. Miyazono. 1992. Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor-beta type III receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 189:356-362.
 150. Fukushima, D., R. Butzow, A. Hildebrand, and E. Ruoslahti. 1993. Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 268:22710-22715.
 151. Lopez-Casillas, F., H. M. Payne, J. L. Andres, and J. Massague. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *The Journal of cell biology* 124:557-568.
 152. Pepin, M. C., M. Beauchemin, C. Collins, J. Plamondon, and M. D. O'Connor-McCourt. 1995. Mutagenesis analysis of the membrane-proximal ligand binding site of the TGF-beta receptor type III extracellular domain. *FEBS letters* 377:368-372.
 153. Kaname, S., and E. Ruoslahti. 1996. Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor-beta 1. *The Biochemical journal* 315 (Pt 3):815-820.
 154. Mendoza, V., M. M. Vilchis-Landeros, G. Mendoza-Hernandez, T. Huang, M. M. Villarreal, A. P. Hinck, F. Lopez-Casillas, and J. L. Montiel. 2009. Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* 48:11755-11765.
 155. Ponce-Castaneda, M. V., J. Esparza-Lopez, M. M. Vilchis-Landeros, V. Mendoza, and F. Lopez-Casillas. 1998. Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochimica et biophysica acta* 1384:189-196.
 156. Eickelberg, O., M. Centrella, M. Reiss, M. Kashgarian, and R. G. Wells. 2002. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *The Journal of biological chemistry* 277:823-829.
 157. Mythreye, K., and G. C. Blobe. 2009. The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated

- activation of Cdc42. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8221-8226.
158. Andres, J. L., K. Stanley, S. Cheifetz, and J. Massague. 1989. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *The Journal of cell biology* 109:3137-3145.
 159. Lamarre, J., J. Vasudevan, and S. L. Gonias. 1994. Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface. *The Biochemical journal* 302 (Pt 1):199-205.
 160. Velasco-Loyden, G., J. Arribas, and F. Lopez-Casillas. 2004. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *The Journal of biological chemistry* 279:7721-7733.
 161. Blobel, G. C., X. Liu, S. J. Fang, T. How, and H. F. Lodish. 2001. A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *The Journal of biological chemistry* 276:39608-39617.
 162. Blobel, G. C., W. P. Schiemann, M. C. Pepin, M. Beauchemin, A. Moustakas, H. F. Lodish, and M. D. O'Connor-McCourt. 2001. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 276:24627-24637.
 163. Chen, W., K. C. Kirkbride, T. How, C. D. Nelson, J. Mo, J. P. Frederick, X. F. Wang, R. J. Lefkowitz, and G. C. Blobel. 2003. Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science (New York, N.Y)* 301:1394-1397.
 164. Finger, E. C., N. Y. Lee, H. J. You, and G. C. Blobel. 2008. Endocytosis of the type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor through the clathrin-independent/lipid raft pathway regulates TGF-beta signaling and receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry* 283:34808-34818.
 165. Lee, N. Y., K. C. Kirkbride, R. D. Sheu, and G. C. Blobel. 2009. The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Molecular biology of the cell* 20:4362-4370.
 166. You, H. J., T. How, and G. C. Blobel. 2009. The type III transforming growth factor-beta receptor negatively regulates nuclear factor kappa B signaling through its interaction with beta-arrestin2. *Carcinogenesis* 30:1281-1287.
 167. Lee, J. D., N. Hempel, N. Y. Lee, and G. C. Blobel. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis* 31:175-183.
 168. Blair, C. R., J. B. Stone, and R. G. Wells. The type III TGF-beta receptor betaglycan transmembrane-cytoplasmic domain fragment is stable after ectodomain cleavage and is a substrate of the intramembrane protease gamma-secretase. *Biochimica et biophysica acta* 1813:332-339.
 169. Sankar, S., N. Mahooti-Brooks, M. Centrella, T. L. McCarthy, and J. A. Madri. 1995. Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular

- endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2. *The Journal of biological chemistry* 270:13567-13572.
170. Esparza-Lopez, J., J. L. Montiel, M. M. Vilchis-Landeros, T. Okadome, K. Miyazono, and F. Lopez-Casillas. 2001. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *The Journal of biological chemistry* 276:14588-14596.
 171. Pepin, M. C., M. Beauchemin, J. Plamondon, and M. D. O'Connor-McCourt. 1994. Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:6997-7001.
 172. Brown, C. B., A. S. Boyer, R. B. Runyan, and J. V. Barnett. 1999. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science (New York, N.Y)* 283:2080-2082.
 173. Stenvers, K. L., M. L. Tursky, K. W. Harder, N. Kountouri, S. Amatayakul-Chantler, D. Grail, C. Small, R. A. Weinberg, A. M. Sizeland, and H. J. Zhu. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23:4371-4385.
 174. Kirkbride, K. C., T. A. Townsend, M. W. Bruinsma, J. V. Barnett, and G. C. Blobe. 2008. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *The Journal of biological chemistry* 283:7628-7637.
 175. Stenvers, K. L., and J. K. Findlay. Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21:174-180.
 176. Vilchis-Landeros, M. M., J. L. Montiel, V. Mendoza, G. Mendoza-Hernandez, and F. Lopez-Casillas. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *The Biochemical journal* 355:215-222.
 177. Juarez, P., M. M. Vilchis-Landeros, J. Ponce-Coria, V. Mendoza, R. Hernandez-Pando, N. A. Bobadilla, and F. Lopez-Casillas. 2007. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *American journal of physiology* 292:F321-329.
 178. Hernandez-Pando, R., H. Orozco-Esteves, H. A. Maldonado, D. Aguilar-Leon, M. M. Vilchis-Landeros, D. A. Mata-Espinosa, V. Mendoza, and F. Lopez-Casillas. 2006. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clinical and experimental immunology* 144:264-272.
 179. Bandyopadhyay, A., F. Lopez-Casillas, S. N. Malik, J. L. Montiel, V. Mendoza, J. Yang, and L. Z. Sun. 2002. Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer research* 62:4690-4695.
 180. Bandyopadhyay, A., Y. Zhu, S. N. Malik, J. Kreisberg, M. G. Brattain, E. A. Sprague, J. Luo, F. Lopez-Casillas, and L. Z. Sun. 2002. Extracellular domain of TGFbeta type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene* 21:3541-3551.
 181. Bandyopadhyay, A., L. Wang, F. Lopez-Casillas, V. Mendoza, I. T. Yeh, and L. Sun. 2005. Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor

- growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *The Prostate* 63:81-90.
182. Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian, and W. Vale. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404:411-414.
 183. Chapman, S. C., D. J. Bernard, J. Jelen, and T. K. Woodruff. 2002. Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. *Molecular and cellular endocrinology* 196:79-93.
 184. Makanji, Y., K. L. Walton, M. C. Wilce, K. L. Chan, D. M. Robertson, and C. A. Harrison. 2008. Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan. *The Journal of biological chemistry* 283:16743-16751.
 185. Makanji, Y., P. D. Temple-Smith, K. L. Walton, C. A. Harrison, and D. M. Robertson. 2009. Inhibin B is a more potent suppressor of rat follicle-stimulating hormone release than inhibin a in vitro and in vivo. *Endocrinology* 150:4784-4793.
 186. Makanji, Y., C. A. Harrison, P. G. Stanton, R. Krishna, and D. M. Robertson. 2007. Inhibin A and B in vitro bioactivities are modified by their degree of glycosylation and their affinities to betaglycan. *Endocrinology* 148:2309-2316.
 187. MacConell, L. A., A. M. Leal, and W. W. Vale. 2002. The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *Endocrinology* 143:1066-1075.
 188. Chapman, S. C., and T. K. Woodruff. 2003. Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology* 144:5640-5649.
 189. Escalona, R. M., K. L. Stenvers, P. G. Farnworth, J. K. Findlay, and G. T. Ooi. 2009. Reducing betaglycan expression by RNA interference (RNAi) attenuates inhibin bioactivity in LbetaT2 gonadotropes. *Molecular and cellular endocrinology* 307:149-156.
 190. Wiater, E., K. A. Lewis, C. Donaldson, J. Vaughan, L. Bilezikjian, and W. Vale. 2009. Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 23:1033-1042.
 191. Wiater, E., C. A. Harrison, K. A. Lewis, P. C. Gray, and W. W. Vale. 2006. Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *The Journal of biological chemistry* 281:17011-17022.
 192. Looyenga, B. D., E. Wiater, W. Vale, and G. D. Hammer. Inhibin-A antagonizes TGFbeta2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGFbeta coreceptor betaglycan. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 24:608-620.
 193. Ethier, J. F., P. G. Farnworth, J. K. Findlay, and G. T. Ooi. 2002. Transforming growth factor-beta modulates inhibin A bioactivity in the LbetaT2 gonadotrope cell line by competing for binding to betaglycan. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 16:2754-2763.
 194. Farnworth, P. G., Y. Wang, R. Escalona, P. Leembruggen, G. T. Ooi, and J. K. Findlay. 2007. Transforming growth factor-beta blocks inhibin binding to

- different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan. *Endocrinology* 148:5355-5368.
195. Wiater, E., and W. Vale. 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 278:7934-7941.
 196. Fuller, P. J., and S. Chu. 2004. Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15:122-128.
 197. Bilandzic, M., S. Chu, P. G. Farnworth, C. Harrison, P. Nicholls, Y. Wang, R. M. Escalona, P. J. Fuller, J. K. Findlay, and K. L. Stenvers. 2009. Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 23:539-548.
 198. Steller, M. D., T. J. Shaw, B. C. Vanderhyden, and J. F. Ethier. 2005. Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 3:50-61.
 199. Woodward, T. L., N. Dumont, M. O'Connor-McCourt, J. D. Turner, and A. Philip. 1995. Characterization of transforming growth factor-beta growth regulatory effects and receptors on bovine mammary cells. *Journal of cellular physiology* 165:339-348.
 200. Liu, Q., S. S. Huang, and J. S. Huang. 1997. Function of the type V transforming growth factor beta receptor in transforming growth factor beta-induced growth inhibition of mink lung epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 272:18891-18895.
 201. Cui, X. M., and C. F. Shuler. 2000. The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion. *The International journal of developmental biology* 44:397-402.
 202. Boyer, A. S., and R. B. Runyan. 2001. TGFbeta Type III and TGFbeta Type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Dyn* 221:454-459.
 203. Droguett, R., C. Cabello-Verrugio, C. Riquelme, and E. Brandan. 2006. Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix Biol* 25:332-341.
 204. Sarraj, M. A., H. K. Chua, A. Umbers, K. L. Loveland, J. K. Findlay, and K. L. Stenvers. 2007. Differential expression of TGFBR3 (betaglycan) in mouse ovary and testis during gonadogenesis. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 25:334-345.
 205. Ahn, J. Y., S. Park, Y. S. Yun, and J. Y. Song. Inhibition of type III TGF-beta receptor aggravates lung fibrotic process. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 64:472-476.
 206. Buckham Sporer, K. R., J. L. Burton, B. Earley, and M. A. Crowe. 2007. Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. *Veterinary immunology and immunopathology* 118:19-29.
 207. Brooks, S. P., Z. P. Bernstein, S. L. Schneider, S. O. Gollnick, and T. B. Tomasi. 1998. Role of transforming growth factor-beta1 in the suppressed allostimulatory function of AIDS patients. *AIDS (London, England)* 12:481-487.

208. Slimani, H., N. Charnaux, E. Mbemba, L. Saffar, R. Vassy, C. Vita, and L. Gattegno. 2003. Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochimica et biophysica acta* 1617:80-88.
209. Kadin, M. E., M. W. Cavaille-Coll, R. Gertz, J. Massague, S. Cheifetz, and D. George. 1994. Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:6002-6006.
210. Pakula, R., A. Melchior, A. Denys, C. Vanpouille, J. Mazurier, and F. Allain. 2007. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 17:492-503.
211. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392-404.
212. Kulkarni, A. B., C. G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K. C. Flanders, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. M. Ward, and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:770-774.
213. Christ, M., N. L. McCartney-Francis, A. B. Kulkarni, J. M. Ward, D. E. Mizel, C. L. Mackall, R. E. Gress, K. L. Hines, H. Tian, S. Karlsson, and et al. 1994. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* 153:1936-1946.
214. Boivin, G. P., B. A. O'Toole, I. E. Orsmy, R. J. Diebold, M. J. Eis, T. Doetschman, and A. B. Kier. 1995. Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice. *The American journal of pathology* 146:276-288.
215. Takahama, Y., J. J. Letterio, H. Suzuki, A. G. Farr, and A. Singer. 1994. Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 179:1495-1506.
216. Mossalayi, M. D., F. Mentz, F. Ouaz, A. H. Dalloul, C. Blanc, P. Debre, and F. W. Ruscetti. 1995. Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor-beta 1 mechanism. *Blood* 85:3594-3601.
217. Suda, T., and A. Zlotnik. 1992. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha induce CD8 expression on CD8- thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8- pre-T cell subset. *J Immunol* 148:1737-1745.
218. Suda, T., and A. Zlotnik. 1992. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3-CD4-CD8 alpha + cells generated in vitro by culturing CD25+CD3-CD4-CD8- thymocytes with T cell growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149:71-76.
219. Schluns, K. S., J. E. Cook, and P. T. Le. 1997. TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells. *J Immunol* 158:2704-2712.

220. Plum, J., M. De Smedt, G. Leclercq, and B. Vandekerckhove. 1995. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* 154:5789-5798.
221. Rosendahl, A., M. Speletas, K. Leandersson, F. Ivars, and P. Sideras. 2003. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol* 15:1401-1414.
222. Mamura, M., A. Nakao, D. Goto, M. Kato, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2000. Ligation of the T cell receptor complex results in phosphorylation of Smad2 in T lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 268:124-127.
223. Gorelik, L., and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12:171-181.
224. Leveen, P., M. Carlsen, A. Makowska, S. Oddsson, J. Larsson, M. J. Goumans, C. M. Cilio, and S. Karlsson. 2005. TGF-beta type II receptor-deficient thymocytes develop normally but demonstrate increased CD8+ proliferation in vivo. *Blood* 106:4234-4240.
225. Graf, D., S. Nethisinghe, D. B. Palmer, A. G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2002. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 196:163-171.
226. Hager-Theodorides, A. L., S. V. Outram, D. K. Shah, R. Sacedon, R. E. Shrimpton, A. Vicente, A. Varas, and T. Crompton. 2002. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 169:5496-5504.
227. Varas, A., A. L. Hager-Theodorides, R. Sacedon, A. Vicente, A. G. Zapata, and T. Crompton. 2003. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* 24:197-206.
228. Takagi, T., J. Harada, and S. Ishii. 2001. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* 2:1048-1053.
229. Bleul, C. C., and T. Boehm. 2005. BMP signaling is required for normal thymus development. *Journal of Immunology* 175:5213-5221.
230. Hedger, M. P., A. E. Drummond, D. M. Robertson, G. P. Risbridger, and D. M. de Kretser. 1989. Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 61:133-138.
231. Hedger, M. P., D. J. Phillips, and D. M. de Kretser. 2000. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 12:595-602.
232. Licona, P., J. Chimal-Monroy, and G. Soldevila. 2006. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* 235:1124-1132.
233. Licona-Limon, P., G. Aleman-Muench, J. Chimal-Monroy, M. Macias-Silva, E. A. Garcia-Zepeda, M. M. Matzuk, T. I. Fortoul, and G. Soldevila. 2009. Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochemical and biophysical research communications* 381:229-235.

234. Aleman-Muench, G. R., and G. Soldevila. 2012. When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunology and cell biology* 90:137-148.
235. Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams, and T. A. Chatila. 2007. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nature immunology* 8:359-368.
236. Licona-Limon, P., and G. Soldevila. 2007. The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunology letters* 109:1-12.
237. Wong, S. H., L. Hamel, S. Chevalier, and A. Philip. 2000. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *European journal of biochemistry / FEBS* 267:5550-5560.
238. Sarraj, M. A., R. M. Escalona, A. Umbers, H. K. Chua, C. Small, M. Griswold, K. Loveland, J. K. Findlay, and K. L. Stenvers. Fetal testis dysgenesis and compromised Leydig cell function in Tgfb3 (beta glycan) knockout mice. *Biology of reproduction* 82:153-162.
239. Walker, K. A., S. Sims-Lucas, G. Caruana, L. Cullen-McEwen, J. Li, M. A. Sarraj, J. F. Bertram, and K. L. Stenvers. Betaglycan is required for the establishment of nephron endowment in the mouse. *PloS one* 6:e18723.
240. Schick, B. P., and J. A. Jacoby. 1995. Serglycin and betaglycan proteoglycans are expressed in the megakaryocytic cell line CHRF 288-11 and normal human megakaryocytes. *Journal of cellular physiology* 165:96-106.
241. Worapamorn, W., H. R. Haase, H. Li, and P. M. Bartold. 2001. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *Journal of cellular physiology* 186:448-456.
242. Margulis, V., T. Maity, X. Y. Zhang, S. J. Cooper, J. A. Copland, and C. G. Wood. 2008. Type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediates apoptosis in renal cell carcinoma independent of the canonical TGF-beta signaling pathway. *Clin Cancer Res* 14:5722-5730.
243. Schulz, J. G., W. Annaert, J. Vandekerckhove, P. Zimmermann, B. De Strooper, and G. David. 2003. Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *The Journal of biological chemistry* 278:48651-48657.
244. Chu, W., X. Li, C. Li, L. Wan, H. Shi, X. Song, X. Liu, X. Chen, C. Zhang, H. Shan, Y. Lu, and B. Yang. TGFBR3, a potential negative regulator of TGF-beta signaling, protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis. *Journal of cellular physiology* 226:2586-2594.
245. Ogawa, K., M. Funaba, Y. Chen, and M. Tsujimoto. 2006. Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. *J Immunol* 177:6787-6794.
246. Huber, S., F. R. Stahl, J. Schrader, S. Luth, K. Presser, A. Carambia, R. A. Flavell, S. Werner, M. Blessing, J. Herkel, and C. Schramm. 2009. Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. *J Immunol* 182:4633-4640.

247. Shen, Z., L. Chen, F. Hao, and J. Wu. 2009. Transcriptional regulation of Foxp3 gene: multiple signal pathways on the road. *Medicinal research reviews* 29:742-766.
248. Lu, L., J. Ma, X. Wang, J. Wang, F. Zhang, J. Yu, G. He, B. Xu, D. D. Brand, D. A. Horwitz, W. Shi, and S. G. Zheng. Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. *European journal of immunology* 40:142-152.
249. Inman, G. J., F. J. Nicolas, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping, and C. S. Hill. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* 62:65-74.
250. Tsuchida, K., M. Nakatani, N. Yamakawa, O. Hashimoto, Y. Hasegawa, and H. Sugino. 2004. Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Molecular and cellular endocrinology* 220:59-65.
251. Bernard, D. J., K. B. Lee, and M. M. Santos. 2006. Activin B can signal through both ALK4 and ALK7 in gonadotrope cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4:52.
252. Suresh, P. S., T. Rajan, and R. Tsutsumi. New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. *Endocrine journal* 58:223-235.
253. Childs, G. V., B. T. Miller, and W. L. Miller. 1997. Differential effects of inhibin on gonadotropin stores and gonadotropin-releasing hormone binding to pituitary cells from cycling female rats. *Endocrinology* 138:1577-1584.
254. Xu, G., Y. Zhong, S. Munir, B. B. Yang, B. K. Tsang, and C. Peng. 2004. Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in human epithelial ovarian cancer cells via activin receptor-like kinase 7. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:5523-5534.
255. Kogame, M., S. Matsuo, M. Nakatani, A. Kurisaki, H. Nishitani, K. Tsuchida, and H. Sugino. 2006. ALK7 is a novel marker for adipocyte differentiation. *J Med Invest* 53:238-245.
256. Sjöholm, K., J. Palming, T. C. Lystig, E. Jennische, T. K. Woodruff, B. Carlsson, and L. M. Carlsson. 2006. The expression of inhibin beta B is high in human adipocytes, reduced by weight loss, and correlates to factors implicated in metabolic disease. *Biochemical and biophysical research communications* 344:1308-1314.
257. Tsuchida, K., P. E. Sawchenko, S. Nishikawa, and W. W. Vale. 1996. Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. *Molecular and cellular neurosciences* 7:467-478.

XII. Publicaciones

Betaglycan (T β RIII) Is Expressed in the Thymus and Regulates T Cell Development by Protecting Thymocytes from Apoptosis

German R. Aleman-Muench¹, Valentin Mendoza², Kaye Stenvers³, Eduardo A. Garcia-Zepeda¹, Fernando Lopez-Casillas², Chander Raman⁴, Gloria Soldevila^{1*}

1 Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México, **2** Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México, **3** Reproductive Development and Cancer laboratory, Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia, **4** Departments of Medicine and Microbiology, Division of Clinical Immunology and Rheumatology University of Alabama at Birmingham, Alabama, United States of America

Abstract

TGF- β type III receptor (T β RIII) is a coreceptor for TGF β family members required for high-affinity binding of these ligands to their receptors, potentiating their cellular functions. TGF- β [1–3], bone morphogenetic proteins (BMP2/4) and inhibins regulate different checkpoints during T cell differentiation. Although T β RIII is expressed on hematopoietic cells, the role of this receptor in the immune system remains elusive. Here, we provide the first evidence that T β RIII is developmentally expressed during T cell ontogeny, and plays a crucial role in thymocyte differentiation. Blocking of endogenous T β RIII in fetal thymic organ cultures led to a delay in DN-DP transition. In addition, *in vitro* development of T β RIII^{-/-} thymic lobes also showed a significant reduction in absolute thymocyte numbers, which correlated with increased thymocyte apoptosis, resembling the phenotype reported in Inhibin α ^{-/-} thymic lobes. These data suggest that Inhibins and T β RIII may function as a molecular pair regulating T cell development.

Citation: Aleman-Muench GR, Mendoza V, Stenvers K, Garcia-Zepeda EA, Lopez-Casillas F, et al. (2012) Betaglycan (T β RIII) Is Expressed in the Thymus and Regulates T Cell Development by Protecting Thymocytes from Apoptosis. PLoS ONE 7(8): e44217. doi:10.1371/journal.pone.0044217

Editor: Jean Kanellopoulos, University Paris Sud, France

Received: May 25, 2012; **Accepted:** August 3, 2012; **Published:** August 29, 2012

Copyright: © 2012 Aleman-Muench et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work in GS's lab was supported by a grant from DGAPA, UNAM (PAPIIT #IN228205). GRAM was a recipient of a doctoral fellowship #208213 from CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: soldevi@servidor.unam.mx

Introduction

T cell development requires the recognition of self-peptide MHC complexes by immature thymocytes, leading to the selection of a self-restricted and autotolerant T cell repertoire. In addition to the nature of TCR signals triggered by self-peptide recognition, other signals provided by thymic stromal cells, such as those triggered by members of TGF- β superfamily like TGF β , activins/inhibin and BMP subfamilies have been shown to act as key regulators of apoptosis, survival and cell cycle progression in different cell types [1–3].

We and others have described that members of TGF- β superfamily are differentially expressed in the thymus and regulate specific developmental checkpoints, influencing T cell development in [4,5]. Specifically, among TGF β s, only TGF β 1 and TGF β 2 appear to regulate DN1-DN2 and DN-DP transitions and promote maturation of CD8SP [4]. On the other hand, BMPs and their negative regulators, chordin, noggin and twisted gastrulation (Tsg), are also expressed in the thymus. BMP2 and BMP4 were shown to negatively regulate DN1-DN2, DN3-DN4 and DN-DP transitions [4,5]. Finally, we have recently described that inhibins are abundantly expressed in the thymus by stromal cells and thymocytes [6] and that, addition of exogenous inhibins in FTOCs regulate T cell development at the DN3-DN4, DN-DP, and DP-CD8SP stages [7]. Moreover, endogenous inhibins were required

to obtain normal thymocyte numbers and adequate DN-DP transition during *in vitro* T cell development [7].

A central coreceptor in the canonical signaling pathway of TGF- β is betaglycan, also known as the TGF- β type III receptor (T β RIII), which is a widely expressed membrane-anchored proteoglycan. Structurally, it is characterized by a large extracellular region, containing heparan and chondroitin sulphate chains, and a short cytoplasmic domain that lacks a signaling motif, which has recently been shown to regulate cell processes like apoptosis and cell migration [8,9]. T β RIII-null mice embryos die between E13.5 to E18.5 of embryonic stage by heart and liver defects, caused by an altered TGF- β 2-induced mesenchymal transformation process and the incidence of apoptotic events [10]. Recently, it has been described that the absence of T β RIII also compromises normal seminiferous cord formation, Leydig cell function in testis [11] and alters kidney development [12].

The main function of T β RIII is to orchestrate the TGF β , BMP and inhibin-mediated signals in different cell types. T β RIII enhances the binding of all three TGF- β isoforms to the TGF- β signaling receptor complex, but is specially required for high affinity binding and functional activity of TGF- β 2 [10,13–17]. On the other hand, T β RIII enhances the binding of BMP2, BMP4, BMP7 and GDF5 to BMPRI leading to an increase in Smad1 phosphorylation, and thus potentiates its functional effects [18]. In addition, T β RIII binds inhibins with high affinity, potentiating the

exclusion of ACTRIB (ALK4) to antagonize activin-mediated functions [14,19–21]. Also, TβRIII enables inhibins to antagonize BMP signaling [22] and to reduce TGF-β2 signals through the endocytic internalization of TβRIII [23]. Conversely, TβRIII also allow TGF-β1 and 2 to attenuate inhibin-mediated functions by downregulating the expression and binding of this co-receptor [24,25].

Although TβRIII is broadly expressed in many tissues, its presence and the potential function of this receptor in the hematopoietic system remains poorly characterized [26–31]. Given that downstream signaling of many TGF-β ligands are regulated by TβRIII to fine tune key cellular processes, here we investigated the expression of TβRIII in the thymus and its potential role in T cell differentiation.

Materials and Methods

Mice

4 to 6 week old C57BL/6 mice were used in our experiments. TβRIII wild type, heterozygous, and null mouse embryos [10] were obtained from synchronized embryonic day 14 (E14) matings of TβRIII heterozygous mice. All animal handling and experimental procedures were done according to the Instituto de Investigaciones Biomedicas ethics guidelines. The study was approved by the “Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL)” of the Institute.

PCR and Genotyping

Amplification of wild-type or mutant TβRIII alleles in tissue samples from E14 embryos was achieved with the following primers: P1 5'-ATTGTGTTTCATAGTCCAGA-3', wt 5'-CCTAGTCTTGGTCTGTACT-3', and Neo 5'-TAGGGTTCCGATTTAGTGCT-3', using the following program: 1 minute of initial denaturing step at 94°C, then 35 cycles of denaturing (94°C for 1 min), annealing (53°C for 1 min), and elongation (72°C 1 min), and one final step at 72°C for 5 min. Products obtained after PCR were electrophoresed in 1% agarose gels.

RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA was obtained from total fetal (E14-E15 gestation) and adult thymi, E15 thymic stromal cells, sorted adult thymocyte subpopulations, L6E9 and BG22 myoblast cell lines. Testis and brain were used as control tissues. E15 thymic stromal cells were purified as previously described [6]. Sorted thymocyte subsets (DN, DP, CD4⁺ and CD8⁺) were obtained with FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) with a purity of >95%. RNA was isolated using RNA-STAT60 reagent (Tel-Test Inc, Friendslaw, TX) according to manufacturer's protocol. 5–10 μg of total RNA was treated with “DNA-Free” reagent (Ambion Inc. Austin TX). cDNA was synthesized using M-MLV RT and oligo dT (both from Invitrogen Inc, Carlsbad, CA) according to manufacturer's recommendations.

Real Time PCR Analysis

The following primers were used: TβRIII Forward 5' - GCCAGACGGCTACGAAGATTT- 3', TβRIII reverse 5' - AACACTACCCTCCAGCACGG- 3', β-Actin Forward 5' - TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC- 3' and β-Actin Reverse 5' - TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG- 3'. Measurement of gene expression was performed amplifying cDNA with SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems) and analyzed with the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplification conditions for TβRIII and β-actin were an initial step of 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 58°C for 1 min and 61.3°C for 1 min. Expression specific gene was calculated using the formula $2^{-\Delta Ct}$. The calculation of TβRIII expression was normalized to β-actin and performed as previously described [6]. The PCR products were analyzed on a 2% (w/v) agarose gel to confirm purity and size of products.

Flow Cytometry

A total of $0.5-1 \times 10^6$ cells were treated with Fc block for 30 minutes at 4°C following by staining with the indicated antibodies: FITC-coupled anti-CD4 (RM4-5), PE-coupled anti-CD44 (Pgp-1,

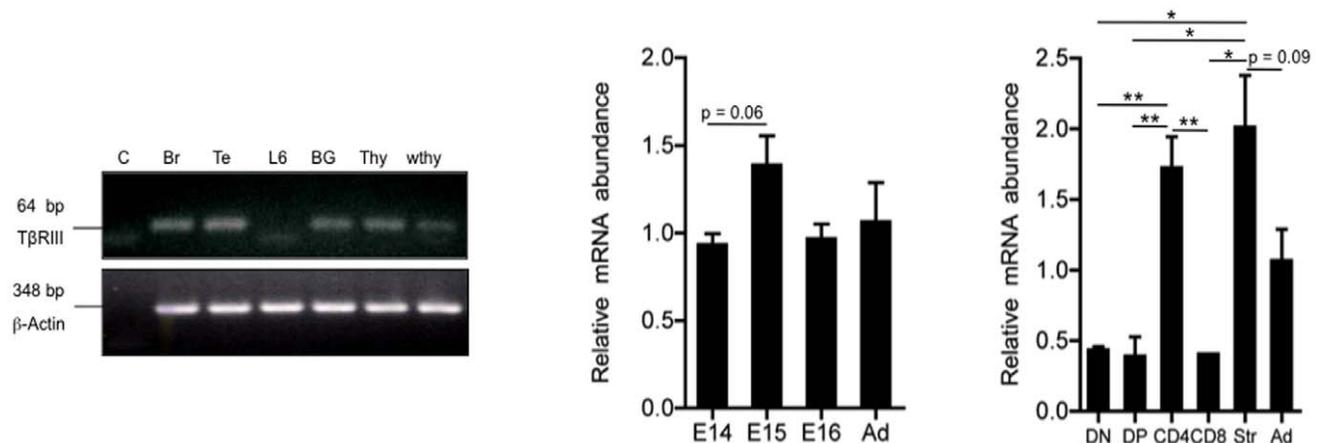


Figure 1. TβRIII mRNA is expressed in fetal and adult murine thymus. RT-PCR was employed to amplify a TβRIII product (64 bp) from cDNA obtained of control and test samples; as positive control, Brain (Br), Testis (Te), TβRIII stably transfected myoblast line cell (BG) were used. H₂O (c) and the parental, TβRIII-negative, myoblast cell line L6E9 (L6) were used as negative controls. cDNA of total thymocytes (thy) and whole adult thymus (wthy, including thymocytes and stromal cells) were tested for the expression of TβRIII. Quantitation of TβRIII expression was performed by quantitative real time PCR analysis of cDNA samples obtained from E14, E15 and E16 thymi and whole adult thymus. Real time PCR shows differential TβRIII expression in sorted thymocyte subpopulations DN (CD4⁻CD8⁻), DP (CD4⁺CD8⁺), CD8⁺ SP and CD4⁺ SP. Str (thymic stroma), Ad (adult thymus). The purity of all sorted thymocyte subsets was greater than 96%. Values represent relative expression ($2^{-\Delta Ct}$), expressed as mean values \pm SEM of three independent experiments. Asterisks indicate * $p \leq 0.05$, and ** $p \leq 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0044217.g001

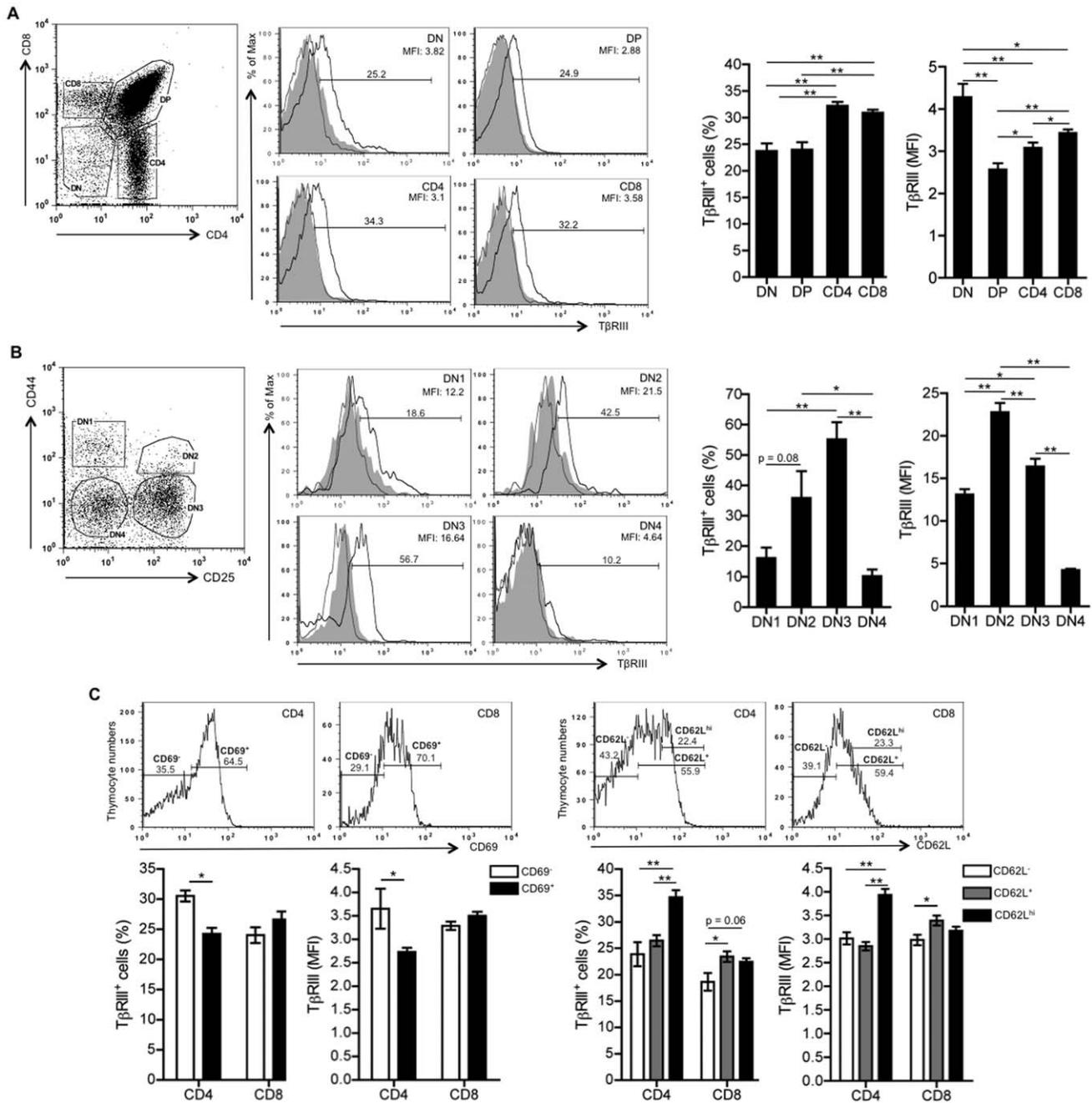


Figure 2. T β RIII is developmentally expressed during T cell ontogeny. Thymocytes from 4 to 6 week old C57BL/6 background mice were stained with antibodies to CD4, CD8, and T β RIII. Pre-immune serum was used as an internal background staining control. (A) Representative histograms showing the percentage of T β RIII⁺ cells in gated DN, DP, CD4⁺ SP and CD8⁺ SP subsets. Graphs show the percentage of T β RIII⁺ thymocytes and geometric MFI calculated after subtracting the background staining. (B) Representative histograms showing the percentage of T β RIII⁺ thymocytes in DN1, DN2, DN3 and DN4 immature subsets. Graph represents the analysis of T β RIII⁺ cells and geometric MFI in gated DN1, DN2, DN3 and DN4 immature subsets. Unstained (filled curve in gray), preimmune serum (gray line) and anti-T β RIII antiserum (black line). Data are representative of 4 independent experiments. (C) Left panel, graph shows the percentage of T β RIII⁺ cells and geometric MFI in gated CD69⁻ and CD69⁺ SP thymocytes as showed in histograms. Right panel, graph represents the analysis of T β RIII⁺ cells and geometric MFI in gated CD62L⁻, CD62L⁺ and CD62L^{hi} SP thymocytes as showed in upper panel. Mean values \pm SEM are shown (n = 5 per group). Asterisks indicate * p \leq 0.05, and ** p \leq 0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0044217.g002

Ly-24), PE-coupled anti-CD4 (L3T4), PE-coupled anti-CD8 (Ly-2), PE-coupled anti-CD19 (1D3), biotin-conjugated anti-CD25 (7D4), PeCy5-coupled anti-CD4 (L3T4), Cy5-coupled anti-CD8 (Ly-2), APC-coupled anti-CD4 (RM4-5) and PE-conjugated rabbit anti-active caspase 3, all from BD Biosciences (San Jose, CA)

obtained from BD Biosciences and Biolegend. For T β RIII detection a polyclonal antibody was used [13]. As secondary reagents, FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), PE-conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen) and APC-conjugated streptavidin (BD Biosciences) were used. Dead cells were gated

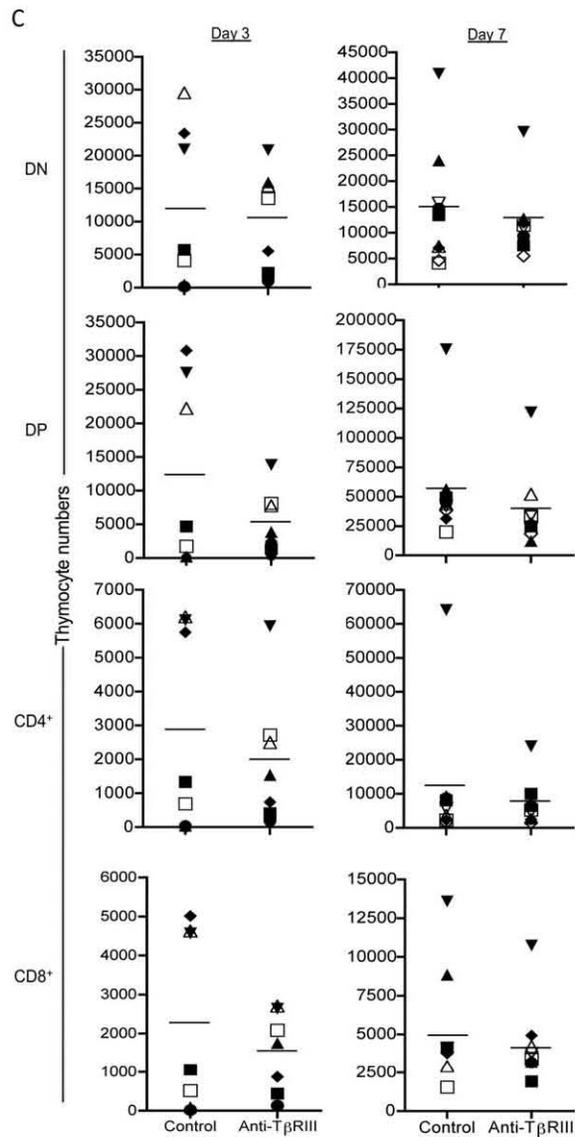
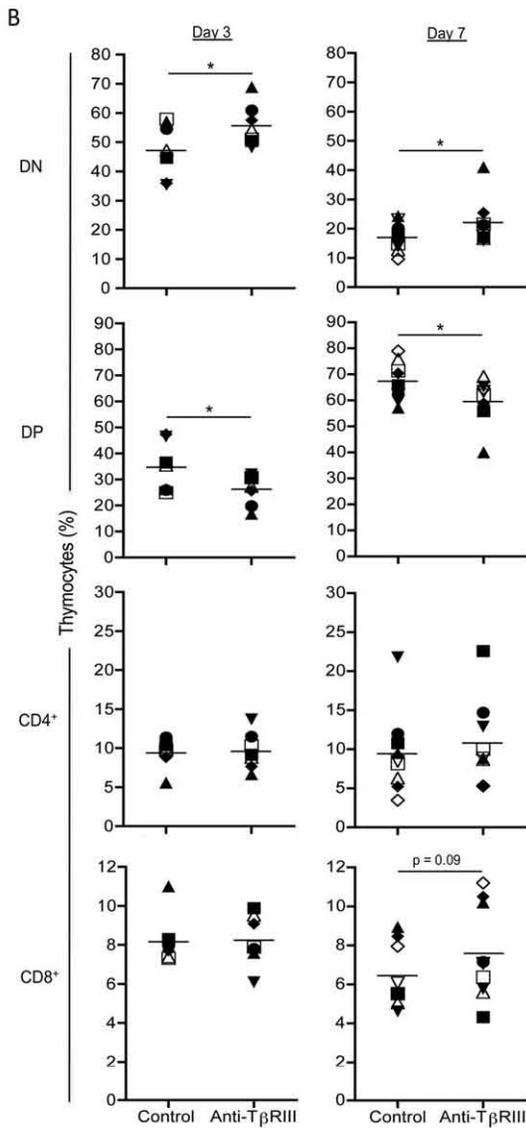
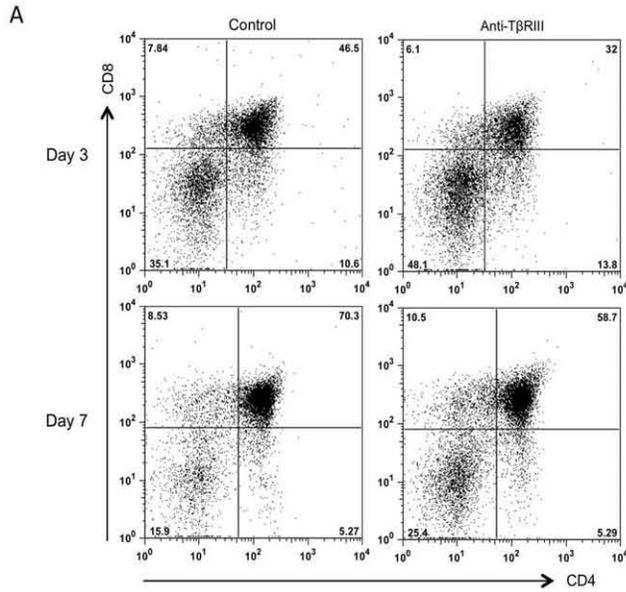


Figure 3. The blocking of T β RIII in FTOCs alters T cell development. E14 thymic lobes were cultured in the presence of anti-T β RIII antibody or in the presence of pre-immune serum (control lobe). At day 3 and 7 of culture thymic lobes were disaggregated, counted and stained with antibodies to CD4, CD8. (A) Representative CD4 versus CD8 staining dot plots. (B). Comparative graphs represent the percentages of DN, DP, CD4SP and CD8SP thymocytes obtained after 3 and 7 days of culture between both treatments. (C) Analysis of cell numbers in non-treated and anti-T β RIII treated FTOCs at day 3 and 7. Data are representative of two independent experiments. Mean values \pm SEM are shown (n = 7 per group for day 3, and n = 9 per group for day 7). Asterisks indicate *p \leq 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0044217.g003

out depending on forward scattering (FSC) and side scattering (SSC). All samples were captured in a FACsCalibur and FACSAria (BD) and data were analyzed with FlowJo $\text{\textcircled{C}}$ Tree Star software.

Western Blotting Analysis

Cell lysates (10×10^6 cells) were resolved on a 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA). Immunoblotting was carried out with anti-T β RIII (Cell Signaling Tech Inc., Beverly, MA), followed by horseradish peroxidase-labeled anti-mouse immunoglobulin (Amersham, Buckinghamshire, UK). As a loading control, anti- β -actin antibody was used (kindly provided by Dr. Isaura Meza, CINVESTAV-IPN, D.F, México). Immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence assay (ECL, Amersham).

FTOCs

Fetal thymi of T β RIII wild type, heterozygous, and null mouse embryos were obtained from timed matings of heterozygote mice (C57BL/6 background) and genotyped as described above. Fetal thymi were cultured as previously described [7]. Fetal thymi were cultured with or without anti-T β RIII blocking Ab (1/100 dilution) for 3–7 days, and medium was refreshed every third day. On days 0, 3 and 7 of culture, thymic lobes were disaggregated and thymocytes counted and stained for flow cytometric analysis.

Apoptosis Assays

Thymocytes were initially stained with CD4/CD8 antibodies followed by Annexin-V, according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences). For the analysis of active caspase 3, cells were permeabilized with Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences) for 1 hr at 4 $^{\circ}$ C and then incubated with anti-active caspase 3-PE (eBioscience, San Diego, CA) for 30 minutes at 4 $^{\circ}$ C.

Statistical Analysis

For FTOCs using the antibody anti-T β RIII, a paired two-tailed Student's test was used to compare lobes from each fetus (control lobe versus treated lobe). For the rest of experiments, an unpaired Student's test was used. Asterisks indicate p \leq 0.05(*) and p \leq 0.01(**). P values \leq 0.05 were considered as statistically significant.

Results and Discussion

T β RIII mRNA is Expressed in Murine Thymocytes and Stromal Cells

We first investigated the expression of T β RIII in the thymus at the mRNA level. Although we expected to find expression on stromal lineage cells (which include epithelial cells, macrophages and dendritic cells), surprisingly, we found significant levels of T β RIII in thymocytes (Figure 1). This expression was comparable to levels observed in the brain and testis, which were used as control tissues [32]. TGF β superfamily members have an essential function in early T cell development that initiates with the arrival of lymphoid progenitors to the thymic anlage from 13.5 days of

gestation [4,5]. In order to determine if T β RIII signaling might have a role in fetal thymocyte development, we analyzed the gene expression of the receptor in E14, E15 and E16 fetal thymi and compared it to that in adult thymi. We observed that T β RIII was significantly expressed in all fetal stages at levels equivalent to adult thymus. Although the expression of T β RIII was slightly elevated E15 fetal thymi, it was not significantly different from other time-points during development (Figure 1). To directly determine the expression of T β RIII in thymocytes at different stages of development from that in stromal cells, we sorted DN, DP, SP CD4 $^{+}$ and SP CD8 $^{+}$ thymocyte subsets from adult thymi and E15 thymic stromal cells. As expected, we observed that T β RIII mRNA was highly expressed in stromal cells (Figure 1). Remarkably, thymocyte subpopulations at all stages of development expressed significant levels of this proteoglycan with the CD4 $^{+}$ SP subset expressing the highest levels (Figure 1). Western blot analysis revealed confirmed a 100 kDa protein that corresponds to the core protein of mouse T β RIII in total adult thymocytes, lymph node cells and splenocytes (Figure S1A).

Thus, this is the first evidence that T β RIII is expressed in thymic stromal cells and also in thymocytes, suggesting its potential role during T cell development.

T β RIII Expression is Regulated during T Cell Ontogeny

Since type I and type II TGF β receptors are differentially expressed in thymocyte subsets and their expression is associated with distinct thymocyte responsiveness to TGF- β superfamily ligands [4,5,33], we investigated whether T β RIII is differentially expressed on the cell surface of developing thymocytes. For this purpose we used a polyclonal antibody directed against the T β RIII ectodomain. Its specificity was confirmed by staining of T β RIII deficient fetal thymocytes and after competition with a soluble form of T β RIII (Figure S1B and C). Consistent with the mRNA expression data (Figure 1), all thymocyte subsets expressed T β RIII protein on the cell surface, showing an increased percentage of T β RIII $^{+}$ cells within the SP subset (Figure 2A). Based on mean fluorescence intensity values (MFI), we observed that the DN subset expressed the highest levels of T β RIII, which diminished at DP stage and moderately increased at the SP stages (Figure 2A).

It is well known that TGF β s, activins/inhibins and BMPs regulate early stages of T cell differentiation [7], we therefore analyzed the expression of T β RIII in immature DN thymocytes by using anti-CD44 and anti-CD25 antibodies to identify DN1, DN2, DN3 and DN4 stages. As shown in Figure 2B, the percentage of DN cells expressing T β RIII cells increased from DN1 to DN2 reaching a peak at the DN3 stage followed by a significant decrease at the DN4 stage. Analysis of MFI confirmed the downregulation of T β RIII at DN4 stage, suggesting that pre-TCR signaling may regulate T β RIII expression in thymocytes. Consistent with these findings, we suggest that T β RIII expression at DN3 stage may be important to integrate the signaling output of BMPs and inhibins influencing the transition of thymocytes to the DP stage. In fact, we recently demonstrated that inhibin A, a ligand with high affinity for T β RIII, promoted DN3 to DN4 transition in FTOCs, suggesting their positive role during TCR β -selection

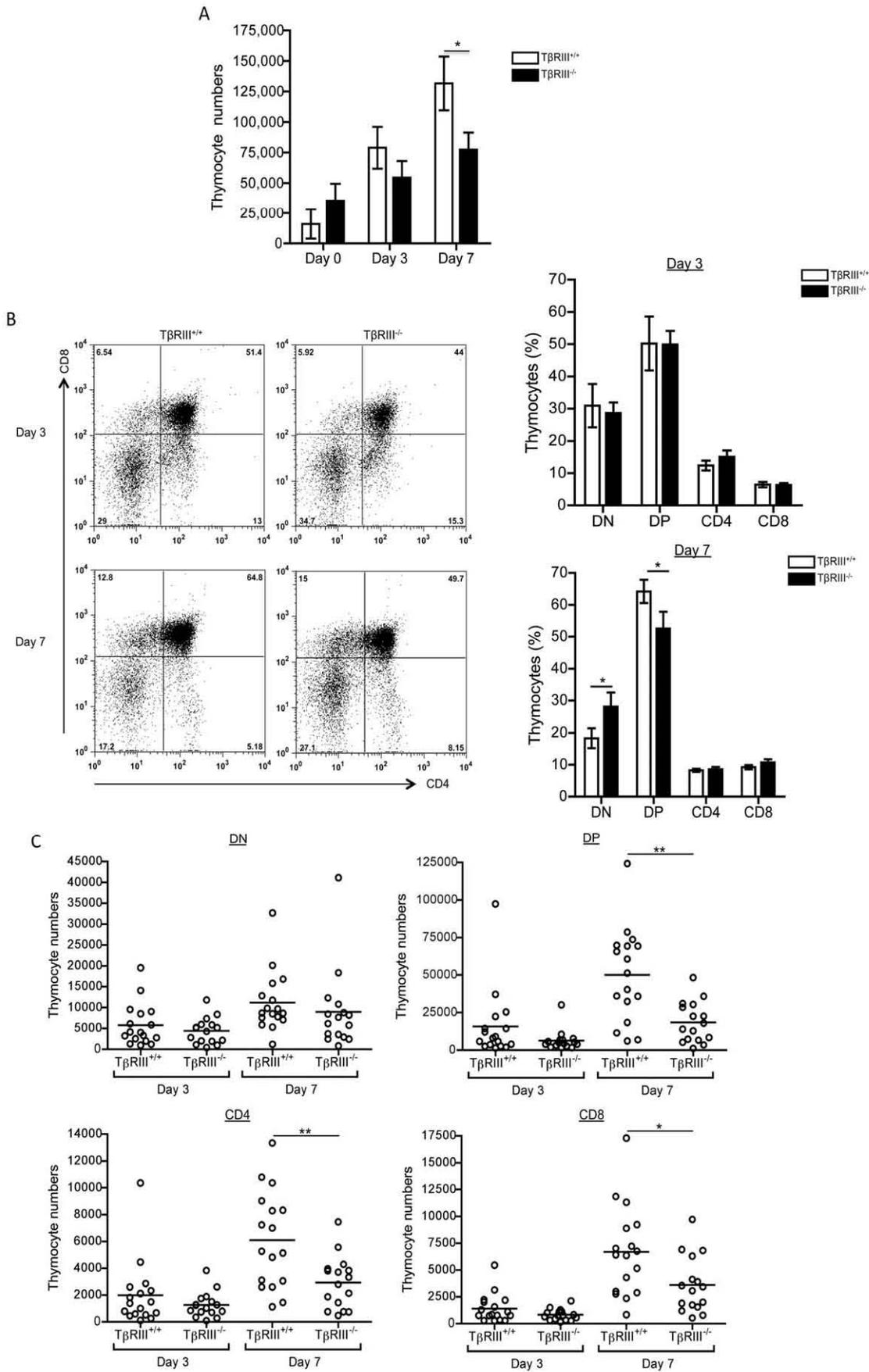


Figure 4. T β RIII^{-/-} fetal thymi display an altered T cell development. (A) Graph of thymocyte numbers at days 0, 3 and 7 from E14 T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymic lobes, respectively. (B) Representative CD4 versus CD8 staining dot plots from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymic lobes at days 3 and 7 of culture. Summary of experiments showing the percentage of each thymocyte subsets from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} FTOCs at days 3 and 7. (C) Analysis of total cell numbers in gated DN, DP and CD4SP and CD8SP thymocytes from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi. Data are representative of three independent experiments. Mean values \pm SEM are shown, T β RIII^{+/+} n = 17 and T β RIII^{-/-} n = 16. Asterisks indicate *p \leq 0.05 and **p \leq 0.01.
doi:10.1371/journal.pone.0044217.g004

process [7]. Moreover, an interesting mechanism was described for BMPs, where the expression of twisted gastrulation (Tsg) is induced after pre-TCR signaling to reverse the BMP2/4-dependent arrest and to promote T cell differentiation [34]. However, future experiments will be necessary to discriminate the contribution of T β RIII in each TGF β ligand-mediated functions at this stage.

Since T β RIII is expressed in SP thymocytes, we next investigated whether upregulation of this receptor might accompany the process of positive selection. We used TCR β , CD5 and CD69 as markers to analyze T β RIII expression in DP cells that have undergone positive selection. No correlation was observed between the expression of T β RIII and the levels of CD5, CD69 and TCR β in DP thymocytes, suggesting that T β RIII expression in thymocytes is not modified by TCR signaling (data not shown). However, analysis of mature SP thymocytes indicated that T β RIII is upregulated in CD4⁺ SP CD69⁻ compared to CD4⁺ SP CD69⁺ thymocytes (Figure 2C, left panels), as well as in CD62L^{hi} CD4⁺ SP and CD62L⁺ CD8⁺ SP compared to CD62L⁻ cells (Figure 2C, right panels). Altogether, these data show that T β RIII expression may be associated with the terminal differentiation of thymocytes and is preferentially expressed in the most functionally mature CD4⁺ and CD8⁺ SP cells (CD69⁻ and CD62L^{+/hi}, respectively).

T β RIII Blocking Results in Delayed T Cell Development

T β RIII ligands TGF- β s, inhibins and some BMPs, have been reported to regulate specific checkpoints during T cell differentiation [4]. To directly determine if T β RIII has a role in T cell development, we evaluated the requirement of this co-receptor by performing blocking assays in FTOCs with specific antisera directed against its extracellular domain. This strategy has been previously employed to evaluate the requirement of T β RIII for epithelial-mesenchymal transition [17] and to restore the T cell stimulatory function of DCs suppressed by TGF β [29]. No differences were observed in absolute cell numbers or in percentages of DN1-DN4 thymocytes at day 3 of culture under blocking conditions (Figure S2). In addition, when we examined T cell development at day 7 of culture, a significant decrease of DN2 subset and a slight reduction was observed in anti-T β RIII treated lobes (Figure S2C and D). Interestingly, blocking of T β RIII signaling significantly reduced the proportion of DP thymocytes that was associated with a corresponding increase in the DN subset (Figure 3A and B) indicating that T β RIII may act by regulating pre-TCR mediated signals, as has been reported for its ligands, BMPs and inhibins [7,34]. This data correlate with the downregulation of T β RIII expression observed between DN3-DN4 and between DN and DP (Figure 2A and 2B). As shown in Figure 3C, analysis of thymocyte cell numbers showed a slight decrease, although not significant, in DP and CD4SP cell numbers at day 3 of culture in fetal lobes treated with anti-T β RIII antiserum.

T Cell Development is Attenuated in T β RIII Null Embryos

To further confirm the role of T β RIII during thymocyte development, we performed FTOCs of T β RIII null embryos. T β RIII null mice show intrauterine lethality due to proliferative

defects in heart and apoptosis in liver, beginning at E13.5 and with higher mortality by E16.5 [10]. Therefore to analyze the impact of T β RIII deficiency in thymocyte development and to reduce deleterious systemic defects, we isolated E14 fetal thymi obtained from T β RIII heterozygous pregnant females and analyzed T cell development in FTOC. We observed no differences in cell numbers at day 0 between all of the genotypes (Figure 4A). In addition, analysis of DN immature subsets showed no significant differences in the absence of T β RIII (Figure S3). However by day 3 and significantly by day 7, thymocyte numbers were greatly reduced in T β RIII null fetal thymi compared to wild type thymi. Consistently, analysis at day 7 of T β RIII^{-/-} FTOCs showed a significant reduction in the percentage of DP thymocytes, which was accompanied by an increase in DN thymocytes (Figure 4B), which correlates with the reduced cellularity observed in the absence of T β RIII (Figure 4A). In fact, analysis of cell numbers in T β RIII^{-/-} FTOCs at day 7 clearly show a significant decrease of DP and consequently in CD4SP and CD8SP thymocytes (Figure 4C). No differences in cell numbers between T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi were observed at day 3 of culture. (Figure 4C). This reduction in thymus cellularity is more pronounced in T β RIII^{-/-} FTOCs than under anti-T β RIII blocking conditions, suggesting that the antibody might not completely block all the available T β RIII (membrane bound and/or soluble) or alternatively, it may only affect membrane bound T β RIII-mediated actions, while in T β RIII deficient thymocytes, also ligand-independent functions are absent, resulting in a more marked phenotype.

Although the kinetics are different, our results show that DN-DP transition is decreased when T β RIII signaling is compromised by use of blocking antibodies or by genetic deletion of the receptor. These data support the notion that T β RIII regulates DN-DP transition during thymocyte differentiation. In line with these findings, despite to the difficulty to discriminate the contribution of T β RIII in the actions mediated by each ligand during thymocyte development, we have recently demonstrated that inhibin α ^{-/-} thymic lobes [7] also show reduced thymocyte numbers and a delayed DN-DP transition. We propose that T β RIII and inhibins may function as a molecular pair to regulate T cell differentiation, a functional association observed in other cell types [35].

Increased Apoptosis in the Absence of T β RIII

Enhanced apoptosis of thymocytes in T β RIII^{-/-} thymic lobes might be the mechanism responsible for the impaired DN-DP transition and the reduced cellularity observed during thymocyte differentiation. This prediction arises from the study of fetal liver of T β RIII null embryos, which showed increased apoptosis associated with a significant reduction in cellularity in liver [10]. To directly test this, we analyzed the extent of ongoing apoptosis at day 7 of culture by measuring the levels of the active form of caspase 3 in all thymocyte subpopulations (Figure 5A). Interestingly, we observed a significant increase in the percentage of active caspase 3⁺ cells in the DN, DP and CD4⁺ SP subpopulations from T β RIII^{-/-} fetal thymi compared to wild type thymi (Figure 5A). In accordance, MFI for active caspase 3 also showed an increase in this apoptotic mediator in DP and DN subpopulations, although

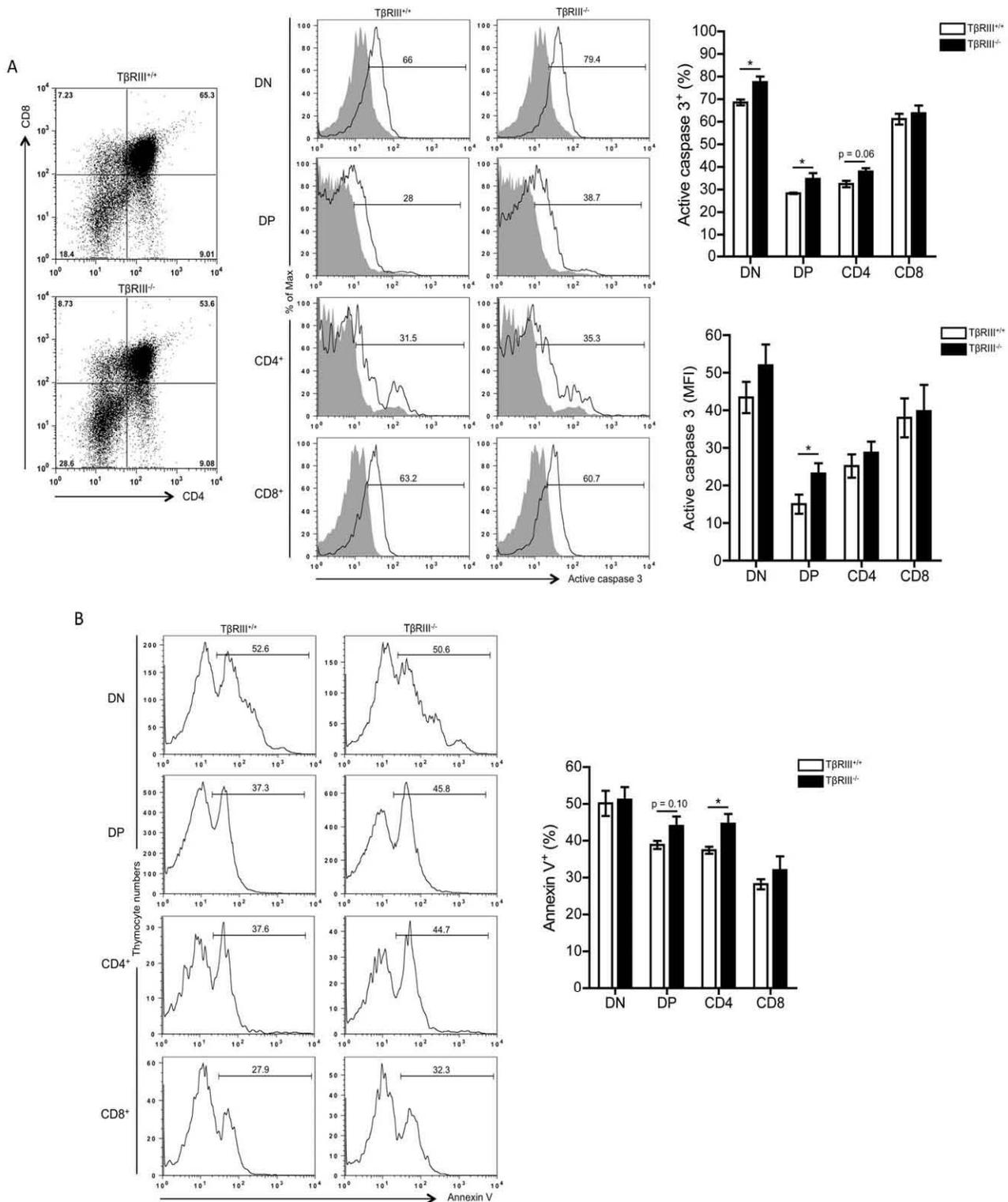


Figure 5. T β RIII deficiency results in increased apoptosis of developing thymocytes. (A) Left panel, representative CD4 versus CD8 staining dot plots from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymic lobes at day 7 of culture. Histograms show the expression of active caspase 3⁺ cells in each gated thymocyte subset. Right panel, graphs represent the percentage of active caspase 3⁺ cells and the levels of expression (MFI values) in each thymocyte subset. Data are representative of three independent experiments. (B) Left panel, representative histograms show the percentage of Annexin V⁺ cells in gated thymocyte subsets. Right panel, graph shows the analysis of the percentage of Annexin V⁺ cells in thymocytes from day 7 T β RIII^{+/+} or T β RIII^{-/-} FTOCs. Data are representative of two independent experiments. Mean values \pm SEM are shown (T β RIII^{+/+} n=3 and T β RIII^{-/-} n=3). Asterisks indicate statistically significant differences (** p \leq 0.05). doi:10.1371/journal.pone.0044217.g005

the latter did not reach statistical significance, suggesting that DP thymocytes are more susceptible to die in T β RIII^{-/-} fetal thymi (Figure 5A). In addition, annexin V staining confirmed the increased apoptosis of DP and CD4⁺ SP thymocytes in the absence of T β RIII (Figure 5B).

In agreement with our data, several findings highlight a crucial role for T β RIII as a regulator of apoptosis including the higher levels of caspase 3 and downregulation of the prosurvival factor Akt, which impact the integrity and function of liver [10]. In addition, overexpression of T β RIII leads to protection of cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis by reversing caspase 3 activation, Bax upregulation and inducing Bcl-2 downregulation [36].

Although most of the functions mediated by T β RIII may involve the interaction with TGF β members, we cannot rule out additional functions mediated by the intracellular domain of this co-receptor, as it has been recently involved in cell migration and apoptosis in a ligand independent fashion [37,38]. Indeed, after shedding of the T β RIII ectodomain, the resulting transmembrane-cytoplasmic domain is cleaved by γ -secretase, influencing the TGF β signaling response [39]. Thus, we may argue that this T β RIII cytoplasmic domain could trigger transduction signals in a similar fashion as Notch [40], acting as novel regulator of early T cell differentiation.

In summary, our data provide the first evidence that T β RIII plays a key role during T cell development: it is differentially expressed during T cell ontogeny and regulates DN-DP transition by protecting thymocytes from apoptosis. However, many questions remain unanswered concerning the role of T β RIII in T cell immunobiology. Indeed, since TGF β is a critical regulator of T cell-mediated immunity, it is feasible to propose that the described effects of TGF β members in immune cells may be regulated by T β RIII. In this sense, the generation of conditional knockout models for T β RIII will allow us to elucidate the function of this receptor in specific cell types, including mature T cell populations.

Supporting Information

Figure S1 T β RIII is expressed in lymphoid cells. (A) Western blot assay of cell lysates obtained from thymus, spleen and lymph nodes, probed with monoclonal anti-T β RIII antibody. A band of a molecular weight of 100 kDa, corresponding to T β RIII core protein, was visualized in all samples tested. The bottom blot shows the corresponding loading control with anti- β -actin antibody, which detects a band of 42 kDa. (B) Analysis of specificity of T β RIII antiserum in T β RIII^{-/-} fetal thymi. Upper panel, histograms show expression of T β RIII in gated DN and DP thymocytes from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi at day 3 of culture. Lower panel, representative histograms showing the detection of T β RIII in gated DN, DP, and SP thymocytes from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi at day

7 of culture. (C) Detection of surface T β RIII expression on thymocytes after competition with soluble form of T β RIII (T β RIIIs). Histograms show T β RIII staining in gated DN, DP and SP thymocytes in the presence of increasing doses of T β RIIIs. (TIF)

Figure S2 Analysis of thymocyte cellularity and DN immature subsets at days 3 and 7 of culture in the presence of T β RIII-blocking antibodies. (A) Comparative graphs showing the numbers of total thymocytes obtained after 3 and 7 days of culture of E14 fetal thymic lobes, treated with anti-T β RIII or pre-immune antiserum (control lobe). (B) Left panel, representative CD44 versus CD25 staining dot plots are shown to compare the effects of both treatments. (C) Comparative graphs show the percentages of DN1, DN2, DN3, and DN4 immature thymocytes obtained at day 3 and 7 of culture. (D) Graphs show absolute cell numbers of DN immature subsets at day and 7 of culture, treated with anti-T β RIII or pre-immune antiserum. Data are representative of two independent experiments. Mean values \pm SEM are shown (n = 7 per group for day 3, and n = 9 per group for day 7). Asterisks indicate statistically significant differences (* p \leq 0.05). (TIF)

Figure S3 Analysis of DN immature subsets in T β RIII^{-/-} fetal thymi at days 3 and 7 of culture. DN immature thymocytes from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} E14 fetal thymic lobes cultures were analyzed at day 3 and 7 of culture. (A) Left panel, representative CD44 versus CD25 staining dot plots are shown to compare the percentages between both genotypes. Right panel, comparative graphs show the percentages of DN1, DN2, DN3, and DN4 immature thymocytes obtained at day 3 and 7 of culture. (B) Graphs show absolute cell numbers of DN immature subsets from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi at day 3 and 7 after culture. Data are representative of three independent experiments. Mean values \pm SEM are shown, T β RIII^{+/+} n = 17 and T β RIII^{-/-} n = 16. Asterisks indicate statistically significant differences (* p \leq 0.05). (TIF)

Figure S3 Analysis of DN immature subsets in T β RIII^{-/-} fetal thymi at days 3 and 7 of culture. DN immature thymocytes from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} E14 fetal thymic lobes cultures were analyzed at day 3 and 7 of culture. (A) Left panel, representative CD44 versus CD25 staining dot plots are shown to compare the percentages between both genotypes. Right panel, comparative graphs show the percentages of DN1, DN2, DN3, and DN4 immature thymocytes obtained at day 3 and 7 of culture. (B) Graphs show absolute cell numbers of DN immature subsets from T β RIII^{+/+} and T β RIII^{-/-} fetal thymi at day 3 and 7 after culture. Data are representative of three independent experiments. Mean values \pm SEM are shown, T β RIII^{+/+} n = 17 and T β RIII^{-/-} n = 16. Asterisks indicate statistically significant differences (* p \leq 0.05). (TIF)

Acknowledgments

We thank BSc Ramses Chávez, MVZ Georgina Díaz and MVZ Jorge Omar García Rebollar for animal care assistance. German Rodrigo Aleman (GR) was a student in the PhD program: Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GS. Performed the experiments: GRAM. Analyzed the data: GRAM EAGZ CR GS. Contributed reagents/materials/analysis tools: VM KS EAGZ FLC GS. Wrote the paper: GRAM GS. 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Authorship and Contributorship'.

References

- Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597–641.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY (2006) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood) 231: 534–544.
- Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S (2002) Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191: 1–16.
- Licona-Limon P, Soldevila G (2007) The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunol Lett* 109: 1–12.
- Varas A, Hager-Theodorides AL, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG, et al. (2003) The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* 24: 197–206.
- Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G (2006) Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* 235: 1124–1132.
- Licona-Limon P, Aleman-Muench G, Chimal-Monroy J, Macias-Silva M, Garcia-Zepeda EA, et al. (2009) Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 229–235.
- Mythreya K, Blobel GC (2009) The type III TGFbeta receptor regulates directional migration: new tricks for an old dog. *Cell Cycle* 8: 3069–3070.
- Gatza CE, Oh SY, Blobel GC (2010) Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cellular signalling* 22: 1163–1174.
- Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, et al. (2003) Heart and liver defects and reduced transforming growth factor

- beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23: 4371–4385.
11. Sarraj MA, Escalona RM, Umbers A, Chua HK, Small C, et al. (2010) Fetal testis dysgenesis and compromised Leydig cell function in Tgfb3 (beta glycan) knockout mice. *Biology of reproduction* 82: 153–162.
 12. Walker KA, Sims-Lucas S, Caruana G, Cullen-McEwen L, Li J, et al. (2011) Betaglycan is required for the establishment of nephron endowment in the mouse. *PLoS One* 6: e18723.
 13. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435–1444.
 14. Esparza-Lopez J, J. L Montiel, M. M Vilchis-Landeros, T Okadome, K Miyazono, Lopez-Casillas F (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 276: 14588–14596.
 15. Lopez-Casillas F, Riquelme C, Perez-Kato Y, Ponce-Castaneda MV, Osses N, et al. (2003) Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 278: 382–390.
 16. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA (1995) Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2. *J Biol Chem* 270: 13567–13572.
 17. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV (1999) Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283: 2080–2082.
 18. KirkbrideKC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 283: 7628–7637.
 19. Stenvers KL, Findlay (2010) Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21: 174–180.
 20. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, et al. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411–414.
 21. Chapman SC, Bernard DJ, Jelen J, Woodruff TK (2002) Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 196: 79–93.
 22. Wiater E, Vale W (2003) Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 278: 7934–7941.
 23. Looyenga BD, Wiater E, Vale W, Hammer GD (2010) Inhibin-A antagonizes TGFbeta2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGFbeta coreceptor betaglycan. *Mol Endocrinol* 24: 608–620.
 24. Farnworth PG, Wang Y, Escalona R, Leembruggen P, Ooi GT, et al. (2007) Transforming growth factor-beta blocks inhibin binding to different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan. *Endocrinology* 148: 5355–5368.
 25. Ethier JF, Farnworth PG, Findlay JK, Ooi GT (2002) Transforming growth factor-beta modulates inhibin A bioactivity in the LbetaT2 gonadotrope cell line by competing for binding to betaglycan. *Mol Endocrinol* 16: 2754–2763.
 26. Kadin ME, Cavaille-Coll MW, Gertz R, Massague J, Cheifetz S, et al. (1994) Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6002–6006.
 27. Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J, et al. (2007) Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 17: 492–503.
 28. Buckham Sporer KR, Burton JL, Earley B, Crowe MA (2007) Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. *Vet Immunol Immunopathol* 118: 19–29.
 29. Brooks SP, Bernstein ZP, Schneider SL, Gollnick SO, Tomasi TB (1998) Role of transforming growth factor-beta1 in the suppressed allostimulatory function of AIDS patients. *Aids* 12: 481–487.
 30. Slimani H, Charneau N, Mbemba E, Saffar L, Vassy R, et al. (2003) Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1617: 80–88.
 31. Schick BP, Jacoby JA (1995) Serglycin and betaglycan proteoglycans are expressed in the megakaryocytic cell line CHRF 288-11 and normal human megakaryocytes. *J Cell Physiol* 165: 96–106.
 32. Sarraj MA, Chua HK, Umbers A, Loveland KL, Findlay JK, et al. (2007) Differential expression of TGFBR3 (betaglycan) in mouse ovary and testis during gonadogenesis. *Growth Factors* 25: 334–345.
 33. Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P (2003) Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol* 15: 1401–1414.
 34. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merckenschlager M (2002) The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 196: 163–171.
 35. Stenvers KL, Findlay JK (2010) Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* 21: 174–180.
 36. Chu W, Li X, Li C, Wan L, Shi H, et al. (2011) TGFBR3, a potential negative regulator of TGF-beta signaling, protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 226: 2586–2594.
 37. Myhre K, Blobe GC (2009) The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8221–8226.
 38. Margulis V, Maity T, Zhang XY, Cooper SJ, Copland JA, et al. (2008) Type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediates apoptosis in renal cell carcinoma independent of the canonical TGF-beta signaling pathway. *Clin Cancer Res* 14: 5722–5730.
 39. Blair CR, Stone JB, Wells RG (2011) The type III TGF-beta receptor betaglycan transmembrane-cytoplasmic domain fragment is stable after ectodomain cleavage and is a substrate of the intramembrane protease gamma-secretase. *Biochimica et biophysica acta* 1813: 332–339.
 40. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ (2010) Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annual review of immunology* 28: 343–365.