



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la señalización diferencial a través del receptor CCR7 en
respuesta a CCL19 y CCL21 en linfocitos T

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. BERENICE MARTINEZ CUATEPOTZO

Tutor principal:
Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Miembros del comité tutor:
Dr. Enrique Ortega Soto
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
Dra. Martha Robles Flores
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D. F. ENERO, 2015



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.

INDICE

Abreviaturas	3
Resumen	1
Introducción	2
Sistema inmune	2
Quimiocinas y sus receptores	2
Señalización de receptores de quimiocinas	5
Familia de las cinasas de Janus	6
Activación de la vía Jak-Stat	8
Fenotipo de los ratones Jak3 ^{-/-}	10
Inhibidor específico de Jak3: WHI-P131	11
Tráfico linfocitario	12
<i>Órganos linfoides primarios: desarrollo de linfocitos T en el timo</i>	12
<i>Órganos linfoides secundarios: activación de linfocitos T</i>	12
Antecedentes	14
Remodelación del citoesqueleto durante la migración	14
Proteínas que controlan la remodelación del citoesqueleto de actina	16
GTPasas pequeñas	17
<i>Rho-A</i>	19
<i>Rac y Cdc42</i>	19
LIMK1/2	21
ADF/cofilina	21
CCR7 y sus ligandos en la migración a ganglios linfáticos	23
JAK3 y citoesqueleto	25
Justificación	28
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	29
Metodología	29
Anticuerpos	29
Reactivos	29
Animales	29
Obtención de linfocitos	30
Determinación de fosforilación de Jak3	30
Tratamiento con inhibidores	30
Ensayos de polimerización de actina por citometría de flujo	31
Ensayos de microscopía confocal	31
Tinción para microscopía confocal	31
Separación de células CD4 ⁺ por perlas magnéticas	31
Análisis estadístico	32
Resultados	32
1.- Determinación de fosforilación de Jak3 por citometría de flujo	32
2. Fosforilación de Jak3 por Western Blot	35
3.- Polimerización de actina	36
4.- Activación de Rac-1	38
5.- Activación de Cdc42 GTP	41
6.- Activación de Rho-A	42
7.- Fosforilación de cofilina (serina 3)	43
Discusión	45
Conclusiones	49
Perspectivas	49
Bibliografía	50
Anexo 1	58
Anexo 2: Soluciones utilizadas	59
Anexo 3: concentraciones de quimiocinas	59

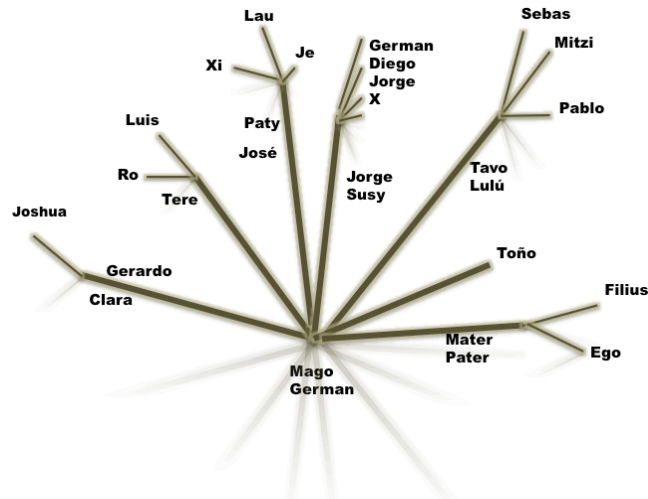
Agradecimientos

Agradezco a al "Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado" (PAEP) por su apoyo para la participación al congreso XXI Congreso Nacional de Inmunología-Querétaro 2014.

A la Doctora Gloria Soldevila por aceptarme en el grupo de trabajo.

Al los doctores Edilberto Peña y Andrés Lupian por enseñarme que el cuerpo y la psique requieren de vez en cuando un ajuste. La ansiedad y otros trastornos empañan nuestras virtudes, pero la depresión podría lapidarlas.

A mi familia, cuya tolerancia es inmensa: mamá Bety, a mi hermano y papá. Claro, también a



por forjarme como la persona que soy.

A Xoch y Rox por enseñarme mucho.

A Yudi, Fanny, Jesús y Ray por siempre está y mostrar que significa la amistad.

A todos los compañeros del lab por participar en mi enseñanza.

A Castelán y toda la gente de foto por enseñarme que uno puede tener más habilidades.

Y a toda la gente que omití, porque aunque no están en una hoja, sí están en mi subconsciente.



Abreviaturas

APC : alofococianina	mTEC :Célula estromal tímica
Arp2/3: proteínas relacionadas de actina	NK: natural killer
CD: "cluster" diferenciación	NK :célula asesina natural
DC: célula dendrítica	PAK: p21-activated kinase
DN : timocitos doble negativos	PD-1:receptor de muerte programada 1
EPO: eritropoyetina	PE: ficoeritrina
FAK-: cinasa de adhesión focal	PFA: paraformaldehido
FERM: Four point one/ Ezrin/ Radixin/ Moesin	PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
FITC: Isocianato de fluoresceína	PKC: fosfocinasa C
GDP- Guanosín difosfato	Prl: prolactina
Gh: HORMONA DE CRECIMIENTO	Psgl1: P-selectin glycoprotein ligand-1
GRK: cinasa de receptores acoplados de protinas G	PTX- toxina pertussis
GTP: Guanosín trifosfato	Rpm-revoluciones por minuto
HEV: vénulas del endotelio alto	S1p: Esfingocina 1-fosfato
ICAM: molécula de adhesión intracelular -1	SCID: "Severe combined immunodeficiency"
IL: Interleucina	SH2: dominio de homología a src 2
IFN: Interferón	SP: Timocitos simple positivos
Jak: cinasa Janus	STAT: "Signal Transducer and Activator of Transcription"
KO: knockout	TCR: receptor de células T
LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen-1	TGFB: Factor de crecimiento transformante
MAdCAM: "Addressin also known as mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1"	WASP: "Wiskott-Aldrich syndrome protein"
MAPK: "mitogen activated protein kinase"	WAVE: "WASP-family verprolin-homologous protein"
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad	WHI-P131 : [4-(4*-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline]

Resumen

CCL19 y CCL21 son quimiocinas necesarias para el "homing" a linfocitos. Aunque ambas tienen igual afinidad por su receptor (CCR7), se sabe que existen diferencias: una concentración mayor en ganglios de CCL21 que de CCL19; unión a glicosaminoglicanos por parte de CCL21; internalización del receptor y rápida extensión de dendritas por CCL19.

Por otra parte, en trabajos anteriores se había demostrado que la estimulación con CCL19, CCL21 y CXCL12 es dependiente de Jak3, provocando la activación de cascadas de señalización que permiten la activación de GTPasas como Rac-1, Rho-A y cofilina, además de polimerización de actina. Sin embargo se desconoce si dicha activación es igual para CCL19 y CCL21 en linfocitos T.

En el presente trabajo se estudiaron las diferencias en la activación de las GTPasas Rac-1, Cdc42 y Rho-A, así como en cofilina y la cinética de polimerización de actina.

Se encontraron cinéticas similares de F-actina, la cual en un primer momento depende de Cdc42 y en el caso de la estimulación con CCL21 da un "loop" de activación rápido a Rac-1, lo que permite la formación del frente de migración; mientras que cuando los linfocitos se estimulan con CCL19 la activación sostenida de Cdc42 genera filopodios.

Existe un retraso en la formación del fenotipo migratorio en los linfocitos T estimulados con CCL19, lo cual coincide con la lenta activación de Rho-A.

Introducción

Sistema inmune

El sistema inmune es un conjunto de órganos (compuesto a su vez de moléculas, células, tejidos) que se encargan de la respuesta colectiva y coordinada frente a patógenos, además de mantener tolerancia a lo propio [1]. Se clasifica como inmunidad innata aquella que da una primera defensa contra lo extraño y depende del reconocimiento de características comunes de los patógenos (no es antígeno específica); se compone de barreras fisicoquímicas, moléculas secretadas y células fagocíticas. Posterior a la respuesta innata, se manifiesta la respuesta inmune adaptativa, caracterizada por ser antígeno-específica. Además, la respuesta adaptativa no es inmediata, toma días para desarrollarse, ya que los linfocitos T y B deben encontrar primero a su antígeno específico, proliferar y diferenciarse hacia células efectoras. Otra característica de esta respuesta inmunológica es la capacidad para responder de forma más rápida ante la presencia de un antígeno previamente presentado, es decir se tiene una memoria inmunológica [2].

Los órganos linfoides son tejidos donde los linfocitos tienen interacciones con las células no linfoides que son importantes para su desarrollo o en el inicio de las respuestas inmunes adaptativas. Los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo; es importante señalar que tanto los linfocitos T como los B se originan en la médula ósea, pero sólo los linfocitos B maduran en ella mientras que los linfocitos T migran de la médula ósea hacia el timo donde maduran. Cuando han completado su maduración, ambos tipos celulares migran hacia los órganos linfoides secundarios.

Los antígenos de periferia son adquiridos por las células presentadoras de antígenos (APC) y luego presentados en los órganos linfoides secundarios (SLO) y además los linfocitos que nunca ha sido estimulados por su antígeno (naïve) recirculan a través de los órganos linfoides secundarios presentado en el contexto de estimulación adecuado, con ello la respuesta inmune adaptativa no es iniciada en el sitio donde el patógeno establece el foco de infección, sino en los órganos linfoides secundarios como los ganglios, el bazo, los tejidos linfoides asociados a la mucosa como placas de Peyer, las amígdalas, los adenoides y el apéndice [1].

Quimiocinas y sus receptores

Las quimiocinas constituyen una gran familia (tabla 1) de proteínas de bajo peso molecular (de 8 a 12 kDa) estructuralmente relacionadas, cuya función principal junto con los receptores de adhesión es dirigir la migración leucocitaria. Las quimiocinas pueden ser consideradas como factores de organización del sistema inmune ya que coordinan la arquitectura microambiental de los órganos linfoides primarios y secundarios tanto en condiciones

homeostáticas como en patológicas. Las quimiocinas también participan en la angiogénesis, organogénesis de los órganos linfoides primarios y secundarios, curación de heridas, metástasis en la activación de las integrinas, y poseen actividad microbiana y antiviral [3].

Tabla1. Clasificación de quimiocinas y sus receptores. Tomado de [4]

CXC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CXCL1	4q12-q13	GRO α /MGS α - α	GRO/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β /MGS α - β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO γ /MGS α - γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Unknown
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Unknown	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Unknown	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unknown	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	Unknown	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
(CXCL15)	Unknown	Unknown	Lungkine	Unknown
C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
XCL1	1q23	Lymphotactin/SCM-1 α /ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q23	SCM-1 β	Unknown	XCR1
CX ₃ C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CX3CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
CC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)	Unknown	Unknown	C10, MRP-1	Unknown
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3
(CCL9/10)	Unknown	Unknown	MRP-2, CCF18 MIP-1 γ	Unknown
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)	Unknown	Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Unknown	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Unknown	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	Unknown	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1/PARC AMAC-1	Unknown	Unknown
CCL19	9p13	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Unknown	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2/Eotaxin-2	Unknown	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Unknown	CCR3
CCL27	9p13	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESkin	CCR10*

La familia de las quimiocinas consta de 50 miembros con secuencias altamente conservadas, por lo cual se pueden clasificar en 4 subfamilias (figura 1). Las quimiocinas de tipo CXC, se caracterizan por tener dos cisteínas separadas por un aminoácido, mientras que en la subfamilia CC se encuentran contiguas. La subfamilia XC que carecen de dos de las cuatro cisteínas conservadas y CX3CL1 en la cual tres aminoácidos separan las cisteínas [5].

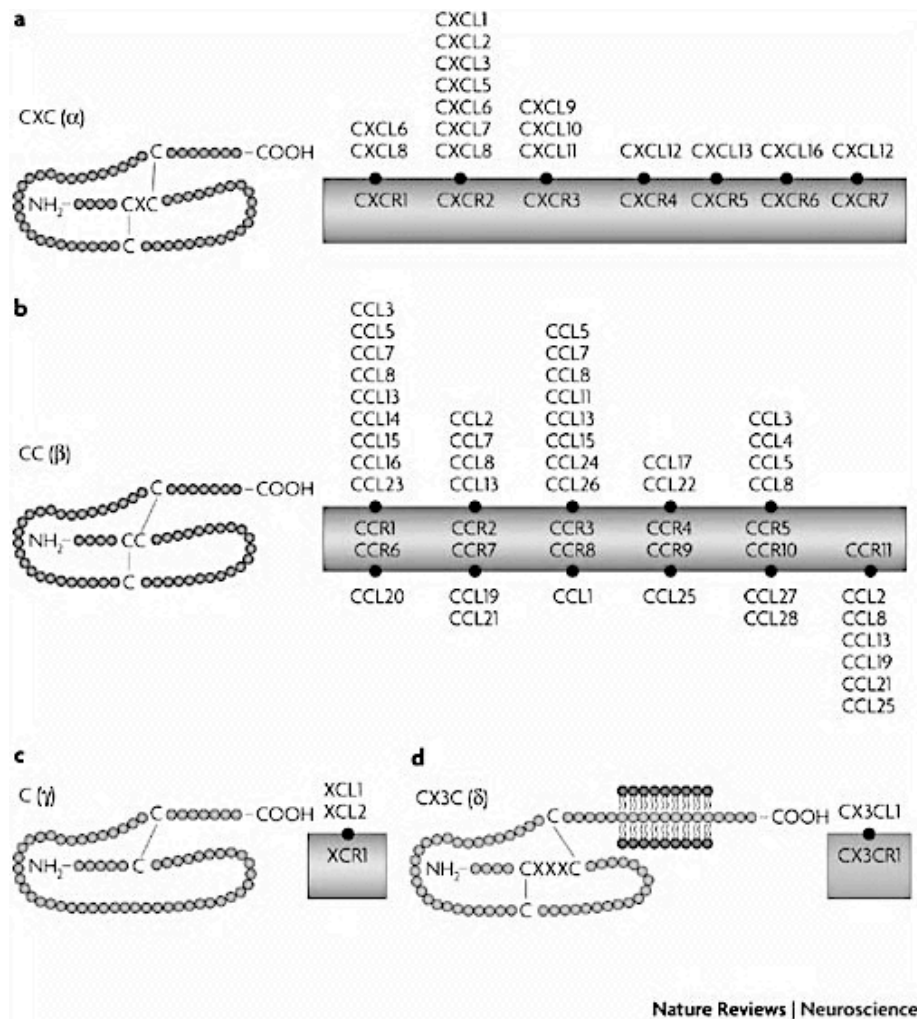


Figura 1.-Representación esquemática de los cuatro grupos de quimiocinas. Las quimiocinas son pequeñas proteínas con una homología entre el 20 y 90% en sus secuencias. Su peso molecular es entre 8 y 14 kDa. Se subdividen en 4 familias, basados en el número y espaciado entre los residuos de cisteína conservados en su extremo amino. Estas familias son CXC, CC, C y CX3C. En el caso de CXC (a), un aa separa los primeros dos residuos de cisteína (cisteína-X aa-cisteína, o CXC). En CC (b), los dos residuos de cisteína están adyacentes uno del otro. En la subfamilia C (c) se distingue estructuralmente por tener solo dos de las 4 residuos de cisteína conservadas que se encuentran en las otras subfamilias. La subfamilia CX3C, está representada por un solo miembro llamado fractalcina (CX3CL1), se caracteriza por presentar tres aa entre las primeras dos cisternas, así como un dominio de tipo mucina (d) [6].

Las quimiocinas tienen una estructura terciaria conservada, con un asa en el extremo amino terminal, seguido de tres hojas beta plegadas anti-paralelas interconectadas por asas, y una hélice alfa en el extremo carboxilo-terminal. Las quimiocinas forman dímeros y tetrámeros a concentraciones fisiológicas, lo que les permite interactuar con glicosaminoglicanos (GAGs) altamente sulfatados, como heparán sulfato [7].

Las quimiocinas ejercen sus efectos mediante la interacción con receptores celulares de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Se han reportado 18 receptores de quimiocinas, hay algunos que unen más de un ligando. Estos receptores se conforman de aproximadamente 350 aminoácidos con un peso molecular de cerca de 40 kDa. El dominio extracelular consiste del amino-terminal y tres asas extracelulares que actúan en conjunto para unir al ligando. La región intracelular se compone de tres asas y el extremo carboxi-terminal. Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores tipo rodopsina de clase A. Tienen una secuencia conservada DRYLAIV en la segunda asa intracelular y una

cisteína conservada en el extremo amino-terminal y otra en la tercer asa extracelular. Usando receptores quiméricos se ha determinado que el dominio amino-terminal es el responsable de la selectividad por el ligando [2,6,8].

Interesantemente, el estado de activación de las células puede regular la expresión de receptores de quimiocinas a nivel transcripcional, y que en esta modulación también participan factores solubles presentes en el ambiente como citocinas [3].

Señalización de receptores de quimiocinas

El modelo clásico de señalización de quimiocinas (figura 2) indica que cuando ésta se une a su receptor, la proteína Gi heterotrimétrica (subunidades α , β , γ) es activada y el complejo se disocia en α y $\beta\gamma$, posterior a la unión de la quimiocinas a su receptor dimérico, lo cual se debe a que activación del receptor provoca un intercambio de GDP unido a la subunidad $G\alpha$ [3]. Las subunidades β llevan a la activación de fosfolipasa C que genera dos segundos mensajeros: inositol(1,4,5)-trifosfato y diacilglicerol. Por su lado la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI3K) genera fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato e inicia la activación de cascadas que tienen como fin la proteína cinasa B y la proteína cinasa de activada por mitógeno (MAPK) [9]. La subunidad $G\alpha_i$ unida a GTP se une al receptor mediante su interacción con una o varias asas intracelulares. El IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico provocando la movilización de Ca^{2+} que en conjunto con el DAG activa varias isoformas de la proteína cinasa C (PKC), misma que después activa una cascada de señalización intracitoplásmica y en el núcleo. El complejo $G\beta\gamma$ también actúa como una proteína de andamiaje que facilita la interacción del receptor con otras vías, como la de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) que están involucrados en la desensibilización del receptor [10].

La subunidad $G\alpha$ es una GTPasa, así que cuando el GTP se encuentra unido a ella es hidrolizado, se induce la disociación de $G\alpha$ de sus efectores y la reasociación de ésta con las subunidades $G\beta\gamma$ da un apagado de la vía, apagando así las vías de señalización inducidas por las proteínas G. La baja tasa de hidrólisis de GTP por las proteínas $G\alpha$ es regulada por interacciones con proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) que regulan negativamente la señalización por proteínas G [2,11] .

La actividad de PI3K está relacionada con la adhesividad de integrinas, migración celular y polarización. La proteína cinasa de adhesión focal (FAK) se fosforila en respuesta a la estimulación del receptor con quimiocina por su ligando, lo que le permite asociarse con la subunidad p85 de PI3K [5]. La activación de FAK induce la fosforilación de proteína del citoesqueleto paxilina y la asociación con su receptor. La inhibición de la activación de PI3K impide la polarización de moléculas de adhesión de varias proteínas de citoesqueleto como ezrina/radixina/moesina, otros efectores de PI3K incluyen GTPasas como Rho, Rac y Cdc42

que participan en la regulación del rearreglo del citoesqueleto de actina y adhesión celular [12,13].

Se sabe que receptores de quimiocinas como CCR2, CCR5 y CXCR4 se dimerizan con la unión de su ligando, lo que lleva a la iniciación de las cascadas de señalización inducidas por los receptores de quimiocinas. Esta dimerización induce la activación de varios miembros de la vía de cinasas de Janus y de los factores de transcripción STAT (Signal Transducers and Activator Transcription Factors) [14,15].

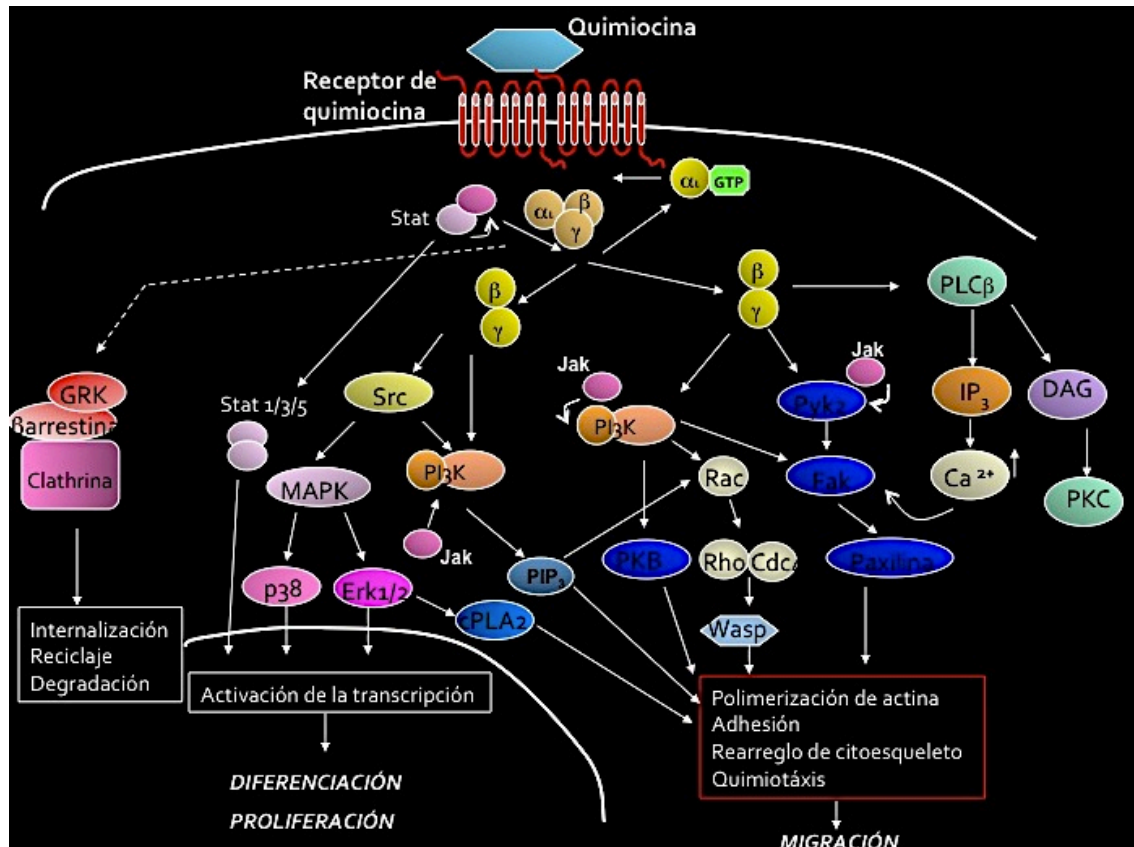


Figura 2. Señalización de quimiocinas. La unión de las quimiocinas a su receptor provocan la dimerización del receptor y la activación de cascadas de señalización como Jak/Stat, así como la activación de la proteína G. Las funciones inducidas son diferenciación, proliferación y migración [3].

Familia de las cinasas de Janus

La familia de las cinasas de Janus (Jaks) son cinasas de tirosina que en mamíferos están compuestas por cuatro miembros Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. En ratones Jak1 se localiza en el cromosoma 4; Jak2 en el 19; Jak3 y Tyk2 en el cromosoma 8; se sugiere que estos últimos podrían haber sido generados por duplicación debido a la cercanía [16]. Las Jaks tiene aproximadamente 20 exones, se han descrito formas alternativas del rearreglo de los exones sin embargo se desconoce sus significado [17-19].

Son proteínas relativamente grandes de más de 1100 aminoácidos, que pesan de 120 a 140 kDa. Tienen siete dominios putativos estructurales que están conservados entre las Jaks de mamíferos, aves, peces e insectos; a estos dominios se les nombra dominios Jak de homología (JH) y se enumeran del extremo carboxilotermin al aminoterminal (figura 3). El dominio JH1 corresponde al que propiamente tiene la función de tirosin-cinasa. El dominio JH2 que es una pseudocinasa cuya función se ha asociado a la regulación del dominio cinasa y una fosforilación basal que daría la inactividad. Esta arquitectura en tándem de los dominios cinasa es la característica distintiva de las cinasas de Janus. El extremo amino terminal de las Jaks contiene un dominio tipo SH2 que corresponde a los JH3 Y JH4 y un dominio de homología de la Banda 4.1, tipo ezrina, radixina, moesina (FERM) que corresponde a JH6 y JH7). Este último dominio interacciona con proteínas transmembranles como los receptores de citocinas y algunos casos regula la expresión de superficie de estos receptores [20,21].

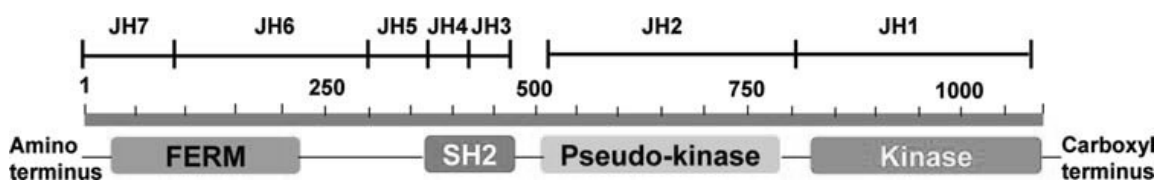


Figura 3. Dominios característicos de la familia de cinasas Janus. El dominio cinasa tiene la actividad catalítica, mientras que el dominio pseudocinasa tiene una actividad reguladora. El dominio SH2 no tiene actividad relacionada aún [20].

Esta también asociado con las cinasas de citoesqueleto, como la asociación de Jak2 con Fak, y de Jak3 con Pyk2. Además el dominio FERM se une al dominio de cinasa de Jak y regula positivamente su actividad catalítica [22].

En mamíferos Jak1, Jak2 y Tyk 2 se expresan de manera ubicua, en contraste , la expresión de Jak3 está restringida a células hematopoyéticas (tanto en humanos como en ratones) y está regulada con el desarrollo y la activación. A nivel celular las Jaks se encuentran en citosol cuando se expresan en ausencia de receptores de citocinas, pero debido a su asociación con los receptores de citocinas se localizan en membrana y en endosomas junto a los receptores [23].

Existen receptores de citocinas dependientes de Jak3, ya que está constitutivamente asociada a la gamma común (γ_c), del receptor de IL-2, por lo cual se encuentra también relacionado a otros receptores como los de IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 [24-26]. La familia de receptores de citocinas que usa la subunidad gp130 es dependiente de Jak1. Jak2 es esencial para la señalización de citocinas tipo hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), eritropoyetina (EPO), trombopoietina (TPO) y la familia de citocinas que señalizan a través del receptor de IL-3; también es importante para la señalización de citocinas que usan el receptor gp 130 y para algunos interferones. Tyk2 es esencial para la señalización de IL-2 y se ha implicado con la señalización de los receptores tipo Toll [23,27].

Los ratones deficientes de Jak1 tienen mortalidad perinatal por lo cual tiene defectos en el desarrollo y la función linfoide. Los ratones deficientes de Jak2 presentan letalidad al día 12.5

embrionario debida a defectos en la eritropoyesis. Los ratones deficientes de Tyk2 son viables y fértiles, pero presentan susceptibilidad a las infecciones parasitarias y presentan una respuesta defectuosa a LPS. La deficiencia de Jak3 se identificó por primera vez en humanos con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID, por sus siglas en inglés) [24]. Dado que la γ_c señala a través de Jak3, la deficiencia en Jak3 impide la señalización de todas las citocinas que utilizan γ_c , lo que trae como consecuencia un desarrollo y función inmune defectuoso. Las mutaciones en el receptor para IL-7, γ_c y Jak3 en conjunto son las responsables de 70% de los casos de SCID. Posteriormente se generaron ratones deficientes de Jak3 (Jak3^{-/-}) que exhiben el fenotipo SCID [17,25,28].

Activación de la vía Jak-Stat

Las Jaks están asociadas constitutivamente a regiones ricas en prolina en la región próxima a la membrana de los receptores de citocinas, aunque en algunos casos la interacción entre las Jaks y el receptor se incrementa con la unión del ligando al receptor [29]. El modelo de activación clásico de la vía de las Jaks propone que con la unión de la citocina, se promueve un cambio conformacional en el receptor que promueve la activación de Jak a través de la interacción recíproca de dos Jaks yuxtapuestas y auto o transfosforilación de residuos de tirosina en el "loop" de activación del dominio de cinasas. La autofosforilación de éste, regula positivamente la actividad de cinasa, sin embargo en Jak3 la fosforilación en esta región puede aumentar (tirosina 980) o inhibir (tirosina 981) la actividad catalítica. Otros sitios de autofosforilación que se han identificado, como el domino conservado entre los dominios JH1 y JH2 en Jak2 (tirosina 813) y Jak3 tirosina 785, que sirve para reclutar la proteína adaptadora SH2B2, que regula positivamente la actividad de Jak2. En Jak3 la autofosforilación de las tirosinas 221 y 570 están involucrados en la regulación negativa de la cinasa (figura 4) [30].

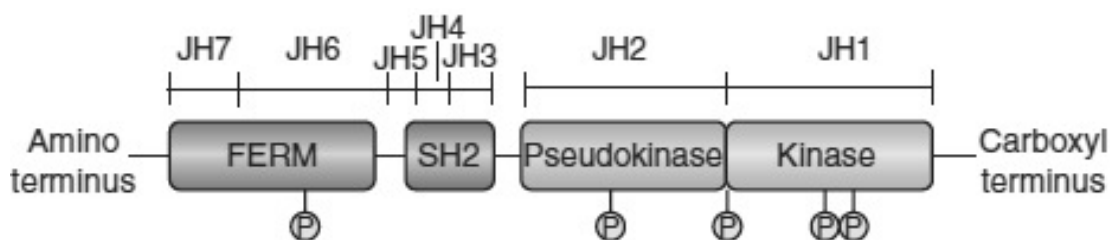


Figura 4. Jak3 tiene diferentes tirosinas fosforilables (tomado de [30]).

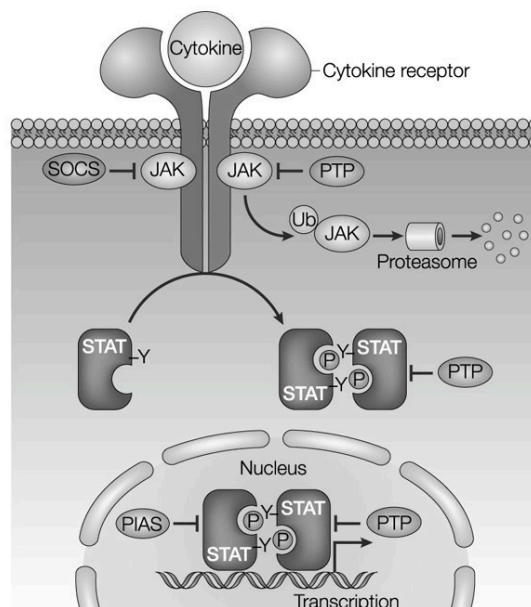
Una vez activadas las Jaks fosforilan residuos de tirosinas en los receptores generando así sitios de anclaje para los STATs que se unen a los receptores por medio de un dominio SH2. Los STATs reclutados a la membrana son fosforilados por las Jaks activadas. Los STATs fosforilados forman homo y/o heterodímeros, lo que les permite translocarse al núcleo donde regulan la expresión de varios genes, entre los que se encuentran algunas quimiocinas y receptores de quimiocinas. Esta vía es importante porque garantiza una señalización rápida de la superficie celular hacia núcleo [14].

Además de las STATs, las Jaks interaccionan con otras proteínas como PI3K en respuesta a estimulación con quimiocinas y de esta interacción depende en parte la fosforilación de algunas proteínas de adhesión focal como FAK, RAFT, p130, Crk y paxilina, importantes para la adhesión celular y la migración.

Existe evidencia de la participación de la vía de las Jaks con otras vías de señalización del linfocito T [31]. Por ejemplo, se ha mostrado la asociación de Jak3 a la cadena ζ del TCR y su activación al estimularlo. Además se ha reportado que las Jaks son activadas por una variedad de receptores estructuralmente diversos, además de los receptores de citocinas, como los receptores de muerte de la familia de CD40, de cinasa de tirosina y receptores acoplados a proteínas G como el receptor de serotonina, angiotensina y varios receptores de quimiocinas como CXCR4, CCR9, CCR7. También se ha descrito la fosforilación de miembros de la familia STAT en respuesta a estimulación con quimiocinas como CCL2 y CCL5 [3,20].

La regulación de esta vía se da por diferentes mecanismos. La degradación de las STATs es uno de los mecanismos por los cuales la vía Jak-STAT puede ser regulada negativamente. Se ha demostrado que STAT1 es un blanco de la degradación por ubiquitina/proteasoma. Algunos STATs presentan varias formas por "splicing" alternativo y degradación. STAT1 y STAT3 tiene formas truncadas que carecen de la región C terminal que se cree que actúan como dominantes negativas [15,20].

La fosfatasa de tirosina Shp-1 regula negativamente la señalización de varias citocinas y se asocia a Jak2 y Tyk2 lo que cataliza la desactivación de las Jaks, así como la desfosforilación de los residuos de tirosina, que cuando están fosforilados permiten la asociación de las STATs. También se ha demostrado asociación de Shp-2 con Jak1 y Jak2.



Nature Reviews | Immunology

Figura 5. Regulación negativa de la vía Jak/Stat. [27]

Fenotipo de los ratones Jak3^{-/-}

Los ratones deficientes de Jak3 o γc presentan severos defectos en el desarrollo de linfocitos T, B y NK, indicando que las citocinas IL2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 que señalizan a través de esa cinasa son importantes para el desarrollo normal de estos tipos celulares [32,33]. Presentan una celularidad normal en comparación a los ratones normales pero con un bloqueo en el desarrollo de células B en médula ósea, en el estadio pro-B a pre-B, dado a la ausencia de señalización por IL-7R, ya que esta promueve tanto el rearreglo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas como la proliferación por distintas vías de señalización [34]. La señalización inducida por IL-7 también es necesaria para el rearreglo de la cadena γ del TCR por lo que los ratones deficientes en Jak3 o γc no tienen linfocitos T $\gamma\delta$ [35]. El desarrollo de las células NK es dependiente de IL-15 por lo que estos ratones carecen de células NK [36]. El timo de los ratones Jak3^{-/-} contiene entre el 0.1 y el 10% del número normal de células. A pesar de este número reducido de timocitos el patrón de tinción con CD4 /CD8 es relativamente normal. Existe una disminución en los timocitos en el estadio DN1 al día 14 de gestación debido a un defecto en la llegada de progenitores de la médula ósea hacia el timo. Además presenta un bloqueo en el paso de DN a DP al día 16 de gestación [37]. El fenotipo del ratón Jak3^{-/-} es similar a los ratones deficientes e IL-7, IL-7R y γc por lo que parte del fenotipo observado se debe a la falta de señalización medida por IL-7, que actúa como un factor de supervivencia y proliferación en la etapa de DN y, en parte, la falta de señalización de receptores de quimiocinas importantes en estos estadios y que señalizan a través de Jak3 [38,39].

En contraste, la diferenciación del linaje T en timo aparentemente es normal basado en el análisis de CD4/CD8, sin embargo el timo presenta hipoplasia. Comparado con un ratón silvestre el ratón KO presenta una celularidad reducida de 10 a 100 veces, sin embargo y sorprendentemente esto da un número normal de células T en periferia. Las células T periféricas expresan altos niveles de CD44 y CD69, pero bajos niveles de CD62L, lo que se puede deber a la interrupción de la señalización de IL-2.

Este fenotipo es similar al observado en los ratones IL-7R α ^{-/-} y γc ^{-/-}, que son las cadenas que forman el receptor heterodimérico para la transducción de señales de IL-7 [39]. Esta activación parece depender de una activación por antígeno ya que ratones deficientes en Jak3 que expresan un TCR transgénico, presentan un fenotipo virgen, por lo cual parece que la activación policlonal de estos linfocitos depende de interacción con lo propio o con antígenos del ambiente. Los linfocitos de los ratones Jak3^{-/-} son anérgicos, puesto que tienen una deficiencia severa en la producción de IL-2, no responden a estímulos mitogénicos y además, son más susceptibles a la apoptosis [26,40-42].

El bazo de los ratones jóvenes deficientes en Jak3 es más pequeño que en los ratones normales aunque el número de células aumenta con la edad hasta desarrollar esplenomegalia severa [43,44]. Estos ratones además presentan defectos en mielopoiesis conforme los

ratones envejecen, como un aumento significativo de células mieloides/premonocíticas en sangre periférica, médula ósea y bazo.

Las células T y los timocitos de los ratones deficientes de Jak3 generalmente tienen una disminución de la producción de IL-2. Los defectos encontrados en la periferia de los ratones deficientes en Jak3 no son el resultado de una maduración defectuosa en el timo [26,41]. Tanto los ratones Jak3^{-/-} como los $\gamma\zeta$ carecen de NK, T $\gamma\delta$ y placas de Peyer [26,41].

La reconstitución de Jak3 utilizando el promotor proximal de Lck, no fue capaz de corregir el defecto de los linfocitos T de periferia. Al salir las células del timo pierden la expresión de Jak3 y estos ratones acumulan grandes números de células T con fenotipo activado memoria y que presentan los mismos defectos funcionales que el ratón deficiente de Jak3 [45].

Inhibidor específico de Jak3: WHI-P131

Se han desarrollado varios inhibidores para Jak3, ya que en humanos la alteración en dicha cinasa forma parte de las causas de la inmunodeficiencia combinada severa. Los inhibidores de Jak3 han sido desarrollados para actuar como inmunosupresores en trasplante de órganos o como inmunomoduladores en trastornos autoinmune [46]. Algunos de los inhibidores desarrollados son:

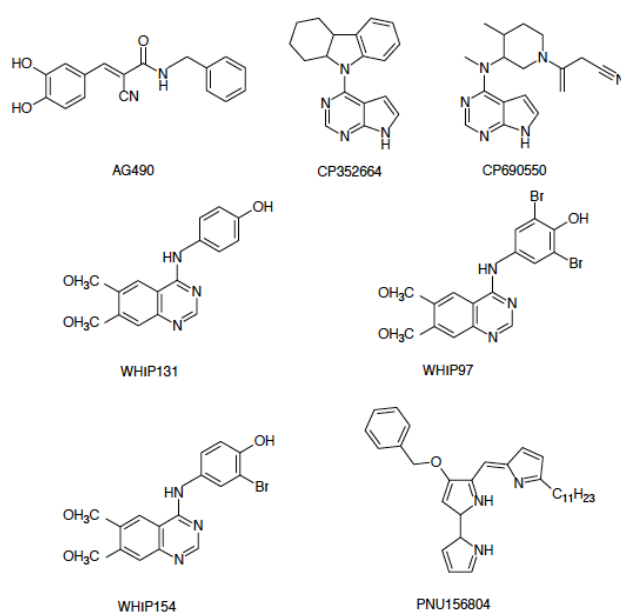


Figura 6. Inhibidores desarrollados para Jak3.

En el caso específico de WHI-P131 ha demostrado tener especificidad, es un homólogo de dimetoxiquinazol ([4-(4*-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline]). Su IC₅₀ es de 9 μ M, permitiéndole solamente actuar sobre el dominio cinasa de Jak3, pero no sobre Jak1 ni Jak2, u otras cinasas [47,48].

Tráfico linfocitario.

Órganos linfoides primarios: desarrollo de linfocitos T en el timo

El desarrollo de los linfocitos T en el timo involucra una estrecha interacción entre los timocitos y las células estromales tímicas. Durante el proceso de diferenciación de los timocitos se requiere la acción coordinada de procesos de selección dirigidos por las señales del TCR, que reconoce complejos péptido/MHC en células presentadoras de antígeno, así como la simultánea migración de los timocitos por distintos compartimentos anatómicos del timo [49].

La colonización del timo ocurre al día 11.5 del desarrollo embrionario en ratón, previo a la vascularización del timo, los precursores de los timocitos llegan al primordio tímido vía vasos sanguíneos adyacentes a éste. Se ha demostrado el papel parcial pero significativo de las quimiocinas CCL21 y CCL25 en este estadio temprano de colonización [50,51].

En ratones adultos, los pre-timocitos entran al timo adulto vascularizado por la región cortico-medular. Se ha demostrado que esta colonización está regulada por la interacción adhesiva entre la P-selectina expresada en el estroma tímico y la glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (PSGL1) en los progenitores linfoides. Los receptores de quimiocinas implicados en el reclutamiento de estos precursores no están claramente establecidos, pero se sugiere que CCR9 podría estar implicado. Recientemente, se ha demostrado que los receptores CXCR4, CCR7 y CCR9 participan redundantemente en el reclutamiento de progenitores linfoides al timo durante la etapa embrionarias [52].

Después de la entrada al timo, los timocitos migran hacia la zona subcortical donde CCR7 es requerido. En los ratones deficientes de CCR7 o para sus ligandos, las células DN1-DN2 se acumulan en la región cortico-medular, mientras que la celularidad de los timocitos en estadios DN3 y DN4 se reducen. En los timocitos DP, disminuye la expresión de CCR7 lo cual induce la migración prematura de timocitos DP hacia la médula [51].

Por otro lado, en los ratones deficientes de CCR9, los timocitos inmaduros no se acumulan en la zona subcortical, sino que se distribuyen a través de la corteza; no obstante su localización errónea, la maduración de estos timocitos hacia SP no parece tener defectos, sugiriendo que la señalización de CCR9 funciona como una señal de atracción/retención a esta zona. Interesantemente, esta migración no es un prerrequisito para el desarrollo tímico [53,54].

Órganos linfoides secundarios: activación de linfocitos T

Los linfocitos recirculan en sangre hacia órganos linfoides secundarios. Para ello, al inicio las células que se mueven por el flujo del torrente sanguíneo disminuyen la velocidad dando un rodamiento lento por la pared vascular (mediado por selectinas), hasta encontrar un estímulo en el endotelio, lo que involucra a receptores específicos (figura 7). Estos estímulos pueden ser las quimiocinas CCL19 o CCL21, esta última se encuentra inmovilizada por la unión de glicosaminoglicanos en la superficie de las HEV [55]. La señalización mediada por CCR7 induce cambios conformacionales de las integrinas $\alpha 1\beta 2$ en los linfocitos que se unen a

moléculas de adhesión celular adresa de mucosa 1(MAdCAM) expresada en las HEVs que conducen a los ganglios linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. Posterior a ello se da una locomoción celular lateral y una migración transendotelial que permite la entrada por completo de la célula [54,56].

LFA-1 activado se une a una molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y eso genera una fuerte adhesión que permite el arresto de células T en las HEV, seguido de su migración a la zona de células T (también referido como la paracorteza) de los ganglios linfáticos. Por lo tanto, CD62L , CCR7 y LFA-1 juegan un papel importante en los procesos de adhesión y trans migración de linfocitos T vírgenes o "naïve". Las células T entran selectivamente los ganglios linfáticos debido a la diferencia de receptores en cada célula, así como una compleja combinación de selectinas, quimiocinas e integrinas. Cabe señalar que el requisito de CD62L y CCR7 para la entrada a órganos linfoides secundarios no es absoluto. La $\alpha 4\beta 7$ integrina que se expresa en niveles bajos entre las células T "naïve" puede mediar el rodamiento o "rolling" y por lo tanto la adhesión en intestino. Por otra parte, una pequeña fracción de las células T de memoria se puede utilizar el receptor de quimiocina CXCR4 (CXCR4) en lugar de CCR7 al tráfico en los ganglios linfáticos aunque no se conoce por completo la repercusión de esta observación [54].

Después de la entrada a ganglios linfáticos las células reciben señales de las quimiocinas CCL19 y CCL21 solubles, lo cual aumenta la motilidad facilitando encontrar una célula dendrítica, ya que se estima que un solo linfocito T se puede tener contacto con 500 DC en una hora.

Finalmente, la esfingosina-1-fosfato (S1P) induce la quimiotaxis de las células T, que expresan su receptor (S1P1R), y se expresa abundantemente en la sangre y la linfa, pero está ausente de la zona de células T de los ganglios linfáticos y pulpa blanca esplénica, por lo cual es importante para la salida de las células T de ganglio [53].

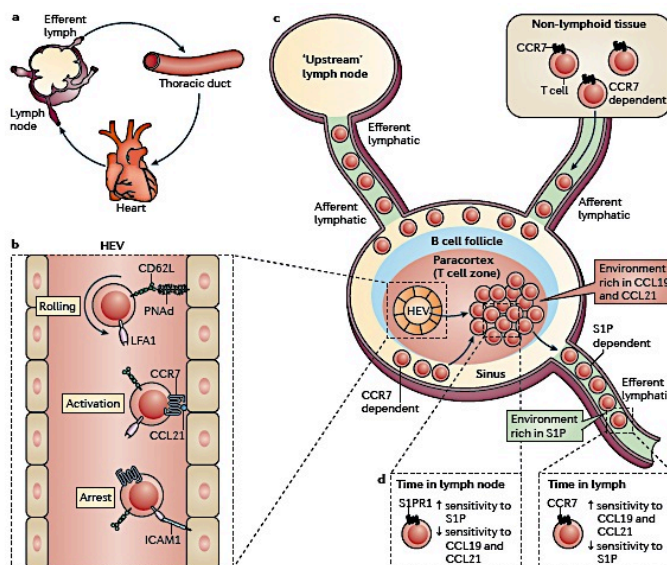


Figura 7. Llegada de linfocitos T a ganglios linfáticos. La entrada de las células T se da en las HEVs, las cuales expresan CCL21 constitutivamente, por lo cual el proceso es mediado por CCR7. La localización en la zona T también es mediada por CCL21 y CCL19 (tomado de [53]).

Antecedentes

Remodelación del citoesqueleto durante la migración

La migración celular es mediada por quimiocinas que son percibidas en diferentes concentraciones, lo que da como resultado el establecimiento de polaridad en las células y una migración direccional generada por el rearrreglo del citoesqueleto e interacciones [57] de adhesión con la matriz extracelular. Un ejemplo es CCL21, quimiocina que tiene un rol importante en la migración transendotelial de células T a órganos linfoides secundarios [53,58,59]. Se conoce que las células para el movimiento tipo ameboideo siguen una secuencia de tres pasos: el primero es la extensión de frente de migración, el segundo contracción en la región central y por último retracción del urópodo. Un linfocito T en migración se caracteriza por tener un frente de migración ("leading edge") rico en actina, una región contráctil en el centro y un urópodo adhesivo (figura 8) [60].

La extraordinaria plasticidad morfológica de los linfocitos [53] T les permite moverse rápidamente a través de tejidos sin requerir degradación de la matriz, haciendo uso del entorno tisular [61,62].

Además de las propiedades adhesivas de la ambiente, los linfocitos T se perciben quimiocinas como moléculas difusibles a reclutar selectivamente a las células a ubicaciones específicas de tejido, esto significa que son dependientes del tejido y la etapa de mismo, así como de su función. El encontrar una APC que presente un péptido que sea reconocido por su TCR se da una señal para detener el movimiento migratorio [63-65].

Las pequeñas GTPasas de la familia Rho actúan como integradores clave de los estímulos recibidos por receptores de membrana, modulando la formación del frente de migración y el úropodo [13,62,66]. Los filamentos de actina que se producen continuamente en la proximidad a la membrana plasmática, mientras que la parte trasera del lamelipodio es degradada para liberar monómeros de actina que serán reciclados [67], produciendo un flujo retrógrado de actina, este flujo genera una fuerza de tracción que permite a la célula la extensión y cruzar a través de pequeños huecos de la matriz extracelular. El frente de migración se enriquece con receptores de quimiocinas como CCR2, CCR5 y CXCR4 que permiten percibir en entorno para dirigir su migración. La integrina LFA-1 también se ha demostrado que se enriquece en el frente de migración y que su interacción con ICAM-1 permite la formación del lamelipodio [68-70].

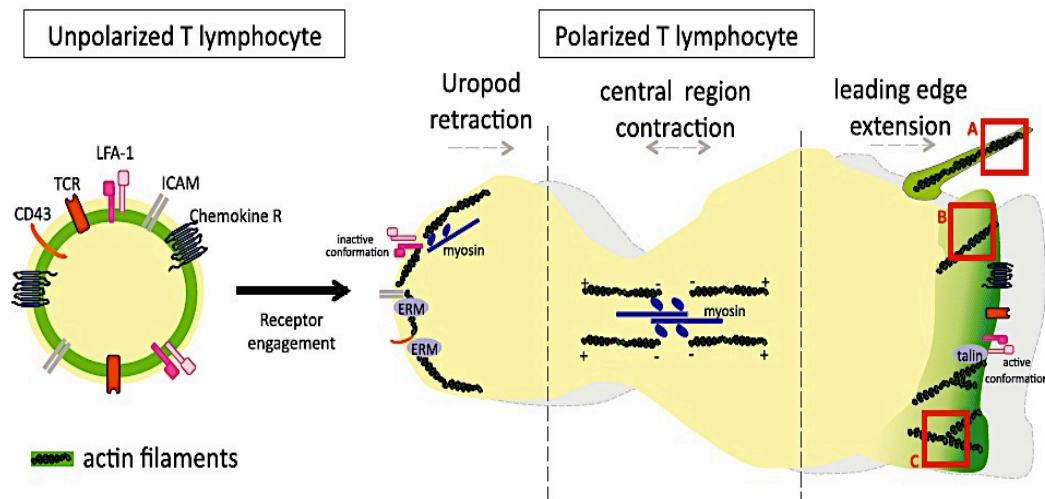


Figura 8. Polarización del linfocito T provocan cambios y reordenamiento del TCR, así como del receptor de quimiocinas (tomado de [70]).

La función del urópodo en la migración no está completamente entendida, pero se ha mostrado que tiene ciclo continuos entre adhesión, retracción y de "deadhesion" (que puede ser definido como un proceso que involucra la transición de un fuerte estado de adhesión caracterizado por puntos de adhesión focal, fibras de estrés hacia un estado de adherencia intermedia representado por la célula extendida). Moléculas como CD43, CD44 e ICAM-1, 2 y 3 se ven enriquecidas en el urópodo. Además la miosina permite la disociación de LFA-ICAM-1 y consecuentemente la extensión celular por "*deadhesion*" [64,65]. EL urópodo tiene como características una rápida extensión (outgrowth), la capacidad de recobrar su forma normal, puede alcanzar un tamaño enorme hasta seis veces el cuerpo celular, además de presencia "*ruffles*" transitorios y la capacidad para tener movimientos para escanear el ambiente circulante y las células circunvecinas, estas características fueron descritas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, en condiciones típicas a las de cultivo de linfocitos T humanos [9,71].

Proteínas como Ezrin, radixin, y moesin (ERM) tienen un papel importante relacionado el citoesqueleto de actina y las moléculas de superficie celular participando con ello en la polarización y la motilidad de los leucocitos a través de otras proteínas como vinculina, alfa actina, palidina, talina [65].

Por otra parte, la polarización del citoesqueleto está involucrada con la adhesión, extensión, fusión y migración transdotelial y presentación de antígenos [72]. *In vivo*, cuando los linfocitos T circulantes entran a órganos linfoides periféricos a través de las HEV, al inicio el "rolling" es controlado por CD62L que permite que las células puedan entrar en contacto con quimiocinas como CCL21. CCR7 induce la activación de LFA-1 por modificaciones conformacionales que dan una adhesión firme necesaria para la diapédesis [68,73]. Una vez dentro de órganos linfoides secundarios las células T explorar el microambiente en busca de

APC con antígenos afines, aunque al mismo tiempo necesita evitar la posible unión con células con antígenos no específicos que reconozca su TCR. La activación de las células T vírgenes en los órganos linfoides secundarios se produce en tres fases distintas de la motilidad: en primer lugar, los linfocitos T vírgenes establecer contactos breves sucesivos con dendrítica por medio de sus dendritas; en una segunda fase los linfocitos disminuyen su velocidad media permitiendo un contacto de larga duración de la dendrítica, y por último las células T se separan y recuperan su velocidad. El reconocimiento del TCR con el complejo péptido-MHC de APC es el evento crítico para la reorganización del citoesqueleto de actina necesario para la sinapsis inmunológica [13,66,74].

Proteínas que controlan la remodelación del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina siempre se encuentra en cambio, ya que el linfocito T siempre se encuentra monitoreando el exterior. Los monómeros de actina se encuentran unidos a β -4 timosina o a profilina y la remodelación del citoesqueleto es en parte basada en un ensamble y desensamble de estos monómeros. En un lado denominado (+), llamado en inglés "*barbed end*" de los filamentos de actina se tiene un ensamble de los monómeros de actina (polimerización o nucleación) mientras que el lado (-) o también llamado "*less pointed end*" se tiene un desensamble que da la liberación de monómeros de actina, por hidrólisis de ATP (figura 9) [75-77].

Los filamentos de actina pueden ser desensamblados y remodelados por distintas familias de proteínas como: moléculas de asociación a actina, nucleadores, proteínas de agrupación y de "capping" [78-81].

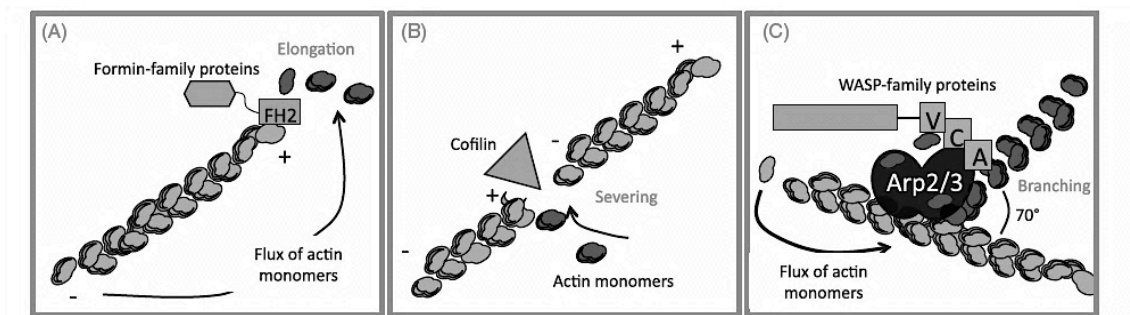
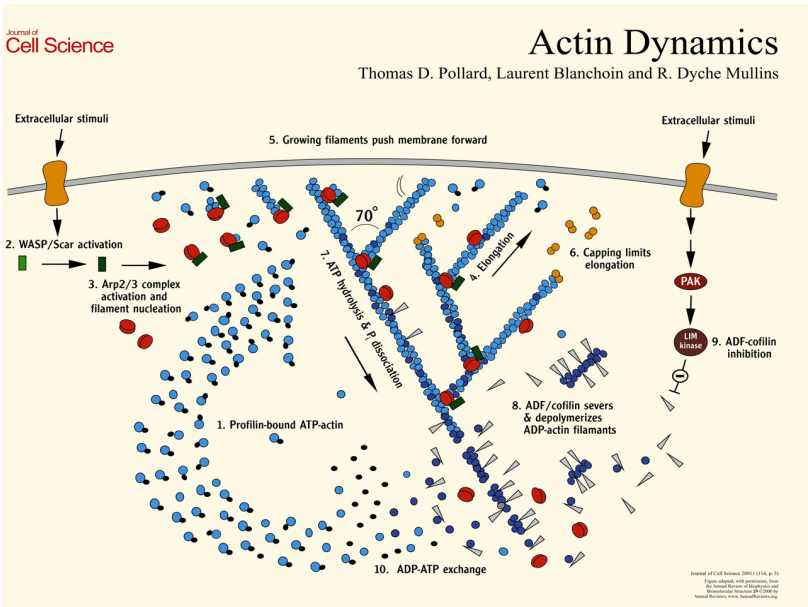


Figura 9. Dinámicas de actina mediadas por cofilina y Arp 2/3. Los filamentos de actina son polímeros de actina enlazados formando una doble hélice levógira. Cada monómero de actina tiene polaridad, lo que le confiere al filamento también la misma característica Tomado de 41.

Los nucleadores de actina (tabla 2), como el complejo Arp2/3, elongan y nuclean filamentos lineales de actina, mientras que cofilina corta filamentos de actina y los deja libres para unirse al "barbed end", esto puede generar nuevos filamentos de actina o preexistentes filamentos con un ángulo de 70° (figura 10). Esta activación es dirigida por dos familias de proteínas: WASP (Wiskott Aldrich síndrome protein) y WAVE. Que contiene un dominio homólogo a verprolina y cofilina (dominio VCA) en un extremo carboxilo terminal, que permite que se unan a monómeros de actina e interactuar con Arp2/3 [57,77,82-84].

Figura 10.- El modelo de nucleación y polimerización de actina al frente de migración de células móviles. La actina (círculos azules) al frente de migración de células migrantes se organiza en redes, con rápido crecimiento, llamados extremos barbados, proyectados hacia la membrana celular. La polimerización ocurre en los extremos barbados libres, generándose una fuerza anterógrada por el crecimiento rápido de los filamentos de actina, permitiendo la protrusión de la membrana. La iniciación de un nuevo filamento recae en el complejo Arp2/3 (círculos rojos), activado por las proteínas WASP, WAVE o SCAR (rectángulos verdes), que responden a una



variedad de señales (forma amarilla a la izquierda). Las ramificaciones se generan por la unión del complejo Arp2/3 al lado de los filamentos preexistentes. Otras moléculas también participan en la generación de estructuras dependientes de actina, las cuales dependerán del contexto celular y del estímulo de que se trate [85].

Otras proteínas como coronina-1A están relacionadas con la inhibición de Arp2/3, mientras que L-plastina está involucrada en la polaridad y migración celular. Las proteínas de “capping” como gelsolina estabilizan los filamentos de actina y evitan la unión de monómeros y la disociación en el lado (-) [70,78,86].

Tabla 2. Proteínas que regulan el citoesqueleto de actina.

Table 1 Actin cytoskeleton regulators identified in T lymphocytes			
Type of actin remodeling	Protein family	Protein name	Mode of action
Actin nucleation	Formins	mDia1-3 FMNL1	Elongate actin filaments
	Cofilin	Cofilin	Sever actin filaments
	Arp2/3-associated proteins	Positive regulators: WASP N-WASP WASH WAVE2 HS1 Negative regulators: Coronin-1A	Branch new actin filaments
Actin bundling	Plastin	L-plastin	Bundle parallel actin filaments
Actin capping	Actin capping protein	Gelsolin	Stabilize actin filament length

WASP, Wiskott–Aldrich syndrome protein.

GTPasas pequeñas

La polimerización y la reorganización de actina está modulada por miembros de la familia de las GTPasas pequeñas de Rho. Las GTPasas de Rho (homologas a Ras) pertenecen a una familia de pequeñas proteínas reguladas por la unión a guanosina trifosfato (GTP); cuando están unidas a GTP se encuentran en un estado activo, mientras que cuando están unidas a GDP se encuentran en estado inactivo. En mamíferos se han encontrado 22 miembros que se

pueden subdividir en las familias: Rac (Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG); Cdc42 (Cdc42, TC10 y TCL); CHP y WRCH1; RhoH; Rho BTB (RhoBTB1, RhoBTB2); Rho (RhoA, RhoB y RhoC); RND (RND1, RND2 y RND3); y Rif (Rif and RhoD). Los miembros de las cuatro subfamilias Rac, Cdc42, Rho y Rif pertenecen las GTPasas clásicas de Rho, mientras que las otras son atípicas (figura 11)[87].

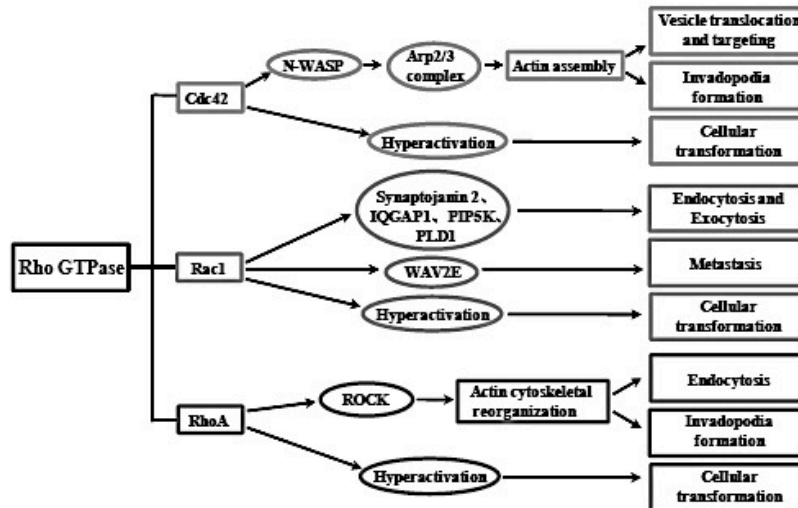


Figura 11. Las GTPasas de Rho participan en diferentes funciones como tráfico vesicular, transformación celular, invadopodia y metástasis. Cdc42 regula el tráfico vesicular, invadopodia a través de N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), a través de Arp 2/3. Rac1 es un efector de la endocitosis y exocitosis. RhoA activa ROCK (coiled coil containing protein kinases) modulando la endocitosis y la formación de invadopodios [66].

Existen tres formas de regular la activación de GTPasas Rho (Figura 12). La primera por conversión de GDP a GTP, lo cual es catalizado GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina); el segundo es la modulación de GAPs que genera la hidrólisis de GTP, aumentando la activación de GTPasa y haciendo que regrese a un estado inactivo; y la tercera es la interacción con inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina, el cual se encuentra unido para evitar la activación espontánea, pueden unirse al grupo prenil del carboxilo terminal de algunas proteínas para conservar el estado inactivo [87-89].

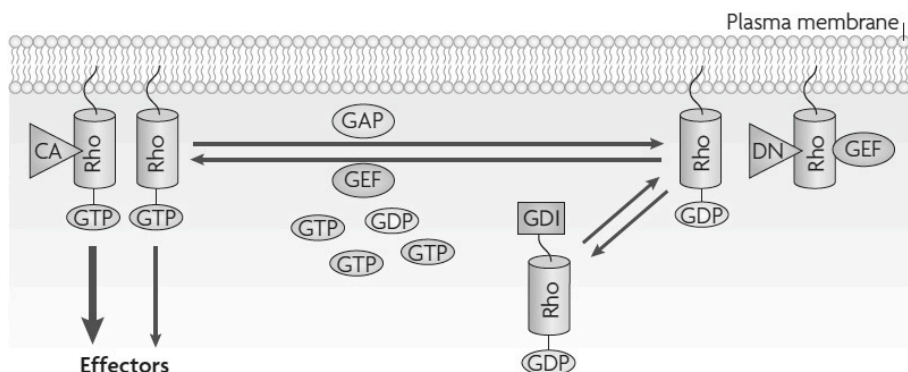


Figura 12. Ciclos de GTPasas, intercambios de GTP a GDP. Tomado de [88].

Las GTPasas de Rho interactúan con más de 50 proteínas efectoras como cinasas de serina/treonina, cinasas de tirosina, lipasas, oxidasas, proteínas de andamiaje y regulan una variedad de procesos como el rearrreglo del citoesqueleto de actina, dinámicas de microtubulos, adhesión celular, endocitosis, tráfico vesicular, entre muchos otros procesos [71,90].

Rho-A

La interacción de factores de crecimiento, moléculas de adhesión de la matriz extracelular con receptores celulares, seguida por la activación de Rho, Rac y Cdc42, pueden generar el rearrreglo de sistemas de actina y microfilamentos resultando en la formación de complejos acto-miosina (fibras de estrés) lamelipodios y proyecciones llamadas filopodios.

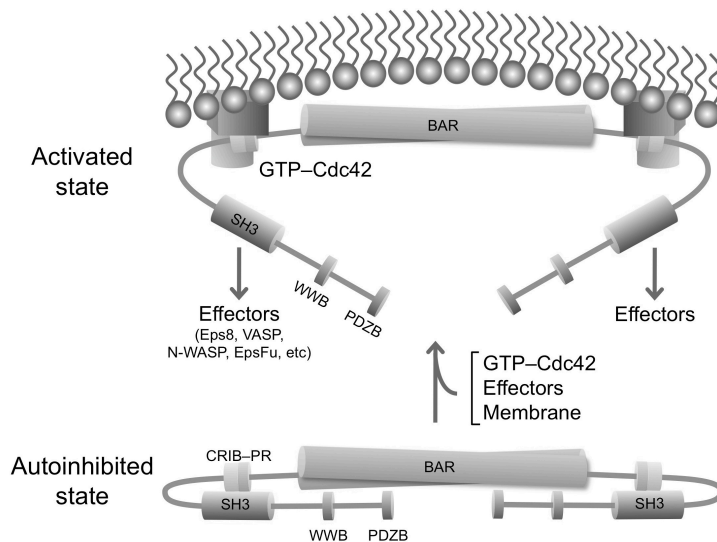
Rho-A GTP actúa con su cinasa de treonina serina llamada ROCK, la cual a su vez fosforila la cadena ligera de la miosina fosfatasa (MLCP), la cual conduce a la inactivación de MLCP y el incremento de p-MLC dentro de la célula. ROCK también puede fosforilar a JK y activar a la cinasa de MLC, que incrementa los niveles de pMLC. PMLC es un regulador positivo de los complejos actina-miosina, por lo que se induce la formación de más fibras de estrés [60,66,91].

Rho se asocia con las adhesiones, adhesiones focales y la formación de fibras de estrés [92]. Se ha observado que a pesar de RhoA tenga mayor importancia en el urópodo (retracción) también se activa en el frente de migración para protruir. Aunado a ello, se ha encontrado que ROCK está fuertemente activo en el urópodo. El rol mejor descrito es el de Rho/ROCK durante la migración de leucocitos donde se aumenta pMLC y es estimulada la contracción de actomiosina en el urópodo [91].

Rac y Cdc42

Rac promueve la migración mediante la estimulación de la extensión inicial de la proyección frente de migración y la inducción de adhesiones en esta región. Rac y Cdc42 generan lamelipodios y filopodios respectivamente [93,94]. Hablando en temporalidad, en linfocitos T la GTPasa Cdc42 es la primera activada en respuesta a quimiocinas y es uno de los pasos iniciales que permiten una pérdida de simetría, conduciendo a la adquisición de una forma de mayor eficiencia para la migración [93]. Su activación se polariza al sitio donde la célula recibe el estímulo quimiotáctico, que en conjunto con WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) y su asociación con el complejo Arp2/3, conlleva la polimerización de actina para la formación de los filopodios, estructuras conformadas de filamentos de actina dispuestos paralelamente que generan protrusiones finas de la membrana celular [74,94].

Figura 13.- Protrusión de la membrana celular por Cdc42. La GTPasa Cdc42 permite la polarización celular con o sin ayuda de otras moléculas que den puntos de referencia para la polaridad, y se asocia con proteínas de andamiaje, GEFs, GAPs y proteínas efectoras, para formar un complejo multiproteico y dinámico mediado por el ciclo de intercambio de GTP/GDP [95].



Posterior a la activación de Cdc42, se da la activación de Rac, la cual se asocia a

WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein-family verprolin homologous protein) y Arp2/3 para permitir la polimerización de actina en forma de redes, generando ramificaciones dispuestas a 70 ° con respecto al filamento de origen [96]. Estas redes permiten que la protrusión de la membrana sea más extensa, plana y alargada, a la que se denomina lamela. El lamelipodio es la estructura lamelar polarizada y orientada hacia el gradiente quimiotáctico.

Una vez que se ha establecido el frente de migración mediado por Cdc42 y Rac1, las señales moleculares dan el "switch" de activación a la GTPasa RhoA, que es responsable de la activación de la cascada de señalización que conduce a la formación del urópodo, una estructura migratoria fundamental para el desplazamiento de la célula y con una capacidad de contracción y retracción que le confiere a la célula una fuerza mecánica de empuje, mediada por la formación de focos de adhesión inmaduros.

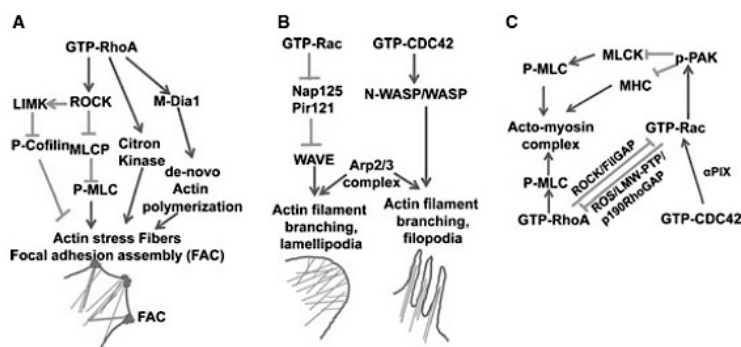


Figura 14. Cascadas de señalización que inducen la formación de puntos de adhesión focales, lamelipodios y filopodios [97].

Rac y Cdc42 también regulan la activación de PAK necesaria para la formación de filamentos de actina ramificados [98]. Se sabe también que Cdc42 puede regular la formación y el establecimiento de la polaridad celular necesaria para la migración dirigida [92,99].

Por otra parte, se conoce que existe un potencial de comunicación entre Rho y Rac, ya que se ha encontrado que en diferentes tipos celulares (como fibroblastos) el estado de activación de Rac es inversamente proporcional al de Rho activo (figura 15) [71]. Esto puede deberse a

señalización a través de PAK1, ya que PAK inhibe la contractilidad acto-miosina por su efecto sobre la fosforilación de la cadena pesada de miosina II y la ligera de la cinasa de miosina. La sobre-expresión de Rac en fibroblastos, da una disminución de Rho activo [86,100].

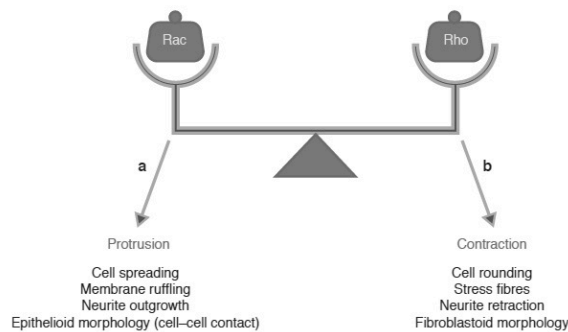


Figura 15. Antagonismo de las funciones de Rac y Rho. La activación de Rac se asocia a las protusiones en la membrana. En contraste la activación de Rho está involucrada con la contracción por el complejo actin-miosina, formación de fibras de estrés, retracción [100].

LIMK1/2

Existen dos isoformas de LIMK, ambas son reguladas de manera diferencial por las GTPasas Rho (figura16). LIMK1 es activada de manera específica por PAK en la treonina 508, efector

de Cdc42 y Rac, mientras que LIMK2 es activada en la treonina 505 por ROCK, efector de RhoA, y por el PAK efector de Cdc24 [98].

Las tres GTPasas activan a la molécula LIMK, que a su vez fosforila a cofilina, molécula reguladora de las dinámicas de actina [101].

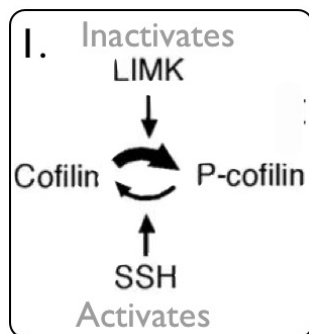


Figura 16. Estados de cofilina. La cofilina es activada al desfosforilarse por medio de SSH; cuando es fosforilada por LIMK regresa a su estado inactivo [98].

ADF/cofilina

ADF/cofilina son proteínas expresadas en eucariontes que constan de tres formas en mamíferos: ADF, cofilina-1 (de tejido no muscular), y cofilina 2 (muscular).

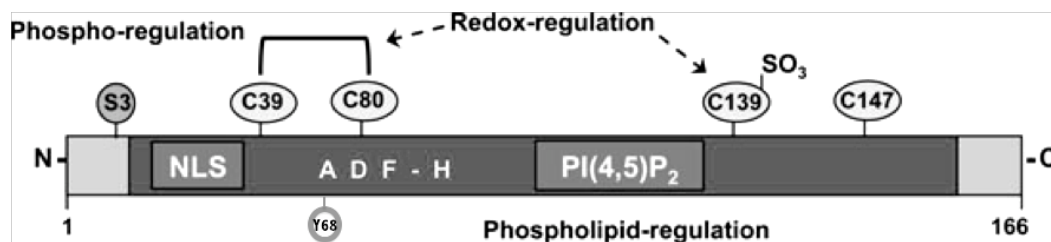


Figura 17.- Sitios de regulación de cofilina. Cofilina es una molécula que presenta diversos sitios de regulación. En la representación esquemática de cofilina se muestran sitios regulados por fosforilación (Ser3, Tyr68), de oxido-reducción (residuos de cisteína), y por fosfolípidos vía unión a PIP2 [102,103].

Cofilina es un modulador de las dinámicas de actina, ya que puede despolimerizar los filamentos de actina separando los monómeros; por otra parte al cortar los filamentos genera nuevos sitios de elongación de los filamentos preexistentes. Además, puede ceder la G-actina secuestrada y también puede incrementar la flexibilidad de los filamentos al unirse a ellos [82,104,105]. Cofilina puede directamente competir con el complejo Arp 2/3 reduciendo la afinidad por los filamentos, lo cual se observa drásticamente en los lamelipodios. El complejo Arp 2/3 consiste en dos proteínas relacionadas con actina y otras 5, que son nucleadoras, generando filamentos con un ángulo de 70 ° con relación a filamentos preexistentes [82,101]. ADF/cofilina es esencial para la polimerización y despolimerización de actina durante el proceso de movimiento celular, su unión a filamentos de actina, promueve la separación y formación de nuevos “*barbed ends*” que permiten la nucleación de nuevos filamentos de actina por el complejo Arp 2/3. Durante la migración celular por una lado F-actina se ensambla en el borde más delantero de la célula y por otro, la parte trasera o (-) se desensambla [73,86].

La actividad y función de cofilina está mediada por cinasas y fosfatasa de las que se destacan: LIMK1 y LIMK2 como fosforiladoras en serina 3 de cofilina (figura 17), interfiriendo en su unión con actina y así presentando su estado inactivo; las fosfatasa PP1/PP2A, calcineurina (PP2B), Slingshot (SSH1L, -2L y -3L) y cronofina, que desfosforilan la serina 3 y con ello activando a cofilina. La fosforilación y desfosforilación de su amino terminal en serina 3 es esencial para la regulación de la actividad de la activación [83,106].

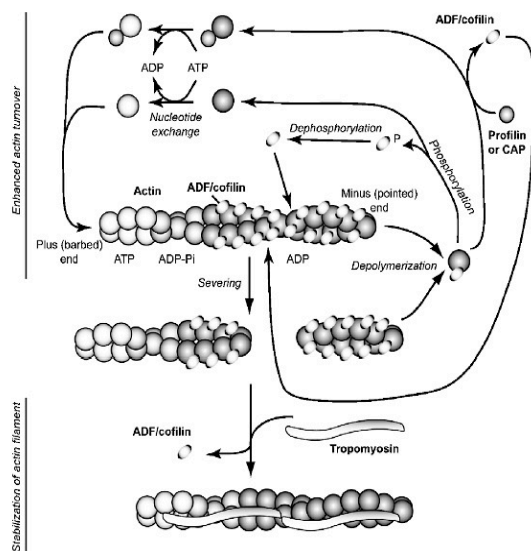


Figura 18. Regulación de las dinámicas de actina dependientes de ADF/Cofilina en cooperación con otras proteínas. Coordinación de la fosforilación y desfosforilación de ADF/cofilina que compite con proteínas como profilina o CAP. En contraste algunas proteínas de unión a F-actina, como tropomiosina, compiten con ADF/cofilina para la unión a actina, lo cual resulta en la estabilización de los filamentos de actina [107].

En leucocitos y otras células cofilina se mantiene una mayor proporción de su estado inactivo (se tiene entre el 80-90% de cofilina inactiva y el 10-20% de cofilina activa) ya que el citoesqueleto de actina también está en movimiento y participando en diversos procesos celulares. [68]. El desensamblaje o ensamblaje mediado por cofilina depende de la concentración de la misma. [83].

CCR7 y sus ligandos en la migración a ganglios linfáticos

El receptor CCR7 es un receptor acoplado a proteínas G con siete dominios transmembranales, el cual se expresa en células dendríticas, timocitos durante su desarrollo, células T naïve y T de memoria central. Se sabe que participa en la migración, ya que en ratones deficientes de CCR7 la migración de linfocitos T hacia nódulos linfáticos es deficiente [108]. CCR7 media las señales que controlan la migración de células del sistema inmune a órganos linfoides secundarios y el posicionamiento dentro de ellos, y muestra una expresión en las células T cuando migran a los folículos de las células B para ayudar a la producción de anticuerpos. De esta manera, CCR7 representa un importante receptor de *homing* (figura 19) y participa en localización de las subpoblaciones de linfocito T junto con CXCR5 determinado la posición de células inmunes en el microambiente de los órganos linfoides secundarios. Es importante decir que cuando CCR7 se expone a altas concentraciones del ligando se desensibiliza *in vivo* [4], además en un ratón normal los linfocitos T se adhieren *in vivo* en los sitios donde se presenta CCL21, lo cual indica que ayuda a la adhesión rápida [54,108].

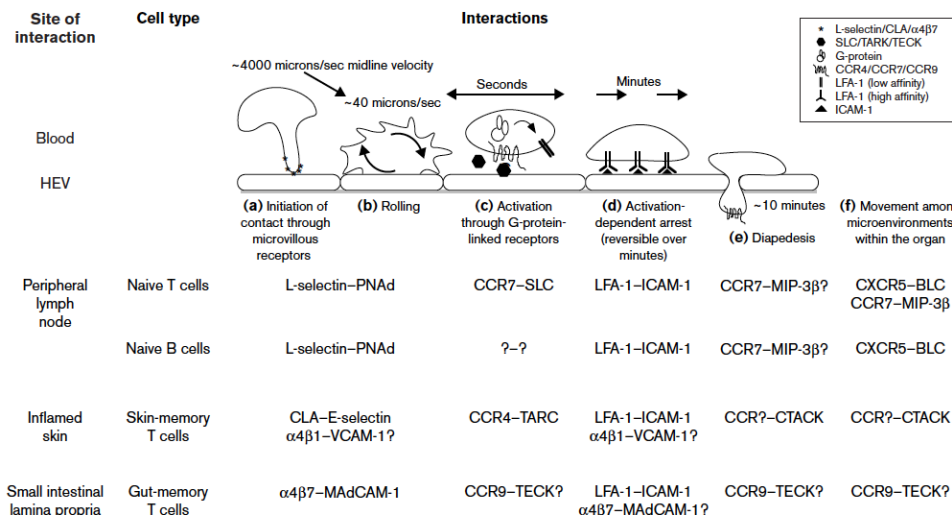


Figura 19. Pasos de la migración celular y trans migración. En las HEVs, los linfocitos T pueden interactuar con adhesinas periféricas de ganglios (PNAd) como son CD34 o GlyCAM-1 asociadas a carbohidratos. El rodamiento de la célula a lo largo del endotelio permite mayor interacciones con las moléculas para permitir una adhesión firme que conducirá al anclaje de la célula. LFA-1 e ICAM-1 expresadas en los linfocitos T y endotelio, respectivamente, son los dos receptores claves para el arresto de la célula, pero en una célula en reposo la avidéz de LFA-1 por su ligando es débil, por lo que la célula requiere otras señales para permitir la trans migración al nivel de las HEVs. Estas señales son activadas por las quimiocinas presentes en las células endoteliales (como CCL21 o CCL19) que interactúan con CCR7 en las células T [5].

Las quimiocinas CCL19 y CCL21 son constitutivamente expresadas y controlan el movimiento de las células durante la homeostasis (Figura 20). CCL21 tiene una cola amino-terminal con 32 aminoácidos, de los cuales 12 son residuos básicos que permiten la unión a glicosaminoglicanos y otras moléculas. CCL19 sólo es producida y presentada en la zona de las células T en humanos, en ratones también en nódulos linfáticos, mientras que CCL21 es producida en zona de células T en el nódulo linfático y puede ser translocada a las vénulas del endotelio alto en humanos, mientras que en ratones es producida y presentada en ambos lugares [59,109]. Además, la producción de CCL19 es mayor aproximadamente 100 veces que CCL21 en órganos linfoides secundarios [110].

Como resultado de una duplicación génica en ratón se tiene dos variables CCL21-leu, la cual contiene una leucina en la posición 65 y es expresada en vasos linfáticos de órganos no linfoides como pulmón, colon corazón, piel; mientras que la CCL21 ser es expresada en órganos linfoides como el timo, nódulos linfáticos y bazo [54].

Antecedentes indican que en células dendríticas solamente es necesaria CCL21, pero no CCL19, para la migración a órganos linfoides secundarios. CCL19 posiblemente activa DC par el reclutamiento dentro de los nódulos linfáticos en condiciones inflamatorias. Es por ello que algunos modelos matemáticos comprobados *in vitro* sugieren que estas dos quimiocinas se encuentran en diferentes combinaciones en el mismo entorno [59].

Los ligandos CCL19 y CCL21 tienen una afinidad similar por el receptor CCR7, sin embargo se conoce que pueden inducir diferentes señales. CCL19 estimula CCR7 dando también una internalización del receptor, seguida por una desensibilización, lo cual implica CCL19 tiene un corto tiempo de respuesta en comparación con CCL21. La endocitosis del receptor con CCL19 es mediada por arrestina 3 mientras que para CCL21 es independiente de arrestina 2 y 3 [111,112]. Es importante mencionar que los niveles de CCL19 y CCL21 en ratones deficientes en Jak3 no son significativamente diferentes a los de un ratón silvestre [113,114].

Existen varias diferencias que se resumen en la siguiente tabla, que indican que CCL19 y CCL21 no tienen funciones redundantes [53], a continuación se resumen:

Tabla 3. Respuestas diferenciales entre quimiocinas CCL19 y CCL21.

CCL19	CCL21
CCL19 se expresa por las células endoteliales y en células intersticiales del ganglio linfático pero puede ser transportada hacia la superficie luminal de las HEV. [115] Concentraciones fisiológicas se tiene 5nM [59]	CCL21 es expresado en las vénulas del endotelio alto y participa en la inducción de integrinas que se unen a ICAM1 y MADCAM1. [7,115] En concentraciones fisiológicas se tiene 100nM [59]
Desensibilización del receptor	No hay desensibilización del receptor [111]
Se puede encontrar soluble [7,116]	Se encuentra soluble y unida a glicosaminoglicanos [7,53]
Arrestina 3 media la endocitosis de CCR7 (degradación)[111] En DCs induce rápida extensión de dendritasdependiente de Rac/Cdc42[99] En DCs, activa Stat, 1, 3, y 5(Datos sin publicar)	Se recicla después de su internalización [111,117] En DCs no induce una rápida extensión de dendritas[113] Activa Stat 1 y 5

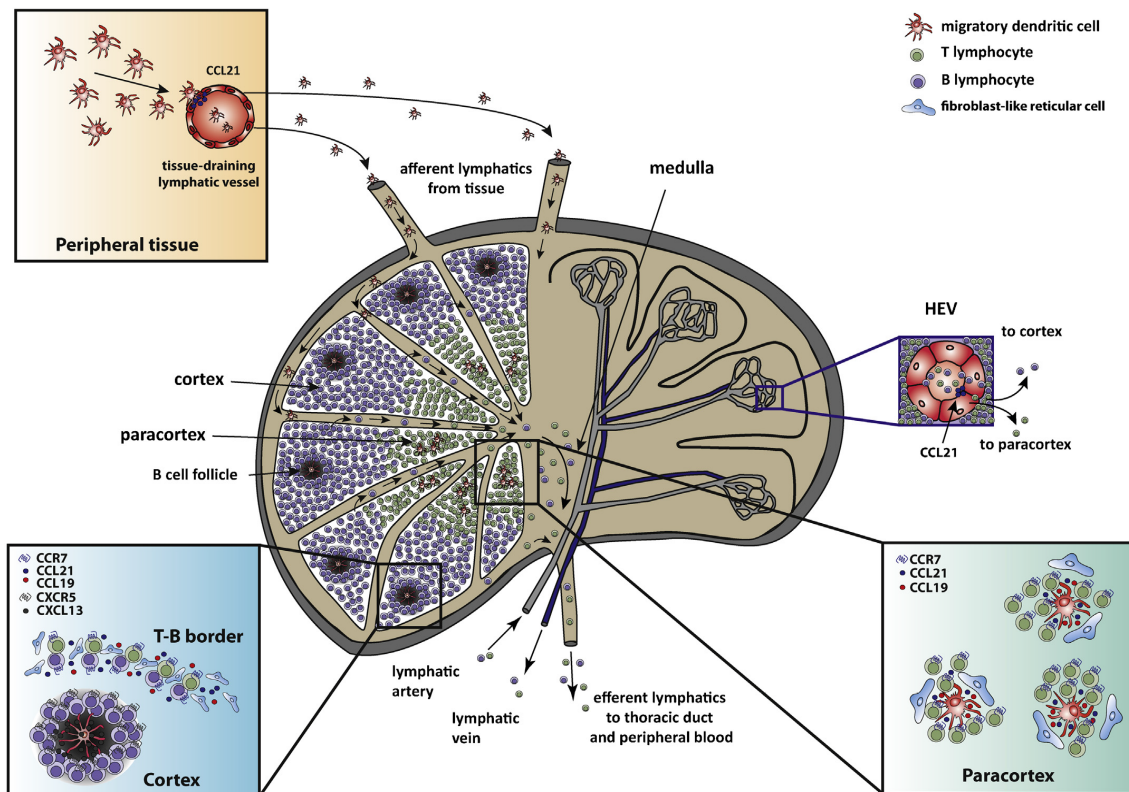


Figura 20. Los ganglios linfáticos son órganos linfoides encapsulados en forma de frijol que se encuentran subdivididos en tres regiones principales: La corteza, la paracorteza y la médula. Los linfocitos vírgenes entran a los ganglios linfáticos vía HEVs o vasos linfáticos aferentes, y salen por los senos corticales, senos medulares y los vasos eferentes linfáticos en la médula. Existe una zona en la paracorteza, denominada zona de células T, donde los linfocitos T se acumulan [53].

JAK3 y citoesqueleto

Existen estudios donde se vincula las cinasas de Janus con el rearrreglo del citoesqueleto. Jak2, por ejemplo, mostró que es requerido para la activación de PI3K, FAK (focal adhesion kinase) y paxilina en células progenitoras hematopoyéticas en respuesta de CXCL12. [118] También, Jak2 puede inducir la formación del complejo de CCR2/Lyn/Paxillin/Stat3 en macrófagos peritoneales estimulados con CCL2 [119]. Así mismo, Tyk2 y Jak1 se mostró que interactúan con Jamip-1, componentes del citoesqueleto de tubulina, en células T Jurkat, siendo esto sugerente de la participación de los Jaks en la polarización celular y migración inducida por quimiocinas [120].

Por otra parte, se observó que la migración de enterocitos en respuesta a IL-2 requiere de Jak3 para la redistribución de F-actina. Pero también en ese mismo estudio los autores mostraron el requerimiento de Jak3 para la fosforilación de vilina. [121]. Otro estudio reciente muestra que las proteínas de unión a actina vilina y gelsolina tienen interacción directa con Jak3 en células epiteliales intestinales [122,123]. En el mismo año se mostró que la actividad de Jak3 repercute en la función de la fosfolipasa D2 (PDL2) sobre la modulación de Rac2/GEF durante la quimiotaxis de los neutrófilos hacia IL-8 [122].

Estudios de nuestro laboratorio donde fueron utilizados linfocitos de ratones C57BL/6 se estimularon con las dos diferentes quimiocinas y por medio de inmunoprecipitación se determinó que la fosforilación de Jak3 se induce desde 15 segundos de estimulación [114]. Recientemente, nuestro grupo ha reportado la participación de Jak3 en la reorganización del citoesqueleto en linfocitos T. El análisis de polimerización de actina por citometría de flujo demostró que existe un incremento relativo máximo de F actina a los 10 segundos al estimular con la quimiocina CCL21, regresando a su estado basal a los 300 segundos; mientras que al usar el modelo murino deficiente en Jak3 se observó que la polimerización de actina se encuentra abatida (Figura 21) [124]. Además, se demostró que la migración hacia CCL21 y CCL19 era inhibida parcialmente tras el pre-tratamiento con el fármaco WHIP-131 (80 $\mu\text{g/ml}$) que es específico para Jak3.

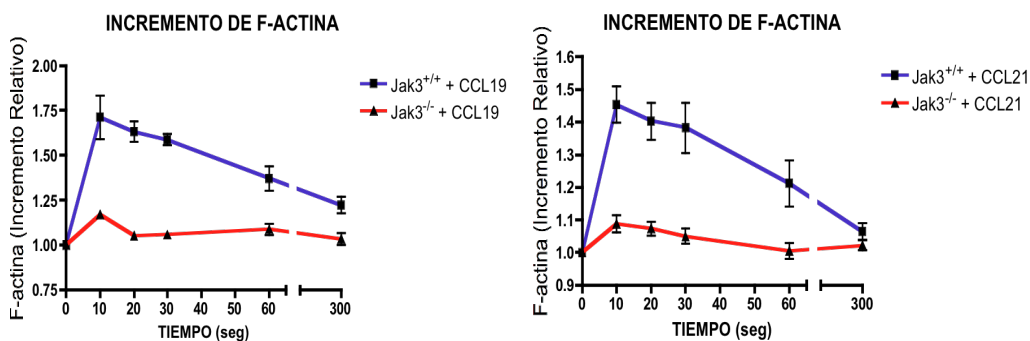
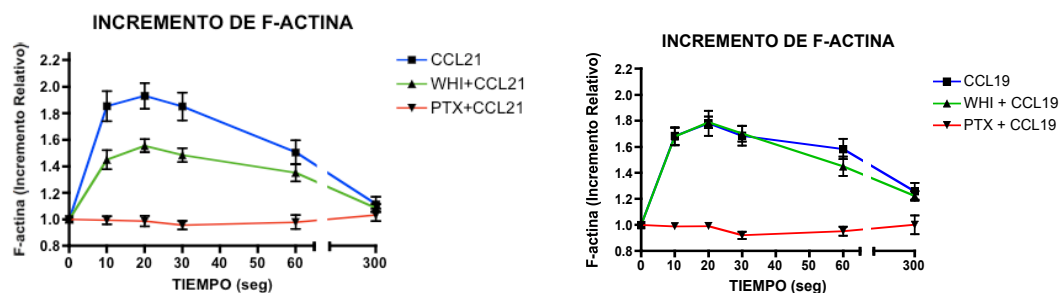


Figura 21. Polimerización de actina en células deficientes en Jak3. (a) Histogramas representativos de las células de bazo de ratones Jak3^{+/+} o Jak3^{-/-} estimuladas con las quimiocinas. (b,c) Células de ratones Jak3^{+/+} (línea azul), o Jak3^{-/-} (línea roja) estimuladas con 300ng/mL de las quimiocinas CCL19 (b) o CCL21 [124].

Al utilizar una dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ de WHI-P131 se observaron diferencias en la sensibilidad a la inhibición farmacológica de Jak3, ya que al medir la polimerización de actina en respuesta a CCL21 versus CCL19, que sugerían que la señalización inducida por CCL19 era menos dependiente de la vía de Jak 3 (Figura 22).

a) WHIP-131 30ug/ml



b) WHIP-131 80ug/ml

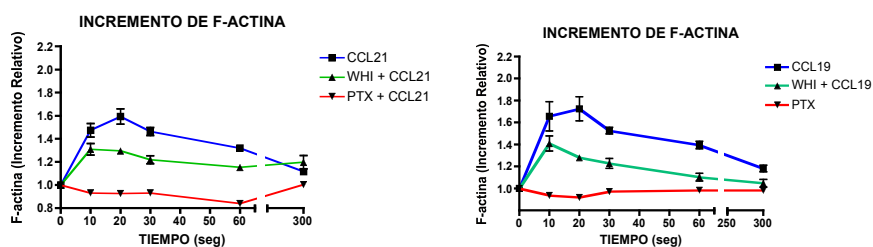


Figura 22. Polimerización de actina de linfocitos de ratones silvestres estimuladas con CCL19 y CCL121 con tratamientos previos de DMSO (azul), toxina Pertussis (rojo) y a) WHI-P131 30µg/mL y b) 80 µg/mL [124].

Por otra parte la inhibición farmacológica de Jak3 da una deficiente adquisición del fenotipo migratorio en respuesta a CCL21, además que dichas células muestran una deficiencia en la polimerización de actina. En este reporte también se demostró que en linfocitos al inhibir Jak3 la fosforilación de cofilina en serina 3 y estimular con CCL21 disminuye sin mostrar un incremento posterior a los 30 segundos (el cual es mostrado por la dinámica control y la tratada con PTX) lo cual indica que Jak3 podría participar en la inactivación de cofilina directamente. En análisis mostró que la activación de Rac1 dependiente de CCL21 se disminuye con la inhibición de Jak3 [124], mientras que la activación de RhoA, se ve inhibida tanto por PTX, como con el inhibidor específico de Jak3. Estos datos generaron un modelo donde la proteína G heterotrimérica y las vías de señalización de Jak3 juegan papeles complementarios e independientes. Cuando se da una estimulación de con CCL21, CCL19 o CXCL12 se activan ambas vías, dando como resultado la activación de Rac-1 en una manera complementaria. Posteriormente, se da una polimerización de actina temprana la cual es independiente de Jak3 y requiere la activación de Cdc42. La formación completa del frente de migración proviene de ambas vías. Por otra parte, existe la posibilidad de que cofilina sea regulada directamente por Jak3. En el caso de la formación del urópodo se da por la activación de RhoA y efectores de ROCK favoreciendo la formación y función de complejo de actinmiosina y de LIMK2 [124].

Justificación

La migración es un proceso crucial para la respuesta inmune, defectos en ella provocan una pobre respuesta ante procesos infecciosos así como una homeostasis alterada. Uno de los eventos fundamentales para el proceso de migración es la reorganización del citoesqueleto, por lo cual es de vital importancia estudiar las vías de señalización involucradas en este proceso. Debido a que existen antecedentes que indican que las quimiocinas CCL19 y CCL21 pueden ejercer efectos diferenciales tanto en linfocitos T como en células dendríticas (activación de proteínas, localización y respuestas estructurales), es importante evaluar si éstas pueden inducir vías de señalización distintas. Se sabe que Jak3 media la migración y rearrreglo del citoesqueleto en linfocitos T cuando las quimiocinas CCL19 y CCL21 se unen a su receptor (CCR7). Sin embargo, se desconoce si existen diferencias en los mecanismos específicos que participan durante la reorganización del citoesqueleto (actina, GTPasas y cofilina) en linfocitos T en respuesta a estas dos quimiocinas.

Hipótesis

Existen diferencias en las vías de señalización mediadas por CCR7 río abajo de Jak3 que participan en el rearrreglo del citoesqueleto en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21 en linfocitos T.

Objetivo general

Estudiar las vías de señalización que llevan al rearrreglo del citoesqueleto (F-actina, y GTP-Rac 1, GTP-Rho A, cofilina) iniciadas con el receptor CCR7 dependientes de Jak3 en respuesta a sus dos ligandos (CCL19 y CCL21).

Objetivos particulares

- Determinar la fosforilación de Jak3 después de la estimulación con CCL19 y CCL21.
- Analizar la polimerización de actina después de la activación de CCR7 en respuesta a CCL21 y CCL19 y la participación de Jak3 en dicho proceso.
- Determinar las diferencias en activación de las GTPasas RhoA, Rac-1 y Cdc42 en respuesta a las quimiocinas ligando de CCR7
- Determinar cinética de fosfo-cofilina en respuesta a CCL19 y CCL21.

Metodología

Anticuerpos

Determinación fosfo-Jak3. Anticuerpo primario pJak3 policlonal (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Anticuerpo pJak3 tirosina 980 D44E3 (Cell signaling). Anticuerpo secundario anti-rabbit HRP (santa cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). Secundario anti-rabbit FITC (Cell signaling).

Inmunofluorescencia. Se usaron anticuerpos RhoA-GTP, Rac-1 GTP y Cdc42-GTP (New East, Biosciences, Whitewoods Lane, Malvern, PA), fosfo-cofilina (Ser-3) y rodamina-faloidina (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Fue usado como anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Molecular Probes, Invitrogen, Inc). Medio de montaje fue obtenido de Dako (Denmarks, A/S) .

Reactivos

- Quimiocinas. Se utilizaron quimiocinas murinas recombinantes CCL21 y CCL19 compradas a PeproTech (Rhocky Hill, NJ).
- Inhibidor. El inhibidor WHI-P131 en concentraciones de 30 μ g y 80 μ g/mL (Calbiochem, San Diego, CA).
- La toxina pertussis (PTX) 200 ng/mL fue obtenida de Sigma (St Loouis, MO, EUA).
- DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma Chemicals). Fue usado como control en linfocitos obtenidos de ratones silvestres.

Animales

Los ratones Jak3^{-/-} (B6129S4-Jak3tm1Ljb, o también llamados C57BL/6 –JAK3tm1Ljb) fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA). Se usaron ratones Jak3^{-/-} de 3 a 6 semanas de edad y como controles se usaron ratones de la misma edad C57BL/6 (de cepa

silvestre) o ratones heterocigotos . Los ratones estuvieron en condiciones libres de patógenos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y bajo los lineamientos del Comité de Ética de la misma entidad.

Obtención de linfocitos

De ganglio. Se obtuvieron ganglios (axilares, inguinales y mesentéricos) de ratones WT. El tejido se disgregó mecánicamente utilizando dos membranas de nylon de 50 micrómetros sumergidas en RPMI (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) con los suplementos estándar y adicionado con 2 % ó 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Las células obtenidas se lavaron 2 veces centrifugando a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se resuspendieron en el volumen de RPMI requerido para el ensayo a realizarse.

De bazo. Se obtuvo por medio de una operación post-mortem obtenidos de ratones Jak3^{+/+} o ratones Jak3^{-/-} (determinación de genotipo por PCR, anexo1). Los bazos fueron disgregados mecánicamente y posterior a ello se lisaron los eritrocitos con ACT (Anexo 2). De igual forma se resuspendieron y contaron las células utilizando RPMI, utilizando azul tripano para determinar viabilidad.

Determinación de fosforilación de Jak3

Las células de bazo de ratones heterocigotos y knock out fueron estimuladas con pervanadato 100 ng/mL en RPMI con 10 % de suero fetal bovino. Previamente se lisaron los eritrocitos y las células obtenidas fueron lisadas usando buffer de lisis (ver anexo 2). Se colocaron 28.6×10^6 células de ratones heterocitos y KO en cada carril. Las células lisadas se calentaron a 95 °C por 10 min. y se separaron con SDS-PAGE usando gel de acrilamida al 10 %. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con TBS con 5 % de albumina sérica bovina (Research Organics, Cleveland, OH). La determinación de anticuerpo primario fue usando los dos anticuerpos anti fosfo –Jak3, seguido de un anticuerpo secundario con HRP. La señal fue detectada usando peroxidasa del kit Western Blotting substrate (Pierce, Rockford, IL).

Tratamiento con inhibidores

Las células obtenidas de los ganglios, a una concentración de 8×10^6 en RPMI 10 % de SFB se mantuvieron 2 horas en la incubadora a 37 °C, 5 % CO₂, con 200 ng/mL de PTX, con 30 µg/mL u 80 µg/mL de WHI-P121, 0.6 o 1.6 µl/mL DE DMSO respectivamente como control. Las células se lavaron tres veces con RPMI y se resuspendieron para posteriormente hacer ensayos de polimerización de actina.

Ensayos de polimerización de actina por citometría de flujo

Las células fueron estabilizadas colocándolas en hielo 10 min y posteriormente estimuladas con CCL19 y CCL21 (24.6 nM) a los tiempos de 0, 10, 20, 30, 60 y 300 segundos. La estimulación se detiene formaldehído al 3.7 % 1:1 del volumen de células tomado durante la estimulación. Las células se incuban 1 hora a 10-18 °C. Posterior a ello se tiñen con un buffer A (Anexo2) que contiene 0.78 unidades de NBD-falacidina FITC (Molecular Probes, Invitrogen Inc.) lisofosfatidilcolina (0.25 mg/mL), formaldehído 7.4 % en PBS (1X) incubándose una hora. Las células se analizan el mismo día mediante citometría de flujo (FACScan. B&D). A partir de una región de células vivas, basados en tamaño y granularidad (FSC Vs. SSC) se calculó el incremento relativo de F-actina (canal FI1), midiendo la intensidad media de fluorescencia de las células estimuladas entre las no estimuladas.

Ensayos de microscopía confocal

Las células de ratones B6 obtenidas de ganglios fueron maceradas. Antes de la estimulación las células fueron puestas en igualdad de condiciones dejándolas 10 minutos en hielo y 5 minutos a 37 ° C. Las células fueron estimuladas para diferentes tiempo (0, 10, 30, 300, 600, 900 segundos) dependiendo el ensayo. El volumen tomado para cada tiempo fue de 150 µL que corresponden a 1×10^6 células. La estimulación se detiene con PFA 7.4 % 1:1. Las células se colocan 12 horas en cubreobjetos pre-tratados con poli-L lisina al 0.05 %.

Tinción para microscopía confocal

Las células adheridas a cada cubreobjeto fueron permeabilizadas usando Tritón X-100 al 0.1 % en PBS por 6 minutos. Posterior a ello se colocó solución de bloqueo (ver anexo) 1 hora. El anticuerpo primario (Rac-1, Rho-A GTP, Cdc42-GTP o fosfo-cofilina) se colocaron en la dilución obtenida de la estandarización 1 hora. Posterior a ello se lavaron 4 veces usando PBS/Tween-20 al 0.1 % en y se utilizó como anticuerpo secundario Alexa 488, se lavaron 3 veces con PBS tween al 0.1 %. Posterior a ello y dependiendo del ensayo se utilizó CD4 APC 1:750. Al final de 3 lavados con PBS/Tween al 0.1 % se colocó Faloidina rodaminada 1:150 y se lavó su exceso con PBS. Las muestras fueron montadas utilizando como medio DAKO. Se obtuvieron entre 8-15 fotografías por tiempo de estimulación usando el microscopio confocal Zeiss.

Separación de células CD4+ por perlas magnéticas

Previo a la estimulación de linfocitos heterocigotos y KO (para microscopia confocal) se realizó separación por perlas magnéticas.

Análisis estadístico

Los datos se representan el promedio \pm SEM. Fue usada una T de Student pareada de 2 colas la cual fue determinada con el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Resultados

1.- Determinación de fosforilación de Jak3 por citometría de flujo

Para determinar si existan diferencias entre las respuestas de las quimiocinas CCL19 y CCL21 posterior a la activación de CCR7, se trató identificar en linfocitos T la fosforilación de Jak3 en su tirosina 980. Primero se trató de estandarizar el protocolo para la detección de la fosforilación de Jak3 por citometría de flujo utilizando linfocitos obtenidos de bazo. La figura 24 muestra la cinética realizada con la quimiocina CCL21 (300 ng/mL) usando el anticuerpo generado por compañía Santa Cruz (tirosinas 980/981), donde se observó un incremento del 2.4 veces con respecto al basal en la fosforilación, desde los 30 segundos y una disminución de la misma a los 5 minutos. Utilizando el modelo de ratón knock out para Jak3 (genotipo determinado por PCR, ver anexo 1), se observó que su fosforilación basal era mayor que la obtenida para los ratones silvestres en un 100% (figura 23). Dicha observación es discordante, ya que el modelo Jak3 no contienen el dominio cinasa, en su lugar contienen una inserción para el gen de resistencia a neomicina. La alta intensidad en la media de fluorescencia para el ratón deficiente de Jak3 indicaba un pegado inespecífico del anticuerpo pJak3.

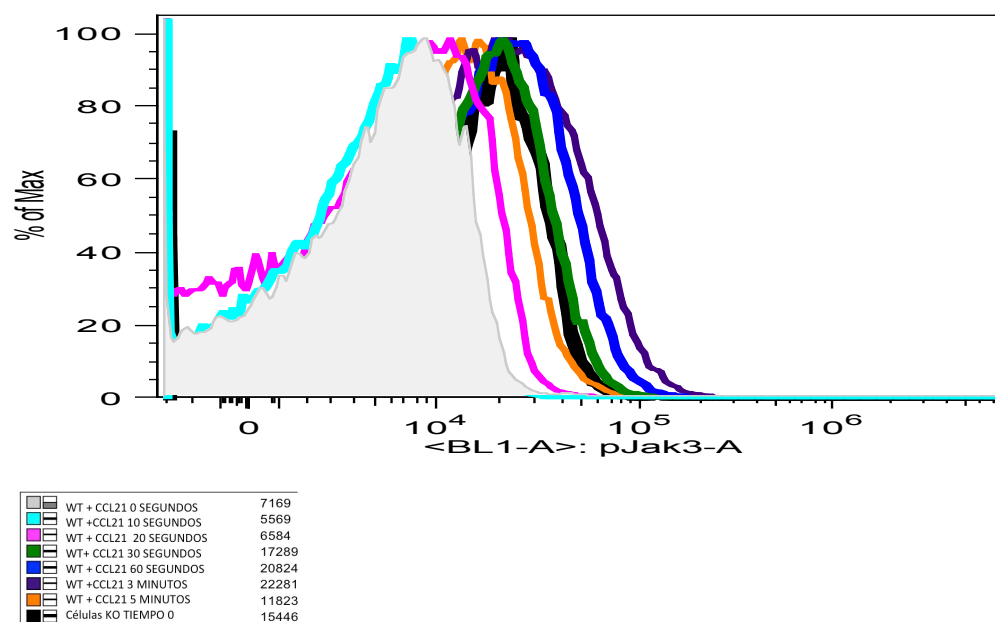


Figura 23. Histogramas de la cinética de fosforilación de Jak3 (tirosina 980/981 Santa Cruz) posterior a la estimulación con CCL21 (300ng/mL). El basal del ratón silvestre se muestra en gris, y el incremento en la fosforilación se observa desde los 20 y 30 segundos (línea rosa y naranja). La línea negra muestra la tinción basal para un ratón Jak3 $-/-$. Los histogramas provienen de dot plot de linfocitos TCD4 $^{+}$.

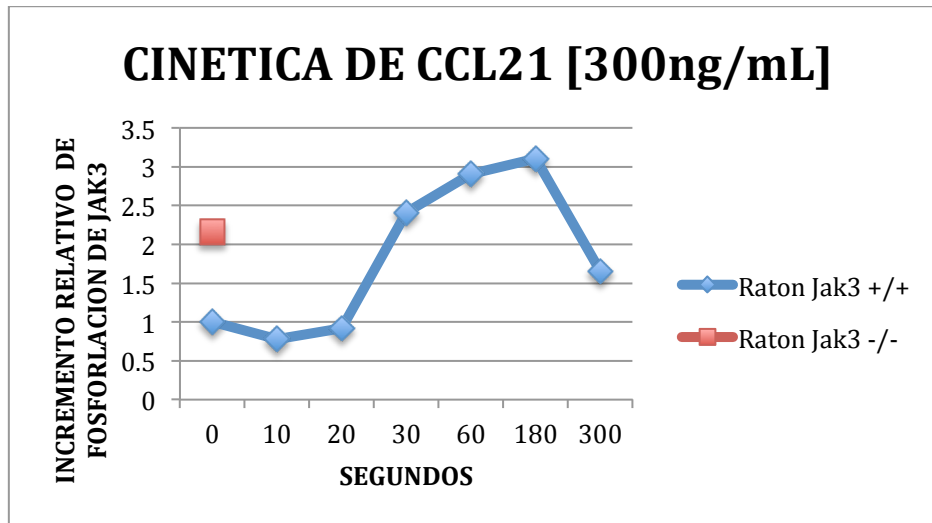


Figura 24. Cinética de fosforilación de Jak3. Se muestra los incrementos relativos con respecto al basal del ratón Jak3^{+/-} para la fosforilación en respuesta de 300ng/mL de CCL21. La línea azul muestra la cinética para el raton Jak3^{+/-}. La línea roja muestra el basal para el ratón Jak3^{-/-}.

Para detectar si dicho pegado inespecífico se debía al anticuerpo secundario se realizaron comparaciones de la tinción doble positiva para CD8 y CD4, y el anticuerpo secundario, tanto en ratón heterocigoto, como en ratón Jak3^{-/-}. Este experimento mostró que la inespecificidad del anticuerpo secundario es poca (Figura 25) y similar tanto en los ratones silvestres como en los deficientes de Jak3.

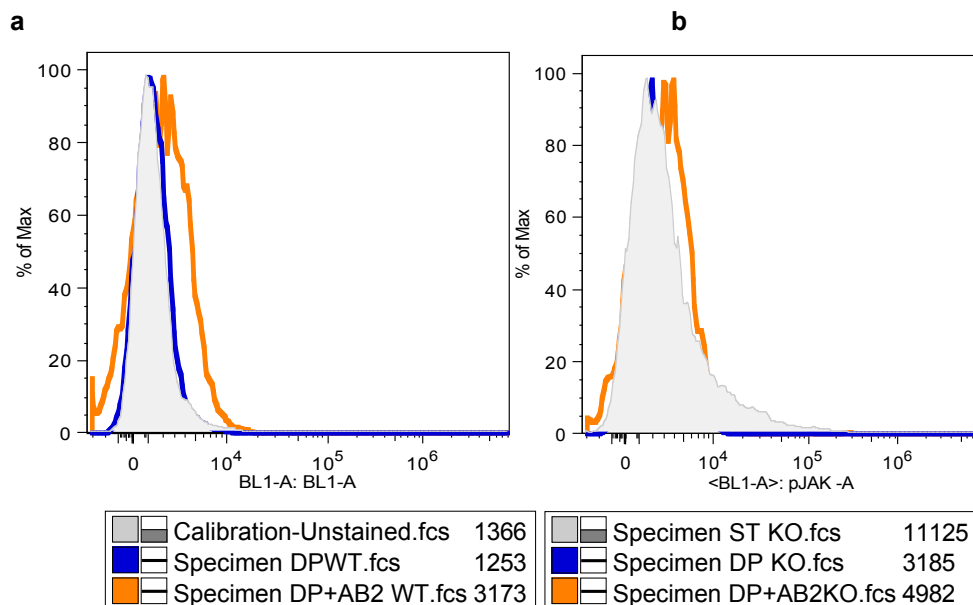


Figura 25. Histogramas de anticuerpo secundario y tinción superficial para CD4 o CD8. A) Tinción en ratón Jak3^{+/-} b) Ratón deficiente de Jak3. Los histogramas provienen de la región linfóide de células vivas.

Con la idea de conocer si la concentración del anticuerpo es correcta, se realizó una curva de titulación usando con pervanadato (inhibidor de tirosina fosfatasas), tanto en ratones silvestres como en los deficientes de la molécula Jak3. Los resultados mostrados en la figura

26 indican que la fosforilación posterior a la estimulación con pervanadato, tanto en ratones $Jak3^{+/+}$ como en ratones deficientes de $Jak3$ es semejante. Con ello se muestra que el anticuerpo pJak3 de la compañía Santa Cruz no es el ideal para medir la fosforilación de la molécula $Jak3$ por citometria de flujo, ya que tiene un pegado inespecífico.

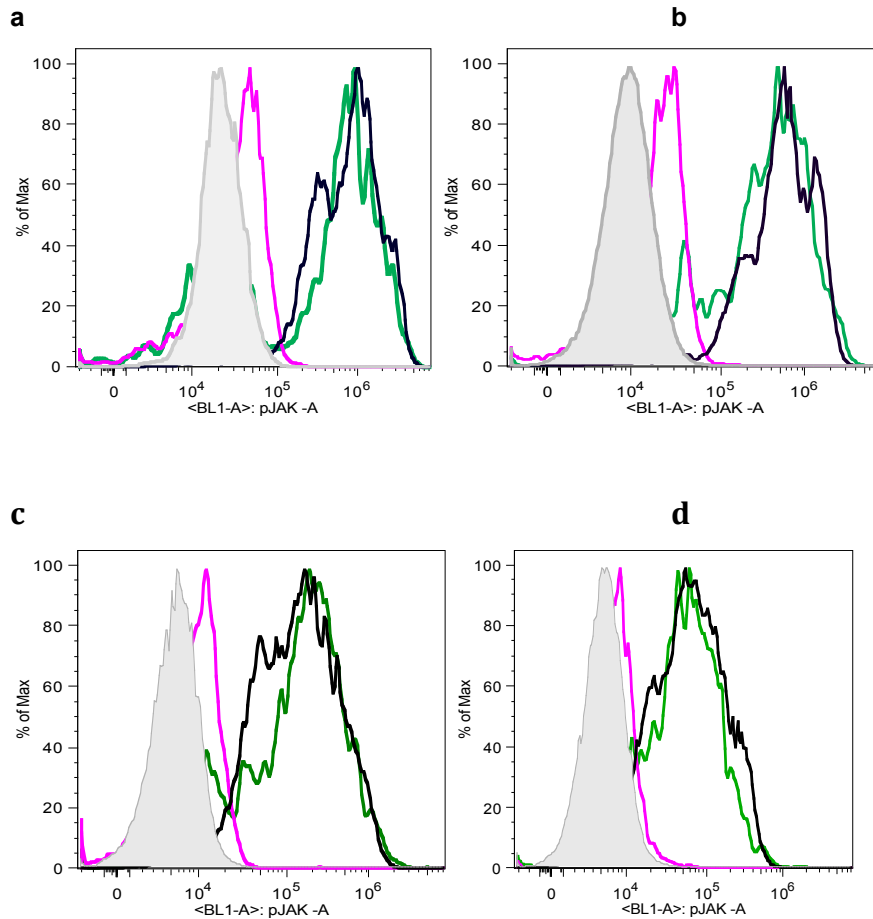


Figura 26. Titulación del anticuerpo pjak3 de Santa Cruz, la curva gris indica el basal para un ratón silvestre, la rosa el basal para un ratón $Jak3^{-/-}$; la línea negra indica la estimulación con pervanadato para el ratón silvestre y la línea verde indica la estimulación con pervanadato para $Jak3^{-/-}$. a) indica una concentración 1:30, (b) 1:90, (c) 1:270 y (d) 1:810.

Ante los resultados, se determinó probar otro anticuerpo que reconoce la misma fosforilación en la tirosina 980, producido por la compañía Cell Signaling. Se comparó la estimulación con pervanadato entre ratón silvestre y el $Jak3^{-/-}$. En la figura 27 se muestra que con este anticuerpo se tienen basales con menor intensidad media de fluorescencia, sin embargo se sigue teniendo un basal para el ratón $Jak3^{-/-}$ mayor al silvestre, lo cual resulta incongruente a los esperado.

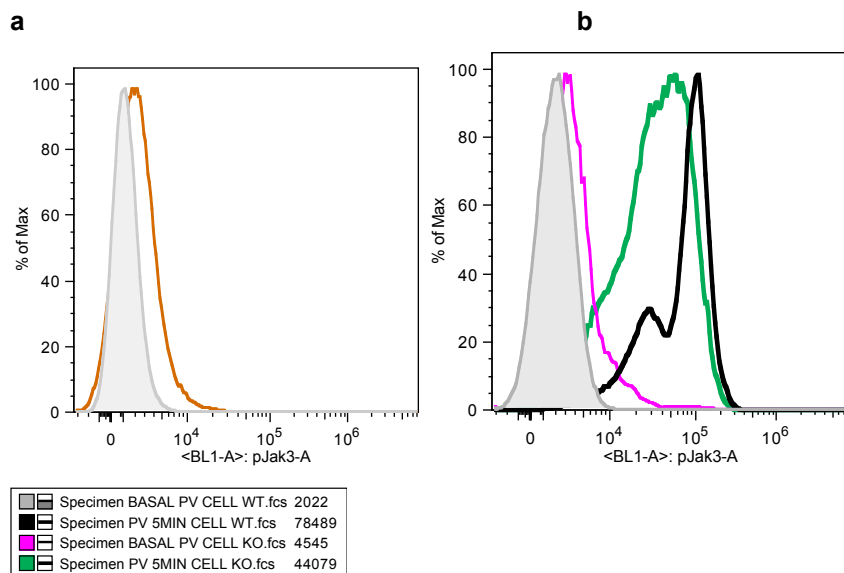


Figura 27. Histogramas para la fosforilación de Jak3 usando el anticuerpo producido por Cell signaling. (a) muestra el pegado inespecífico de anticuerpo secundario (línea naranja). (b) muestra la fosforilación de ratón Jak^{+/+} (línea negra) y la del ratón Jak3^{-/-} (línea verde) comparado contra el basal del ratón Jak3^{+/+} (gris) y el ratón Jak3^{-/-} (rosa).

2. Fosforilación de Jak3 por Western Blot

Con el objetivo de intentar determinar la fosforilación por medio de Western Blot, se colocaron 28.5×10^6 células obtenidas de bazo de ratones knock out (posterior a la lisis de eritrocitos) con y sin estímulo de pervanadado. Los anticuerpos usados para la detección de la fosforilación fueron p-Jak3 (tirosina 980/98) Santa Cruz en una concentración 1:250 y Cell signaling pJak3 (tirosina 980) en una concentración 1:1000. En la figura 28 se muestra las bandas obtenidas en el western blot. Los carriles A y C corresponden a las células sin estimulación, en las cuales se tiene pocas bandas, mientras que los carriles B y D que corresponden a las células estimuladas y donde ambos anticuerpos reconocen diferentes proteínas de diversos pesos moleculares; el número de bandas reconocidas hace difícil identificar si existe o no una banda del peso molecular correspondiente a pJak3 (106 kD). Considerando que ratones Jak3^{-/-} deficientes para la molécula y que los anticuerpos son específicos, no deberían reconocer ninguna otra proteína.

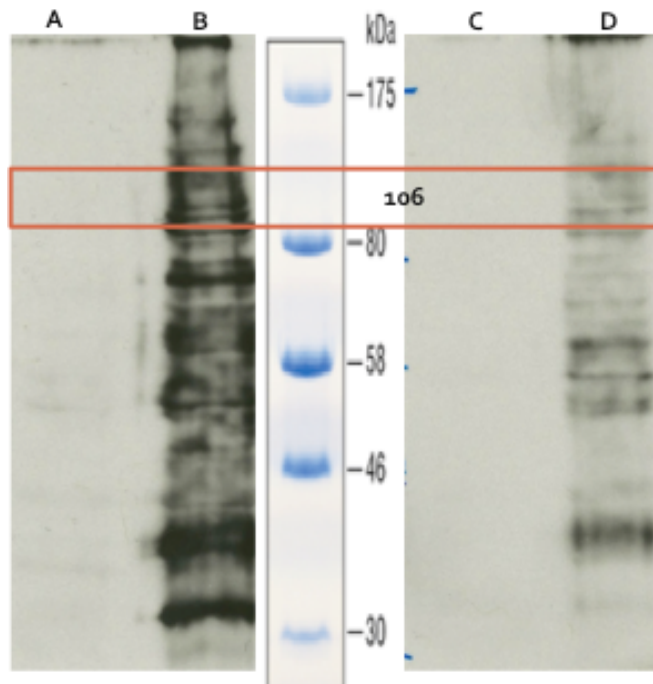


Figura 28. Determinación la fosforilación de Jak3 por Western Blot. Células obtenidas de bazo de ratón $Jak3^{-/-}$ 28.5×10^6 células por carril. Carril A. células sin estimulación, anticuerpo p-Jak3 Santa Cruz; carril B. células con estímulo de pervanadato, anticuerpo p-Jak3 Santa Cruz; carril C. células sin estimulación anticuerpo Cell signaling ; carril D. células con estimulación, anticuerpo p-Jak3 Cell signaling (#5031).

3.- Polimerización de actina.

Para determinar si existen diferencias entre la polimerización de actina se realizaron estimulaciones con las dos quimiocinas a concentraciones equimolares (24.6 nM) (figura 29).

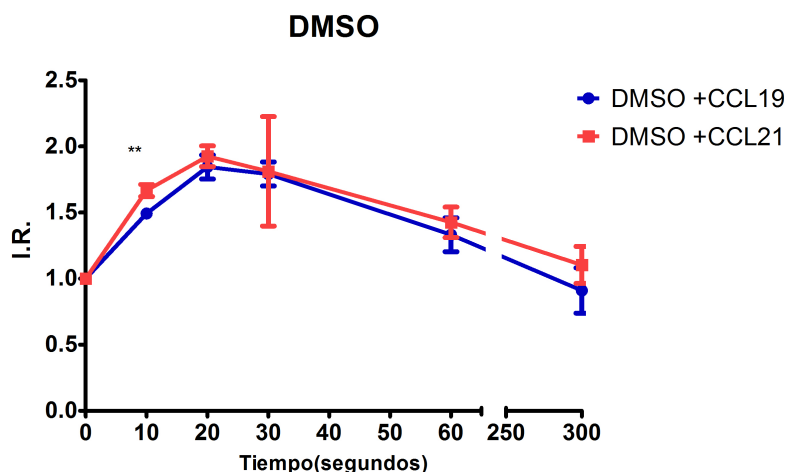


Figura 29. Cinética de polimerización de actina. Linfocitos primarios de ratones C57BL/6 se pre-trataron con DMSO para CCL19 y CCL21 en concentraciones equimolares. Tiene una diferencia estadística a los 10 segundos. (n=4) . ** $p < 0.01$. Las gráficas representan el promedio de 4 experimentos independientes \pm SEM.

Se encontró que los incrementos relativos de la polimerización de actina eran significativamente diferentes entre ambas quimiocinas a los 10 segundos ($p < 0.01$), sin embargo ambas inducen cinéticas similares en los linfocitos T.

Para saber si la respuesta era dependiente de Jak3 se pre-trataron a los linfocitos con WHI-p131 (inhibidor específico para Jak3) DMSO vehículo del inhibidor y PTX (inhibidor de la

activación de proteína G). El inhibidor se uso en dos diferentes concentraciones con base a los antecedentes del laboratorio que indicaban diferencias en la inhibición entre quimiocinas.

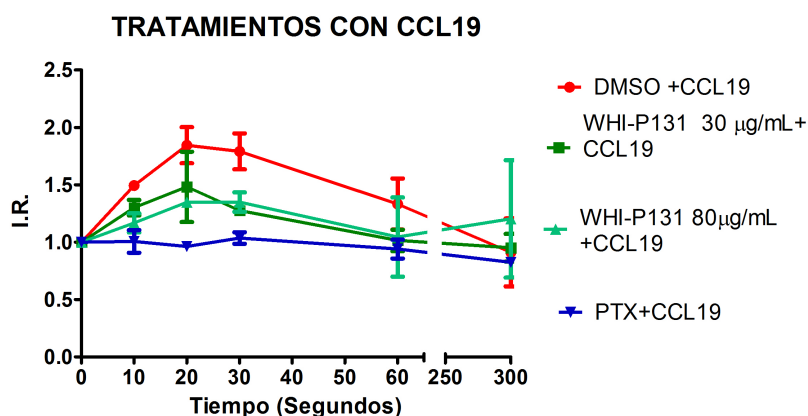


Figura 30. Cinética de polimerización de actina para diferentes tratamientos para CCL19 en concentración de 24.6nM. Linfocitos primarios de ratones C57BL/6 se pre-trataron con DMSO (línea azul), WHI-P131 (línea roja) o PTX (línea verde), estimuladas con la quimiocina CCL19 en tiempos (0-300 segundos). Las gráficas representan el promedio de 4 experimentos independientes \pm SEM.

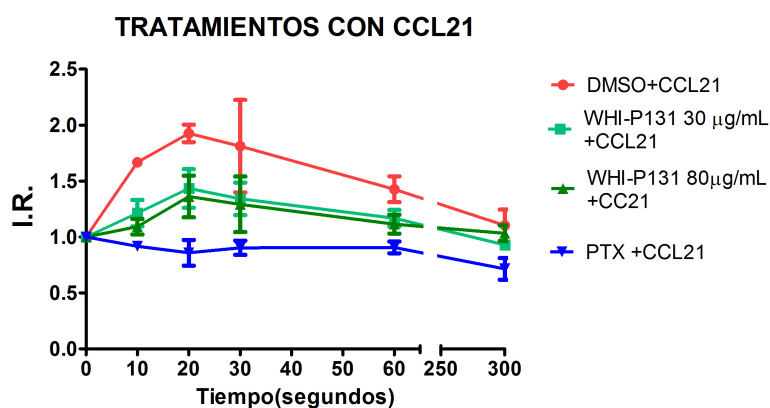


Figura 31. Cinética de polimerización de actina para diferentes tratamientos para CCL21 en concentración de 24.6nM. Linfocitos primarios de ratones C57BL/6 se pretrataron con DMSO (línea azul), WHI-P131 (línea roja) o PTX (línea verde), estimuladas con la quimiocina CCL21 en tiempos (0-300 segundos). 4 experimentos independientes \pm SEM.

Se compararon también los incrementos relativos para F-actina usando tratamientos con el inhibidor de Jak3 (WHI-P131) a dos concentraciones 30 y 80 μ g/mL: la respuesta es igualmente inhibida en ambas quimiocinas (figura 30 y 31). Por lo tanto, podemos concluir que lo reportado con anterioridad (falta de inhibición con CCL19 al usar 30 μ g/mL) era debido a la concentración usada. Es importante recordar, que al igual que todos los fármacos, la actividad inhibitoria no es total y depende de una concentración media, la cual evita afectar a otras cinasas.

Por otra parte, al pre-incubar las células con PTX, la cual inhibe la activación de la proteína G heterotrimérica, afectó de manera similar la respuesta hacia CCL21 Y CCL19, puesto que la polimerización de actina se ve totalmente abatida.

4.- Activación de Rac-1

Por medio de microscopia confocal se realizó la medición de la cinética de activación de Rac-1 GTP de linfocitos T obtenidos de ganglios de ratones silvestres, posterior a estimulación con las dos quimiocinas en concentraciones equimolares.

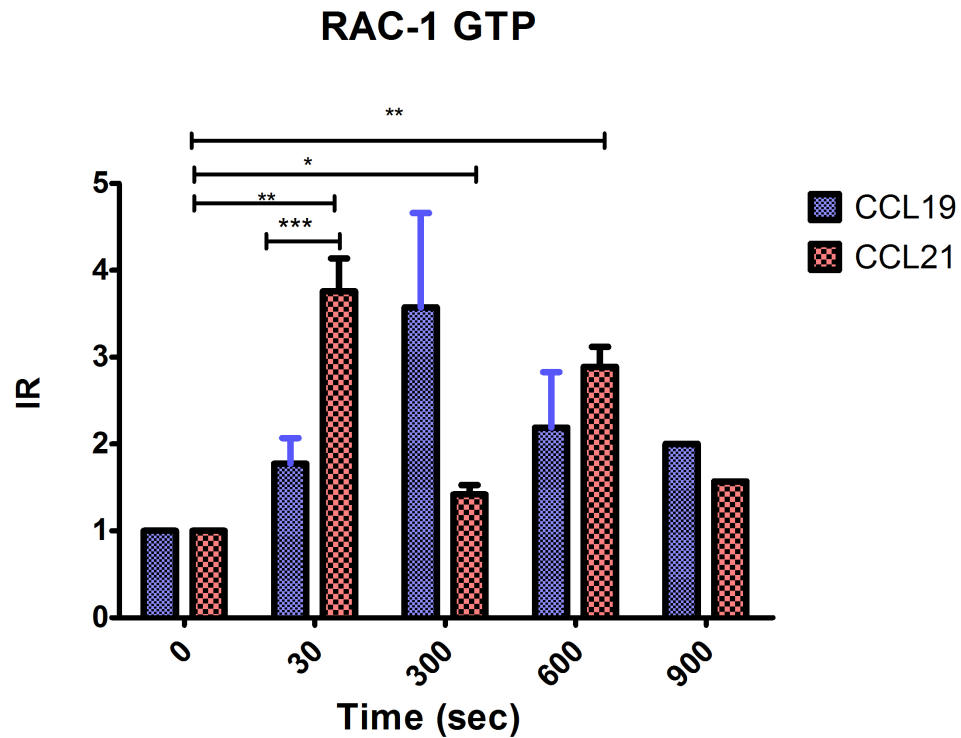


Figura 32. Gráfica que muestra los incrementos relativos para la activación de Rac-1GTP. En rojo se muestra la activación obtenida para CCL21 y en azul para CCL19. La grafica corresponde a 5 experimentos independientes \pm SEM. *** $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ para los tiempos de 0-600 segundos y un experimento para 900 segundos.

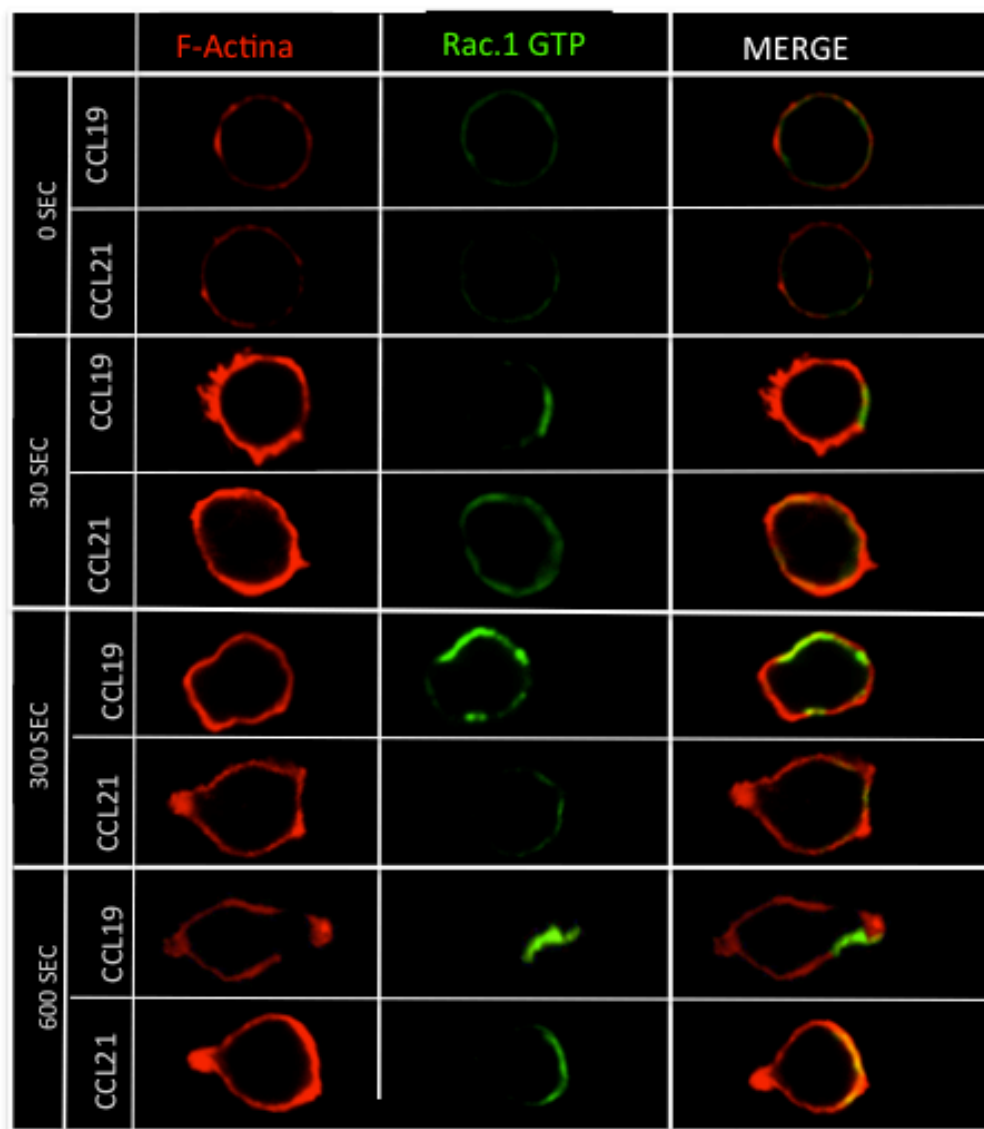


Figura 33. Retraso en la activación de Rac-1GTP para CCL19. Muestra las microscopías representativas de 5 ensayos independientes. En el canal rojo se muestra actina y en el verde Rac-1 GTP.

La figura 32 se muestra que para CCL21 la estimulación activa rápidamente Rac-1 a los 30 segundos, y disminuye a los 300 segundos, en cambio para CCL19 a la misma concentración molar la estimulación se ve incrementada hasta los 300 segundos. La comparación estadística resulta significativa a los 30 segundos con una $p < 0.01$

En la figura 33 se muestran las microscopías representativas de una n de 5 se puede observar que la activación de Rac-1 concuerda con la formación del frente de migración. Para CCL21, la formación del polarización de la célula comienza a los 30 segundos, mientras que para CCL19 es evidente hasta los 600 segundos cuando se tiene un fenotipo migratorio completo. Se realizó un ensayo a los 900 segundos, donde se observó una tendencia a la reactivación de Rac-1 por parte de CCL21, eso concordaría con la propuesta que estas GTPasas siguen ciclos de activación debido al intercambio de GTP por GDP.

Activación de GTPasas en ratones $Jak3^{-/-}$

Para determinar diferencias entre las quimiocinas y su dependencia con $Jak3$ se intentó determinar ratones heterocigotos ($Jak3^{+/-}$) y deficientes ($Jak3^{-/-}$). Para ello se separaron células por medio de perlas magnéticas. A continuación se muestran las microscopías obtenidas (figura 34).

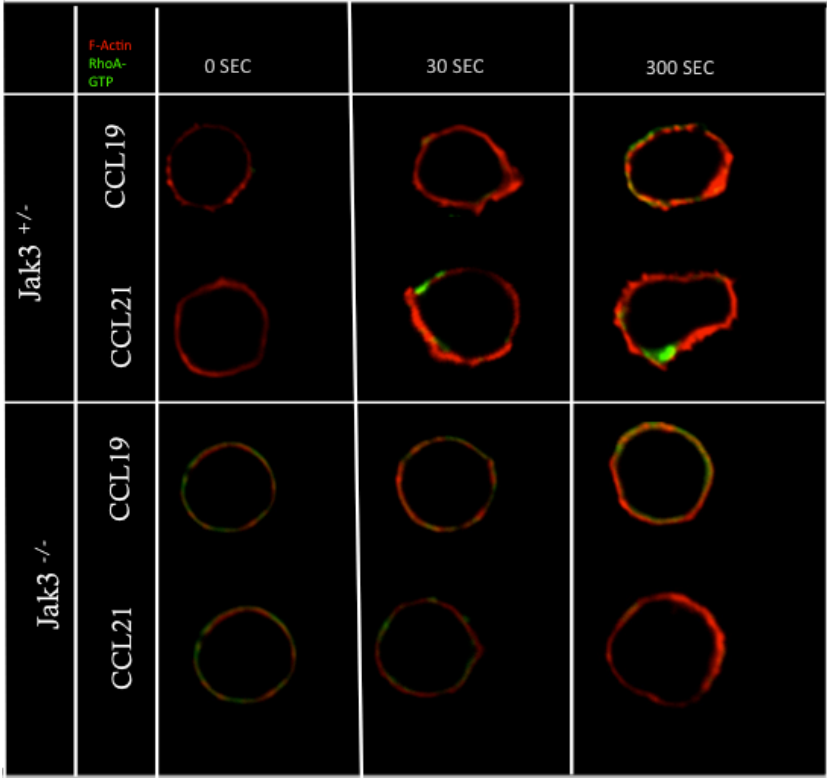


Figura 34. Muestra las microscopías confocales para Rac.1 en ratones $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$. La separación de célula CDC4+ se realizó por perlas magnéticas.

El experimento no fue concluyente ya que los ratones $Jak3^{-/-}$ tienen un aumento en la apoptosis celular, lo que da como consecuencia un bajo número de células posterior a la estimulación, que hace imposible tener un resultado cuantitativo representativo. Para determinar si la técnica de separación influyó en los resultados se hizo una tinción triple con CD4 APC. Sin embargo, la dificultad en este caso radica en encontrar células CD4+ (triple positivas para la tinción) en bazo de los ratones $Jak3^{-/-}$ (figura 35), ya que como se sabe su fenotipo es anérgico activado.

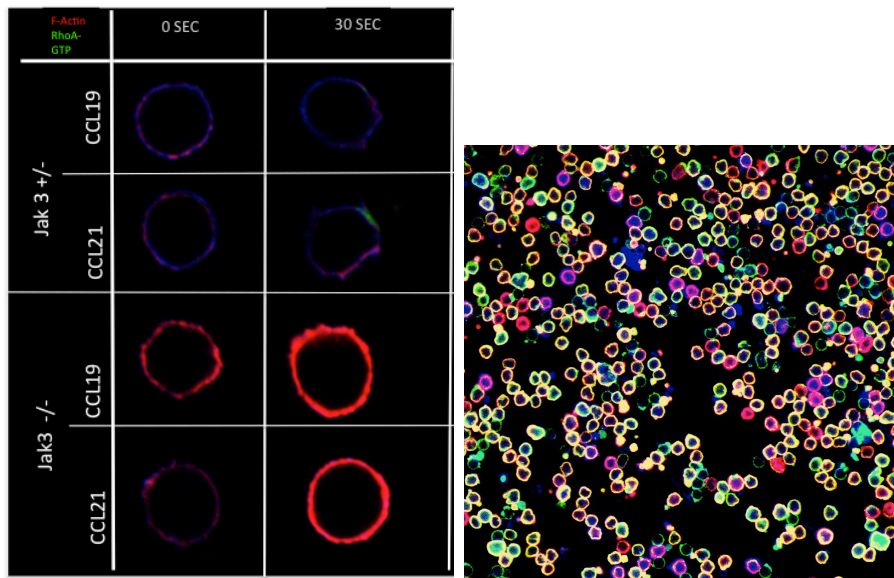


Figura 35. Muestra las microscopías confocales para RhoA en ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}. Se utilizó una triple tinción con CD4APC. A. Cinética temporal de activación de RhoA. B. Panorámica.

5.- Activación de Cdc42 GTP

Se sabe que Cdc42 genera un “loop” de activación hacia Rac-1, además promover la formación de filopodios. Conociendo la cinética de Rac-1 y el retraso migratorio generado posterior a la estimulación de CCL19 en linfocitos, se determinó hacer la cinética para Cdc42 GTP con las mismas quimiocinas, usando también un tiempo más corto (10 segundos), en el cual se había previamente observado que existían diferencias en la polimerización de actina. Como se muestra en la figura 36, la cinética de activación para Cdc42 mostró una relación con la de Rac-1; Cdc42 se activó desde los 10 segundos para ambas quimiocinas, sin embargo, su activación fue más sostenida en la estimulación con CCL19.

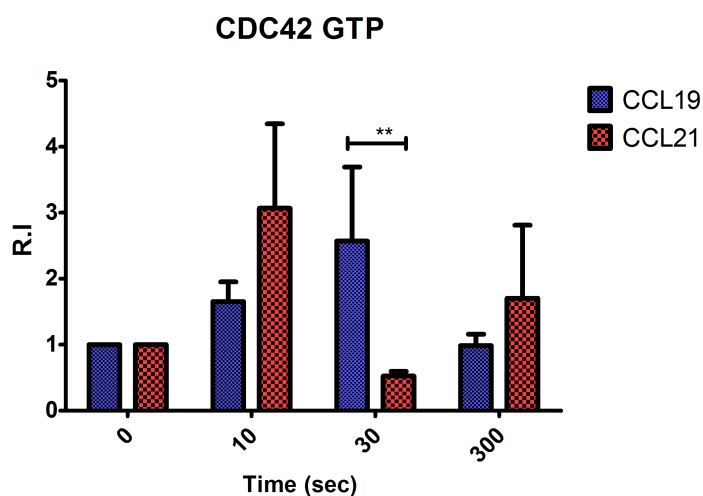


Figura 36. Gráfica que muestra los incrementos relativos para la activación de Cdc42 -1GTP. En rojo se muestra la activación obtenida para CCL21 y en azul para CCL19. La gráfica corresponde a 5 experimentos independientes \pm SEM.*** $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

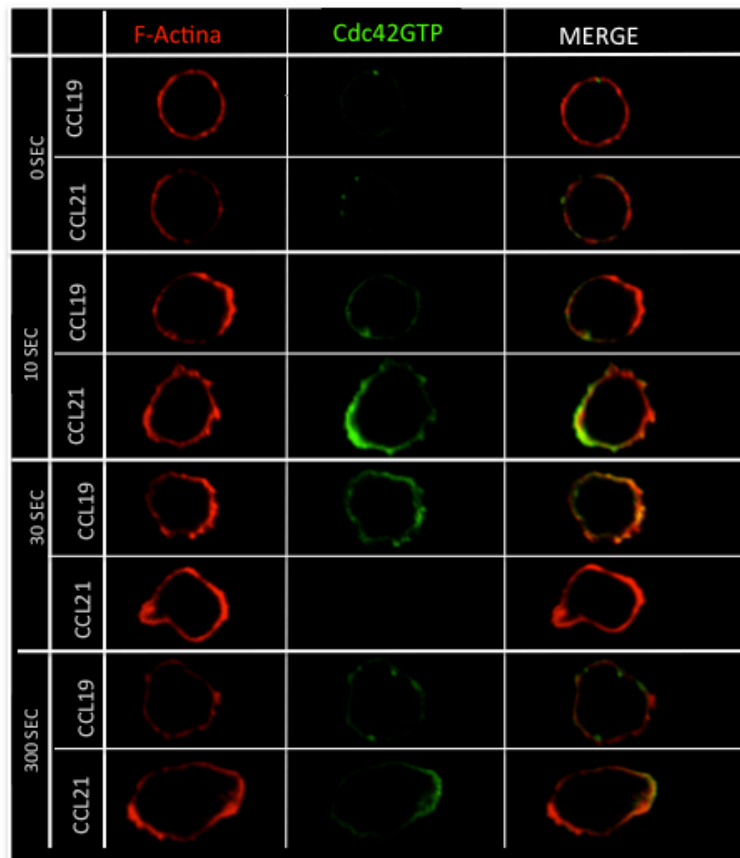


Figura 37. Activación temprana pero poco sostenida de Cdc42 inducida por la estimulación de CCL21. Muestra las microscopías representativas de 4 ensayos independientes. En el canal rojo se muestra actina y en el verde Cdc42-1 GTP.

6.- Activación de Rho-A

Se determinó la intensidad de fluorescencia para la GTPasa Rho-A, la cual se relocaliza en el urópodo. En el caso de CCL21 se muestra (n=5) a una mayor activación en comparación con CCL19.

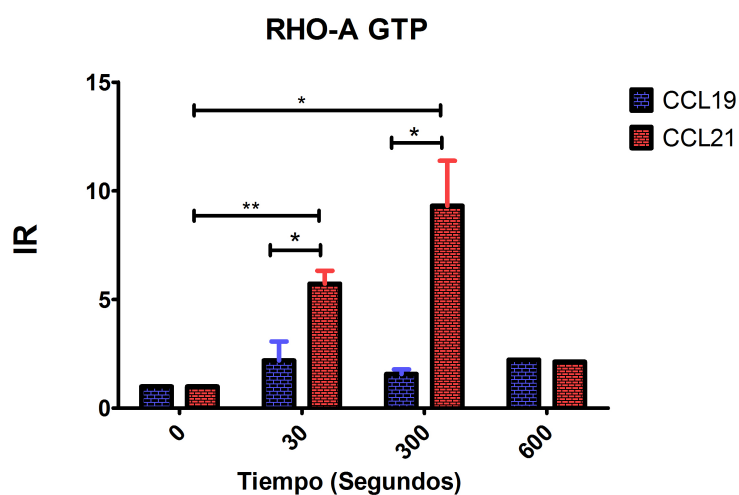


Figura 38. Gráfica que muestra los incrementos relativos para la activación de Rho-AGTP. En rojo se muestra la activación obtenida para CCL21 y en azul para CCL19. La grafica corresponde a 5 experimentos independientes \pm SEM. *** $P < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

En la microscopía confocal se muestra que la activación y relocalización de Rho-A es más rápida e intensa para CCL21.

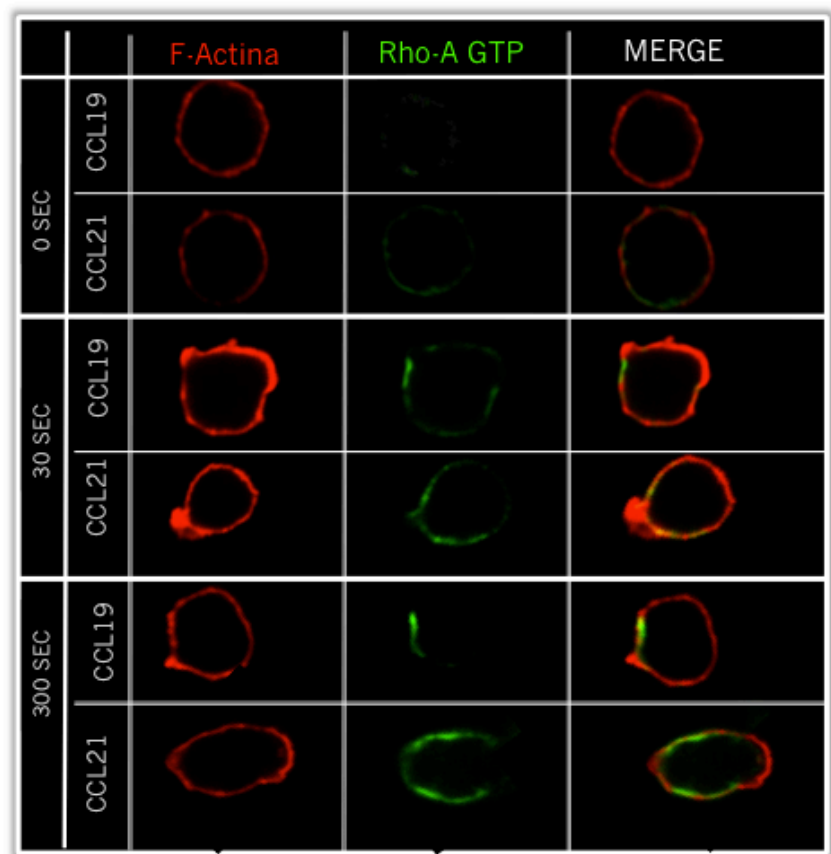


Figura 39. Microscopías representativas para Rho-GTP de 5 experimentos.

7.- Fosforilación de cofilina (serina 3)

Se determinó la cinética de cofilina fosforilada en serina 3, es decir su estado inactivo de la cofilina. Se encontró que la cinética de cofilina para CCL21 es igual a lo descrito por Ambriz-Peña por medio de Western Blot, donde se tenían altos basales para pCofilina al inicio y estos disminuían a los 30 segundos para luego recuperar su basal a los 300 segundos. Para CCL19 se encuentra a los 30 segundos mayor cantidad de cofilina fosforilada (inactiva).

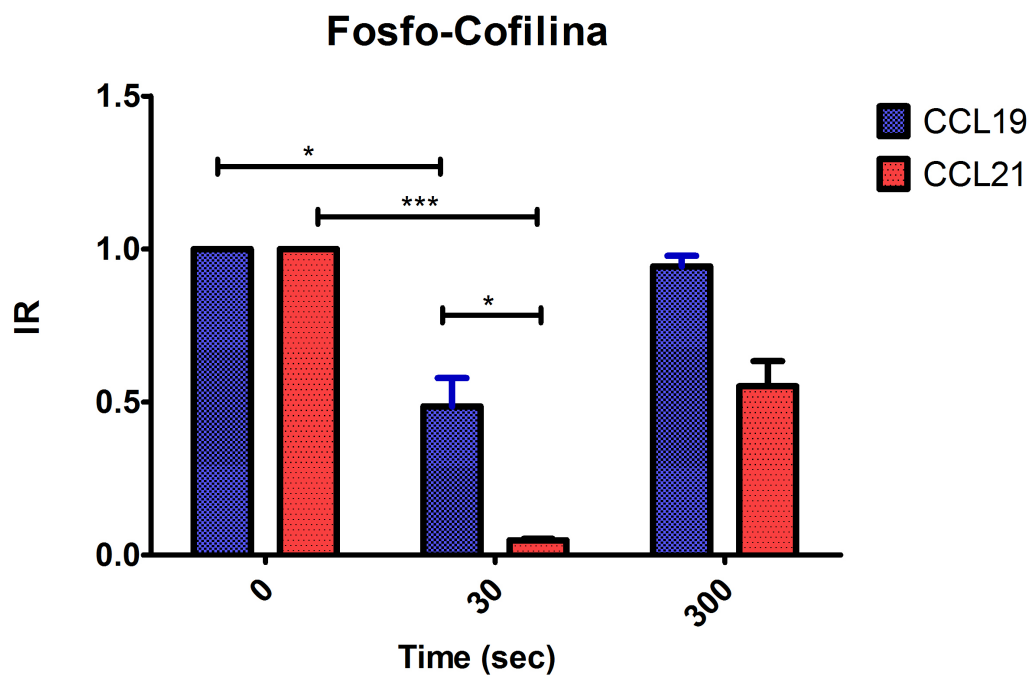


Figura 40. Grafica que muestra la diferencia de activación de cofilina a los 30 segundos después de la estimulación con CCL21 y CCL19. .Representa 4 experimentos independientes \pm SEM *** $P < 0.005$, * $p < 0.05$

En las micrografías de confocal se puede observar de igual forma que para RhoA y Rac-1 que el fenotipo migratorio no se forma con CCL19 a los 300 segundos pero sí para CCL21.

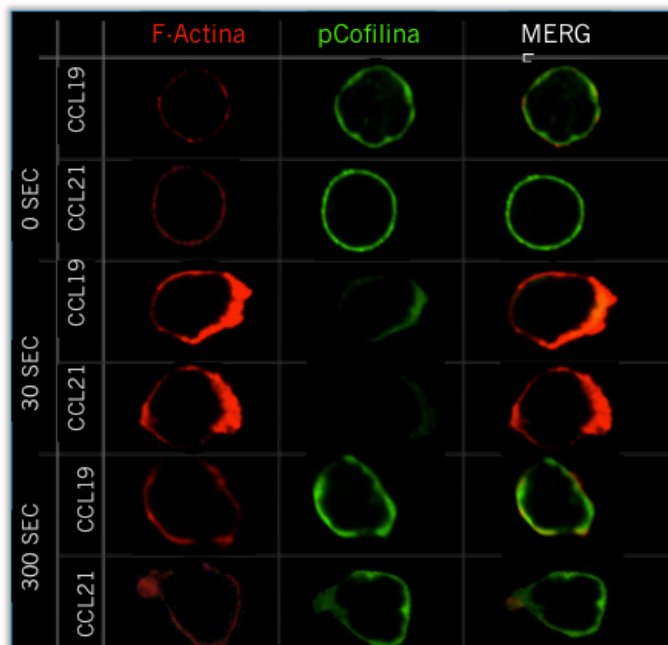


Figura 41. Microscopías representativas de 4 experimentos para fosfo cofilina.

Discusión

Las quimiocinas son controladores de muchas respuestas inmunes incluyendo la migración de linfocitos a ganglios linfáticos. Se ha descrito que varias quimiocinas pueden tener un mismo receptor, tal es el caso de CCL19 y CCL21, cuyo receptor es CCR7 [61]; ambas quimiocinas tiene igual afinidad por su ligando, sin embargo se ha descrito diferencias tanto en sus concentraciones fisiológicas (100 veces mayor CCL21 que CCL19 dentro de ganglio), como en sus efectos (extensión de dendritas, desensibilización del receptor, unión a glicosaminoglicanos) [53]. Por otra parte se ha demostrado que el receptor CCR7 tiene una relación estrecha con la activación de la cinasa Jak3 y esta a su vez con la reorganización del citoesqueleto necesaria para la formación del fenotipo migratorio durante la migración celular [124]. Considerando lo anterior, se determinó analizar la existencia de diferencias de entre ambas quimiocinas (CCL19 y CCL21) río debajo de la activación del receptor y su dependencia de Jak3 en linfocitos T [124]. Es importante mencionar que se decidió igualar las concentraciones molares de las quimiocinas CCL19 y CCL21, debido a la diferencia entre sus pesos moleculares (8.8 y 12.2 kDa, respectivamente), por lo que se tomó como referencia el dato donde se tiene mayor migración para CCL21 (300 ng/mL) en linfocitos T descrito con anterioridad en otros trabajos de nuestro laboratorio, el cual corresponde a 24.6 nM.

Estudios anteriores mostraron por medio de inmunoprecipitación que Jak3 se fosforila desde los 15 segundos bajo estímulo de CCL19 y CCL21 (100 ng/mL) [114]. Para conocer si la acción de las quimiocinas tiene la misma dependencia de Jak3 se realizaron pruebas para determinar su fosforilación (activación). Se trató de estandarizar un protocolo para su determinación por citometría de flujo, sin embargo se observó que la media de fluorescencia era mayor para aquellas células provenientes de los ratones deficientes de la molécula Jak3 en comparación con heterocigotos (fig. 23). El análisis dio como resultado que este aumento no era originado por el anticuerpo secundario (no hay diferencias significativas entre la intensidad de fluorescencia con y sin el anticuerpo secundario).

Posterior a ello, realizó un Western Blot para ver si era posible determinar la banda de 106 kDa específica de Jak3 fosforilado y así poder discriminar otras moléculas que dieran este aumento en la intensidad media de fluorescencia. Para eso se usaron dos anticuerpos de casas comerciales diferentes (los dos existentes en el mercado), ambos fueron generados con el objetivo de detectar la fosforilación en la tirosina 980 y indican que son específicos usando como control a la línea celular Hep G2 (carente

de Jak3). La figura 28 muestra el Western Blot resultado de la lisis de células de bazo posteriores a la eliminación de eritrocitos, tanto basalmente como posterior a una estimulación con pervanadato. El pervanadato al ser un inhibidor de fosfatasa evita que las células se desfosforilen, por lo tanto puede ser usado como control para determinación de proteínas en su forma fosforilada. Inesperadamente se observó que anticuerpos no hacen posible la identificación correcta de la banda con el peso correspondiente a la fosforilación de Jak3 (106 kDa) debido a la gran cantidad de bandas que son detectadas, lo cual indica que hay gran "crossreactividad" del anticuerpo en el reconocimiento de otras proteínas, sobre todo de pesos moleculares menores a las cinasas Jak. Interesantemente el numero de bandas es mayor posterior a la estimulación con pervanadato, por lo cual se puede suponer que el anticuerpo sí detecta formas fosforiladas de tirosinas, aunque no sea específico. Se sabe que existe una alta homología entre cinasas Janus, y que Jak2 [12] se ha sugerido que también tiene relación con CCR7, por lo cual con seguridad sería una de las bandas reconocidas [27]. Inhibir las otras cinasas podría ser una opción para mejorar la discriminación de bandas inespecíficas.

Otro de los inconvenientes para este ensayo es el número de células usadas para cada carril; esto se debe a que para comparar es necesario evitar las diferencias entre fondo genético ("background") por lo cual se requiere usar ratones de la misma camada. Cabe mencionar que en el caso de ratones Jak3^{-/-} las células al tener un fenotipo anérgico activado dan un menor número de células viables posteriores a la estimulación [34].

Ante estas dificultades se estableció estudiar las diferencias de las dos quimiocinas basándose en sus efectos posteriores a la fosforilación de Jak3 [124].

Uno de los efectos que ha manifestado una dependencia de Jak3 es la polimerización de actina, la cual puede ser definida como la formación de filamentos a partir de actina G. Como muestra la figura 29, la cinética de polimerización de actina resulta similar para las dos quimiocinas: se tiene un punto máximo a los 20 segundos y regresa a su basal a los 5 minutos. Empero, entre ambas quimiocinas se encuentra a los 10 segundos una diferencia estadísticamente significativa, donde la polimerización de actina inducida por CCL21 es más alta que para CCL19; dicha diferencia podría reflejar la rapidez de la formación del frente de migración, ya que es en este donde se necesita la mayor generación de filamentos [125]. A pesar de encontrar una sola diferencia se continuo con el estudio ya que el ensayo únicamente identifica en potencia relativa para la inducción de polimerización de actina, sin embargo no da información sobre qué tipo de estructuras que forman los filamentos de actina, lo

cual es importante porque da una idea como interacciona con otras células [68,113,126].

En datos no publicados del laboratorio usando concentración de 300 ng/mL, tanto para CCL19 como CCL21, indicaron que la polimerización de actina inducida por CCL19 solamente era inhibida usando la concentración de WHIP-131 80µg/mL (corresponde a la CI_{50}), mientras que para CCL21 desde los 30µg/mL se podía observar la inhibición, lo cual sugería mayor dependencia de CCL19 con Jak3. En el presente estudio se determinó que a concentraciones equimolares las dos quimiocinas se ven inhibidas desde 30 µg/mL, lo que indica que ambas son dependientes de igual forma de Jak3, y que la observación antes descrita era un efecto de la concentración usada, recordando que los inhibidores tienen concentraciones en las que pueden actuar sin inhibir a otras cinasas [47,127].

Un modulador de las dinámicas de actina es cofilina, se determinó su activación (desfosforilación) utilizando microscopia confocal. Se detectaron diferencias entre las quimiocinas a los 30 segundos al tener mayor intensidad de fluorescencia bajo la inducción con CCL19 que para CCL21, lo cual es un reflejo de diferencias en las dinámicas de cofilina, de forma interesante eso corresponde a la formación de filopodios y protrusiones que cambian rápidamente de lugar y grosor. El basal alto de cofilina inactiva corresponde a las descripciones donde se indica que es necesario tener al inicio cofilina inactiva para poder controlar la liberación de monómeros de actina y tener lugares para generar filamentos a partir de los existentes. Por lo tanto, sería importante analizar en futuros trabajos si existen también diferencias en la activación de proteínas que son requeridas para la activación de cofilina (desfosforilación) como SSH1L o LIMK1/2 (inactivada) [101].

Estudios anteriores indicaban que la activación de cofilina temprana (30 segundos) podría estar relacionada con SSH1L como resultado de la F actina generada dentro del mismo tiempo, ya que se sabe que esta funciona como una fosfatasa y es activada tras la polimerización de actina, permitido con ello la activación de cofilina de una manera espacio-temporal para la formación del lamelipodio y la migración dirigida en respuesta a quimiocinas.

Las GTPasas RhoA, Rac y Cdc42 definen que estructuras de actina forma la célula, es decir dependiendo de la GTPasa que participe es el tipo de remodelación y disposición de la F-actina, así como efectores moleculares activados. La investigación mostró diferencias de activación de Rac-1 y RhoA, en frente de migración y urópodo respectivamente, donde en ambos casos la quimiocina CCL21 promueve una mayor activación (más interesa y rápida). Esta diferencia está relacionada con las

observaciones descritas por otros grupos donde se determinó que CCL21 ayudaba a la migración y activación de ICAM-1, mientras que CCL19 está relacionada con la relocalización dentro de la zona T, ya que es producida por las células dendríticas para favorecer el encuentro con los linfocitos T [7,99,113].

La activación temprana de Cdc42 coincide con lo visto en otros estudios donde se supone que la polimerización temprana de actina, es dependiente de esta GTPasa que en conjunto con WASP y Arp 2/3 permite la formación de protrusiones de la membrada para la formación de filopodios [93], además de otras funciones relacionadas con los focos de adhesión. Se sabe además que la formación del urópodo y la activación de RhoA dependen de Jak3, ya que su inhibición provoca la deficiencia en la formación [124].

Por otra parte, la estimulación de CCL19 induce una activación más lenta del linfocito y con mayor protrusiones con mayor dependencia de Cdc42, lo cual podría ayudar al contacto con diferentes APC hasta encontrar la adecuada para correcta presentación antigénica (péptido-MHC) [65,116].

Con anterioridad se había descrito un "loop" de activación entre Cdc42 y Rac-1, o cual coincide con los efectos inducidos por CCL21, sin embargo aun no se sabe que molécula podría funcionar como un freno en el caso de CCL19 y que permite la estabilidad de los filopodios, sin el rápido cambio al frente de migración.

La correcta generación de un fenotipo migratorio no sólo es necesario para una correcta migración, también tiene como objetivo movilizar la maquinaria celular para lograr percibir su entorno y para la correcta presentación antigénica. Los resultados de este trabajo muestran que existe un retraso en la formación del fenotipo migratorio bajo el estímulo de CCL19, y que en cambio genera filopodios con gran estabilidad que dependen de Cdc42.

Finalmente considerando que la migración celular es necesaria para una correcta respuesta inmune y homeostasis, los datos de este trabajo sugieren que los efectos de CCL19 y CCL21 generados sobre linfocitos T no son redundantes, cada una de las quimicinas tiene una función fuera y dentro del ganglio. Ello también podría sugerir diferencias entre proteínas relacionadas con el contacto con la matriz extracelular (como proteínas de adhesión) y con las células presentadoras de antígeno (como moléculas coestimuladoras durante la presentación antigénica). Se ha descrito recientemente que CCRL1 generan un gradiente fisiológicamente funcional de ambas quimiocinas [128]. En un contexto inflamatorio esta diferencia también es de importancia pues explicaría y daría idea de por qué en enfermedades autoinmunes que existen diferencias en la sobre expresión CCL21 y CCL19 [129,130]. En

conclusión, parecería que CCL19 induce una respuesta para encontrar a las dendríticas y generar estabilidad dentro del ganglio, mientras que CCL21 genera una migración y entrada al ganglio.

Conclusiones

- Las cinéticas de polimerización de actina sólo muestran diferencia significativa a los 10 segundos, siendo mayor la polimerización para CCL21.
- La activación de Rac-1 es más rápida e intensa con la estimulación de CCL21 que con CCL19 en linfocitos T.
- La activación de Cdc42 es más rápida pero menos sostenida con la estimulación de CCL21.
- La activación de RhoA muestra una tendencia a ser más intensa por CCL21 con linfocitos T.
- La activación de cofilina debida a su desfosforilación es mayor a los 30 segundos con CCL21 que con CCL19.
- Los ensayos con ratones Jak3^{-/-} no fueron terminados debido dificultades con la viabilidad de las células T.

Perspectivas

- Identificar si existen diferencias entre la cinética LIMK para la estimulación con CCL19 y CCL21
- Generar un modelo *in vitro* donde coexistan CCL19 y CCL21.
- Estudiar diferencias entre las moléculas de adhesión en linfocitos T posterior a una estimulación con CCL19 y CCL21

Bibliografía

1. Alberts B, Wilson JH, Hunt T (2008) Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. xxxiii, 1601, 1690 p. p.
2. Zlotnik A, Yoshie O (2012) The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36: 705-716.
3. Soldevila G, García-Zepeda, E.A. (2003) Rol of chemokines in T cell development. *Inmunología* 22: 371-384.
4. Campbell JJ, Butcher EC (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12: 336-341.
5. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25: 75-84.
6. Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8: 895-903.
7. Schumann K, Lammermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, et al. (2010) Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* 32: 703-713.
8. Bellanger D, Jacquemin V, Chopin M, Pierron G, Bernard OA, et al. (2014) Recurrent JAK1 and JAK3 somatic mutations in T-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia* 28: 417-419.
9. Bardi G, Niggli V, Loetscher P (2003) Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* 542: 79-83.
10. Katada T, Bokoch GM, Northup JK, Ui M, Gilman AG (1984) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem* 259: 3568-3577.
11. Katada T (2012) The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol Pharm Bull* 35: 2103-2111.
12. Stein JV, Soriano SF, M'Rini C, Nombela-Arrieta C, de Buitrago GG, et al. (2003) CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101: 38-44.
13. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
14. Imada K, Leonard WJ (2000) The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37: 1-11.
15. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC (2007) Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 44: 2497-2506.
16. Kumar A, Toscani A, Rane S, Reddy EP (1996) Structural organization and chromosomal mapping of JAK3 locus. *Oncogene* 13: 2009-2014.
17. O'Shea JJ, Plenge R (2012) JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36: 542-550.
18. Schindler C, Levy DE, Decker T (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282: 20059-20063.
19. Leu JH, Yan SJ, Lee TF, Chou CM, Chen ST, et al. (2000) Complete genomic organization and promoter analysis of the round-spotted pufferfish JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 genes. *DNA Cell Biol* 19: 431-446.
20. Wu W, Sun XH (2012) Janus kinase 3: the controller and the controlled. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 187-196.

21. Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, et al. (2001) Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol Cell* 8: 959-969.
22. Wong M, Uddin S, Majchrzak B, Huynh T, Proudfoot AE, et al. (2001) Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J Biol Chem* 276: 11427-11431.
23. Laurence A, Pesu M, Silvennoinen O, O'Shea J (2012) JAK Kinases in Health and Disease: An Update. *Open Rheumatol J* 6: 232-244.
24. O'Shea JJ, Husa M, Li D, Hofmann SR, Watford W, et al. (2004) Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* 41: 727-737.
25. Soldevila G, Licona I, Salgado A, Ramirez M, Chavez R, et al. (2004) Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology* 112: 191-200.
26. Baird AM, Thomis DC, Berg LJ (1998) T cell development and activation in Jak3-deficient mice. *J Leukoc Biol* 63: 669-677.
27. Xu D, Qu CK (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13: 4925-4932.
28. Candotti F, Oakes SA, Johnston JA, Giliani S, Schumacher RF, et al. (1997) Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 90: 3996-4003.
29. Abell K, Watson CJ (2005) The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity. *Cell Cycle* 4: 897-900.
30. Zhou YJ, Hanson EP, Chen YQ, Magnuson K, Chen M, et al. (1997) Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13850-13855.
31. Thomis DC, Lee W, Berg LJ (1997) T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis. *J Immunol* 159: 4708-4719.
32. Candotti F, O'Shea JJ, Villa A (1998) Severe combined immune deficiencies due to defects of the common gamma chain-JAK3 signaling pathway. *Springer Semin Immunopathol* 19: 401-415.
33. Safford MG, Levenstein M, Tsifrina E, Amin S, Hawkins AL, et al. (1997) JAK3: expression and mapping to chromosome 19p12-13.1. *Exp Hematol* 25: 374-386.
34. Zeng YX, Takahashi H, Shibata M, Hirokawa K (1994) JAK3 Janus kinase is involved in interleukin 7 signal pathway. *FEBS Lett* 353: 289-293.
35. Krejsgaard T, Ralfkiaer U, Clasen-Linde E, Eriksen KW, Kopp KL, et al. (2011) Malignant cutaneous T-cell lymphoma cells express IL-17 utilizing the Jak3/Stat3 signaling pathway. *J Invest Dermatol* 131: 1331-1338.
36. Lai YG, Hou MS, Lo A, Huang ST, Huang YW, et al. (2013) IL-15 modulates the balance between Bcl-2 and Bim via a Jak3/1-PI3K-Akt-ERK pathway to promote CD8 α α ⁺ intestinal intraepithelial lymphocyte survival. *Eur J Immunol* 43: 2305-2316.
37. Cavalcanti E, Gigante M, Mancini V, Battaglia M, Ditonno P, et al. (2010) JAK3/STAT5/6 pathway alterations are associated with immune deviation in CD8 T cells in renal cell carcinoma patients. *J Biomed Biotechnol* 2010: 935764.
38. Malabarba MG, Rui H, Deutsch HH, Chung J, Kalthoff FS, et al. (1996) Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing

- interleukin-2 receptor-gamma and interleukin-4 receptor-alpha. *Biochem J* 319 (Pt 3): 865-872.
39. Notarangelo LD, Giliani S, Mella P, Schumacher RF, Mazza C, et al. (2000) Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gamma-c-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunobiology* 202: 106-119.
 40. Amin HM, Medeiros LJ, Ma Y, Feretzaki M, Das P, et al. (2003) Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 22: 5399-5407.
 41. Baird AM, Lucas JA, Berg LJ (2000) A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3. *J Immunol* 165: 3680-3688.
 42. Cetkovic-Cvrlje M, Olson M, Gbate K (2012) Targeting Janus tyrosine kinase 3 (JAK3) with an inhibitor induces secretion of TGF-beta by CD4+ T cells. *Cell Mol Immunol* 9: 350-360.
 43. Boucekikoua A, Scourzic L, de Wever O, Zhang Y, Cervera P, et al. (2014) JAK3 deregulation by activating mutations confers invasive growth advantage in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma. *Leukemia* 28: 338-348.
 44. Martin P, Gomez M, Lamana A, Cruz-Adalia A, Ramirez-Huesca M, et al. (2010) CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 30: 4877-4889.
 45. Kumar RN, Radhika V, Audige V, Rane SG, Dhanasekaran N (2004) Proliferation-specific genes activated by Galpha(12): a role for PDGFRalpha and JAK3 in Galpha(12)-mediated cell proliferation. *Cell Biochem Biophys* 41: 63-73.
 46. Papageorgiou AC, Wikman LE (2004) Is JAK3 a new drug target for immunomodulation-based therapies? *Trends Pharmacol Sci* 25: 558-562.
 47. Changelian PS, Moshinsky D, Kuhn CF, Flanagan ME, Munchhof MJ, et al. (2008) The specificity of JAK3 kinase inhibitors. *Blood* 111: 2155-2157.
 48. Velotta JB, Deuse T, Haddad M, Masuda E, Park G, et al. (2009) A novel JAK3 inhibitor, R348, attenuates chronic airway allograft rejection. *Transplantation* 87: 653-659.
 49. Love PE, Bhandoola A (2011) Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol* 11: 469-477.
 50. Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, et al. (2006) Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* 108: 2531-2539.
 51. Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, et al. (2007) Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol* 37: 2090-2096.
 52. Calderon L, Boehm T (2011) Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7517-7522.
 53. Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, et al. (2013) A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 269-283.
 54. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 362-371.
 55. Cuesta-Mateos C, Lopez-Giral S, Alfonso-Perez M, de Soria VG, Loscertales J, et al. (2010) Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the

- homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 38: 756-764, 764 e751-754.
56. Miyasaka M, Tanaka T (2004) Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4: 360-370.
 57. Pfaendtner J, De La Cruz EM, Voth GA (2010) Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7299-7304.
 58. Moser B, Loetscher P (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2: 123-128.
 59. Nandagopal S, Wu D, Lin F (2011) Combinatorial guidance by CCR7 ligands for T lymphocytes migration in co-existing chemokine fields. *PLoS One* 6: e18183.
 60. Hall A (2012) Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 40: 1378-1382.
 61. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9: 970-980.
 62. Hotchin NA, Hall A (1996) Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv* 27: 311-322.
 63. Otero C, Eisele PS, Schaeuble K, Groettrup M, Legler DF (2008) Distinct motifs in the chemokine receptor CCR7 regulate signal transduction, receptor trafficking and chemotaxis. *J Cell Sci* 121: 2759-2767.
 64. Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4: 110-122.
 65. Vicente-Manzanares M, Sancho D, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F (2002) The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Int Rev Cytol* 216: 233-289.
 66. Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 965-970.
 67. Ryan GL, Petroccia HM, Watanabe N, Vavylonis D (2012) Excitable actin dynamics in lamellipodial protrusion and retraction. *Biophys J* 102: 1493-1502.
 68. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* 94: 235-263.
 69. Charest PG, Firtel RA (2006) Feedback signaling controls leading-edge formation during chemotaxis. *Curr Opin Genet Dev* 16: 339-347.
 70. Lafouresse F, Vasconcelos Z, Cotta-de-Almeida V, Dupre L (2013) Actin cytoskeleton control of the comings and goings of T lymphocytes. *Tissue Antigens* 82: 301-311.
 71. Nayak RC, Chang KH, Vaitinadin NS, Cancelas JA (2013) Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 256: 255-268.
 72. Fais S, Malorni W (2003) Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J Leukoc Biol* 73: 556-563.
 73. Klemke M, Kramer E, Konstandin MH, Wabnitz GH, Samstag Y (2010) An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments. *EMBO J* 29: 2915-2929.
 74. Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: 167-179.
 75. Carlier MF (1990) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys* 26: 51-73.

76. Carlier MF, Pantaloni D, Evans JA, Lambooy PK, Korn ED, et al. (1988) The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett* 235: 211-214.
77. Pantaloni D, Hill TL, Carlier MF, Korn ED (1985) A model for actin polymerization and the kinetic effects of ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7207-7211.
78. Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, et al. (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci* 62: 955-970.
79. Carlier MF, Pantaloni D, Korn ED (1986) The effects of Mg²⁺ at the high-affinity and low-affinity sites on the polymerization of actin and associated ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 261: 10785-10792.
80. Carlier MF, Valentin-Ranc C, Combeau C, Fievez S, Pantaloni D (1994) Actin polymerization: regulation by divalent metal ion and nucleotide binding, ATP hydrolysis and binding of myosin. *Adv Exp Med Biol* 358: 71-81.
81. Carlsson AE (2008) Model of reduction of actin polymerization forces by ATP hydrolysis. *Phys Biol* 5: 036002.
82. Bernstein BW, Bamburg JR (2010) ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20: 187-195.
83. Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, et al. (2004) Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304: 743-746.
84. Pavlov D, Muhlrads A, Cooper J, Wear M, Reisler E (2007) Actin filament severing by cofilin. *J Mol Biol* 365: 1350-1358.
85. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2001) Actin dynamics. *J Cell Sci* 114: 3-4.
86. Delorme V, Machacek M, DerMardirossian C, Anderson KL, Wittmann T, et al. (2007) Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Dev Cell* 13: 646-662.
87. Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL (2013) Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci* 14: 7089-7108.
88. Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265: 23-32.
89. Siderovski DP, Willard FS (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 1: 51-66.
90. Tybulewicz VL, Henderson RB (2009) Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9: 630-644.
91. Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ (2010) Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol* 190: 553-563.
92. Bristow JM, Sellers MH, Majumdar D, Anderson B, Hu L, et al. (2009) The Rho-family GEF Asef2 activates Rac to modulate adhesion and actin dynamics and thereby regulate cell migration. *J Cell Sci* 122: 4535-4546.
93. Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S (2010) Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol* 191: 1261-1269.
94. Tapon N, Hall A (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86-92.

95. Kast DJ, Yang C, Disanza A, Boczkowska M, Madasu Y, et al. (2014) Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. *Nat Struct Mol Biol* 21: 413-422.
96. Amann KJ, Pollard TD (2001) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3: 306-310.
97. Heasman SJ, Ridley AJ (2010) Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration. *Small GTPases* 1: 174-179.
98. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1: 253-259.
99. Yanagawa Y, Onoe K (2002) CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 100: 1948-1956.
100. Caron E (2003) Rac signalling: a radical view. *Nat Cell Biol* 5: 185-187.
101. Bernard O (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1071-1076.
102. Samstag Y, John I, Wabnitz GH (2013) Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev* 256: 30-47.
103. Samstag Y, Eckerskorn C, Wesselborg S, Henning S, Wallich R, et al. (1994) Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4494-4498.
104. Bamburg JR, Bernstein BW (2010) Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep* 2: 62.
105. Bamburg JR, Bernstein BW (2008) ADF/cofilin. *Curr Biol* 18: R273-275.
106. Jovceva E, Larsen MR, Waterfield MD, Baum B, Timms JF (2007) Dynamic cofilin phosphorylation in the control of lamellipodial actin homeostasis. *J Cell Sci* 120: 1888-1897.
107. Ono S, Nomura K, Hitosugi S, Tu DK, Lee JA, et al. (2011) The two actin-interacting protein 1 genes have overlapping and essential function for embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 22: 2258-2269.
108. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, et al. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23-33.
109. Oliveira-Neto HH, de Souza PP, da Silva MR, Mendonca EF, Silva TA, et al. (2013) The expression of chemokines CCL19, CCL21 and their receptor CCR7 in oral squamous cell carcinoma and its relevance to cervical lymph node metastasis. *Tumour Biol* 34: 65-70.
110. Fevang B, Yndestad A, Damas JK, Halvorsen B, Holm AM, et al. (2009) Chemokines and common variable immunodeficiency; possible contribution of CCL19, CCL21 and CCR7 to immune dysregulation. *Clin Exp Immunol* 158: 237-245.
111. Byers MA, Calloway PA, Shannon L, Cunningham HD, Smith S, et al. (2008) Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21. *J Immunol* 181: 4723-4732.
112. Otero C, Groettrup M, Legler DF (2006) Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol* 177: 2314-2323.
113. Rivas-Caicedo A, Soldevila G, Fortoul TI, Castell-Rodriguez A, Flores-Romo L, et al. (2009) Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration. *PLoS One* 4: e7066.

114. Garcia-Zepeda EA, Licona-Limon I, Jimenez-Solomon MF, Soldevila G (2007) Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs. *Immunology* 122: 247-260.
115. Carlsen HS, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Baekkevold ES (2005) Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* 106: 444-446.
116. Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, et al. (2001) The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193: 1105-1112.
117. Tateyama M, Fujihara K, Misu T, Feng J, Onodera Y, et al. (2006) Expression of CCR7 and its ligands CCL19/CCL21 in muscles of polymyositis. *J Neurol Sci* 249: 158-165.
118. Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE (2001) Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97: 3342-3348.
119. Biswas SK, Sodhi A (2002) Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol* 2: 1095-1107.
120. Steindler C, Li Z, Algarte M, Alcover A, Libri V, et al. (2004) Jamip1 (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules. *J Biol Chem* 279: 43168-43177.
121. Kumar N, Mishra J, Narang VS, Waters CM (2007) Janus kinase 3 regulates interleukin 2-induced mucosal wound repair through tyrosine phosphorylation of villin. *J Biol Chem* 282: 30341-30345.
122. Mishra J, Karanki SS, Kumar N (2012) Identification of molecular switch regulating interactions of Janus kinase 3 with cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 287: 41386-41391.
123. Mishra J, Kumar N (2014) Adapter protein Shc regulates Janus kinase 3 phosphorylation. *J Biol Chem* 289: 15951-15956.
124. Ambriz-Pena X, Garcia-Zepeda EA, Meza I, Soldevila G (2014) Jak3 enables chemokine-dependent actin cytoskeleton reorganization by regulating cofilin and Rac/Rhoa GTPases activation. *PLoS One* 9: e88014.
125. Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, et al. (2003) Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160: 375-385.
126. Yamaoka K, Min B, Zhou YJ, Paul WE, O'Shea J J (2005) Jak3 negatively regulates dendritic-cell cytokine production and survival. *Blood* 106: 3227-3233.
127. Cole AG, Bohnstedt AC, Paradkar V, Kingsbury C, Quintero JG, et al. (2009) 2-Benzimidazolyl-9-(chroman-4-yl)-purinone derivatives as JAK3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 6788-6792.
128. Ulvmar MH, Werth K, Braun A, Kelay P, Hub E, et al. (2014) The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nat Immunol* 15: 623-630.
129. Qin Y, He LD, Sheng ZJ, Yong MM, Sheng YS, et al. (2014) Increased CCL19 and CCL21 levels promote fibroblast ossification in ankylosing spondylitis hip ligament tissue. *BMC Musculoskelet Disord* 15: 316.

130. Christopherson KW, 2nd, Hood AF, Travers JB, Ramsey H, Hromas RA (2003) Endothelial induction of the T-cell chemokine CCL21 in T-cell autoimmune diseases. *Blood* 101: 801-806.

Anexo 1

Extracción de ADN

Se cortan 0.5 cm de las colas de los ratones de la cepa Jak3, se colocan en tubos eppendorff de 1.5mL. Se añade 600uL de la solución de NaOH 50mM y se les mantiene en calentamiento de 90-100 °C durante 1 a 2 horas. Después se incuban a 4°C durante 10 minutos y se añade 50uL de una solución de Tris pH 8. Los tubos se centrifugan a 13000rpm durante 10 minutos. Se recuperon 300uL del sobrenadante para realizar dos extracciones fenol-cloroformo (1:1) y dos de cloroformo. Entre cada una y para separar la fase acuosa se centrifuga a 13000 rpm. Finalmente la fase acuosa se almacena a -20°C.

PCR

Mezcla de reacción de PCR NEO

MgCl₂	1 µL
Buffer 10x	2.5 µL
dNTPs 2.5mM	0.25 µL
Oligonucleótidos hebra sentido(100ng/mL)	0.35 µL
Oligonucleótidos hebra antisentido(100ng/mL)	0.35 µL
H₂O inyectable	20.25 µL
Taq polimerasa	1.0 µL
DNA obtenido de la extracción	2 µL

Neo1 (casett de neomicina) hebra sentido5´ GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3´´
antisentido 3-GTACGTGCTCGCTCGATGCG-5

Mezcla de reacción de PCR JAK3

MgCl₂	1 µL
Buffer 10x	2.5 µL
dNTPs 2.5mM	0.25 µL
Oligonucleótidos hebra sentido y antisentido (100ng/mL)	0.35 µL
H₂O inyectable	20.25 µL
Taq polimerasa	1.0 µL
DNA obtenido de la extracción	2 µL

Jak3 hebra sentido 3´GGCAACTTTGGCAGCGTGGAGCTGTGCCGC-3

Jak3 hebra antisentido 3´-CTGGCCCATAGCTGACTCCCCGGTACTTGA-5

Anexo 2: Soluciones utilizadas

Buffer de FACS

SFB 2%
NaN₃ 0.02%
EDTA 5nM
Paraformaldehído 4% (0.1L)
PF 4 g
Diluir en BSA 1x pH 7.3

Buffer de transferencia

Tris base 3g
Glicina 14.4 g
Metanol 200mL

Loadin buffer 4x (0.1L)

SDS 20% 40mL
Tris 1M pH 6.8 20 uL
Glicerol 40mL
Azul de bromofenol
Dilución 1mL
Loadin buffer 250uL
Beta mercapto 310 uL
H₂O 440 uL

PBS 10x

NaH₂PO₄-4H₂O 1.28g
Na₂HPO₄ -7H₂O 11.24g
Ajustar pH 7.3
NaCl 43.88 g
Aforar a 500mL

- **ACT**

Solución A

NH₄Cl 8.3 g
H₂O 1L

Soluciónn B

Tris base 2.06g
H₂O 90mL
Aforar a pH a 7.7 con HCl
Aforar a 100mL

- **RPMI sin SFB**

RPMI 1 sobre
Antibiotic- antimycotic (100x) 10mL
L-glutamina 200mM 10mL
Bicarbonato de sodio 2g

HEPES buffer solution (1M) 12.5mL

H₂O 1000mL

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

- Polimerización de actina por citometría de flujo

Buffer A

Diluir formaldehído a partir del stor a 37% 1:5 en PBS 1x

Buffer B

NBD-phallacidin en metanol 1.5 mL
Formaldehído 37%

Anexo 3: concentraciones de quimiocinas

A continuación se muestra el calculo de la concentración de cada una de las quimiocinas

300ng/mL CCL 21 = 24.6 nM (12.2kDa)

300ng/mL CCL19= 34. 1nM(8.8 kDa)

24.6 nM para las dos quimiocinas
