



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INMUNOLOGÍA

**“PAPEL DE CD5 EN LA PROTECCIÓN A APOPTOSIS
DURANTE EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T:
MECANISMOS MOLECULARES”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
CARLOS ALBERTO MIER AGUILAR**

**TUTOR: DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO
CINVESTAV**

MÉXICO DF, DICIEMBRE 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.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/086/Jur/2015

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

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **376** del 21 de octubre del 2015, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **CARLOS ALBERTO MIER AGUILAR**, con número de cuenta **302671885** con la tesis titulada: "**PAPEL DE CD5 EN LA PROTECCIÓN A APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T: MECANISMOS MOLECULARES**", dirigida por la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo.

Presidente: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
Secretario: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
Vocal: Dra. Claudia González Espinosa
Vocal: Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Vocal: Dra. Martha Robles Flores

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 22 de octubre del 2015



DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA



DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumno
AOR/CRL/aap

A mi familia, porque cada vez es más grande y mejor

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido el fruto de muchos años de trabajo en un laboratorio al que le debo todo lo que soy profesionalmente. Ahí aprendí lo que es la ciencia y en muchos aspectos, lo que es la vida. Después de casi 8 años de estar en el mismo lugar y pasar momentos buenos y malos, ha llegado el momento de despedirme. Sé que no es un adiós, porque en donde este siempre estará en mi corazón y siempre que tenga la oportunidad iré a visitarlo.

Es imposible mencionar a todas las personas que han influido en mi vida profesional y personal; sin embargo, quiero agradecer a los compañeros presentes y pasados del laboratorio que me han hecho ser mejor persona y espero, investigador: Nelly, Xochitl, Erika, Germán, Diana, Violeta, Roxana, Ramsés, Marisol, Evelyn, Aleida, Cynthia, Josúe, Luis, Jacobo, pero sobre todo quiero agradecerle a Erica porque ella ha sido mi apoyo en los momentos buenos, malos y peores que he vivido dentro y fuera del laboratorio. Gracias por aceptar ser mi esposa y estar siempre conmigo, sin tus palabras de aliento en los momentos de mayor debilidad no sé dónde estaría. Espero ser solo un poco de todo lo que tú has sido para mí.

Para que un laboratorio sea grande, la persona que lo dirige tiene que ser aún más grande y así es la Dra. Gloria. Gracias por aceptarme cuando no sabía nada de ciencia, ni nada de la vida, gracias por las palabras que me dio de apoyo en los momentos más difíciles y los regaños en los momentos de mayor rezago. Gracias por ser más que una tutora y tener la confianza que tiene para conmigo. Espero el final de esta tesis sea solo el inicio de mucho más. Siempre ha sido para mi como parte de mi familia y así seguirá siendo. Gracias también al Dr. Eduardo, porque su forma de ser y su forma de presionar a los alumnos genera alumnos de excelencia, le deseo lo mejor en la vida.

Finalmente, quiero agradecer a mi madre porque ella fue, ha sido y siempre será la primera luz de mi vida, y aunque ahora mi vida esta compartida con alguien más, su apoyo ha forjado lo que soy y lo que siempre desee ser. Te amo mamá, siempre estas y estarás conmigo.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo con el apoyo de CONACYT Proyecto #166024. Carlos Alberto Mier Aguilar recibió durante la realización de su doctorado una beca de CONACYT #363223.

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	11
SISTEMA INMUNE.....	11
SISTEMA INMUNE INNATO	11
SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO	12
LINFOCITOS T	13
DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T	13
SEÑALIZACIÓN DEL TCR DURANTE EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.....	23
CD5	31
PAPEL DE CD5 EN LA MODULACIÓN DE LAS SEÑALES DEL TCR EN LINFOCITOS T.....	33
PAPEL DE CD5 EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS LINFOCITOS	37
ANTECEDENTES	39
JUSTIFICACION	43
HIPOTESIS	43
OBJETIVOS	44
OBJETIVO GENERAL.....	44
OBJETIVOS PARTICULARES	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
RATONES	45
LÍNEAS CELULARES.....	45
ANTICUERPOS Y REACTIVOS.....	46
TRANSFECCIÓN Y GENERACIÓN DE CLONAS ESTABLES QUE EXPRESAN VARIANTES DE CD5H.....	46
INDUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LAS CLONAS CON MUTACIONES PUNTUALES DE CD5H.....	50

DETERMINACIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS (AKT, ERK) POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO (PHOSPHOFLOW).....	52
CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS TIMOCITOS DE LOS RATONES CD5-CK2 Δ BD	53
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS NATURALES EN LOS RATONES WT vs CD5-CK2 Δ BD.....	54
DETERMINACIÓN DE MUERTE BASAL Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AICD) EN TIMOCITOS DE RATONES WT VS CD5- CK2 Δ BD	54
ESTIMULACIÓN IN VIVO CON pOVA: DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AICD) <i>in vivo</i> Y DE DIVERSAS PROTEÍNAS INTRACELULARES. ANALISIS POR SUBPOBLACIONES TÍMICAS.....	55
INYECCIÓN DE α -CD3 EN RATONES ADULTOS Y NEONATOS: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES Y MARCADORES DE MUERTE.	56
MOBILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN SUBPOBLACIONES TÍMICAS	57
DETERMINACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN NUCLEAR DE PERK POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO ACOPLADA A IMÁGENES.....	58
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
RESULTADOS	59
EXPERIMENTOS IN VITRO.....	59
PAPEL DE LAS TIROSINAS 429, 441 Y 463 DE CD5 EN LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE LINFOCITOS T	59
Generación y mantenimiento de las clonas mutantes de CD5h	59
Determinación de Apoptosis en las clonas con expresión de mutantes de CD5h	62
Determinación de la fosforilación de AKT y ERK en las distintas clonas ...	67
EXPERIMENTOS IN VIVO	70
PAPEL DE LAS SERINAS S458-461 (CK2 BINDING DOMAIN) EN EL DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DE LOS LINFOCITOS T	70

.....	70
Generación y genotipificación de ratones CD5-CK2 Δ BD.	70
Análisis de las subpoblaciones tímicas en los ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD	71
Análisis de la supervivencia de los timocitos en los ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD	76
Determinación de los niveles intracelulares de fosfoproteínas relevantes en las vías de señalización mediadas por el dominio de unión a CK2	77
Determinación de flujos de Ca ²⁺ en timocitos de ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD	79
Determinación subcelular de pERK en los timocitos de ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD	80
Determinación de la fosforilación de Zap70, JNK, P38, ERK y niveles de Bcl-2 en ratones neonatos CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD	82
DISCUSIÓN	85
Papel de los residuos de Tirosina 429, 441, 463 en la supervivencia de los linfocitos T: Mecanismos moleculares.	85
Papel del dominio de unión a CK2 del receptor CD5 (CD5-CK2BD) en el desarrollo y supervivencia de los linfocitos T.....	91
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	100
REFERENCIAS	101
PUBLICACIONES	107

RESUMEN

El desarrollo de los linfocitos T es fundamental para el adecuado funcionamiento de estas células en periferia; muchos son los mecanismos y moléculas involucradas en este proceso. Una de las moléculas más importantes para regular este desarrollo es el receptor CD5; sin embargo, no se sabe cuáles son las regiones y mecanismos a través de las cuales este receptor ejerce sus funciones. Para resolver esta pregunta, se generaron mutantes puntuales de los residuos de tirosina de CD5, los cuales fueron transfectados en la línea celular EL4. Para entender cuál es el papel de dichos residuos en la supervivencia de los linfocitos T se realizaron ensayos de inducción y determinación de apoptosis, así como la medición de los niveles de Caspasa 3 activa y se analizó la activación de ERK y AKT en respuesta a la activación del TCR para determinar los mecanismos por los cuales estos residuos modulan la supervivencia de los linfocitos T. Adicionalmente, se utilizó un ratón transgénico en el cual los residuos de serina 458-461 (dominio de unión a CK2) de CD5 fueron eliminados. Para caracterizar el papel de este dominio en el desarrollo de los linfocitos T se analizaron a detalle las subpoblaciones tímicas, así como las vías de activación del TCR en estas células. Finalmente, se analizó la supervivencia de los linfocitos T in vitro e in vivo. Los hallazgos obtenidos muestran que el residuo Y429 es importante para regular negativamente la muerte celular inducida por activación, ya que en ausencia de este residuo se incrementa la muerte celular tras la activación del TCR correlacionando con la activación incrementada de ERK 1/2, sugiriendo que este residuo forma parte de un dominio Pseudo-ITIM. En los ratones carentes de las S458-461 se demostró que este dominio es importante para regular negativamente la activación de ERK 1/2; así como para regular negativamente la supervivencia de los linfocitos T y la selección de linfocitos T CD4+ vs CD8+ sin afectar las señales proximales del TCR.

ABSTRACT

The development of T lymphocytes is a crucial process for the correct activity of these cells in periphery; several mechanisms and molecules have been described to be involved in this process. One of the most important molecules that regulates thymocyte development is the glycoprotein receptor CD5, however, up to date it is not well understood what regions and mechanisms are involved in CD5 functions. To answer this question, we generated substitutions of the tyrosine residues of human CD5, these mutants were transfected into the EL4 cell line. To understand the role of these residues in Thymocyte survival we performed apoptosis induction assays with α -CD3 \pm α -CD28 antibodies; furthermore, we determined the levels of active caspase 3 in each of the mutants generated. To further understand the mechanisms through which the tyrosine residues modulate thymocyte survival we analyzed the activation of ERK and AKT proteins after TCR activation. Additionally, we used transgenic mice where the S458-461 (CK2 binding domain) of CD5 were deleted. To characterize the role of these domain in thymocyte development we analyzed the different thymocyte subpopulations as well as the TCR signaling pathways in these cells. Finally, we also analyzed the thymocyte survival both in vitro and in vivo. Our findings show that Y429 residue of CD5 is important to negatively regulate activation induced cell death in thymocytes since the absence of these residue results in enhanced activation induced cell death which correlates with ERK 1/2 hyperphosphorylation. These results suggest that Y429 residue belongs to a Pseudo-ITIM domain within the cytoplasmic region of CD5. In the CK2BD transgenic mice we also demonstrated that these region negatively regulates ERK 1/2 phosphorylation as well as thymocyte survival and CD4+ lineage commitment without affecting proximal TCR signals.

LISTA DE ABREVIATURAS

Nombre	Acrónimo	Función
Patrones Moleculares Asociados a Patógenos	PAMPs	Son reconocidos a través de receptores del sistema inmune innato
Toll Like Receptors	TLRs	Reconocimiento de distintos patrones moleculares. Se expresan en una gran variedad de células del sistema inmune innato
NOD-like Receptors	NLRs	Reconocimiento de distintos patrones moleculares. Se expresan en una gran variedad de células del sistema inmune innato
Inmunoglobulinas A, D, E, G, M	IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Reconocimiento específico de diversos patrones moleculares. Auxiliares en neutralización, opsonización, activación de complemento, etc.
Linfocitos CD4+CD8+	Linfocitos/Timocitos DP	Fase del desarrollo tímico de los Linfocitos T.
Complejo Principal de Histocompatibilidad	MHC	Se asocia a diversos péptidos para su reconocimiento por receptores como el TCR. Existen 2 tipos MHC I y MHC II.
Receptor de Células T	TCR	Reconocimiento de péptidos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)
Células Presentadoras Profesionales de Antígeno	APC	Células que expresan MHC I y MHC II en su superficie, con la finalidad de presentar péptidos procesados a las células T.
Células T reguladoras.	Treg	Regula Negativamente la proliferación y función de los Linfocitos T convencionales.
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	Lck	Cinasa de residuos de tirosina, expresada en linfocitos T.

Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	ITAM	Dominio presente en diversas proteínas, involucrado en la activación de diversas vías de señalización. Une a diversas proteínas después de la fosforilación de los residuos de tirosina contenidos en ellos. Se puede asociar a otras cinasas,
Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif	ITIM	Dominio presente en diversas proteínas, involucrado en la inhibición de diversas vías de señalización. Une a diversas proteínas después de la fosforilación de los residuos de tirosina contenidos en ellos. Se puede asociar a algunas fosfatasas.
Zeta-Chain (TCR) Associated Protein Kinase 70 kDa	Zap70	Cinasa de tirosina que se asocia a las tirosinas fosforiladas de la cadena ζ del TCR así como del complejo CD3 y que activa diversas vías de señalización.
Linker of Activated T cells	LAT	Sirve de unión a diversas proteínas que contengan dominios SH2. Después de su fosforilación recluta diversas proteínas adaptadoras.
Fosfolipasa C	PLC	Enzima que hidroliza fosfolípidos y genera Diacilglicerol e Inositol 1,4,5 trifosfato.
Diacil Glicerol	DAG	Segundo mensajero de diversas vías de señalización que activa a la proteína cinasa C.
Proteína Cinasa C	PKC	Cinasa de Serina/Treonina activada por diacilglicerol y capaz de ejercer diversas funciones.
Nuclear factor of activated T cells	NFAT	Factor de transcripción relevante para el Sistema inmune.
Mitogen-activated protein kinases	MAPK	Familia de proteínas que regulan la proliferación, diferenciación, mitosis, ciclo celular, entre otras actividades.
Extracellular-signal-regulated kinases	ERK	Cinasa miembro de la familia MAPK que se activa en respuesta a estímulos externos y regula la proliferación, diferenciación, supervivencia, entre otras actividades, en diversos tipos celulares.

INTRODUCCIÓN

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es un conjunto de barreras físicas, moléculas y diferentes tipos celulares, el cual tiene como principal finalidad reconocer antígenos propios y extraños al organismo y generar tolerancia a los antígenos propios o una respuesta inmune en contra de los antígenos extraños. De manera general, se divide en dos grandes apartados: el sistema inmune innato y sistema Inmune adaptativo [1].

SISTEMA INMUNE INNATO

La inmunidad innata es considerada como el primer tipo de defensa que encuentran los patógenos al invadir un organismo. Se divide, de manera general, en: a) barreras físicas (mucosas, barreras epiteliales, entre otras); b) proteínas, entre las que destaca el sistema de complemento, las citocinas y quimiocinas, así como algunos péptidos que poseen actividad antimicrobiana; y c) componentes celulares (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, entre otras). Una de las principales características de las células que componen el sistema inmune innato es la expresión de diversos receptores que son capaces de reconocer diversos patrones moleculares asociados a patógenos conocidos como PAMPs. Entre los receptores más importantes a través de los cuales el sistema inmune innato realiza sus funciones podemos encontrar: TLRs (Toll like receptors), NLRs (NOD-like receptors), RLRs (RIG-I-like receptors) [2]. A pesar de que estos receptores no sufren modificaciones en su afinidad para incrementar su capacidad de reconocimiento, recientemente se ha demostrado que se unen de manera específica a moléculas con estructuras conservadas y que esto se da con una alta eficiencia por lo que el sistema inmune innato es capaz de montar una respuesta de intensidad y eficacia constante [3].

Algunas de las células del sistema inmune innato (células dendríticas, macrófagos, entre otras) tienen capacidad de presentar antígenos procesados, por lo que se les conoce como células presentadoras de antígeno (APCs). Estas células

expresan algunos receptores, de los antes mencionados, los cuales son fundamentales para el reconocimiento y activación de estas.

SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

El sistema inmune adaptativo o inmunidad adaptativa es aquella que de manera general toma lugar después de la respuesta inmune innata. Comparada con la respuesta inmune innata, la inmunidad adaptativa es considerada de mayor eficiencia, ya que su capacidad de respuesta depende del reconocimiento de un antígeno con alta especificidad. A partir de este reconocimiento, el sistema inmune adaptativo genera una gran diversidad de moléculas de reconocimiento (anticuerpos), así como la proliferación de células efectoras (expansión clonal) y generación de células de memoria las cuales son capaces de persistir en el organismo aun cuando el reto antigénico haya sido removido por completo. Esta característica “única” del sistema inmune adaptativo es conocida como memoria inmunológica y es de gran relevancia cuando existe un segundo encuentro con el mismo antígeno, ya que la respuesta secundaria es de mayor intensidad y velocidad. Finalmente, la complejidad del proceso de selección y desarrollo de las células del sistema inmune adaptativo, permite eliminar células que reconocen antígenos propios, sin embargo, aquellas células que no son eliminadas son incapaces de responder debido a un mecanismo conocido como anergia. De manera global este proceso es conocido como tolerancia inmunológica y su existencia es fundamental para la homeostasis de los organismos. Finalmente, la generación de anticuerpos a partir de células plasmáticas complementa al sistema inmune adaptativo, ya que estas proteínas son de alta especificidad, permitiendo una rápida y eficaz respuesta contra agentes extraños al organismo [3].

A diferencia del sistema inmune innato, el sistema inmune adaptativo posee un repertorio celular restringido; las principales células que componen este sistema son los linfocitos. De acuerdo a su origen y función, los linfocitos se componen en 2 grandes categorías: linfocitos B y linfocitos T. De manera general, los linfocitos B son un subtipo celular que se desarrolla en médula ósea. Es en esta región anatómica en donde expresa un receptor específico para cada célula

conocido como receptor de células B (BCR). Una vez alcanzada la última etapa de desarrollo dentro de médula ósea, estas células continúan su maduración en periferia, en donde dependiendo de diferentes condiciones (activación celular) pueden diferenciarse a células plasmáticas, productoras de anticuerpos, o células de memoria. Los anticuerpos o inmunoglobulinas, son un componente importante de la respuesta humoral del sistema inmune adaptativo. En la mayoría de los mamíferos existen 5 tipos de inmunoglobulinas, las cuales son: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La ubicación, expresión y funciones de cada inmunoglobulina es diversa, lo cual permite que se generen efectos diversos como son: neutralización de patógenos, opsonización, activación de complemento, etc [4]. Finalmente, los linfocitos T, requieren de un órgano adicional para su correcto desarrollo. Este órgano se conoce como timo y su función se discutirá a fondo en la siguiente sección.

LINFOCITOS T

DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T

El timo es un órgano linfoide primario, presente en la mayoría de los vertebrados (con excepción de los peces no mandibulados, ej: lampreas). Su función es crucial para el adecuado funcionamiento del sistema inmune, ya que en él se dan los procesos de maduración y selección de los linfocitos T, así como la inducción de la tolerancia central [5]. La formación del timo se da durante la embriogénesis temprana a partir del endodermo. Estudios en ratón han demostrado que a partir del día 11.5 del desarrollo embrionario se empieza a expresar el gen ***Foxn1***, el cual es fundamental para la correcta formación del timo [6]. Este gen codifica para un factor transcripcional que es esencial para la formación del estroma tímico, ya que la ausencia de este resulta en una ausencia absoluta de linfocitos T. Posterior a su formación, el timo se divide en dos regiones anatómicas muy bien definidas, las cuales se denominan corteza y médula [7]. Es muy importante señalar que las células que componen ambas regiones del timo son tanto fenotípica como funcionalmente distintas entre sí. Entre las células estromales, se encuentran las células epiteliales tímicas, tanto en la región cortical (cTecs) como en la medular

(mTecs) [8]. Estudios de transferencia de precursores epiteliales tímicos (E12) [7] han demostrado que existe al menos un progenitor común entre ambas células, aunque se requieren más experimentos para caracterizar por completo este progenitor.

El proceso de maduración y selección de los timocitos puede dividirse en 5 grandes pasos: 1) Entrada de progenitores linfoides no comprometidos al linaje T hacia el timo; 2) Generación de linfocitos DP en corteza exterior del timo; 3) Selección positiva de los timocitos en la corteza; 4) Selección negativa de los timocitos en región cortico-medular/médula por la interacción con mTECs y APCs; así como la generación de nTregs; 5) Exporte de linfocitos T maduros del timo hacia la periferia.

La primera parte del desarrollo tímico comprende la llegada de los progenitores linfoides (CLP) provenientes de la médula ósea que entran al timo a través de vénulas ubicadas cerca de la región cortico-medular gracias a la participación de quimiocinas y moléculas de adhesión [9]. Estudios realizados en timo prenatal (fetal), han demostrado un papel relevante de las quimiocinas CCL19 (CCR7) y CCL25 (CCR9) en la llegada de los progenitores linfoides a timo [10]. La importancia de estas quimiocinas se ha demostrado en ratones deficientes de CCR7 (receptor de CCL21 y CCL19) en los cuales se ha observado una disminución parcial de timocitos [11]. Adicionalmente se ha demostrado que la deficiencia de CCR9 genera una reducción de hasta 3 veces el número total de timocitos comparado con ratones silvestres[12]. Debido a que la ausencia de CCR7 y CCR9 genera una reducción parcial en el número de timocitos en el estadio prenatal, se ha propuesto que existen otros factores quimiotácticos relevantes en este proceso; sin embargo, al día de hoy no existe una evidencia contundente de la participación de otros receptores en el desarrollo tímico durante la fase prenatal [13].

Estudios realizados en la fase postnatal han demostrado un papel relevante de la molécula de adhesión PSGL-1 (Platelet-selectin glycoprotein Ligand 1), así como de su receptor (P-Selectina), las cuales se encuentran expresadas en

timocitos y estroma tímico respectivamente [14]. De manera adicional se ha observado que anticuerpos dirigidos contra CXCR4 y la generación de ratones deficientes para CCR5 (en condiciones de irradiación subletal) afectan la llegada de progenitores no comprometidos de médula ósea hacia timo (homing) [15]; sin embargo, estos experimentos no han permitido demostrar de forma concluyente la relevancia de estos receptores de quimiocinas en la llegada a timo. Finalmente, experimentos realizados en ratones linfopénicos deficientes para el receptor CCR9 han mostrado una disminución en el reclutamiento de progenitores hacia timo postnatal [12]; sin embargo, no fue hasta recientemente que se demostró que la eliminación simultánea de CCR7 y CCR9 resulta en una disminución severa de los progenitores de médula ósea que se reclutan hacia el timo adulto. Es importante señalar que, a pesar de estos hallazgos, en la actualidad no se tiene un modelo que represente de manera concluyente a todas las moléculas requeridas para la llegada y posterior desarrollo de los progenitores de médula ósea hacia el timo [16, 17].

Los progenitores provenientes de médula ósea, comienzan su desarrollo en timo[18]. Las diferentes subpoblaciones se dividen con base en diferentes moléculas de superficie:

- DN: Timocitos doble negativos, ausencia de CD4 y CD8.
 - DN1: CD44+ CD25- CD117+
 - DN2: CD44+ CD25+ CD117+
 - DN3: CD44- CD25+ CD117-
 - DN4/pre-DP CD44- CD25- CD117-
- DP: Timocitos doble positivos, expresión simultánea de CD4 y CD8.
- CD4+ SP: Timocitos CD4+ simple positivos, expresión de CD4.
- CD8+ SP: Timocitos CD8+ simple positivos, expresión de CD8.

Después de la llegada de los progenitores de médula ósea hacia la región cortico-medular, a través de vénulas, el desarrollo de los timocitos continua con la

migración de estas células hacia la corteza tímica (corteza peri-medular). En esta zona, los timocitos DN1 permanecen un aproximado de 10 días (modelo murino) [19]; es importante señalar que en esta parte del desarrollo de los linfocitos T, los timocitos DN1 se expanden aproximadamente 1000 veces. Las señales encargadas de regular la proliferación y mantenimiento de los timocitos durante esta fase del desarrollo, no han sido identificadas totalmente; sin embargo, se ha propuesto que existen 2 señales de gran importancia durante esta fase. Estas señales son la unión del Ligando de Kit a su receptor (CD117) [20] y la unión de Notch a sus ligandos (Delta-like ligands) [21].

Finalmente, es durante esta fase del desarrollo de los linfocitos T que se inicia un proceso conocido como compromiso de linaje. Este proceso es de vital importancia ya que restringe el desarrollo de los progenitores de médula ósea hacia otros subtipos celulares, como son linfocitos B, células mieloides, etc. Las señales descritas, encargadas de regular este proceso están dadas por la unión de Notch a su ligando Dll1, aunque la participación de otros ligandos como Dll4 también es de importancia para este evento [21].

Al terminar su transición por la corteza peri-medular, los timocitos inician su migración hacia la región más interna de la corteza tímica. Es en esta zona en donde los timocitos DN incrementan la expresión de CD44 y CD25 para convertirse en timocitos DN2. Experimentos realizados en ratones con eliminación condicional de CXCL12 en el estroma tímico (quimeras de médula ósea), se ha demostrado un papel fundamental de esta quimiocina en la llegada y retención de los timocitos hacia la corteza interna. Adicionalmente, se ha observado que la interacción de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ con VCAM1 y la interacción de integrinas como $\alpha E\beta 7$ con E-cadherina son también, de gran importancia en la migración y maduración de los timocitos DN2 [18].

Al igual que en la región peri-medular de la corteza tímica, la participación de Notch y sus ligandos Dll1 y Dll4 es fundamental para la especificación hacia el linaje T; aunque existe una pequeña cantidad de timocitos DN2 que retienen el potencial de convertirse en células NKs, DCs, etc., es en este estadio del desarrollo

de los linfocitos T que la mayoría de los timocitos restringen su desarrollo al linaje T [21].

Adicional a los eventos antes mencionados, es en la fase DN2 del desarrollo de los linfocitos T en donde se inicia la expresión de la recombinasa RAG, la cual se encarga del rearreglo de los genes de TCR γ y TCR δ , así como del locus de TCR β ; sin embargo, durante la fase DN2 solo se da el rearreglo de los genes TCR γ y TCR δ [22]. Una de las señales fundamentales para el rearreglo de estos genes es IL-7, la cual se ha demostrado juega un papel de gran importancia en el desarrollo de una subpoblación tímica que expresa un TCR $\gamma\delta$ [23].

Una vez concluidos los eventos celulares de la fase DN2, los timocitos, disminuyen la expresión de CD44+ y CD117+ para convertirse en timocitos DN3. Esta transición va acompañada de la migración de estas células hacia la parte más externa de la corteza tímica. Una de las señales fundamentales que ha sido identificada para regular este proceso de relocalización es la quimiocina CCL25 (CCR9), la cual se expresa en el estroma tímico tanto cortical como medular. Adicionalmente, la quimiocina CXCL12 (CXCR4) se ha observado como un factor quimiotáctico al cual los linfocitos DN3 son capaces de responder y por lo tanto podría jugar un papel importante en la relocalización de estas células en la corteza tímica más externa [24-26].

Durante la fase DN3 del desarrollo de los linfocitos T se dan diversos procesos de selección tímica que deciden el linaje que seguirán los linfocitos T durante las fases subsecuentes de su desarrollo y función. Primero, la recombinasa RAG continúa el proceso de rearreglo de los genes TCR γ y TCR δ ; adicionalmente, es durante esta fase que esta misma recombinasa inicia el rearreglo del locus TCR. Una vez rearreglados, estos genes producen la expresión de un TCR $\gamma\delta$ o un pre-TCR β ; sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los timocitos se comprometen a un linaje $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$ no han sido completamente elucidados [27].

Existen 2 modelos que intentan explicar cómo los timocitos se comprometen hacia un linaje $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$. El primer modelo, conocido como modelo instructivo, sugiere

que primero se da la expresión de un pre-TCR β o un TCR $\gamma\delta$ y es a través de la transducción de señales dada por alguno de estos receptores que los timocitos deciden un linaje. Por otro lado, el modelo estocástico o de pre-compromiso, propone que la elección del linaje $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ se da previamente a la expresión de un pre-TCR β o $\gamma\delta$; en su lugar, solo aquellas células que “coinciden” con su pre-compromiso sobreviven, ej: una célula pre-comprometida a $\gamma\delta$ que expresa un pre-TCR β no es capaz de proseguir su desarrollo. Recientemente, se ha identificado que la deficiencia del factor transcripcional SOX13 reduce significativamente el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$; además, se ha reportado que la expresión de este factor transcripcional coincide con un patrón de expresión del receptor de IL-7 en timocitos DN2, lo que permite distinguir las células que se comprometerán al linaje $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Finalmente, existe evidencia experimental adicional que muestra que la intensidad de señales transducidas por un único TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) es capaz de promover el desarrollo a ambos linajes. En conjunto, todas estas evidencias sugieren que la elección de linaje $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ es un proceso muy complejo que puede requerir más de un modelo para ser explicado completamente [23].

Adicional a la elección del linaje $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$, un proceso fundamental en el desarrollo de los linfocitos T, es la selección beta, el cual es el primer punto de control de la selección tímica. Este proceso requiere de la expresión de un pre-TCR funcional, el cual se compone por una cadena beta rearreglada (β) y una cadena alfa invariante ($pT\alpha$) [28]. Inicialmente, se sugirió que este pre-TCR no requiere de la unión de un ligando presentado a través de MHC para llevar a cabo su función; sin embargo, evidencia reciente sugiere que se requiere de la presencia de un ligando presentado a través del complejo pMHC (u otro ligando), para poder proseguir con el proceso de desarrollo de los timocitos [29]. Es importante señalar que los timocitos DN3 que expresan un pre-TCR funcional son capaces de seguir adelante con el desarrollo; sin embargo, aquellos que son incapaces de señalizar a través de este receptor debido a que expresan un pre-TCR no funcional, mueren por apoptosis. Esto se debe a que el locus TCR β en los timocitos sufre un estricto proceso de exclusión alélica que permite la expresión de un solo alelo de TCR β ,

por lo que la ausencia de un pre-TCR β concluye con la eliminación de esa célula [30]. Finalmente, las células que reciben señales a través del pre-TCR sufren un proceso de expansión de hasta 4 veces [31, 32].

Una vez concluidos los procesos de selección beta y compromiso de linaje durante la fase DN3, los timocitos migran rápidamente a la región interna de la corteza en donde expresan niveles bajos de CD4+ y CD8+, razón por la cual son llamados DN4/pre-DP. Adicionalmente a la expresión del mRNA de CD4+ y CD8+, así como bajos niveles de ambas proteínas en superficie, es después de la selección beta cuando se incrementa la expresión del receptor glicoproteico CD5. La expresión de este receptor está regulada por las señales enviadas a través del TCR, por lo cual su expresión se induce o incrementa tras un evento de señalización a través del TCR. Este receptor es de gran relevancia para los linfocitos T, ya que regula las señales del TCR y la supervivencia de estas células [33].

Al iniciar la expresión simultánea de CD4 y CD8, los linfocitos T en desarrollo son conocidos como DP. Además de la expresión de ambos correceptores, una característica de los linfocitos DP es que continúan expresando la recombinasa RAG, por medio de la cual rearreglan el locus TCR α , el cual una vez rearreglado es expresado en conjunto con la cadena TCR β previamente seleccionada y de esta forma se expresa por primera vez un TCR completamente funcional [30].

La expresión de un TCR completamente rearreglado y funcional da paso al siguiente punto de control de la selección tímica. Durante este punto de control, los timocitos DP interactúan con complejos pMHC, presentados por las células epiteliales corticales (cTECs). De manera general, aquellos linfocitos T que son capaces de enviar señales con una “intensidad adecuada” son seleccionados para proseguir su desarrollo, mientras que aquellos timocitos que son incapaces de enviar señales a través del TCR mueren por “negligencia” [34]. Alternativamente, aquellos timocitos que no han sido capaces de señalizar a través del TCR pueden rearreglar el segundo alelo de la cadena TCR α , con la finalidad de volver a entrar al proceso de interacción y selección por las cTECs. Interesantemente, evidencia reciente ha demostrado que algunos linfocitos T que rearreglan la cadena α del

TCR por segunda ocasión son capaces de expresar 2 TCRs funcionales y que una vez en periferia estas células con TCR duales tienen el potencial de interactuar con 2 péptidos distintos y con diferentes afinidades, con un potencial para algunas enfermedades autoinmunes. De manera interesante, esto sugiere que, contrario a lo postulado inicialmente, durante la fase DP del desarrollo de timocitos la muerte por selección negativa de aquellas células auto reactivas también juega un papel importante [30, 35]. Las vías de señalización y mecanismos de selección se discutirán a fondo más adelante.

Es durante la fase DP del desarrollo de los linfocitos T que inicia un proceso fundamental para los linfocitos T. Esta fase es conocida como elección de linaje y consiste en la selección de un correceptor que permanecerá por el resto de la vida útil de los linfocitos T (CD4 o CD8). Al igual que la elección de linaje $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$, existen varios modelos que intentan explicar la selección de linaje CD4 vs CD8. De manera global, los modelos que abarcan este proceso se pueden dividir en tres grandes grupos: estocástico, instructivo y cinético [36]. El modelo estocástico de elección de linaje sugiere que durante la interacción pMHC-TCR ocurre una disminución en la expresión de alguno de los correceptores de manera aleatoria. Esto significa que en caso de que la interacción pMHC-TCR sea con un MHC clase II se requiere que el correceptor CD4+ mantenga su expresión; asimismo sucede con los péptidos MHC clase I y CD8+ [37, 38]. Sin embargo, resultados de eficiencia de selección, así como las proporciones de CD4+ vs CD8+ contradicen este modelo.

El modelo instructivo se puede dividir en 2 grandes vertientes. La primera, conocida como modelo de la intensidad de señal, sugiere que durante el proceso de interacción pMHC-TCR las señales “débiles” del TCR promueven una disminución del correceptor CD4+, favoreciendo así la selección de linfocitos T CD8+ SP. De la misma forma, se sugiere que señales de alta intensidad del TCR promueven una disminución en la expresión del correceptor CD8+, generando así la subpoblación de linfocitos T CD4+SP [39, 40]. Alternativamente, se ha propuesto un segundo modelo instructivo más incluyente el cual postula que adicional a las señales débiles del TCR, una duración corta de las señales del TCR, puede promover la selección de linfocitos T CD8+, mientras que una señal de larga

duración promueve el desarrollo de linfocitos T CD4+ [41]. Al igual que el modelo estocástico, existe evidencia experimental que contradice la validez de este modelo por lo que más recientemente se ha propuesto un tercer modelo que incluye algunos conceptos básicos del modelo instructivo.

El tercer modelo propuesto para explicar la elección de linaje CD4+ vs CD8+ es llamado modelo cinético de señalización. Este modelo postula, al igual que el modelo instructivo, que la elección de linaje depende de la duración de las señales del TCR; sin embargo, a diferencia del modelo instructivo, propone que la duración de esta señal está regulada por receptores de citocinas como el rIL-7. En particular, propone que durante el estadio DP (CD4+ CD8bajo) los timocitos que envían de manera persistente señales a través del TCR, aún en ausencia de CD8, son seleccionados hacia timocitos CD4+ y adicionalmente bloquean las vías de señalización a través de IL-7 y posiblemente otros miembros de la familia γ c. Mientras que, aquellos timocitos que no son capaces de seguir enviando señales del TCR en ausencia de CD8, sufren una inversión de correceptores, es decir, incrementan CD8+ y disminuyen CD4+, por medio de las señales del receptor de IL-7 y otros miembros de la familia γ c [36]. Al día de hoy, no se ha podido determinar si los 3 modelos juegan un papel en la selección de linaje o si alguno de los 3 es el modelo predominante; sin embargo, parece que la intensidad de las señales del TCR y la duración de estas juegan un papel fundamental en la selección del linaje.

Una vez seleccionados, los timocitos DP, en transición hacia SP, incrementan de nuevo la expresión del receptor CD5, así como del receptor CD69 [33]. Además, incrementan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, lo cual les permite migrar hacia la región medular del timo, tiempo durante el cual concluyen su maduración hacia linfocitos SP. Con la llegada a médula de los linfocitos CD4+SP o CD8+SP concluye la fase cortical del desarrollo tímico y dan inicio los siguientes puntos de control del proceso de selección [42].

En la parte más externa de la médula (región cercana a la región cortico-medular), los linfocitos SP se caracterizan por la expresión de CD69+ y la ausencia de expresión de CD62L. Al igual que en el proceso de selección positiva en corteza,

el proceso de selección negativa en médula tímica requiere la interacción del TCR con un complejo pMHC. Al igual que en corteza, las células de médula que interactúan con los timocitos son las células epiteliales (mTECs); sin embargo, a diferencia de la corteza, en médula tímica existen células presentadoras profesionales (APCs/DCs) que presentan pMHC a los timocitos [43].

A diferencia de las cTECs, las mTECs presentan características que las hacen únicas en fenotipo y función. Primero, a diferencia de las cTECs, las mTECs expresan moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) lo que las caracteriza como células presentadoras profesionales. Adicionalmente, las células mTECs expresan un regulador transcripcional llamado “Regulador Autoinmune” (AIRE) el cual induce la expresión ectópica de proteínas de diversos tejidos, lo cual es fundamental para el proceso de tolerancia central. Adicionalmente, se ha observado que las DCs son capaces de capturar estos antígenos y presentarlos a los timocitos, para de esta forma contribuir a la tolerancia central. Además de los receptores CD80 y CD86 expresados tanto en las mTECs como en las DCs, el papel de CD28 en el timocito es de relevancia para proveer señales co-estimuladoras del TCR que permitan una adecuada selección negativa [8].

Finalmente, además del proceso de selección negativa que permite la adecuada generación de tolerancia central, rs en la médula tímica que se genera una subpoblación de linfocitos T CD4+ caracterizada por la expresión del factor transcripcional FOXP3, así como altos niveles de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25), esta subpoblación se caracteriza por haber sido seleccionada a partir de linfocitos T con alta afinidad/avidez, los cuales no fueron eliminados y en su lugar adquirieron propiedades supresoras [44]. El papel de citocinas que comparte la cadena γ común (γ_c) como IL-2 e IL-7 ha sido demostrado en la generación de estas células; así como el del factor soluble conocido como Linfopoyetina tímica estromal (TSLP) [45]. Una vez concluido el proceso de selección negativa, los timocitos CD4+SP que continuaron con su desarrollo incrementan los niveles en superficie de CD62L y disminuyen los niveles de CD69. La reducción en los niveles de esta proteína es fundamental para llevar a cabo la migración hacia órganos linfoides secundarios [46].

Como se puede observar, con base en todos los procesos de selección antes mencionados, el desarrollo de los linfocitos T es un sistema complejo que requiere de más de un punto de control para asegurar el correcto funcionamiento. Además, la regulación de estos procesos está íntimamente relacionado con las vías de señalización involucradas durante los procesos de maduración y selección.

SEÑALIZACIÓN DEL TCR DURANTE EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.

Durante el desarrollo de los linfocitos T, una de las principales vías de señalización es la del TCR. De manera general, esta vía depende de la unión de un pMHC hacia el TCR/pre-TCR, así como la unión de uno de los dos correceptores CD4/CD8 al pMHC. Adicionalmente, la unión de la proteína CD28, expresada en la superficie de los linfocitos T, con las proteínas de la familia B7, (CD80 y CD86) expresadas en las células presentadoras, induce la activación de vías que potencian las señales del TCR. Es importante señalar que durante el desarrollo de los linfocitos T, las señales del TCR varían en cantidad y calidad lo que permite tener los procesos de selección beta, selección positiva y selección negativa; así como, los procesos de elección de linaje $\alpha\beta/\gamma\delta$ y CD4/CD8. Finalmente, existen receptores adicionales que participan en la modulación de las señales, entre ellos destaca el receptor CD5, del cual se hablará más adelante.

De manera breve, la selección positiva de los linfocitos T da inicio cuando un péptido de baja afinidad unido al complejo MHC interacciona con el TCR expresado en los linfocitos T. La relevancia de las moléculas accesorias del TCR se demostró con la generación de ratones deficientes de las diversas cadenas del complejo CD3. De manera interesante se observó que los ITAMs presentes en la cadena zeta del TCR son fundamentales para la selección positiva, este proceso podía ocurrir aún en la ausencia de esta cadena. Sin embargo, también se demostró que el repertorio y funcionalidad de estos linfocitos T está gravemente afectado [47]. Una vez que los linfocitos T en desarrollo interactúan con el complejo péptido-MHC se da la activación de diversas proteínas. La primera de ellas, Lck, es una cinasa de tirosinas miembro de la familia Src. Al activarse esta cinasa, se inicia la fosforilación

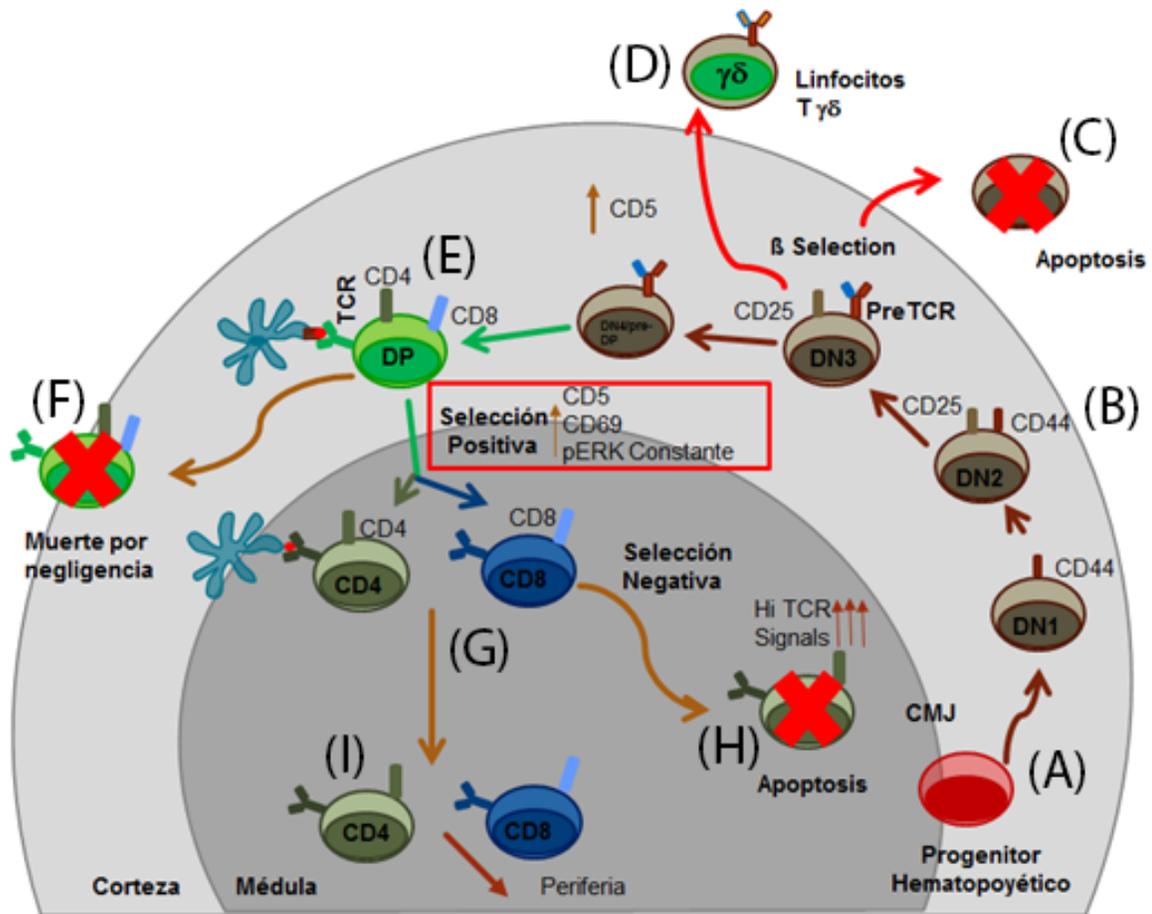


Figura 1. Esquema representativo del desarrollo tímico de los Linfocitos T. (A) Entrada de progenitores hematopoyéticos a la región corticomedular. (B) Generación de células DN (CD4-CD8) en la región cortical del timo (C) Selección β de Linfocitos T DN3, muerte por ausencia de señales. (D) Generación de Linfocitos $\gamma\delta$ a partir de linfocitos DN3. (E) Generación de Linfocitos DP (CD4+CD8+) en la corteza tímica. (F) Muerte por ausencia de señales en linfocitos DP. (G) Generación de Linfocitos SP (CD4+ ó CD8+) a partir de linfocitos DP seleccionados positivamente. (H) Selección Negativa de Linfocitos SP por exceso de señal a través del TCR. (I) Linfocitos SP maduros, previo a la migración hacia órganos linfoides secundarios. Ver texto para detalles.

de diversas proteínas; entre estas proteínas, es importante señalar a dos fundamentales para las señales del TCR y la selección positiva de los linfocitos T [48]. Primero, la cinasa Lck fosforila las tirosinas contenidas en los ITAMs de la cadena zeta, asociada al TCR. Una vez que se encuentran fosforiladas las tirosinas de estos ITAMs, se recluta una proteína conocida como ZAP70. Esta proteína, a su vez es fosforilada por la cinasa Lck, y algunos otros miembros de la familia Src y

Syk, lo que genera la activación de esta cinasa [49]. Una vez activa, ZAP70 fosforila a la proteína LAT (parcialmente); esta proteína, es el sitio de unión de otras proteínas, las cuales juegan un papel fundamental en los procesos tanto de selección positiva, como negativa de los linfocitos T [50]. Entre las proteínas más relevantes para llevar a cabo el proceso de selección positiva se encuentra PLCgama 1 [51]. Esta fosfolipasa, como su nombre lo indica, resulta en la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, generando dos mediadores fundamentales para la selección de los linfocitos T: DAG (Diacilglicerol) e IP3 (Inositol trifosfato). El IP3 es un mediador capaz de inducir la movilización de calcio almacenado en el retículo endoplásmico incrementando así los niveles de Ca^{2+} intracelular; esto resulta en la activación de Calcineurina. Entre los principales factores implicados en la selección positiva se encuentra NFAT, cuya eliminación en linfocitos T DP afecta dramáticamente la selección positiva [52]; este factor, es activado por medio de la Calcineurina dependiente de Ca^{2+} . Adicionalmente, para generar los niveles de Ca^{2+} adecuados para la activación de NFAT se requiere de la activación de miembros de la familia Tec como lo es la proteína ITK, la cual también es fundamental en la selección positiva [53]. Finalmente, por otro lado, DAG activa a PKC lo que puede activar la vía Ras, la cual conduce a la activación de MEK y subsecuentemente de ERK 1/2 [34]. Esta proteína es fundamental para la selección positiva, ya que la ausencia de activación de esta proteína bloquea el proceso de selección positiva. Más aún, se ha determinado que los niveles constantes de fosforilación y activación de ERK son fundamentales para la selección positiva. Entre los factores de transcripción afectados por ERK se encuentra Egr1, cuya delección afecta profundamente la selección positiva de los linfocitos T [54, 55]; sin embargo, el rol de otros factores de transcripción como AP-1 podría ser relevante también. En resumen, podemos decir que la activación de vías de señalización del TCR que incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular y que adicionalmente se encuentran acompañados de una activación constante y sostenida de la proteína ERK 1/2 [56], generan la selección positiva de los linfocitos T.

El proceso de selección negativa también requiere de las señales transducidas a través del TCR; sin embargo, a diferencia de la selección positiva

este proceso se encuentra mediado por péptidos con alta afinidad/avidez presentados por medio del complejo MHC. Entre las diferencias principales se encuentra que la unión de estos péptidos de alta afinidad al TCR induce una fosforilación total de la proteína LAT, lo cual induce la unión de Grb2/Sos a esta, iniciando una cascada de activación de MAPK, la cual concluye en la activación de la proteína ERK 1/2 [34]. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la selección positiva, la fosforilación de esta proteína es mayor, pero es solo transitoria. Adicionalmente, se ha observado que la activación de otras partes de la vía de las MAPK, como son JNK y P38 son fundamentales para los procesos de selección negativa [57-59]. La activación de estas proteínas se puede dar de manera directa a través de la vía Grb2/Sos; sin embargo, existe evidencia de que otros receptores como CD28 son importantes para aumentar la intensidad de las señales del TCR e inducir selección negativa. Entre las vías activadas por el receptor CD28 se encuentran aquellas que involucran a la proteína VAV y que concluyen en la activación de MAPK como JNK y P38. Estos hallazgos, demuestran de manera adicional, que la presencia de moléculas coestimuladoras en las células epiteliales medulares es fundamental para inducir selección negativa en los linfocitos T [7, 8].

Más recientemente, se ha demostrado el papel de una proteína denominada Themis (Thymocyte-expressed molecule involved in selection) la cual, como su nombre lo dice, parece ser un regulador importante de los procesos de selección positiva vs negativa en timo. De manera general, Themis es fosforilado tras la activación del TCR. Adicionalmente, themis se une de manera constitutiva a Grb2 a través de una región poliprolina (que se une al dominio SH3 de Grb2). De manera interesante se ha observado que los ratones deficientes de Themis tienen una profunda afectación en el desarrollo tímico, específicamente en la selección positiva de los timocitos [60]. A pesar de que inicialmente no se encontraron mecanismos que pudieran explicar cómo es que Themis regula la selección positiva vs negativa de los linfocitos T, estudios posteriores, utilizando ligandos con diferentes afinidades al TCR demostraron que en ligandos con alta afinidad, con los cuales se inducen niveles elevados de selección negativa no existen diferencias en ausencia de Themis; sin embargo, la utilización de ligandos de menor afinidad, capaces de

inducir selección positiva en los ratones deficientes de Themis, era suficiente para inducir un proceso de selección negativa en lugar de selección positiva. Adicionalmente, se demostró que la ausencia de Themis en presencia de ligandos de baja afinidad generó un incremento en la fosforilación de moléculas relacionadas con las señales proximales del TCR (pLAT, pPLC γ 1, pLCK). Asimismo, se demostró que Themis es capaz de interactuar no solo con Grb2, sino también con SHP1 para de esta forma regular negativamente las señales del TCR [61]. Adicionalmente, existe evidencia que Themis es capaz de regular la supervivencia de los timocitos en desarrollo (pre-Selección) a través de esta misma interacción con SHP1 [62]. En conjunto, estos resultados muestran que Themis es una molécula recientemente descrita, la cual es de gran relevancia para modular los procesos de selección y supervivencia de los timocitos. Finalmente, existe evidencia de la participación de otras moléculas que son capaces de modular los flujos de calcio en los timocitos y de esta forma afectar los procesos de selección como son *Tespa1* y *VGSC*, así como algunos miRNAs; sin embargo, los mecanismos por los cuales se ejercen algunos de estos efectos aún no han sido dilucidados [63].

Como se mencionó anteriormente, otro de los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo de los linfocitos T y que requiere de las señales del TCR es la elección de linaje CD4 vs CD8. En la actualidad muchos autores apoyan el modelo cinético de señalización en el cual, al igual que los modelos previamente propuestos, la elección del linaje CD4+, requiere de una señal persistente posterior a la selección positiva (ERK sostenido) [56], mientras que en el caso de que esta señal cese se promueve la selección del linaje CD8+ [36]. Es importante señalar que en este modelo la citocina IL-7 (o algún otro miembro de la familia *gc* de citocinas), juega un papel fundamental en la elección de co-receptor. Sin embargo, es importante mencionar que en la actualidad no existe un consenso sobre qué modelo es el más importante para la elección de linaje o si la participación del modelo estocástico o el modelo instructivo en conjunto son los que dictan el linaje de los linfocitos T. A pesar de estas discrepancias, es evidente que las señales del

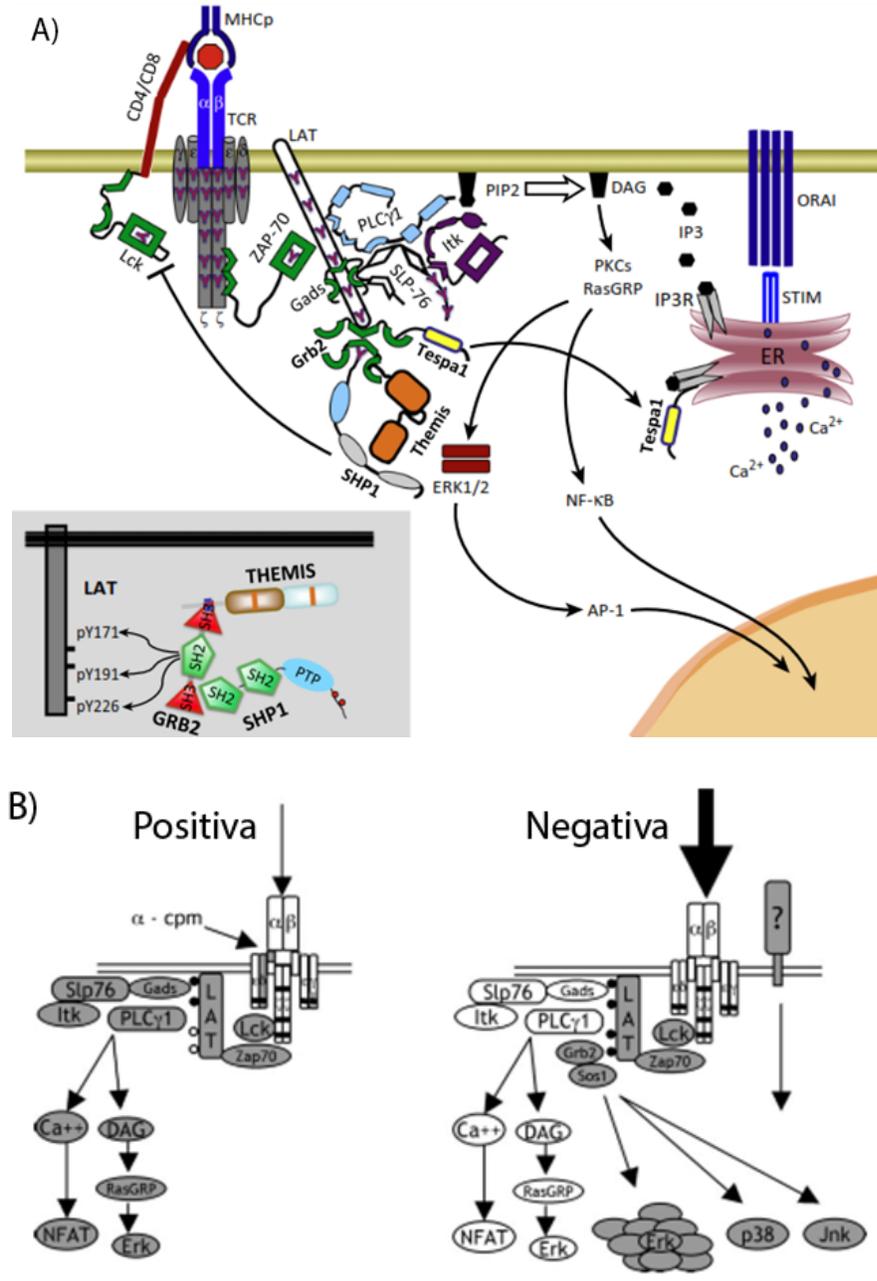


Figura 2. Activación de diversas proteínas y vías de señalización en los procesos de selección (A) Participación de Themis en la transducción de señales a través del TCR. Modificado de Fu et al., Trends in Immunology 2014 (B) Activación diferencial de vías de señalización a través del TCR durante Selección Positiva vs Negativa. Tomado de Starr et al., Ann. Rev. Immunol 2003.

TCR son fundamentales para la elección de linaje de los linfocitos T en desarrollo y como se ha propuesto parece también evidente que las señales de alta intensidad son relevantes para la elección del linaje CD4 sobre el CD8, aunque las moléculas que regulan este efecto aún no se han identificado.

Es importante mencionar que en la actualidad no se conocen todos los mecanismos moleculares por los cuales se regulan las vías de señalización involucrados en los procesos de selección positiva y negativa, ni los receptores adicionales por los cuales se llevan a cabo estas funciones. Sin embargo, uno de los receptores que se ha propuesto puede jugar un papel importante en estos procesos es CD5. En este contexto, se ha observado que los timocitos que son seleccionados positivamente con péptidos de baja afinidad expresan bajos niveles de CD5 mientras que aquellos que son seleccionados con péptidos de mayor afinidad expresan mayores niveles de CD5 en superficie. Adicionalmente, se ha postulado que las células T en periferia que presentan menores niveles de CD5 responden de manera sostenida, con menos muerte celular inducida por activación y su respuesta es retardada, comparada con las células que expresan altos niveles de CD5 [64]. Finalmente, se ha postulado que los linfocitos con baja expresión de CD5 tienen un potencial para reconocer antígenos propios en periferia y por lo tanto menor potencial autorreactivo [65]; sin embargo, los mecanismos por los cuales CD5 es capaz de realizar estos efectos y cómo es que CD5 afecta la selección de estas células durante el desarrollo tímico no se ha estudiado por completo, por lo que es importante conocer el rol de CD5 en este efecto. En la siguiente sección se discutirán las evidencias que se tienen del papel de CD5 en la función y desarrollo de los linfocitos T.

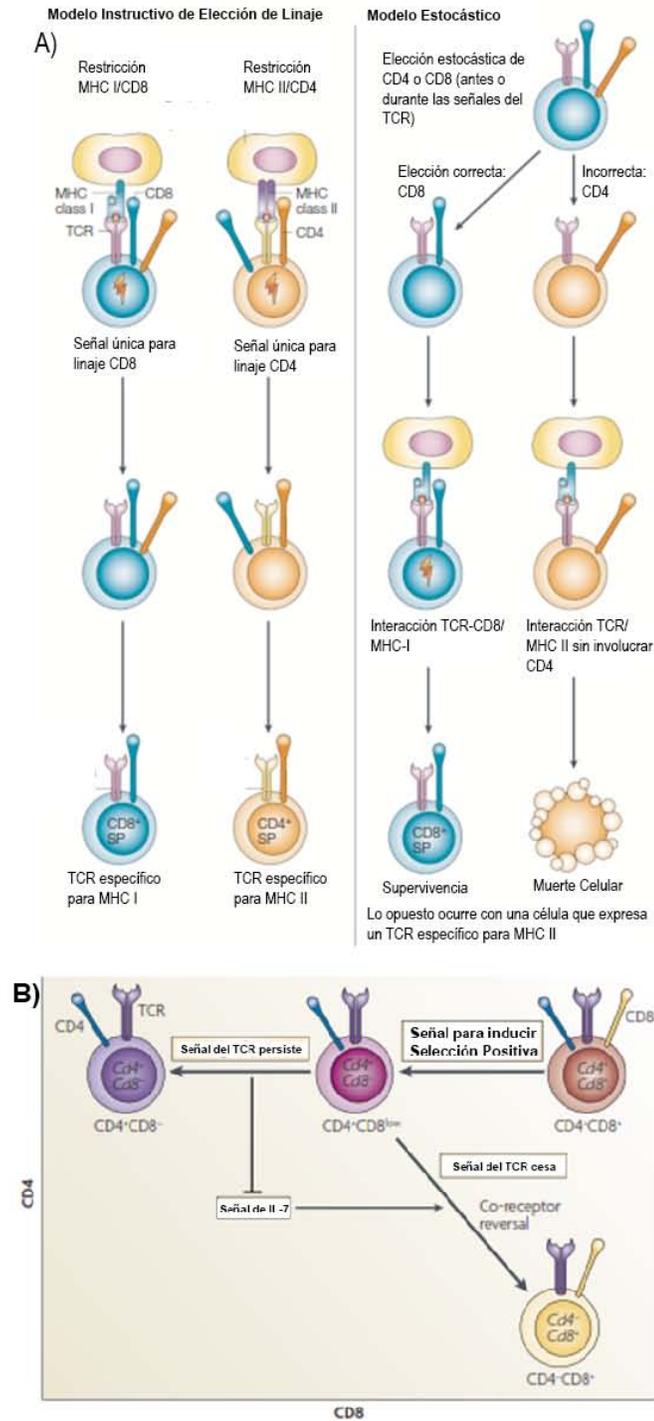


Figura 3. Modelos propuestos para la elección de linaje CD4⁺ vs CD8⁺. (A) Comparativa de los modelos Instructivo vs Estocástico de elección de Linaje. Modificado de Germain R., *Nat. Rev. Immunol*, 2002 (B) Modelo cinético de elección de linaje, con la participación de IL-7 Modificado de Singer et al., *Nat. Rev. Immunol*, 2008.

CD5

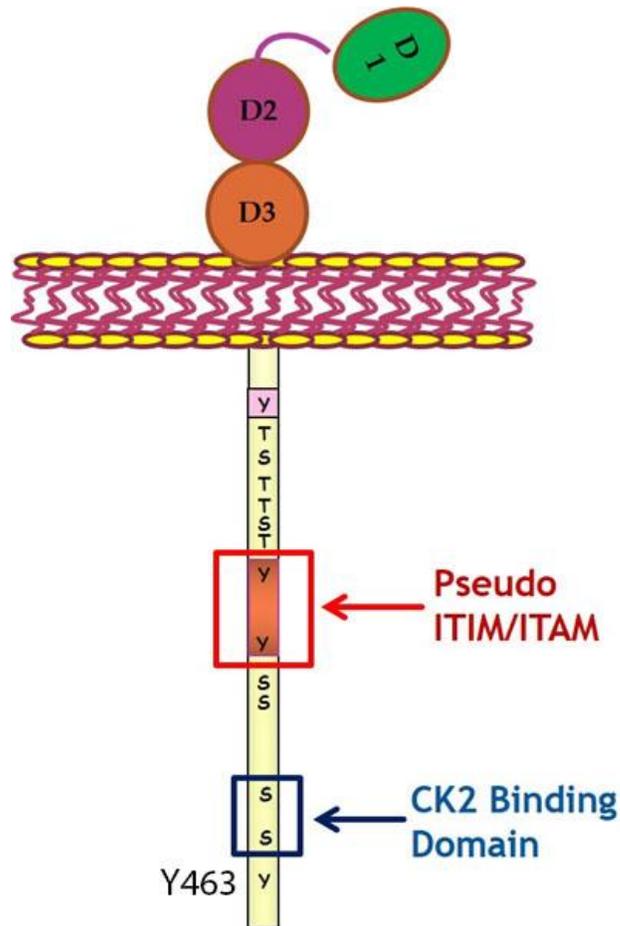


Figura 4. Representación de CD5 y sus dominios extracelulares e intracelulares. En la figura se muestran los 3 dominios extracelulares de CD5 (SRCR domains). Así como el dominio Pseudo ITAM/ITIM (Y429-Y441) y el dominio de unión a CK2 (S458-461).

CD5 es un receptor de 67 KDa, expresado en células T (maduras y en desarrollo), células B1-a y en algunas células B y T leucémicas, por ejemplo: en la Leucemia Linfocítica Crónica de Linfocitos B (B-CLL). Se describió hace más de treinta años y desde su descubrimiento ha sido utilizado como un marcador de linfocitos T, tanto humanos como murinos [66-68].

La expresión de esta proteína se ha observado en diversas especies y de manera muy interesante, a diferencia de los humanos y ratones, la mayoría de las

células B de los conejos y gallinas expresan ese receptor. Adicionalmente, la expresión de este receptor se demostró en ganglios linfáticos fetales humanos.

A pesar de que fue identificado hace más de 30 años, una de las preguntas más importantes que falta por resolver en la biología de CD5 es la identidad de sus ligandos. Inicialmente, se pensó que CD72, una molécula expresada en linfocitos B, era el ligando principal de CD5; sin embargo, al día de hoy ha sido difícil encontrar esta interacción in vivo, y mucho menos detallar los efectos de esta unión en la biología de los linfocitos T y B [69]. Posteriormente por medio de ensayos de inmunoprecipitación y Western Blots se realizó la identificación de diversas glicoproteínas que aparentemente interaccionan con CD5 (gp 35-40, gp 150, gp 200). Adicionalmente se demostró que la región estructural de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH framework) puede interactuar in vitro con CD5 [68]. Finalmente, de manera más reciente se demostró que CD5 es capaz de interactuar in vitro consigo mismo, sugiriendo que el ligando de este receptor podría ser el mismo [70]. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados al día de hoy poco sabemos sobre los receptores de CD5.

El análisis de la expresión de CD5 en los diversos tipos celulares murinos, demostró que CD5 se expresa en la superficie de estas células con diferente intensidad [71, 72]:

CD4+ Tímicas>>CD8+ Tímicas>CD4+ Esplénicas>CD8+ Esplénicas>DP
Tímicas>>Células B1-a.

Una de las incógnitas sobre la biología de CD5 es la modulación de su expresión en las diversas células en las cuales este receptor se expresa. En este contexto, se ha observado que el gen de CD5 contiene sitios de unión a la proteína ETS-1 la cual parece ser el principal regulador [72]. Experimentos realizados en linfocitos T con mutaciones en los ITAMS de la cadena zeta, demostraron que los niveles de CD5 en los linfocitos T correlacionan directamente con el nivel de activación del TCR (fosforilación de los ITAMs) y que esto era modulado durante el desarrollo de los linfocitos T después de la fase DN3 y DP (selección beta y selección positiva). Adicionalmente, se observó que no solo la expresión de CD5

es regulada por las señales del TCR, sino que CD5 modula por sí mismo, las señales del TCR, lo cual se discutirá en la siguiente sección [33, 71].

PAPEL DE CD5 EN LA MODULACIÓN DE LAS SEÑALES DEL TCR EN LINFOCITOS T

CD5 es una proteína relevante en la biología de los Linfocitos T. Su expresión está íntimamente relacionada con la transducción de señales a través del TCR, y su expresión es fundamental para la regulación negativa de las señales del TCR. Sin embargo, diversos estudios han sugerido que el papel de CD5 en los linfocitos T no es tan simple como solo regular las señales del TCR.

Los primeros experimentos realizados con la finalidad de entender el papel de CD5 en la biología de los linfocitos T mostraron que la utilización simultánea de anticuerpos α -CD5 junto con α -CD3 en sangre humana, inducían un incremento en la proliferación de los linfocitos T, sugiriendo que esta molécula es capaz de coestimular las vías de señalización activadas por el TCR. Adicionalmente, la utilización simultánea de α -CD3 con α -CD5 demostró que CD5 es capaz de inducir un incremento en las respuestas de IL-2 al incrementar la expresión de su receptor en los linfocitos T. En conjunto, aparentemente, todas las primeras evidencias apuntaban a un rol de CD5 como coestimulador de las señales del TCR [73].

Experimentos adicionales, utilizando α -CD5 soluble en presencia del anticuerpo OKT3 pegado a placa mostraron que CD5 promovía un incremento en la expresión del receptor de IL-2 y la secreción de IL-2 en los linfocitos T humanos. Adicionalmente, la utilización de la clona Cris-1 del anticuerpo α -CD5 demostró que este anticuerpo, en presencia de monocitos es suficiente para inducir la proliferación de linfoblastos de T; sin embargo, la utilización de este anticuerpo no activaba el metabolismo de los fosfatidilinositoles ni generaba cambios en la movilización de Ca^{2+} en estas células, lo que sugería un mecanismo no canónico, a diferencia del observado en la señalización por el TCR. Adicionalmente, la utilización de este anticuerpo, demostró que CD5 es capaz de inducir la actividad de la Proteína Cinasa C (PKC) a través de la producción de Diacilglicerol. En conjunto estos resultados demostraron que CD5 podía activar vías de

señalizaciones tanto dependientes como independientes del TCR y que estos mecanismos funcionaban principalmente como activadores de los linfocitos T [74, 75].

Para determinar los mecanismos por los cuales CD5 es capaz de coestimular o inducir señales positivas para el TCR se realizaron experimentos en células Jurkat, en los cuales se activó CD5 en conjunto con el TCR o de manera independiente a este. Interesantemente, se observó que la coestimulación del TCR a través de CD5 induce el reclutamiento y activación de una fosfolipasa C dependiente de fosfatidil colina (PC-PLC), mientras que la activación de vías de señalización de CD5 independientes del TCR induce la síntesis de novo de DAG a través de un mecanismo independiente de PC-PLC [76-78]. Finalmente, uno de los hallazgos más importantes de esos trabajos fue la identificación de un dominio cercano a la parte carboxi-terminal de CD5 que incluía las serinas 458, 459, 461 y que permitió establecer que esta región es capaz de unir a la proteína CK2 (Caseína Kinasa II). Adicionalmente se demostró que esta unión se da de manera constitutiva a través de la subunidad β de esta proteína y que la unión se puede incrementar una vez se da la activación de los linfocitos T [78-80].

Debido a que muchos de los efectos previamente observados en la biología de CD5 (movilización de Ca^{2+} , generación de DAG e IP3, etc) dependen de la activación de vías moduladas por cinasas de tirosina, se realizó el mapeo e identificación de los residuos de tirosina más relevantes dentro de la cola citoplasmática de CD5. Fue así, como se identificó que los residuos Y429, Y441 y Y463 de región citoplasmática de CD5 pueden ser fosforilados por Lck o Fyn (sólo Y429 y Y463), los cuales son miembros de la familia src de tirosina cinasas, tras la activación del TCR. Además, la utilización de variantes de la línea Jurkat, deficientes de lck, mostró deficiencias en la fosforilación de CD5 en estos residuos [81, 82]. Por último, un estudio independiente demostró que las Treoninas 410 y 412 (T410 y 412) de CD5 parecen ser importantes para la activación de la fosfolipasa C dependiente de fosfatidil colina (PC-PLC) y la subsecuente liberación de IP3 y DAG, así como para la fosforilación de CD5 dependiente de PKC [83].

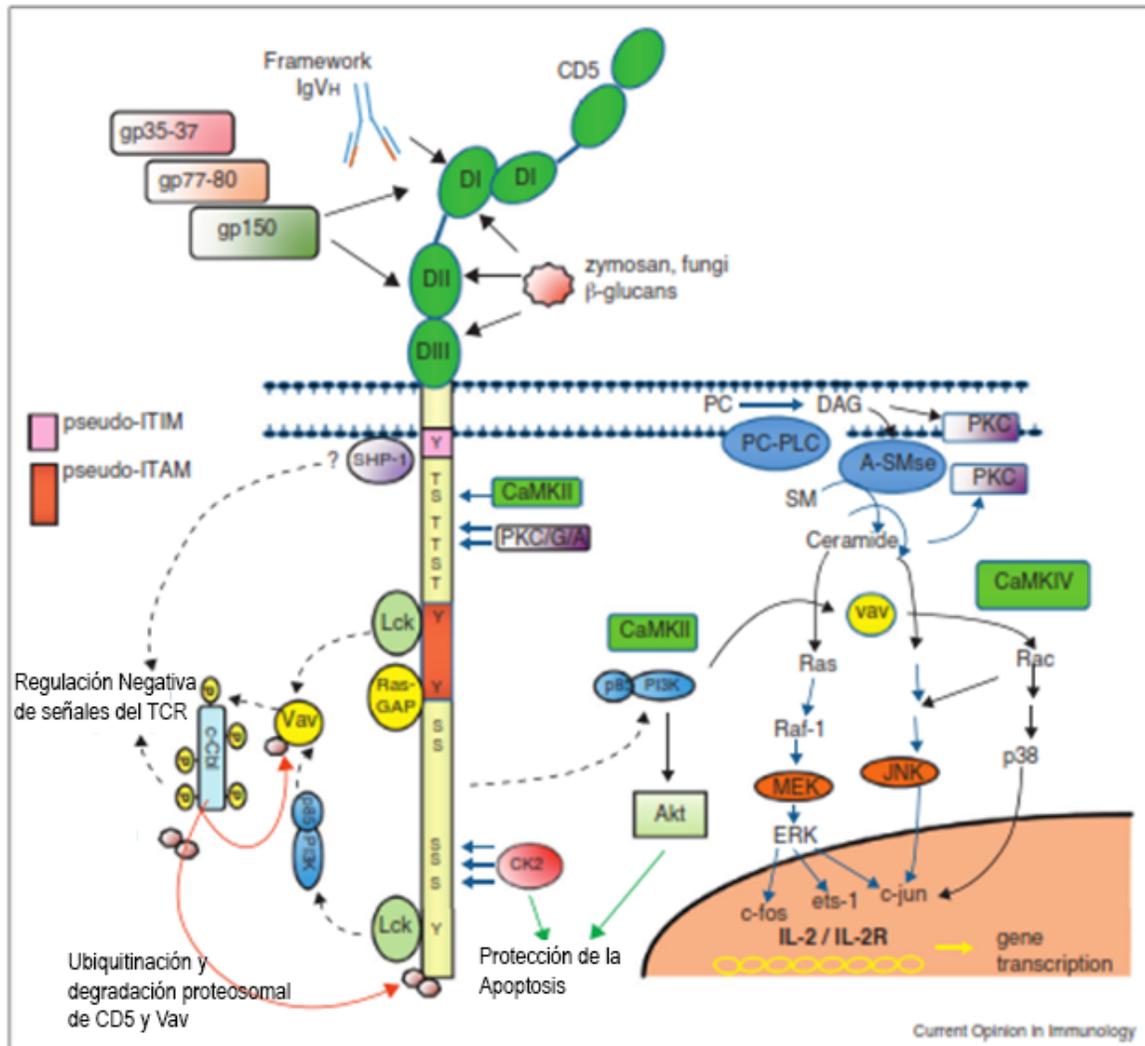


Figura 5. Vías de señalización moduladas por el receptor CD5. Esquema que muestra las diversas vías activadas por CD5 tras la activación por sus ligandos. Modificado de Soldevila et al., *Crit. Rev. Immunol*, 2011. Ver texto para más detalles.

Como se puede observar, muchos de los estudios iniciales de CD5 apuntaban a un papel de esta proteína como coestimulador de las señales del TCR, ya sea dependientemente de éste o independientemente de éste; sin embargo, la generación de un ratón deficiente de CD5 permitió estudiar por primera vez el papel real de esta proteína in vivo.

Tarakhovsky et al., en 1995 demostró que los timocitos obtenidos de ratones deficientes del receptor CD5 son hipersensibles a las señales dadas por α -CD3.

Además, demostró que la estimulación con α -CD3 o PMA (ester de forbol activador de PKC) tanto en linfocitos CD4+ o CD8+ en desarrollo, induce una hiperproliferación de estas células. Experimentos adicionales, demostraron que la utilización de α -CD3 solo o en conjunto con α -CD4 genera un incremento en la movilización de Ca²⁺ e induce hiperfosforilación de diversas proteínas como son PLC γ 1, la cadena ζ y Vav. Estos resultados demostraron por primera vez que el verdadero rol de CD5 in vivo es el de regular negativamente las señales del TCR [84, 85].

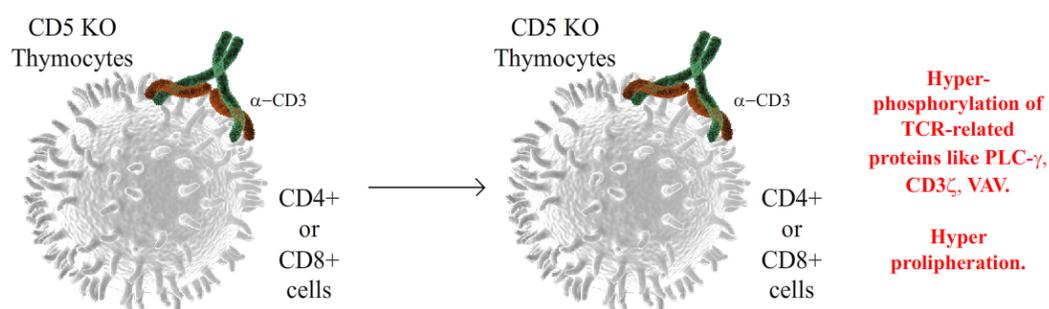


Figura 6. Papel de CD5 en la regulación de las señales del TCR en timocitos. Timocitos CD4+ o CD8+ obtenidos de ratones deficientes de CD5, estimulados con anticuerpos α -CD3 presentan hiperfosforilación de proteínas relacionadas al TCR, como PLC γ , VAV, así como hiperproliferación, comparados con ratones silvestres (WT).

Azzam et al, confirmó el rol de esta proteína como regulador negativo de las señales del TCR. Utilizando ratones con diferentes TCR transgénicos, demostró que CD5 es un regulador fino de las señales del TCR, y que su ausencia provocaba un incremento en éstas, afectando la selección de algunos TCR de alta afinidad (delección clonal), así como su sobreexpresión ayudaba a la selección de algunos TCR que debían ser seleccionados negativamente. En este contexto, se demostró que la Y378 es un sitio posible de unión a la fosfatasa SHP-1, la cual regula negativamente las señales del TCR y que la tirosina Y429 es un sitio fundamental para la regulación negativa de las señales del BCR [86], aunque el papel de estos residuos en la modulación de las señales del TCR no ha sido estudiado [33, 71].

Finalmente, para entender mejor las posibles vías de señalización que conducen a la regulación de las señales del TCR se han realizado ensayos de inmunoprecipitación con péptidos obtenidos de las tirosinas Y429-441 y de la Y463. En estos experimentos, se ha demostrado que proteínas como c-Cbl, RasGAP, PI3K, son capaces de unirse a los 3 distintos residuos (Y429, Y441 y Y463). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la región carboxi-terminal de CD5 es importante para la unión y por ende actividad de c-Cbl, la cual es una ubiquitin ligasa importante en la regulación negativa de las señales del TCR [87, 88]. Estos datos se suman a datos previos donde se propuso a este dominio en la regulación negativa de las señales del TCR a través de un mecanismo dependiente de Fyn [89].

En conjunto, los experimentos *in vivo*, así como las diversas vías de señalización que CD5 afecta y las interacciones que presenta, han demostrado que el verdadero rol de CD5 en los linfocitos T, es el de regular negativamente las señales del TCR; sin embargo, estudios recientes han demostrado un papel fundamental de este receptor en regular la supervivencia de los linfocitos T. Adicionalmente, a pesar de que sabemos que CD5 es un modulador de las señales del TCR, los diferentes mecanismos por los cuales lleva a cabo esta función, así como los residuos/dominios encargados de esto y el impacto que estos tienen en el desarrollo y función de los linfocitos T no ha sido estudiado.

PAPEL DE CD5 EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS LINFOCITOS

Desde su identificación como un marcador en la superficie de algunas leucemias como B-CLL, se ha propuesto que CD5 puede actuar como un modulador de la supervivencia celular; sin embargo, fue hasta hace poco tiempo que el verdadero papel de este receptor como modulador de la supervivencia se comenzó a estudiar [67].

Uno de los primeros experimentos que sugirió que CD5 tiene un papel relevante en la supervivencia de los linfocitos T fue realizado en timocitos. Ahí se demostró que la activación de los timocitos con α -CD3 + α -CD5 resulta en la inducción de pERK, la cual es una molécula que se postula como una proteína

anti-apoptótica en este contexto. Adicionalmente, se demostró que el entrecruzamiento de estos receptores por medio de anticuerpos monoclonales induce la expresión de Bcl-2, el cual es uno de las moléculas anti-apoptóticas más relevantes y que la expresión de esta proteína se encuentra afectada por inhibidores de la vía de ERK 1/2 (Inhibidor de MEK1/2 PD0325901). Es importante señalar que, aunque en este contexto ERK tiene un aparente papel anti-apoptótico, el rol de ERK modulado por CD5, y su efecto global en la biología de los linfocitos T mediada por CD5 no se ha entendido por completo [90].

A pesar de los experimentos antes mencionados, no fue hasta después que se demostró conclusivamente que CD5 regula la supervivencia de los linfocitos T. Para demostrar esto, se realizaron experimentos de inducción de Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) en ratones deficientes de CD5. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes ya que contrario a lo esperado (en ausencia de CD5 los linfocitos T deberían activarse más y generar una enfermedad más intensa), los ratones deficientes de CD5 presentaron una enfermedad mucho menos severa. Al analizar las causas de esta observación se pudo determinar que los linfocitos T deficientes de CD5 presentaban niveles de muerte celular inducida por activación (AICD) muchos más elevados [91]. En conjunto, estos datos demostraron un rol del receptor CD5 en la protección a apoptosis. Los mecanismos y evidencias directas que condujeron a la realización de esta tesis se discutirán en la siguiente sección.

ANTECEDENTES

Una de las proteínas relacionada con la biología de CD5 y más importantes en la modulación de la supervivencia de diversos tipos celulares, entre ellos los linfocitos, es la Kinasa de Caseína II (CK2). Por esta razón [92-94], se realizó el mismo ensayo que en el ratón CD5KO (Inducción de EAE), solo que ahora en ratones carentes del dominio de unión a CK2 de CD5 (CD5 expresado bajo el promotor de CD2). Interesantemente, las observaciones hechas en estos ratones son muy similares a las encontradas en el ratón deficiente de CD5. En conjunto estos experimentos demostraron por primera vez que CD5 es un receptor que modula de manera muy importante la muerte de los linfocitos T en periferia y que además uno de los dominios de CD5 importantes para llevar a cabo esta función, es el dominio de unión a CK2 (CD5-CK2BD) [95, 96]. Adicionalmente, trabajos más recientes han demostrado que la ausencia del dominio de unión a CK2 de CD5 en linfocitos CD4+ en periferia afecta significativamente la fosforilación de AKT (cinasa que modula la supervivencia celular) lo que sugiere que esta vía podría ser a través de la cual el CK2BD de CD5 regula la supervivencia en CD4+ de periferia [97]. Es importante señalar, que estos efectos fueron observados en linfocitos T maduro, más no en linfocitos T en desarrollo, por lo que el papel de este dominio en la biología de los timocitos no ha sido estudiado.

Además del modelo de EAE, otros trabajos han mostrado la importancia de CD5 en regular la supervivencia de los linfocitos T. Utilizando clonas de linfocitos T citotóxicos con bajos niveles de CD5 se mostró que estas son más susceptibles a la muerte celular inducida por activación, que aquellas que expresan altos niveles de CD5. Adicionalmente, el bloqueo de CD5 con anticuerpos promueve la apoptosis en estas clonas. Además, se ha observado que la expresión ectópica de CD5 en una línea celular Jurkat carente de CD5, protege a estas células de AICD tras la activación con PMA y que el bloqueo de CD5 induce la expresión de FasL. Estos hallazgos soportan la idea de CD5 como un regulador de la supervivencia de los Linfocitos T [98].

Como se mencionó anteriormente, diversas proteínas se unen a los residuos de tirosina Y429/441 y Y463 de CD5; sin embargo, entre las proteínas que se unen a estos residuos y que se encuentran relacionadas con la supervivencia celular se

encuentra la subunidad p85 de PI3K, la cual a través de su dominio SH2 se une a las tirosinas Y429/441 con alta afinidad y al residuo Y463 con menor afinidad [87]. Esto es de gran relevancia ya que esta proteína inicia la cascada de activación de la vía PI3K/AKT la cual, de manera general, genera la activación final de AKT lo que promueve la supervivencia celular a través de diversos mecanismos (inactivación caspasas, inactivación BAD, etc) [99].

En este contexto, datos publicados en nuestro laboratorio, han demostrado la relevancia de CD5 en la modulación de AKT y de la supervivencia de los linfocitos T en desarrollo. Utilizando ratones deficientes de CD5 en fondo Balb/C se demostró que los timos de estos ratones son de menor tamaño y contienen un menor número de células que los timos de los ratones silvestres (WT), a las 12 semanas de edad. Se demostró que la razón de esto es un incremento en la apoptosis de estas células medidas por el ensayo de anexina V. Más aún, el incremento en apoptosis medida por anexina V correlaciona con un incremento en el porcentaje de células con caspasa 3 activa. Una caracterización más a fondo de estas células demostró que la apoptosis de estos linfocitos T correlaciona con una disminución en la fosforilación de AKT después de un estímulo con α CD3 + α CD28, sugiriendo un rol de la cinasa AKT en la supervivencia mediada por CD5 [100] (Figura 7)

Finalmente, como se mencionó anteriormente, a pesar de la evidencia indirecta de la participación de algunos otros residuos (residuos de tirosina) dentro de la región citoplasmática de CD5, adicionales a CK2, poco se conoce del papel real de estos residuos en la modulación de la supervivencia y/o señales del TCR. La única evidencia indirecta del papel de alguno de estos residuos (Y429) se observó en linfocitos B [86]. Por medio de la expresión en linfocitos B de quimeras de la región citoplasmática de CD5 y la región extracelular del receptor $Fc\gamma$ RIIB se identificó al residuo Y429 de CD5 como un regulador negativo de las señales del BCR, debido a que la activación de ERK y la movilización de calcio intracelular se encuentran incrementadas en mutantes de este residuo. Sin embargo, el papel de este residuo en la señalización de linfocitos T, así como en su supervivencia en desarrollo no había sido estudiado con anterioridad hasta este trabajo.

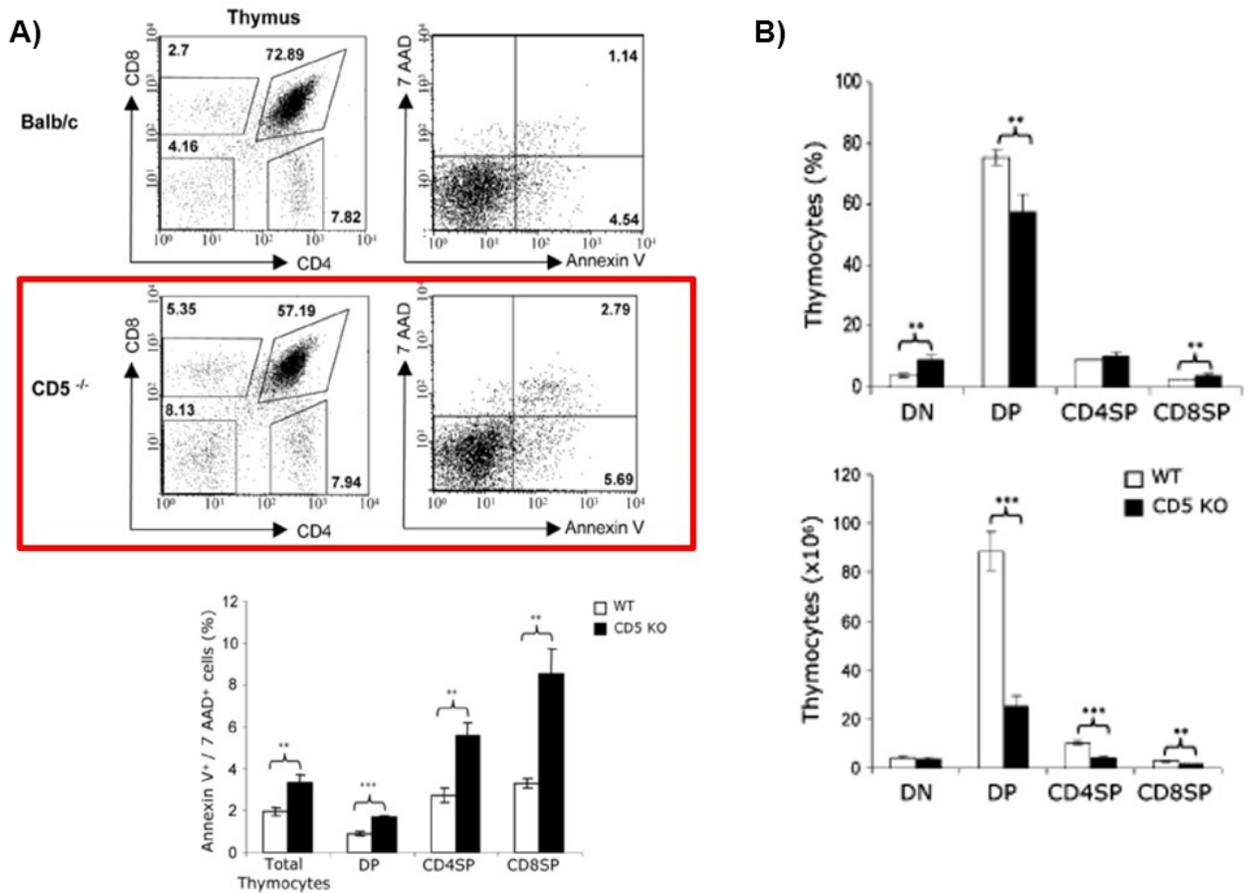


Figura 7. La ausencia de CD5 promueve la muerte celular de los linfocitos T en desarrollo. (A) Análisis de las diferentes subpoblaciones tímicas (CD4⁺, CD8⁺, DP, DN) demuestra un incremento en las células Anexina V⁺ en ratones deficientes de CD5 vs ratones silvestres **(B)** Disminución en porcentajes celulares y números totales de las diversas poblaciones tímicas en ratones deficientes de CD5 vs ratones silvestres.

JUSTIFICACION

En conjunto, existen evidencias que apuntan a que uno de los efectos importantes de CD5 sobre los linfocitos T es la protección a apoptosis; sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por responder. Entre ellas, ¿cuál es el rol de las diferentes tirosinas y del dominio de unión a CK2 en la supervivencia de los linfocitos T durante el desarrollo tímico? ¿Participan estos residuos de CD5 en los procesos de selección de los timocitos?

Para responder estas preguntas en la actualidad existen tanto modelos in vitro como in vivo que permitirán entender el rol de cada uno de los residuos de CD5 en la biología de CD5 tanto en periferia como en desarrollo y además, nos permitirán entender las vías de señalización involucradas en estos procesos y cómo afectan la maduración y supervivencia de los linfocitos T.

HIPOTESIS

Existen residuos de tirosina y serina en la región citoplásmica de CD5 que son cruciales para promover la supervivencia de linfocitos T y que regulan el desarrollo de los timocitos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el papel de los residuos de tirosina así como de serina presentes en la cola citoplasmática de CD5 (Y429, Y441, Y463, S458-461), en la protección a apoptosis mediada por CD5 durante el desarrollo de los timocitos. Así como determinar los mecanismos a través de los cuales estos residuos ejercen sus efectos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la ausencia de las tirosinas Y429, Y441, Y463 en la supervivencia de los timocitos in vitro.
2. Identificar las vías intracelulares relacionadas con la supervivencia/apoptosis de los timocitos que se encuentran afectadas en las diversas mutaciones (Caspasa 3, Bcl-2)
3. Analizar el desarrollo tímico en ratones que carecen del dominio de unión de CK2 (CD5-CK2BD) (S458-S461)
4. Analizar la apoptosis de timocitos de ratones CD5-CK2BD durante las distintas etapas de maduración en el timo
5. Analizar las vías de señalización relacionadas con supervivencia y señalización del TCR en el ratón deficiente del dominio de unión de CK2.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 8-12 semanas de edad como controles; así como, ratones de la cepa C57BL/6 OTII de 8 a 12 semanas, los cuales expresan un TCR específico para el péptido de Ovoalbumina (OVA) 323-339 [101]. Adicionalmente, se utilizaron ratones deficientes de la proteína CD5 (CD5KO) [85] y ratones transgénicos “Knock-In” generados en colaboración con el laboratorio del Dr. Chander Raman en “The University of Alabama at Birmingham”, en los cuales se expresa una variante de la proteína CD5, en la cual se eliminó la región de unión a la Cinasa de Caseína II (CKII/2), denominados CD5-CK2 Δ BD [96]. Finalmente, estos últimos ratones se cruzaron con los ratones C57BL/6 OTII para obtener una nueva línea, CD5-CK2 Δ BD OTII. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo los lineamientos éticos institucionales del IIB-UNAM y de “The University of Alabama at Birmingham”. Adicionalmente, se utilizaron ratones neonatos (0-24 horas de edad) silvestres WT vs CD5-CK2 Δ BD.

Para genotipificar los ratones CD5-CK2 Δ BD utilizados en los experimentos se utilizaron los siguientes primers:

- Forward: 5'-ATGGACTCCCACGAAGTGCTG-3'
- Reverse: 5'-CTTGTAGAGGATGGTGCCA-3'

LÍNEAS CELULARES

La línea celular EL4, timoma murino generado por la inyección de 9,10-dimetil-1,2 benzantraceno en ratones C57BL/6, se utilizó para generar transfectantes estables que expresan diversas variantes de CD5 humano. La línea celular E6 (Jurkat) se utilizó en algunos experimentos como control de expresión de CD5 humano. La línea celular EL4 se mantuvo en cultivo en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% SFB, 100 U/mL de Penicilina y 0.1 mg/mL de Antimicótico/Antibacteriano. La línea celular E6 (Jurkat) se cultivo en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% SFB, 100 u/mL de Penicilina y 0.1 mg/mL de Antimicótico/Antibacteriano.

ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Para la realización de esta tesis se utilizaron los siguientes reactivos: α -mouse CD3 ϵ PE-Cy5 (α -mCD3) (145-2C11), α -mouse CD5 AF647 (α -mCD5) (53-7.3), biotin-labeled α -mouse CD3 ϵ (a-CD3), biotin-labeled a-mouse CD28 (α -CD28) (37.51) and 7-AAD obtenidos de Biolegend (San Diego, CA). α -Akt PE (pS473) (M89-61) (α -pAkt), α -ERK1/2 (pT202/pY204) (α -pERK), α -Active Caspase-3 PE (C92-605) fueron obtenidos de BD Biosciences (San Jose, CA). Annexin V-FITC se compró de Beckman Coulter (Brea, CA). Los siguientes reactivos secundarios se utilizaron: goat α -mouse IgG-FITC (ZyMax™ Grade, Invitrogen, Carlsbad, CA); mouse a-human CD5 (α -hCD5) mAb (Cris-1), α -human biotin CD5 (α -hCD5), se describió previamente [22]. Immunopure Affinity Purified Streptavidin fue obtenida de la empresa Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los anticuerpos, CD4 Pacific Blue, CD8 BV 650, CD62Lbn + Streptavidin 605, CD8 AF 647, CD69 PE, CD44 FITC, CD25 PerCP-Cy5.5, CD5 PE Cy-7, Va2, TCRb fueron obtenidos de la empresa Biolegend. Los reactivos Fluo-4 y FuraRed utilizados para la determinación de Ca²⁺ intracelular se compraron a la empresa Molecular Probes. Finalmente, los anticuerpos, α -ERK 1/2 (pT202/pY204), α -pAKT, α -Bcl-2, α -Caspase 3, α -Zap70, α -pJNK, α -pCDC37 y α -pP38 se compraron de la empresa Cell Signaling Technologies. El anticuerpo α -FoxP3 se compró de la empresa eBioscience.

TRANSFECCIÓN Y GENERACIÓN DE CLONAS ESTABLES QUE EXPRESAN VARIANTES DE CD5H

El DNA de las diversas mutantes de CD5h se clonó en el vector pHBAPr1-neo por el Dr. Francisco Lozano del Hospital Clinic de Barcelona que amablemente donó a nuestro laboratorio. Las mutantes generadas codifican para las siguientes mutantes de la región citoplasmática de CD5, en diferentes residuos de Tirosina: WT (sin mutación), YYY (Mutación en Y429, Y441 y Y463), 429 (Mutación en Y429), 441 (Mutación en Y441), 463 (Mutación en Y463), 429-441 (Mutación en Y429, Y441), 429-463 (Mutación en Y429, Y463) y 441-463 (Mutación en 441-463).

Adicionalmente, se nos proporcionó el DNA de un SNP (Polimorfismo de Nucleótido Único) el cual posee una Alanina en sustitución de una Valina en la posición 471 de la región citoplasmática de CD5h.

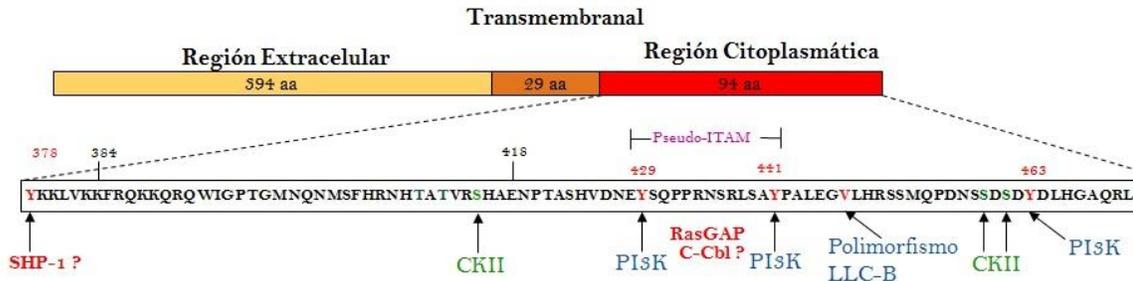


Figura 8. Representación de los dominios intracelulares de CD5h. Se muestran las proteínas que se ha demostrado pueden interactuar con algunos dominios o residuos de la región citoplasmática de CD5.

Con el DNA proporcionado por el Dr. Lozano se transformaron bacterias DH10B, 2 μ L DH10B + 5 μ L DNA + 37 μ L H₂O inyectable, utilizando un electroporador ECM 630 de la marca BTX bajo las siguientes condiciones: 2500V, 125 Ω , 25 μ F. Las bacterias obtenidas se sembraron en placas con medio LB + Agar 1% + 100 μ g/mL de Ampicilina. A las 18 h de haberse sembrado se obtuvieron colonias, las cuales se resembraron en 5 mL de medio LB + 100 μ g/mL de Ampicilina y se cultivaron por 18 h adicionales. Transcurrido este tiempo, se tomaron 4 mL de los cultivos y se centrifugaron por 5 minutos a 13000 rpm (16060 x g) a una temperatura de 4 °C. A partir del pellet obtenido y utilizando el Kit de extracción de DNA plasmídico de la marca QIAGEN se purificó el DNA correspondiente a cada mutante y se resuspendió en 50 μ L

Para corroborar la identidad del DNA obtenido, se realizaron 3 procedimientos diferentes:

- Electroforesis: Se tomaron 2 μ L de DNA y se mezclaron con 7 μ L de H₂O + 1 μ L de Buffer de Carga. Las muestras se colocaron en un gel de Agarosa 1% en TAE 1X + 0.1 μ g/mL de Bromuro de Etidio. La detección de las bandas correspondientes se realizó utilizando un Revelador de luz UV.

- Digestión con Enzima EcoRI: Para determinar la presencia del vector y del inserto de DNA se realizó una digestión con la enzima de Restricción EcoRI. Para esto, se tomaron 3 μ L de DNA + 3 μ L de Buffer 10X (Buffer EcoRI) + 1.2 μ L EcoRI + 22.8 L de H₂O Inyectable. La determinación de las bandas se realizó por electroforesis y se obtuvieron 2 bandas de aprox 10 Kbp y 2 Kbp, las cuales corresponden a los tamaños esperados
- Secuenciación: A partir del DNA obtenido se realizó una secuenciación, por medio de la cual se pudo corroborar con exactitud la identidad de cada una de las mutantes.

Una vez identificado el DNA de cada mutante, el 1mL restante de los cultivos bacterianos antes mencionados, se resembró en 500 mL de medio LB por 18 horas. Transcurridas las 18 horas se realizó la purificación del DNA plasmídico correspondiente a cada mutante por medio del kit MAXIPrep de QIAGEN. El DNA correspondiente a cada mutante se cuantificó por medio de espectrometría de UV y se conservó a -20 °C.

A partir del DNA obtenido para cada mutante (WT, YYY, 429, 441, 463) se realizaron transfecciones estables en la línea celular EL4 con la finalidad de obtener 9 líneas con expresión de las diferentes mutantes de CD5 humano. Para realizar esto, se cultivó la línea EL4 hasta obtener números suficientes para realizar las transfecciones (8 millones de células por cada mutante). Adicionalmente, una fracción del DNA obtenido de cada mutante se trató con la enzima de restricción NdeI con la finalidad de linearizarlo y de esta forma facilitar su integración en el DNA de las células (7 μ g DNA + 2 μ L NdeI + 5 μ L Buffer NdeI + 39.4 μ L H₂O). Las digestiones con NdeI de cada mutante se cargaron en un gel de Agarosa 1% + Bromuro de Etidio. Después de su detección por UV, cada banda se cortó y el DNA correspondiente se purificó utilizando el kit de extracción rápida a partir de geles de la empresa MARLIGEN. El DNA obtenido se resuspendió en 30 μ L de H₂O y congelado a -20 °C para su conservación

Una vez alcanzado el número de células requerido para las transfecciones se prepararon en cubetas de electroporación de 1 mL de la siguiente forma:

- 400 μ L de células EL4 (correspondiente a 8 millones de EL4) + 30 μ L H₂O (Control Negativo)
- 400 μ L de células EL4 + 30 μ L de DNA WT digerido con NdeI y purificado (7 μ g). (Línea hCD5WT)
- 400 μ L de células EL4 + 30 μ L de DNA YYY digerido con NdeI y purificado (7 μ g). (Línea YYY/AAA)
- 400 μ L de células EL4 + 30 μ L de DNA 429 digerido con NdeI y purificado (7 μ g). (Línea Y429A)
- 400 μ L de células EL4 + 30 μ L de DNA 441 digerido con NdeI y purificado (7 μ g). (Línea Y441A)
- 400 μ L de células EL4 + 30 μ L de DNA 463 digerido con NdeI y purificado (7 μ g). (Línea Y463A)

Una vez preparadas todas las cubetas de electroporación se realizó la transfección utilizando las siguientes condiciones: 250 V, 800 Ω , 950 μ F; inmediatamente después, se añadió 1 mL de DMEM al 10% y las células se colocaron en una caja Petri durante 24 horas.

Después de 24 horas de cultivo, las células se colocaron en DMEM al 10% suplementado con el fármaco G418, el cual permitió seleccionar las células que fueron capaces de incorporar el DNA exógeno. De esta forma, las distintas líneas generadas se mantuvieron por aproximadamente 3 semanas hasta obtener aproximadamente 30×10^6 células.

El 66% de las distintas líneas generadas se congelaron y se han mantenido en Nitrógeno líquido y a -70 °C, mientras que el resto de las células (33%) se marcaron con anticuerpos dirigidos hacia las proteínas CD5murino, CD5humano (proteína transfectada) y CD3murino. Por medio de citometría de flujo se determinó el porcentaje de células positivas para los distintos marcadores antes mencionados, y todas las células que presentaron una alta expresión de CD5h y CD3m y una

expresión similar de CD5m fueron separadas por medio de citometría de flujo (“Sorting Celular”).

Una vez obtenidas las células correspondientes a cada mutante, se realizó un sembrado en placas de 96 pozos (por mutante) utilizando la técnica de “dilución límite”, la cual consiste en diluir las células hasta alcanzar una concentración 0.5-1 célula por pozo por cada 200 μ L de medio (suplementado con G418). Una vez sembradas las células en las placas de 96, éstas se cultivaron por 3-4 semanas. Durante este periodo de tiempo, las células se transfirieron a placas de 48, 24 y 12 pozos para mantener una densidad y viabilidad adecuada.

Entre 2-3 semanas después de realizar el sembrado por “dilución límite” de cada clona, se obtuvieron aproximadamente 60 clonas por cada mutante (540 clonas), en las cuales se presentó crecimiento constante en presencia de G418 y en las cuales se alcanzó una densidad de aproximadamente 5×10^6 células. Con la finalidad de determinar el número de clonas funcionales del total de 540 se realizó una tinción con anticuerpos dirigidos contra CD3m, CD5m y CD5h. Los criterios utilizados para determinar el número de clonas funcionales correspondientes a cada mutantes fueron los siguientes: Expresión relativa alta de CD5h (~100 veces con respecto al control de anticuerpo secundario), expresión de CD5m similar a la línea celular parental (EL4) y expresión de CD3m similar a la línea celular parental (EL4). Utilizando estos criterios, se obtuvieron aproximadamente 10 clonas por cada mutante (60 clonas totales), las cuales se mantuvieron en cultivo en presencia de G418 con la finalidad de expandirlas y congelarlas a -70 C y en N₂ líquido (~200 °C). Finalmente, a partir de las clonas obtenidas se seleccionaron las clonas de más alta expresión para cada mutante, con las cuales se realizaron los experimentos funcionales.

INDUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LAS CLONAS CON MUTACIONES PUNTUALES DE CD5H.

Para determinar cuáles residuos de la región citoplasmática de CD5h son los encargados de proteger de la apoptosis a los timocitos, se realizaron experimentos

en los cuales se indujo apoptosis a través del TCR (α -CD3 o α -CD3 + α -CD28) en las clonas previamente obtenidas.

Primero, se realizó una curva Dosis-Respuesta utilizando distintas cantidades de α -CD3m, así como streptavidina para realizar un entrecruzamiento de este anticuerpo. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 1 μ g/mL α -CD3, 3 μ g/mL α -CD3, 5 μ g/mL α -CD3 y 10 μ g/mL aCD3. Como control, se utilizó PMA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μ g/mL. A partir de esta curva, la concentración en la cual se presentó la mejor detección de apoptosis fue de 10 μ g/mL de aCD3 y el mejor coestímulo se presentó al utilizar 10 μ g/mL de aCD3 + 10 μ g/mL de aCD28. Esta concentración se utilizó para realizar los experimentos posteriores.

De manera general, en placas de 96 pozos con fondo plano, se colocaron 100×10^3 células (de cada clona) en un volumen final de 200 μ L con los estímulos correspondientes (Sin Estímulo, α -CD3, α -CD3 + α -CD28 y PMA). Una vez colocados los estímulos correspondientes a cada clona, se añadieron 10 μ g/mL de Streptavidina a los pozos con α -CD3 y α -CD3 + α -CD28, mientras que un volumen equivalente de medio se añadió a los pozos Sin Estímulo o PMA. Se cultivaron por 24h a 37 °C en 5% de CO₂.

Transcurridas las 24h de estimulación en cultivo, las células se retiraron cuidadosamente de los pozos y se colocaron en una placa de 96 pozos fondo U para realizar la tinción de Annexina V + 7-AAD o la tinción de Caspasa 3 Activa.

Para realizar la tinción de Annexina V + 7-AAD se utilizó un buffer comercial denominado "Annexin Binding Buffer", el cual es un buffer isotónico que cuenta con 2.5 mM de Cloruro de Calcio (el Calcio es requerido para el pegado adecuado de la Annexina V a los lípidos como Fosfatidil Serina, los cuales se exponen en la membrana durante el proceso Apoptótico). Para detectar el grado de apoptosis en las células se utilizó el análogo de nucleótidos 7-Actinomicina D (7-AAD), el cual solo es capaz de entrar en las células cuya membrana celular y nuclear ha sido

comprometida. La tinción se realizó de manera directa sobre el pellet celular por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente.

De manera adicional, para determinar la activación de Caspasa 3 en las células EL4 (diferentes clonas) tras la estimulación, se utilizó una fijación con paraformaldehído al 0.5% por 20 minutos seguida de una tinción/permeabilización con el anticuerpo dirigido contra la forma activa de Caspasa 3 (Active Caspase 3) diluido en Saponina al 0.01% por 30 minutos.

DETERMINACIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS (AKT, ERK) POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO (PHOSPHOFLOW).

Para determinar si los niveles de apoptosis en las líneas celulares presentan alguna correlación con la activación de vías de señalización relevantes para el receptor de células T o de supervivencia, decidimos medir los niveles intracelulares de fosfoproteínas como pERK (Thr 202/Tyr 204) y pAKT (Ser 473). Adicionalmente, debido a que los niveles de estas proteínas son muy elevados después de 24h de cultivo, lo cual no permitió identificar diferencias en los niveles entre las distintas clonas y tras los estímulos, se realizó la activación aguda del TCR, por medio de la estimulación por 5 minutos con aCD3 (10 μ g/mL) +/- aCD28 (10 μ g/mL) + Streptavidina (10 μ g/mL).

De manera general, tras el estímulo de 5 minutos, de cada clona y su estímulo correspondiente, se realizó una interrupción de la estimulación con el Buffer Lyse Fix de BD (Paraformaldehído 4%), y se incubó a 37 °C por 10 min. Concluido este tiempo se realizaron lavados con buffer de fosfatos (PBS) suplementado con 2% de suero fetal bovino. Después de esto, se realizó la permeabilización de las células con Metanol al 70% Buffer Perm/Buffer II de BD, por 20 minutos a 4 °C. Transcurridos los 20 minutos se realizaron lavados con PBS+SFB y se realizó la tinción correspondiente con los anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de ERK y AKT. Debido a que estos anticuerpos no están conjugados a ningún fluorocromo fue necesario realizar el bloqueo de los

receptores Fc (CD16/32) en las distintas clonas. Para esto se utilizó un anticuerpo comercial, conocido como Fc Block. Adicionalmente, posterior a la tinción contra pErk o pAKT se utilizó un anticuerpo secundario dirigido contra la fracción Fc del anticuerpo primario (α -rabbit), acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488. Al finalizar la tinción se realizó la detección de los niveles de estas proteínas por medio de citometría de flujo.

CARACTERIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS TIMOCITOS DE LOS RATONES CD5-CK2 Δ BD

Para determinar si la ausencia del dominio de unión a CK2, localizado dentro de la región intracelular de CD5, afecta el desarrollo de los linfocitos T, se realizó la extracción de los timocitos de estos ratones y se compararon con los timocitos de los ratones WT. Para este fin se utilizaron ratones con TCR policlonales o ratones que expresan un TCR que reconoce exclusivamente al péptido OVA en un contexto de MHC Clase II (Ratones OTII).

Primero, se realizó una extracción quirúrgica del timo, en ratones recientemente sacrificados con dislocación cervical. El timo es un órgano que se encuentra ubicado en la parte antero-superior del corazón por lo que la extracción de este órgano se realizó a través de una incisión en la cavidad torácica. Una vez obtenidos los órganos fueron colocados en Medio IMDM con 10% de SFB y macerados para permitir la separación del estroma tímico y del componente celular no estromal.

Los extractos celulares obtenidos de los timos de cada ratón (WT vs CD5-CK2 Δ BD o WT OTII vs CD5-CK2 Δ BD OTII) se lavaron 2 veces con medio IMDM con 10% SFB. Una vez realizado el conteo celular de cada timo por medio de exclusión con azul de tripano, se colocaron 3×10^6 células en placas de 96 pozos con fondo en U. Estas células se tiñeron con los siguientes marcadores con la finalidad de realizar una caracterización de las diversas subpoblaciones tímicas: 1) CD4 Pacific Blue, 2) CD8 BV 650; 3) CD44 FITC; 4) CD25 PerCP Cy5.5; 5) CD62L

BV 605; 6) CD69 PE; 7) CD5 PE-Cy7; 8) Cadena V alpha 2 del TCR AF647; 9) Cadena beta del TCR. AF 647; 10) Exclusión de vivas muertas (Live/Dead Infrared Staining) Near InfraRed

La tinción se realizó en buffer PBS + SFB 2% durante 20 minutos, tras lo cual las células se fijaron con 200 uL de Paraformaldehído al 4% y capturaron en un citómetro LSR II que permite detectar hasta 18 fluorocromos de manera simultánea.

CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS NATURALES EN LOS RATONES WT vs CD5-CK2 Δ BD

La cuantificación de células T reguladoras se realizó a partir de los timocitos extraídos de los ratones WT y CD5-CK2 Δ BD, utilizando el procedimiento antes mencionado. Para esto, se utilizó el protocolo publicado por eBioscience previamente, el cual involucra la permeabilización celular y nuclear de los timocitos con la finalidad de determinar los niveles de FoxP3 intranuclear. A partir de los números totales de las células obtenidas de timo y la determinación de los porcentajes de células positivas para FoxP3+ dentro de las regiones CD4+ o CD4+CD25+ se obtuvieron los números totales de células T reguladores naturales en los ratones antes mencionados.

DETERMINACIÓN DE MUERTE BASAL Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AICD) EN TIMOCITOS DE RATONES WT VS CD5-CK2 Δ BD

Para determinar los niveles de apoptosis en los timocitos de los ratones WT vs CD5-CK2 Δ BD, se realizó, como se describió previamente, la extracción de los timocitos de ambos ratones (Ratones con TCR policlonal únicamente).

Una vez extraídos, los timocitos se colocaron en placas de 96 pozos fondo plano, y se cultivaron por 24 h sin estímulo, o en presencia de α -CD3 (0.1, 1 y 5 μ g/mL) +/- α -CD5 (5 μ g/mL) en una concentración de 100×10^3 células en 200 μ L de IMDM Complementado con el estímulo.

Transcurridas las 24 horas, se realizó una tinción con Anexina V y 7-AAD para detectar la cantidad de apoptosis en los cultivos. La tinción se realizó en Annexin Binding Buffer (con Ca²⁺), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

De manera adicional, y simultánea al marcaje con Annexin V y 7-AAD, se realizó el marcaje de los timocitos con anticuerpos dirigidos contra CD4 y CD8, para poder realizar la determinación de los niveles de muerte basal y muerte inducida por activación (AICD) en las diversas subpoblaciones tímicas.

Una vez concluida la tinción, se realizó la captura de las muestras por medio de citometría de flujo, en un periodo no mayor a 2 horas.

ESTIMULACIÓN IN VIVO CON pOVA: DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (AICD) *in vivo* Y DE DIVERSAS PROTEÍNAS INTRACELULARES. ANALISIS POR SUBPOBLACIONES TÍMICAS.

Con la finalidad de realizar la comparación de los niveles de muerte y de la activación de las diferentes proteínas intracelulares, entre los ratones silvestres (WT) y los deficientes del dominio de unión a CK2, se realizó una inyección con el péptido OVA de manera intraperitoneal.

De manera general, se realizó la inyección de 300 µg de péptido OVA disuelto en PBS por vía intraperitoneal (ip) en un volumen de 100 µL; como control se realizó la inyección de 150 µL de PBS. Después de 24 horas, los ratones WT OTII y CD5-CK2ΔBD OTII se sacrificaron y el timo fue extraído y procesado como se mencionó anteriormente.

Para determinar los niveles de muerte celular inducida por activación (AICD), se utilizó un anticuerpo dirigido contra Caspasa 3. Para evitar fluctuaciones en los resultados debidas al procesamiento de muestra, los timocitos se colocaron inmediatamente en placas de 96 pozos fondo en U (3 x 10⁶ células) y se fijaron con 100 µL de paraformaldehído 0.4% por 7 minutos a temperatura ambiente. Concluidos los 7 minutos, las células se lavaron 2 veces con PBS + 2% SFB y se tiñeron con Live/Dead Near InfraRed Zombie Dye, diluido en PBS por 20 minutos. Al finalizar los 20 minutos de tinción, se realizaron 2 lavados con PBS + 2% SFB y

se realizó una segunda incubación con paraformaldehído (4%) por 7 min a TA. Después de la incubación se realizaron 2 lavados y se procedió a permeabilizar las células con 100 μ L de metanol al 70% diluido en PBS por 15 minutos a 4 C. AL concluir los 15 minutos, se realizaron 2 lavados y se procedió a realizar la tinción con los anticuerpos α -CD4 (Pacific Blue), α -CD8 (AF647) y α -Caspasa 3 por 1 hr a 4 C, Finalizados los 60 minutos, se realizaron 2 lavados y se procedió a incubar a las células con un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 488 por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se realizaron 2 lavados finales y las células se adquirieron en el citometro LSR II.

Para la determinación de pERK, pAKT y pCDC37 se realizó el mismo protocolo; el único cambio en cada tinción fue la utilización de los diferentes anticuerpos primarios antes mencionados.

INYECCIÓN DE α -CD3 EN RATONES ADULTOS Y NEONATOS: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES Y MARCADORES DE MUERTE.

Para determinar el efecto de la activación del TCR en un ambiente policlonal, se inyectaron 20 μ g de α -CD3 en 25 μ L de PBS (neonatos de 0 a 24h de nacimiento) y 150 μ L (adultos). Con la finalidad de determinar si el efecto de la activación de los timocitos se presenta antes de las 24h, se realizó el sacrificio de los ratones adultos a las 12h y 3h. Los ratones neonatos se sacrificaron después de 24h.

El protocolo para realizar la tinción de las diversas proteínas fue el mismo que en el inciso anterior. Las fosfoproteínas determinadas fueron pZAP70, pERK, pJNK, Bcl-2 y pP38.

Adicionalmente, para determinar si la muerte observada correlaciona con algún incremento en receptores de muerte, específicamente FasL/Fas, se realizó

una tinción para estos marcadores en conjunto con los marcadores antes mencionados para la caracterización tímica por subpoblaciones.

MOBILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN SUBPOBLACIONES TÍMICAS

Se realizaron ensayos de estimulación con α -CD3 (1 o 5 μ g/mL) en timocitos de ratones silvestres WT y CD5-CK2 Δ BD, previamente “cargados/teñidos” con el fluorocromo Fluo-4. Este fluorocromo incrementa de manera proporcional su intensidad media de fluorescencia al unirse a Ca^{2+} , al ser excitado por un laser de 488nm. Interesantemente, este fluorocromo disminuye su intensidad media de fluorescencia al unirse a Ca^{2+} al ser excitado por un laser Violeta 405 nm. Aprovechando esta propiedad conocida como “ratiometric measurment” pudimos determinar los niveles relativos de calcio en subpoblaciones tímicas al teñir con CD4 Pacific Blue, y CD8 Alexa 647.

De manera breve, las células se tiñeron por media hora a 4 C con los anticuerpos dirigidos contra CD4 y CD8 y se lavaron con HBSS + Ca^{2+} / Mg^{2+} . Al finalizar la tinción, se procedió a cargar las células por 1hr con Fluo-4 a 4C perfectamente cubiertos de la entrada de luz. Una vez concluido el proceso, los timocitos se lavaron 2 veces y se resuspendieron en 1 mL de HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Para realizar la estimulación, el tubo con los timocitos se colocó en un recirculador de agua para mantener a 37 °C el tubo. Los estímulos fueron añadidos directamente al tubo a la concentración adecuada y las muestras fueron adquiridas por hasta 600 segundos. Transcurridos 480 segundos se añadió 10 nM de Ionomicina a cada tubo, como control positivo para determinar la capacidad de respuesta de estas células, así como la capacidad de detección de los reactivos. Para evitar contaminación con Ionomicina, se lavó el citómetro por 10 minutos con agua entre cada muestra.

DETERMINACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN NUCLEAR DE PERK POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO ACOPLADA A IMÁGENES

Con la finalidad de determinar la sub-localización celular de la fosfoproteína pERK, se realizaron ensayos de citometría de flujo acoplada a imágenes utilizando el equipo AMNIS IMAGESTREAM MARK II.

De manera general, se siguió el mismo protocolo que para la determinación intracelular de proteínas tanto en ratones WT vs CD5-CK2 Δ BD como en ratones WT OTII vs CD5-CK2 Δ BD OTII. La única modificación, fue la adición del compuesto Hoechst 33342 durante la tinción con la mezcla de anticuerpos primarios, con la finalidad de determinar la localización nuclear.

Debido a la capacidad de obtener fotografías de cada célula durante la adquisición de las muestras, el análisis permite identificar con facilidad diferencias sutiles entre los niveles de pERK tanto nuclear como citoplasmático. Para realizar el análisis de estos datos se utilizó el software IDEAS de AMNIS, en el cual se crearon regiones o “máscaras/masks” personalizadas para obtener la relación de pERK citoplasmico vs Nuclear dentro de las subpoblaciones tímicas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se analizaron con una prueba paramétrica, t de student. Los resultados se representan como promedio \pm SEM. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$.

RESULTADOS

EXPERIMENTOS IN VITRO

PAPEL DE LAS TIROSINAS 429, 441 Y 463 DE CD5 EN LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE LINFOCITOS T

Generación y mantenimiento de las clonas mutantes de CD5h

Para poder evaluar el rol de los residuos de tirosina de la región citoplasmática de CD5 se utilizaron diferentes construcciones generadas por el Dr. Francisco Lozano en el Hospital Clinic en Barcelona. El DNA que codifica para estas mutantes fue transfectado utilizando el procedimiento mencionado en la sección de Materiales y Métodos (Figura 9). La expresión de CD5h, CD3m, y CD5m en las diferentes líneas celulares fue determinada por medio de tinción por citometría de flujo con anticuerpos específicos contra estas proteínas. Debido a que CD5m se encuentra constitutivamente expresado en esta línea celular, es necesario que la expresión en las clonas finales sea la misma entre todas las mutantes para de esta forma evitar que la variante murina de CD5 afecte los resultados obtenidos. Adicionalmente, estudios previos por nuestro laboratorio han demostrado que la utilización de anticuerpos específicos contra CD5m o CD5h permite activar de manera diferencial las vías de señalización involucradas en la biología de estos receptores.

a la deficiencia total de CD5. La expresión de CD5h en las diferentes mutantes se presenta a continuación (Figura 10). Como se puede observar en la figura, los niveles de CD5 humano son muy similares entre las distintas células obtenidas, por lo que estas clonas se utilizaron para realizar los experimentos posteriores.

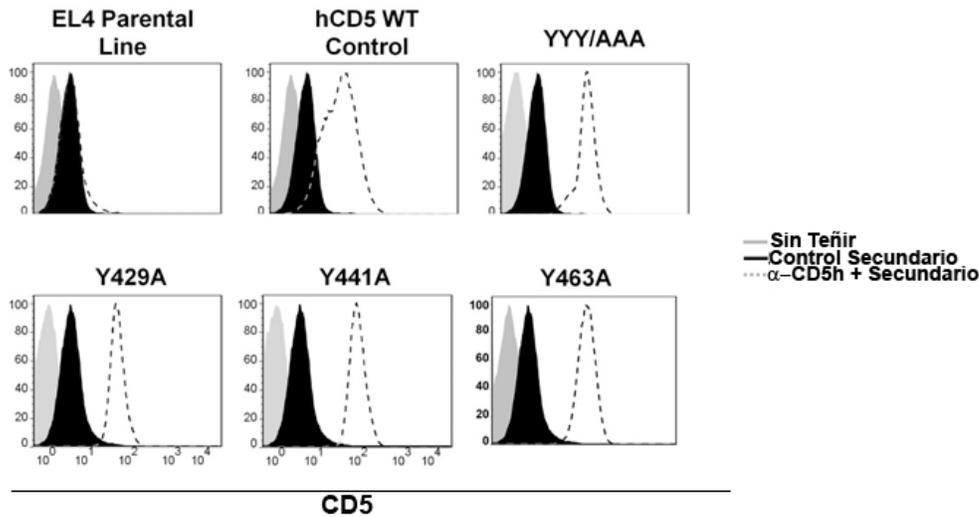


Figura 10. Expresión final de CD5h en las clonas utilizadas para experimentación. Se muestra la expresión en superficie de las diferentes mutantes de CD5h en la línea celular EL4. Así como el control de anticuerpo secundario utilizado para detectar CD5h en estas células.

Adicionalmente, se determinó en las clonas finales la expresión de CD5m y CD3m, la cual se muestra a continuación Figura 11. La expresión es similar en todas las líneas y muy similar a la línea EL4 parental lo cual es importante para poder realizar los diferentes experimentos de estimulación con α -CD3

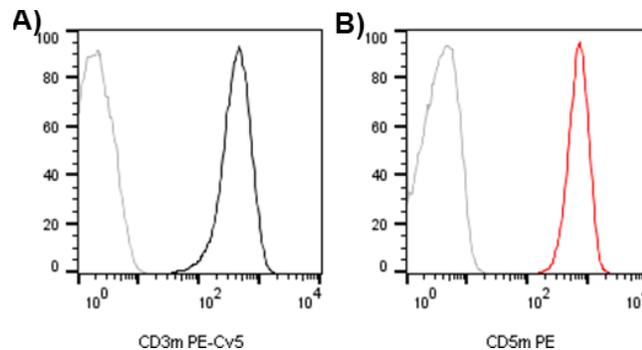


Figura 11. Expresión de CD3m y CD5h en la línea parental EL4. (A) Expresión de CD3murino en la línea celular EL4 utilizada para transfectar las diferentes mutantes. (B) Expresión de CD5murino.

A lo largo del desarrollo de esta tesis, se realizaron determinaciones constantes de los niveles de CD5h, CD3m y CD5m en las diferentes clonas con la finalidad de monitorear los niveles de expresión de estas proteínas para poder realizar los experimentos de manera adecuada. Es importante señalar que debido a que las únicas diferencias entre las diversas mutantes son a nivel de DNA (cambio de un nucleótido) y que aún de esta forma es imposible distinguir las una de otra debido a la presencia en el DNA de la variante murina de CD5, el cuidado de estas clonas fue muy riguroso para evitar contaminación entre ellas. Para esto se evitó siempre el tratamiento simultáneo de las diversas clonas y todo el material (medios, pipetas, etc) se mantuvo perfectamente sellado durante la manipulación de estas líneas celulares.

Determinación de Apoptosis en las clonas con expresión de mutantes de CD5h

Una vez obtenidas las diferentes clonas que expresan las diferentes variantes de CD5h se procedió a realizar los ensayos de determinación de apoptosis. Para realizar esto se realizaron estimulaciones con α -CD3 y α -CD28, como se menciona en la sección de materiales y métodos

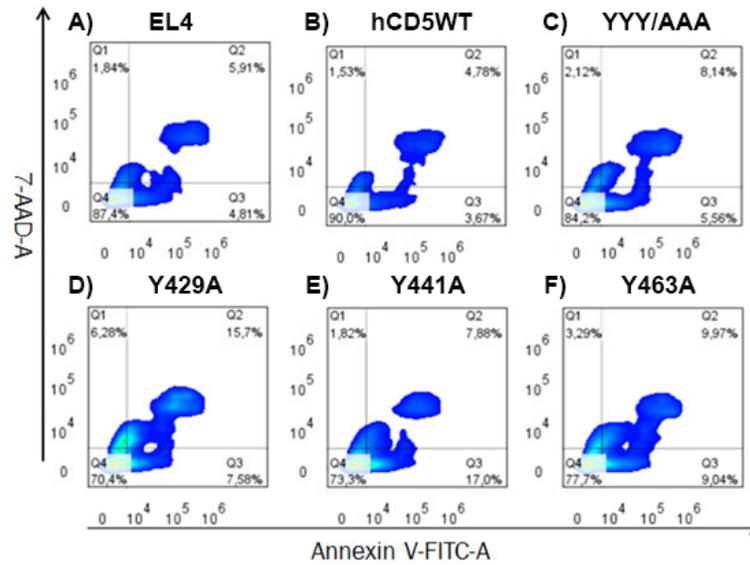


Figura 12. Muerte Basal (Sin estímulo) en las diferentes clonas (A) La línea EL4 fue cultivada 24h en medio con 10% SFB sin estímulo. Al término, se realizó una tinción con Anexina V y 7-AAD para determinar los niveles de muerte. **(B)** Tinción en la clona hCD5WT **(C)** Tinción en la clona YYY/AAA **(D)** Tinción en la clona Y429A **(E)** Tinción en la clona Y441A **(F)** Tinción en la clona Y463A.

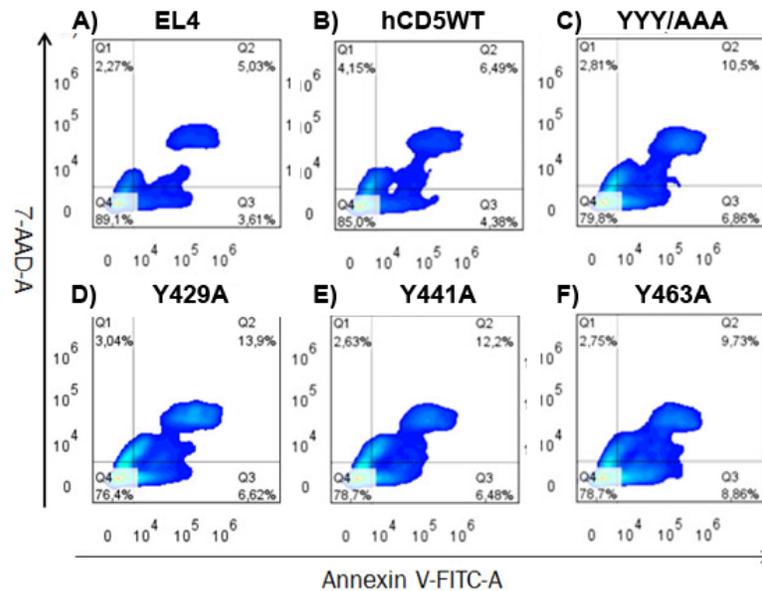


Figura 13. Muerte tras activación (α -CD3) en las mutantes (A) La línea EL4 fue cultivada 24h en medio con 10% SFB con α -CD3 (10 μ g/mL). Al término, se realizó una tinción con Anexina V y 7-AAD para determinar los niveles de muerte **(B)** Tinción en la clona hCD5WT **(C)** Tinción en la clona YYY/AAA **(D)** Tinción en la clona Y429A **(E)** Tinción en la clona Y441A **(F)** Tinción en la clona Y463A.

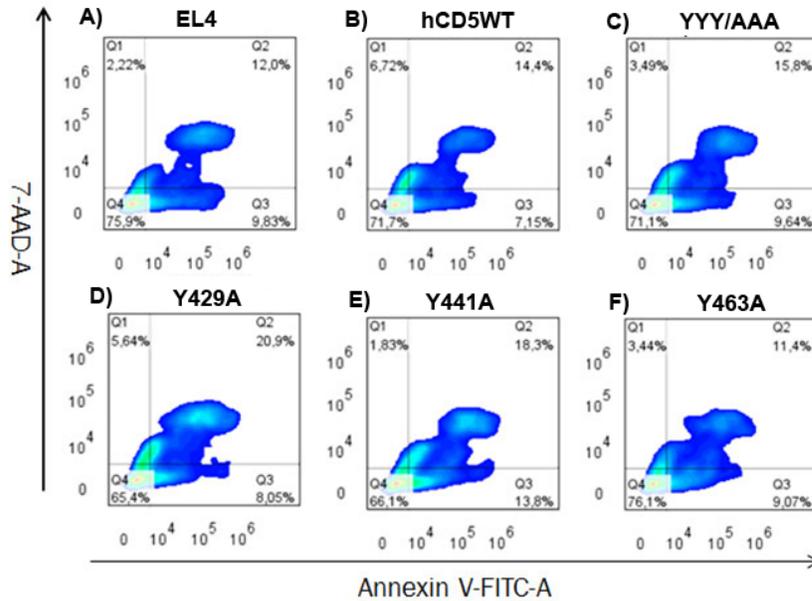


Figura 14. Muerte tras activación con α -CD3+ α -CD28 en las clones mutantes. (A) La línea EL4 fue cultivada 24h en medio con 10% SFB con α -CD3 + α -CD28 (10 μ g/mL + 10 μ g/mL). Al término, se realizó una tinción con Anexina V y 7-AAD para determinar los niveles de muerte **(B)** Tinción en la clona hCD5WT **(C)** Tinción en la clona YYY/AAA **(D)** Tinción en la clona Y429A **(E)** Tinción en la clona Y429A **(F)** Tinción en la clona Y463A.

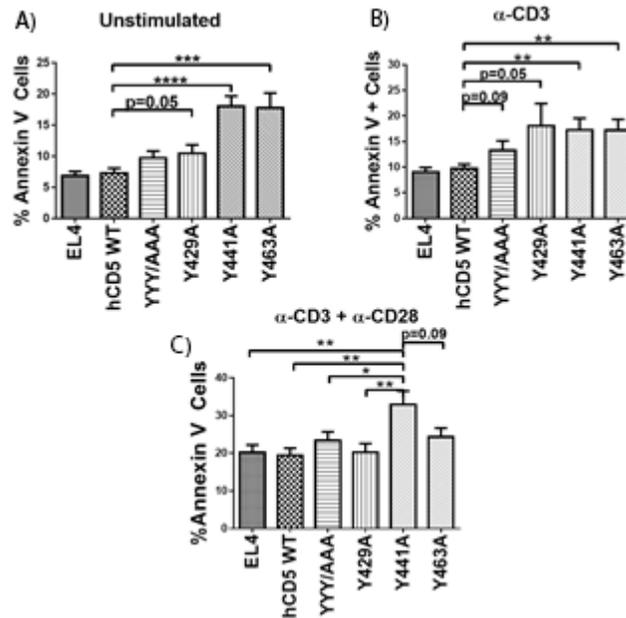


Figura 15. Los residuos Y429, Y441 y Y463 promueven la supervivencia de los timocitos. (A) Niveles de apoptosis medidos por Annexin V en las diferentes líneas sin estímulo **(B)** Células Anexina V+ tras estimulación con α -CD3 (10 μ g/mL) por 24h. **(C)** Células Anexinca V+ tras estimulación con α -CD3+ α -CD28 (10 μ g/mL + 10 μ g/mL) por 24h. (n=4) * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

Como se puede observar en las figuras 12-15, la ausencia de cualquiera de los residuos de tirosina afecta la supervivencia de los linfocitos T. Sin embargo, debido a que aún basalmente se presentan grandes niveles de apoptosis en las diferentes mutantes de CD5h, se decidió hacer una representación gráfica en la cual se ponen lado a lado los niveles de muerte basal y AICD con α -CD3/ α -CD3 + α -CD28 para de esta forma determinar si las células están activándose de manera distinta y esto afecta sus niveles de apoptosis.

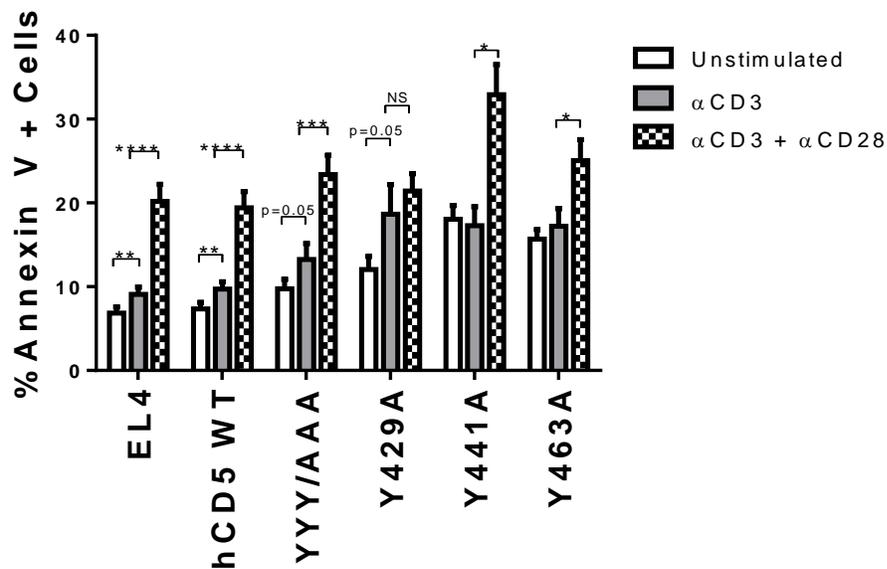


Figura 16. Resumen de los Niveles de Muerte en las diferentes clonas de CD5h. Comparativa de los niveles basales de muerte vs estimulación con α -CD3 vs α -CD3 + α -CD28. Resumen de la figura 15. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Como se puede observar en las figuras 15 y 16, los niveles de muerte en la línea EL4 y CD5hWT se incrementan tras la activación AICD. Así mismo, al comparar los niveles de AICD tras la activación con α -CD3 y α -CD28 se puede observar que, de las mutantes, solo la Y429A presenta mayores niveles de muerte comparado contra el basal (Incremento de casi del 10%), y además el estimular esta clona solo con α -CD3 le permite alcanzar el nivel de AICD observado con α -CD3 + α -CD28. Adicionalmente, se puede observar que la mutante 441 presenta los mayores niveles de muerte tras la activación con α -CD3 + α -CD28.

Estudios previos publicados por nuestro laboratorio han mostrado que los niveles de muerte detectados por Annexin V/7-AAD correlacionan con los niveles de activación de Caspasa 3 [100]. Para determinar si este efecto se observa en las mutantes puntuales de CD5h, se realizó el mismo protocolo de estimulación que para la determinación por Annexin V/7-AAD; sin embargo, la diferencia fue que se utilizó el protocolo de tinción con el anticuerpo específico contra la forma activa de Caspasa 3. Los resultados se presentan a continuación.

Como se puede observar en la figura 17, no existen grandes diferencias entre los niveles de activación de caspasa 3 en las diferentes clonas. Únicamente se observa un incremento en los niveles de Caspasa 3 Activa de forma basal en las clonas YYY y Y463A (Figura 17^a). Adicionalmente, se observa un incremento en la AICD con α -CD3 en la clona solo en la clona YYY (Figura 17B), lo que sugiere que la eliminación de las 3 tirosinas es requerida para inducir la activación de caspasa 3. Esta observación coincide con lo observado previamente en los ratones deficientes de CD5, en los cuales la ausencia de CD5 si muestra una correlación entre anexina V y caspasa.

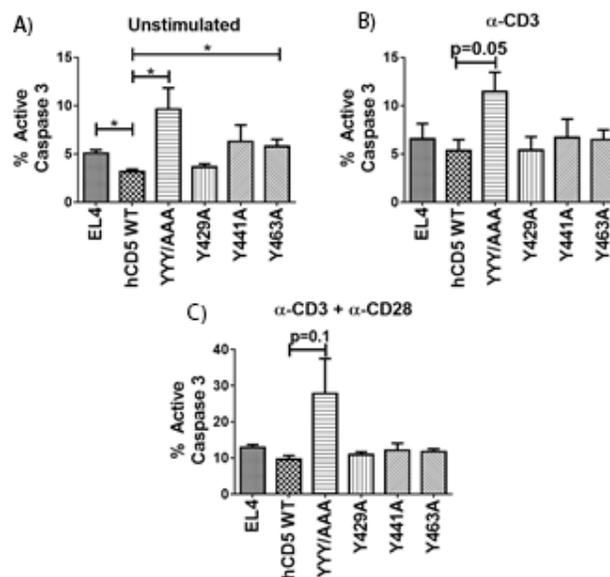


Figura 17. Eliminación simultánea de Y429, Y441 y Y463 resulta en un incremento en la activación de Caspasa 3. (A) Porcentaje de células con Caspasa 3 Activa en las clonas sin estimular (B) Porcentaje de células con Caspasa 3 Activa tras 24h de estímulo con 10 μ g/mL de α -

CD3 (C) Porcentaje de células con Caspasa 3 Activa tras 24h de estímulo con 10 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de $\alpha\text{-CD3}$ + $\alpha\text{-CD28}$. (n=3) * $p < 0.05$

En conjunto, nuestros datos muestran que la muerte determinada por anexina V, no correlaciona con la activación de caspasa 3, lo que podría sugerir mecanismos alternativos de muerte, como podrían ser la activación de otras caspasas ejecutoras como caspasa 6 o 7.

Determinación de la fosforilación de AKT y ERK en las distintas clonas

Debido a que se observó una mayor muerte celular inducida por activación en la clona Y429A y que previamente se ha descrito que este residuo está encargado de la regulación negativa de las vías de señalización del BCR [86]. Se decidió determinar si las señales transducidas a través del TCR se encuentran incrementadas en alguna clona (en particular la 429) y si esto podría explicar los niveles de muerte encontrados. Adicionalmente debido a que existen evidencias de que existen residuos (Y463) que podrían regular la supervivencia de los Linfocitos T a través de un mecanismo independiente de las señales del TCR y dependiente de AKT, se decidió determinar en las clonas cuales son los niveles intracelulares de la forma fosforilada de ERK y AKT. Para realizar esto se estimularon las clonas de manera aguda con $\alpha\text{-CD3}$ +/- $\alpha\text{-CD28}$ como se describe en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura 18, los niveles de pERK son idénticos de manera basal y con $\alpha\text{-CD3}$ + $\alpha\text{-CD28}$ (Figura 18B y 18D); sin embargo, los niveles de pERK son significativamente más elevados en la clona Y429A (incremento del 50%) tras la activación con $\alpha\text{-CD3}$ (Figura 18C). Estos resultados son consistentes con los elevados niveles de apoptosis de esta clona con la activación del TCR. Para determinar si la activación del TCR medida por pERK es tan elevada como con $\alpha\text{-CD3}$ + $\alpha\text{-CD28}$ (similar al patrón de muerte por AICD), se realizó una comparativa en la cual se colocó lado a lado el basal vs $\alpha\text{-CD3}$ vs $\alpha\text{-CD3}$ + $\alpha\text{-CD28}$.

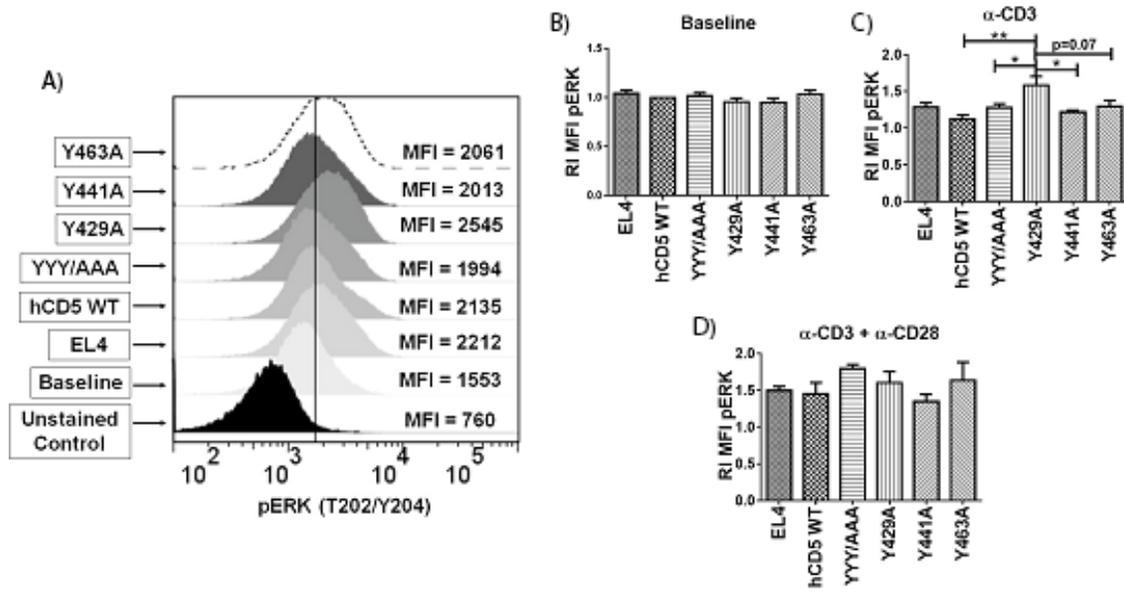


Figura 18. La ausencia de la tirosina 429 resulta en un incremento en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por el TCR (A) Histogramas representativos que muestran los niveles de pERK 1/2 en las diferentes mutantes de CD5h. (B) Niveles relativos de pERK en las diferentes clonas sin estímulo. (C) Niveles relativos de pERK 1/2 en las diferentes clonas después de 5 minutos de estimulación con 10 μ g/mL de α -CD3. (D) Niveles relativos de pERK en las diferentes clonas después de 5 minutos de estimulación con 10 μ g/mL de α -CD3 + α -CD28. (n=4) * p <0.05, ** p <0.01

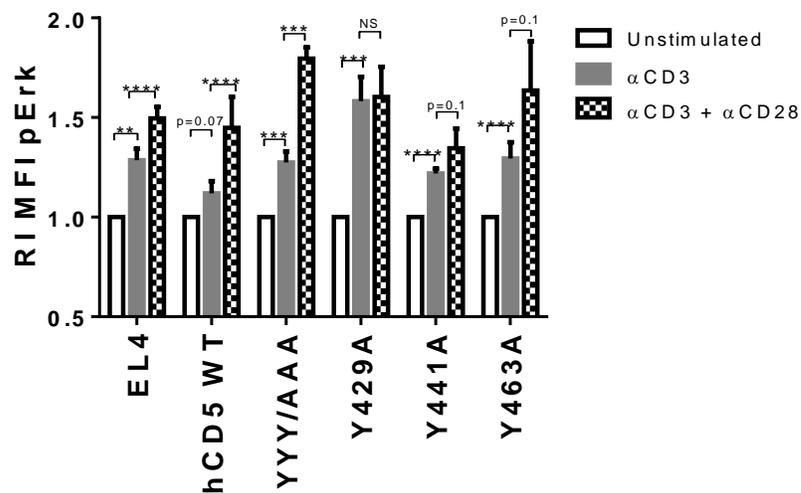


Figura 19. Resumen de los Niveles de pERK 1/2 en las diferentes clonas de CD5h. Comparativa de los niveles basales de pERK vs estimulación con α -CD3 vs α -CD3 + α -CD28. Resumen de la figura 18. * p <0.05, ** p <0.01, * p <0.001, **** p <0.0001.**

En la figura 19 se muestra que la fosforilación de ERK tiene un patrón muy similar a la muerte celular inducida por activación. Mostrando que el residuo 429 es

importante para regular la supervivencia de los linfocitos T a través de un mecanismo dependiente del TCR. De manera interesante Y441A no presenta diferencias significativas en la activación de ERK, lo que sugiere un mecanismo independiente de AICD a las señales del TCR.

Para determinar si existe algún mecanismo dependiente de pAKT que este regulando la supervivencia de los timocitos, se realizó el análisis de la fosforilación del residuo S473 de AKT [99]. Los resultados se presentan a continuación.

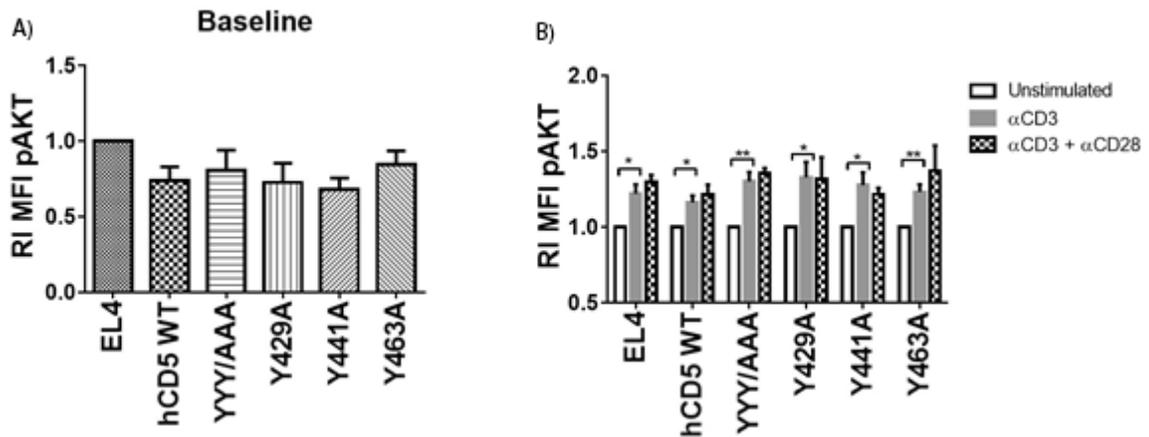


Figura 20. La ausencia de las tirosinas Y429, YY41 ó Y463 no afecta los niveles de fosforilación de AKT. (A) Niveles basales de pAKT (S473) en las diferentes mutantes de CD5h (B) Comparativa de los niveles basales de pAKT vs α -CD3 vs α -CD3 + α -CD28 en las diferentes mutantes de CD5h. * $p < 0.05$

Como se puede observar en la figura 20, no existen diferencias en la fosforilación de pAKT entre ninguna de las clonas, sugiriendo que los residuos de tirosina de la región citoplasmática de CD5 no son los más relevantes para la activación directa de pAKT en la línea celular EL4, aunque es importante mencionar que existen otros residuos dentro de AKT importantes para su actividad como pueden ser la T308 y la S129, fosforilados por mTOR y CK2 respectivamente.

En conjunto, los resultados in vitro sugieren que el residuo Y429 es importante para la supervivencia de los linfocitos T y que la supervivencia de los linfocitos T en respuesta al TCR parece depender de la intensidad de las señales a través de este receptor, por lo que al menos la supervivencia de los linfocitos T mediada por el residuo Y429 de CD5 es dependiente de las señales del TCR.

EXPERIMENTOS IN VIVO

PAPEL DE LAS SERINAS S458-461 (CK2 BINDING DOMAIN) EN EL DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DE LOS LINFOCITOS T

Generación y genotipificación de ratones CD5-CK2 Δ BD.

Para determinar cuál es el papel del dominio de unión a CK2 en el desarrollo y supervivencia de los linfocitos T, se utilizó un modelo murino generado en The University of Alabama at Birmingham por el Dr. Chander Raman, en el cual CD5 se expresa y regula de manera fisiológica; sin embargo, las Serinas 458-461 no se encuentran presentes en la región carboxi terminal de este receptor, por lo que la unión de la proteína CK2 a CD5 no ocurre. Este modelo ya ha sido publicado previamente por nuestro grupo de trabajo [96, 97].

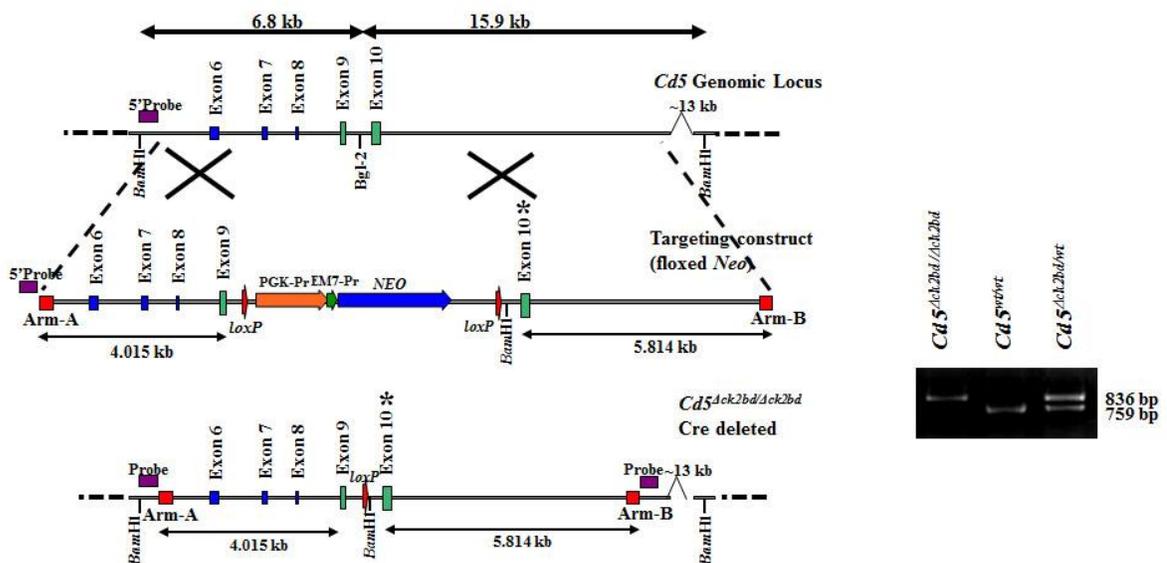


Figura 21. Estrategia experimental utilizada para la generación de los ratones deficientes del dominio de unión a CK2. La identificación de los ratones se realizó por PCR convencional. Como se observa, los ratones WT muestran una banda de menor tamaño que la de los ratones transgénicos ya que los ratones transgénicos contienen un sitio *LoxP* adicional en el sitio de amplificación. Tomada de Sestero et al., *Journal of Immunology* 2012

Como se puede observar en la figura 21, por medio de esta técnica se obtienen ratones que expresan CD5 con la eliminación del dominio de unión a CK2. Adicionalmente, por medio de la presencia del sitio de recombinación *LoxP* se

diseñaron primers que permiten identificar los ratones CD5 WT de los ratones deficientes del dominio de unión a CK2. Para asegurarnos que CD5 se exprese de la misma forma que el CD5 endógeno realizamos una tinción de citometría de flujo en las diversas subpoblaciones de Linfocitos T. Adicionalmente, debido a que los ratones CD5 WT y CD5-CK2 Δ BD se cruzaron con ratones OTII (TCR específico para péptido de OVA presentado por MHC II), se realizó la determinación de la cadena Va2 del TCR la cual es específica para el TCR OTII [101].

Análisis de las subpoblaciones tímicas en los ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD

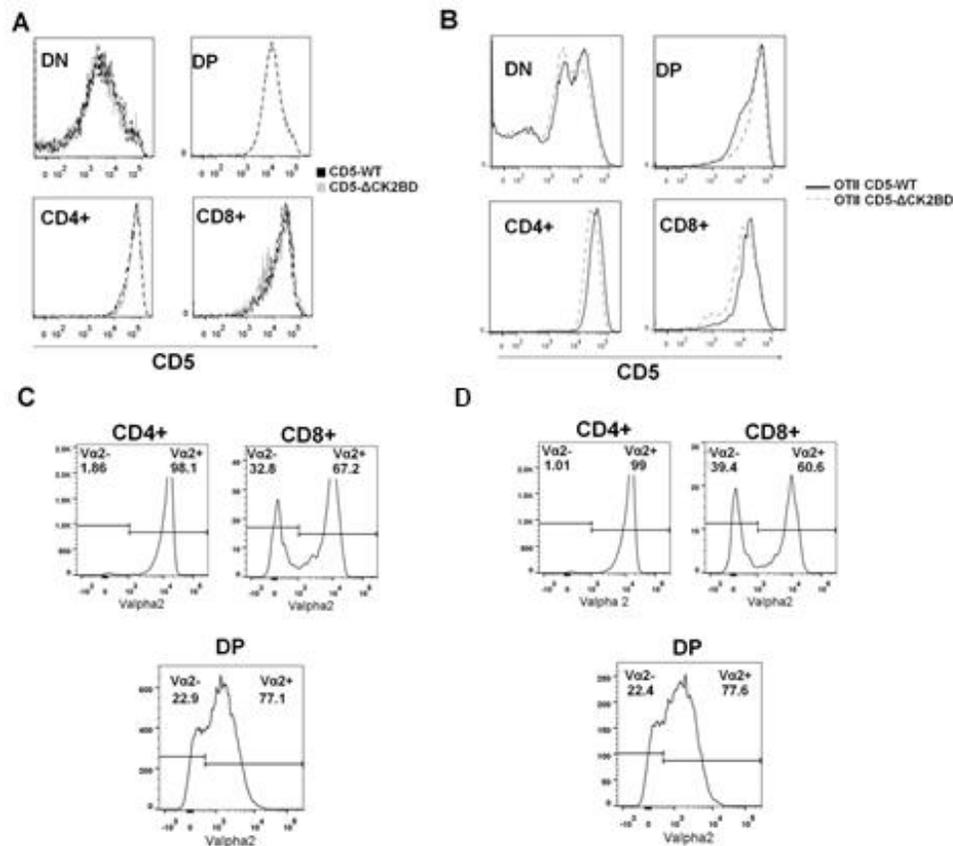


Figura 22. La eliminación del dominio de unión a CK2 de CD5 no afecta la expresión en superficie de CD5, así como los niveles de Va2 en los ratones OTII. (A) Expresión de CD5m en la superficie de los timocitos obtenidos de ratones Silvestres (WT) vs Transgénicos (CD5- Δ CK2BD) (B) Expresión de CD5m en la superficie de los timocitos obtenidos de ratones OTII WT vs OTII CD5- Δ CK2BD. (C) Expresión de la cadena Va2 del TCR en las subpoblaciones tímicas de ratones OTII WT (D) OTII CD5- Δ CK2BD

En la figura 22 se muestra que los niveles de CD5m son muy similares en ambos ratones, lo cual demuestra que CD5 se regula de la misma forma en un ratón WT y un ratón CD5-CK2 Δ BD. Adicionalmente, se puede observar que la mayoría de las células CD4⁺ expresan el TCR transgénico en los ratones OTII. Es importante señalar que los ratones CD8⁺ no expresan el 100% de este TCR ya que el proceso de selección a través del MHC II promueve la selección mayoritaria de linfocitos CD4⁺ y aquellos linfocitos CD8⁺ que sobreviven rearreglan su cadena α del TCR para expresar una distinta, la cual sea funcional.

Una vez que se determinó que CD5 se regula de la misma forma en los ratones WT y CD5-CK2 Δ BD tanto con TCR policlonales como TCR transgénicos. Se realizó la determinación de las diferentes subpoblaciones tímicas y la relación de células CD4 vs CD8 en los timos de los ratones TCR policlonales y TCR transgénicos. Los resultados se muestran a continuación.

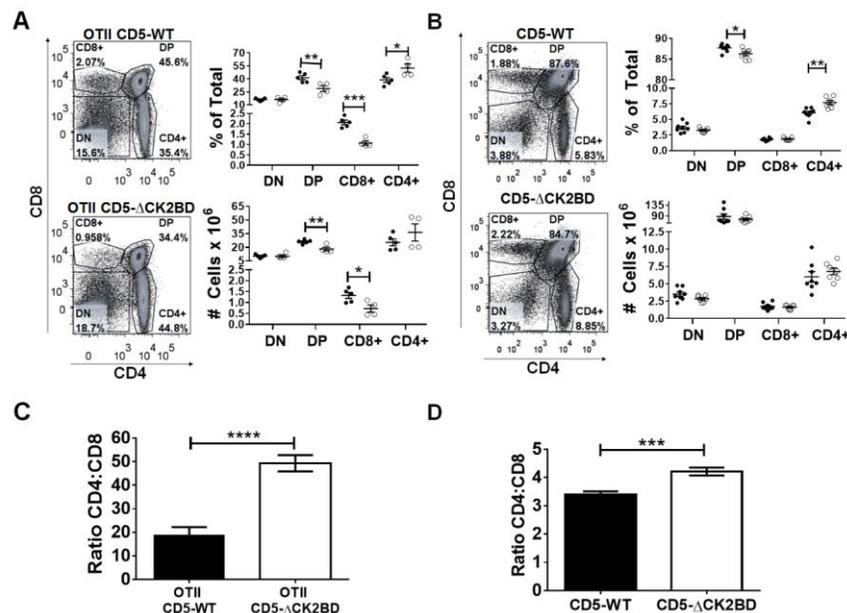


Figura 23. Disminución de timocitos DP e incremento en la generación de células CD4⁺ en ausencia del dominio de unión a CK2. (A) Caracterización de las subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺, DP y DN en los ratones OTII CD5WT vs OTII CD5- Δ CK2BD. Determinación de números totales. (B) Caracterización de las subpoblaciones tímicas en los ratones CD5WT vs CD5- Δ CK2BD. (C) Relación CD4⁺ vs CD8⁺ en ratones OTII CD5WT vs CD5- Δ CK2BD (D) Ratones CD5WT vs CD5- Δ CK2BD (n= 7) Ratones de 8-12 semanas. *p<0.05, **p<0.01, *p<0.001**

Como se puede observar en la figura 23, la ausencia del dominio de unión a CK2 genera una disminución de un 12-15% en la población de células DP y CD8+ (% y Números totales en OTII y % en TCR policlonal). Adicionalmente, la ausencia de este dominio genera un incremento del 12-14% en los porcentajes de CD4+ (OTII y Policlonal) sin afectar los números totales (Figura 23A y 23B). Finalmente, la ausencia del dominio de unión a CK2 genera un incremento en la relación CD4 vs CD8, la cual pasa de una relación 20:1 en ratones OTII CD5WT a una relación 50:1 en ratones OTII CD5- Δ CK2BD (Figura 23C), lo que sugiere que este dominio pudiera participar de manera importante en la elección de linaje de los linfocitos T.

Debido a que CD5 es una molécula cuya expresión se da desde la fase DN3 del desarrollo linfocitario, decidimos analizar si las diferentes subpoblaciones DN se encuentran afectadas en la ausencia del dominio de unión a CK2 de CD5.

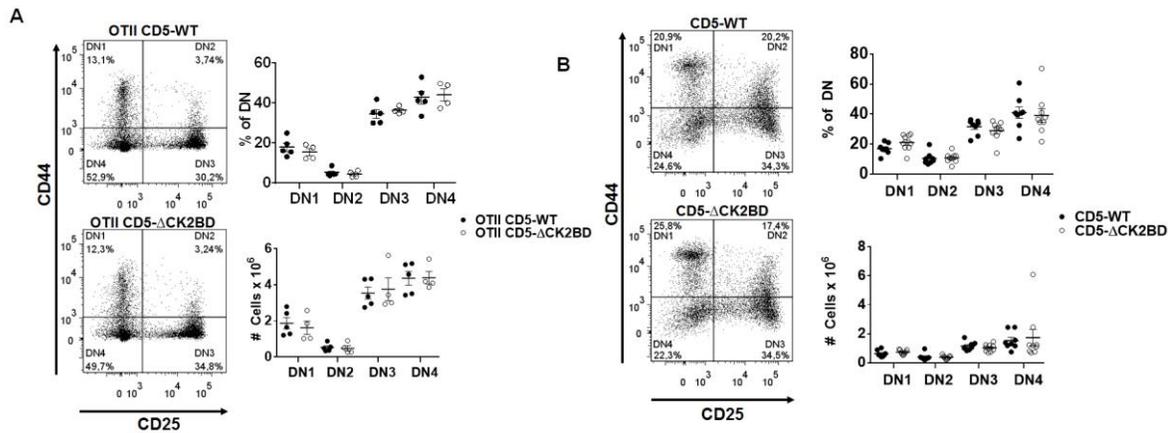


Figura 24. La ausencia del dominio de unión a CK2 no afecta el desarrollo temprano de los linfocitos T (A) Análisis de las subpoblaciones DN 1-4 en los ratones OTII CD5WT vs OTII CD5- Δ CK2BD (B) ratones CD5WT vs CD5- Δ CK2BD. (n=7) Ratones de 8-12 semanas

En la figura 24 se muestra que ninguna de las subpoblaciones DN de los linfocitos CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD no presentan diferencias significativas que se puedan explicar por la ausencia del dominio de unión a CK2.

Debido a que se encontró un incremento en CD4+ y disminución de DP en los ratones con la deficiencia del dominio de unión a CK2 se decidió analizar la

selección positiva de las células DP para determinar si esto se debía a un incremento en este proceso, lo que se reflejaría como una disminución global de las DP e incremento de las células CD4+. Adicionalmente, se realizó el análisis de las células CD4+ por subpoblaciones de células maduras e inmaduras, ya que a pesar de encontrar incrementados los porcentajes de CD4+ no se encontraron diferencias en números totales lo que sugiere una mayor muerte de estas células.

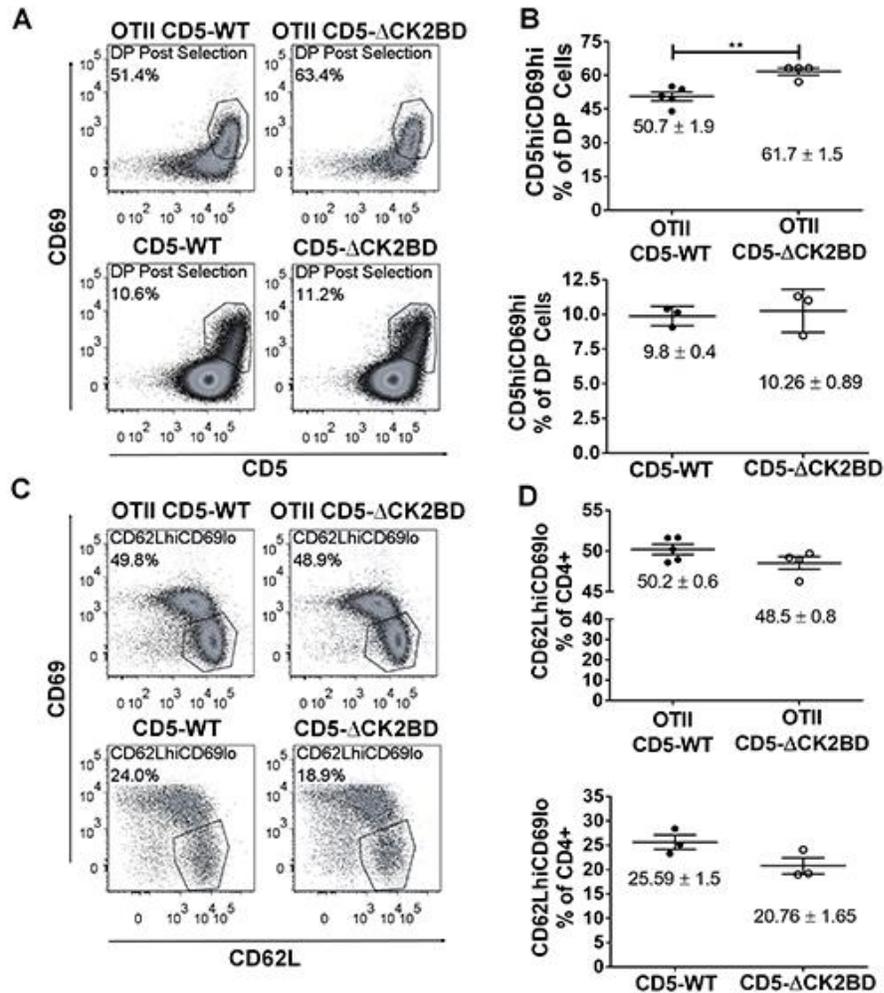


Figura 25. El dominio de unión a CK2 regula la selección positiva de los timocitos, así como la maduración de los timocitos post-selección. (A-B) Números Totales y Porcentaje de Células DP seleccionadas positivamente en ratones OTII CD5WT vs OTII CD5ΔCK2BD (C-D) Números totales y porcentajes de Linfocitos T CD4+CD62LhiCD69lo en ratones OTII CD5WT vs OTII CD5ΔCK2BD. (n=4) Ratones de 8-12 semanas. **p<0.01

En la figura 25 se observa (Panel A y B), por medio de la utilización simultánea de CD5 vs CD69, que los linfocitos DP de los ratones CD5-CK2 Δ BD progresan más fácilmente hacia células simples positivas (mayor selección positiva, incremento de 50% a 62%), lo que explica las diferencias en porcentajes entre ambos ratones. Adicionalmente, al analizar la población más madura de los linfocitos T CD4+ (Figura 25C y 25D) se observa una reducción en esta (50% a 48% y de 26×10^6 células a 20×10^6 células), lo que explica por qué a pesar de que en ausencia del dominio de unión a CK2 existen mayores porcentajes de CD4+, los números totales no se ven afectados.

Los resultados de los análisis de las subpoblaciones tímicas, en conjunto con los hallazgos previos en ratones deficientes de CD5, sugieren que la región de unión a CK2 regula negativamente las señales del TCR. Una forma de determinar qué tan altas son las señales del TCR es por medio de la generación de células T reguladoras. Hallazgos previos por nuestro grupo de trabajo demostraron que en ratones deficientes de CD5, en los cuales las señales del TCR recibidas durante el desarrollo tímico son más altas, las células T reguladoras se encuentran incrementadas.

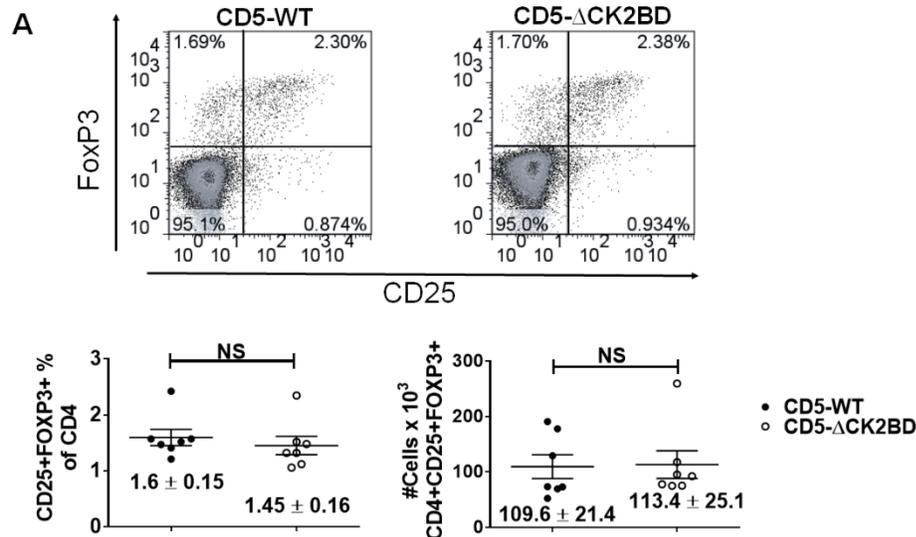


Figura 26. La ausencia del dominio de unión a CK2 no afecta la generación de células T reguladoras naturales. (A) Porcentajes y números totales de células CD4+CD25+FoxP3+ en tímicos de ratones CD5WT vs CD5 Δ CK2BD (n=7) Ratones de 8-12 semanas

De manera muy interesante, y contrario a lo esperado, nuestros hallazgos muestran que las T reguladoras naturales no se encuentran afectadas en la ausencia del dominio de unión a CK2 (Figura 26). Esto muestra que la forma en la que este dominio regula la selección tímica no es por incremento de todas las señales del TCR, como se ha observado previamente en el ratón deficiente de CD5, sino posiblemente por la regulación específica de algunos mediadores relacionados con las señales del TCR y que no se encuentren proximales al inicio de la vía de señalización del TCR.

Análisis de la supervivencia de los timocitos en los ratones CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD

Una de las formas en las que CK2 puede regular la selección tímica es a través de la modulación de la supervivencia de los linfocitos T en desarrollo. Esto es apoyado por nuestros datos que muestran que se encuentran afectadas algunas poblaciones a nivel de porcentajes más no en números totales. Adicionalmente, hemos publicado previamente que el dominio de unión a CK2 afecta la supervivencia de los linfocitos T CD4+ en periferia [96]. Para comprobar esto, realizamos la determinación in vitro e in vivo de la muerte celular de los linfocitos T en desarrollo, como se mencionó previamente en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura 27 , la ausencia del dominio de unión a CK2 afecta profundamente la supervivencia de los timocitos (incremento entre el 40% y 80% en la muerte en los ratones carentes del dominio de unión a CK2) tras la activación aguda del TCR con α -CD3 (Figura 27A) o tras la inyección con péptido OVA (Figura 27B); sin embargo, de manera interesante aún en ausencia de estimulación a través del TCR (basal), la deficiencia en el dominio de unión a CK2 afecta la supervivencia de los linfocitos T CD8+ (Figura 27^a, panel inferior), lo que podría explicar las diferencias entre la relación de linfocitos CD4+ vs CD8+ durante el desarrollo tímico (Mayor relación CD4:CD8, Figura 23C y 23D).

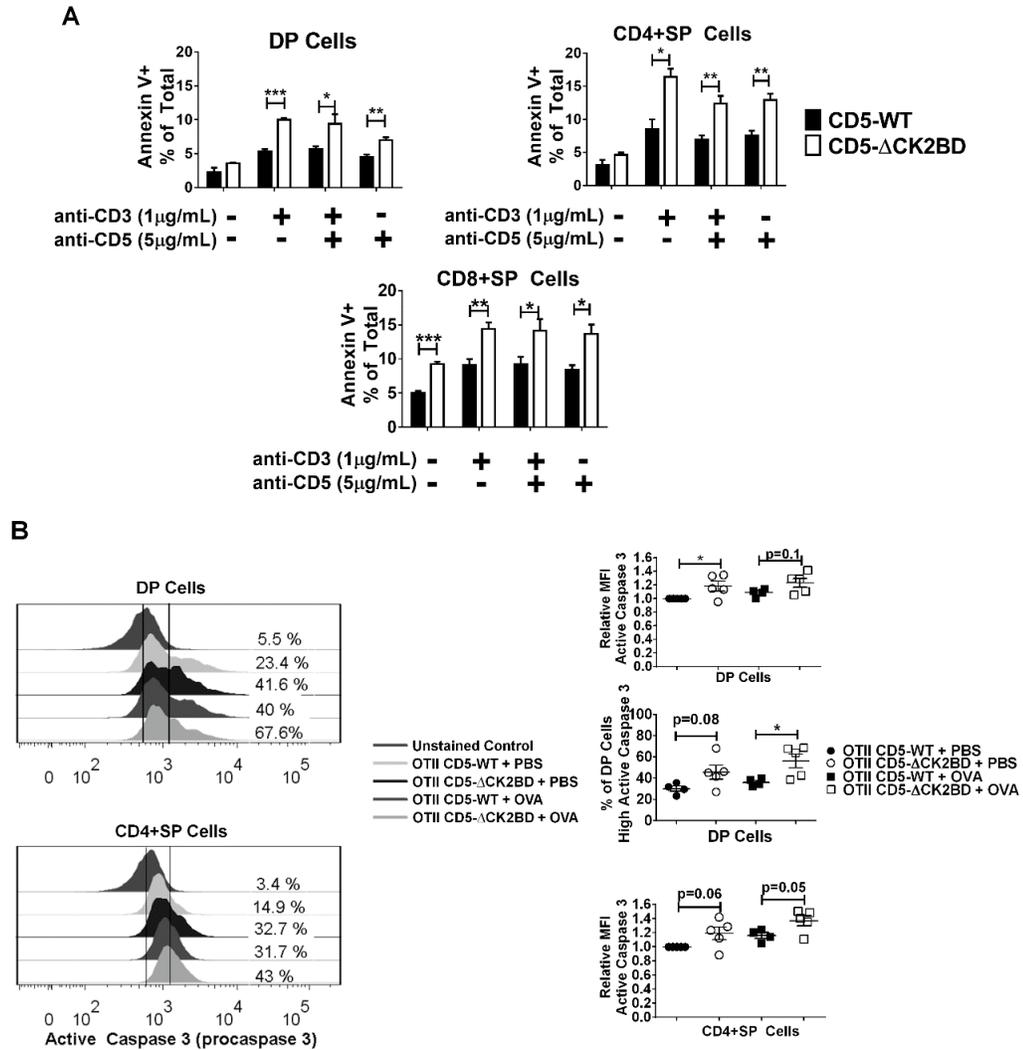


Figura 27 Los timocitos obtenidos de los ratones $CD5\Delta CK2BD$ presentan mayor muerte *in vitro* e *in vivo* (A) Análisis de la muerte basal e inducida por activación en timocitos DP, CD4+, CD8+ cultivados por 24h en presencia de α -CD3 \pm α -CD5 en IMDM con 10% SFB. (B) Análisis de la activación de caspasa 3 en los timocitos de ratones OTII CD5WT vs OTII CD5 Δ CK2BD 24h después de la inyección con PBS (control) o 300 mg de péptido OVA. (n=5) Ratones 8-12 semanas *p<0.05

Determinación de los niveles intracelulares de fosfoproteínas relevantes en las vías de señalización mediadas por el dominio de unión a CK2

CK2 es una proteína que posee más de 300 sustratos [92, 94]; sin embargo, estudios previos han demostrado que la proteína CDC37 y AKT son dos de los principales mediadores de las vías de señalización que involucran CK2 y modulan

la supervivencia celular. Por esta razón decidimos determinar los niveles de pCDC37 y pAKT de manera basal y tras la activación del TCR (OVA).

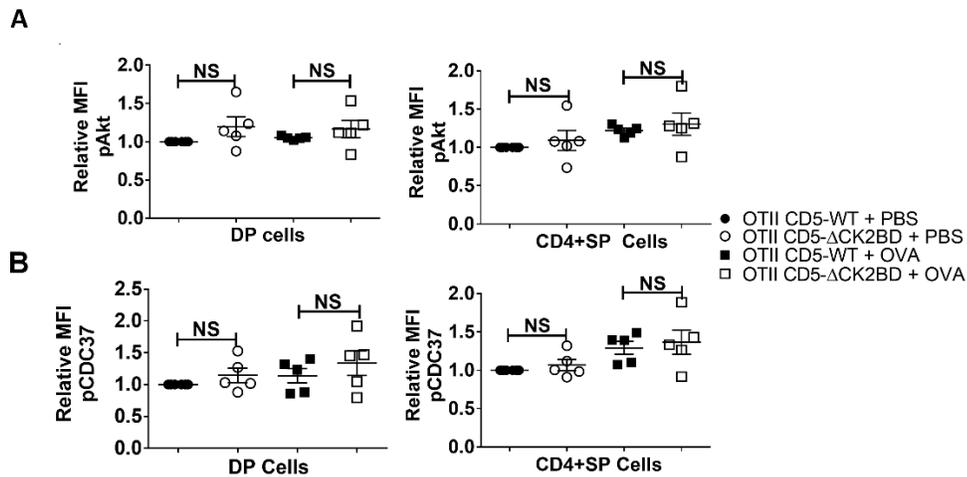


Figura 28. La ausencia del CK2BD de CD5 no afecta la fosforilación de AKT y CDC37 tras la estimulación a través del TCR. (A) Determinación de los niveles de pAKT (S473) en las células DP y CD4+ después de 24h de inyección de 300 μ g de péptido OVA en ratones OTII CD5WT vs OTII CD5 Δ CK2BD **(B)** Niveles de pCDC37. (n=5) Ratones 8-12 semanas

De manera sorprendente (Figura 28A y 28B), la activación de ambas proteínas se encuentran al mismo nivel en ambos ratones, lo que demuestra que no es a través de estas vías de señalización que el dominio de unión a CK2 de CD5 afecta la selección y supervivencia tímica, o que la actividad dependiente de CD5 de estas proteínas depende de otros mediadores distintos a CK2.

Debido a que estudios previos han demostrado que CK2 interactúa con fosfatas que afectan la vía de las MAPK como son PP2A [102] y que uno de los principales mediadores de las señales del TCR es ERK 1/2, decidimos analizar si la fosforilación de esta proteína se encuentra afectada en ausencia del dominio de unión a CK2 de CD5.

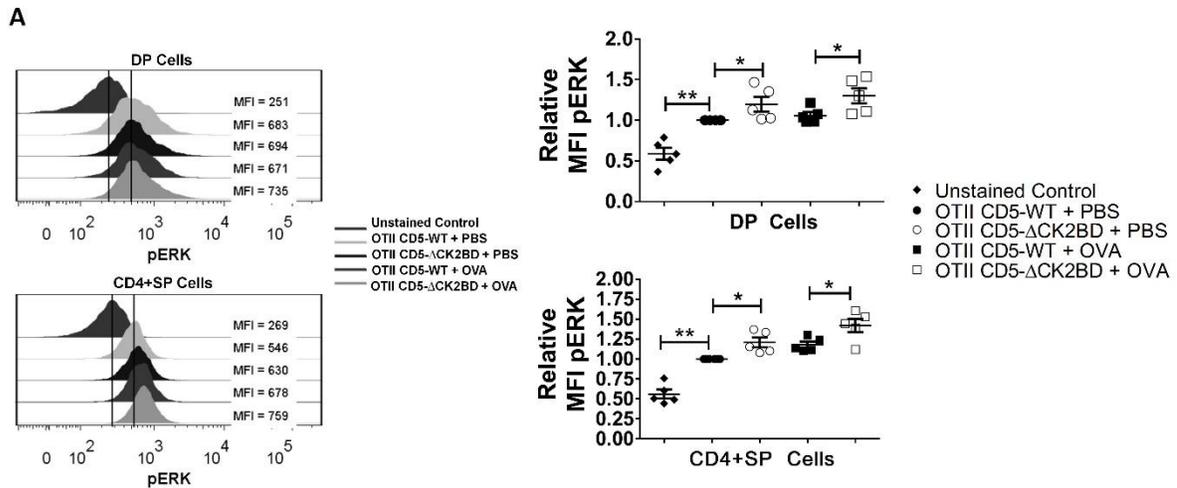


Figura 29. Los timocitos obtenidos de ratones *CD5ΔCK2BD* presentan un incremento en la fosforilación de ERK comparado con los ratones *CD5WT*, basalmente y tras la activación del TCR. (A) Niveles de pERK en los timocitos CD4+ y DP de ratones OTII *CD5WT* vs OTII *CD5ΔCK2BD* después de transcurridas 24h de la inyección de 200 μg de péptido OVA o PBS (Control). (n=5) Ratones de 8-12 semanas. *p<0.05, **p<0.01

Como se puede observar en la figura 28, la fosforilación de ERK 1/2 se encuentra incrementada en la ausencia del dominio de unión a CK2 de manera basal y tras la activación del TCR tanto en DP como en CD4+ SP (Figura 29, Paneles de la derecha). Este es un hallazgo similar al observado en los ratones deficientes de CD5 y en las mutantes Y429A; sin embargo, de manera interesante el análisis de las señales proximales del TCR (Figura 30) muestran que la regulación de ERK no depende de estas señales proximales, lo que difiere de las observaciones hechas en el ratón CD5KO y que no se han estudiado en la mutante Y429A.

Determinación de flujos de Ca²⁺ en timocitos de ratones CD5 WT vs CD5-CK2ΔBD

Una forma de determinar si algunas moléculas río arriba de ERK (señales proximales del TCR) se encuentran afectadas es por medio de la movilización de Ca²⁺ intracelular. Estudios en los ratones deficiente de CD5 muestran un incremento en la movilización de Ca²⁺ en la ausencia de este receptor. Para determinar si el efecto observado sobre ERK 1/2 en ausencia del dominio de unión a CK2 de CD5 es idéntico al observado en el ratón CD5KO [84] realizamos

experimentos de determinación de flujos de calcio por subpoblaciones tímicas. La metodología se explica en materiales y Métodos

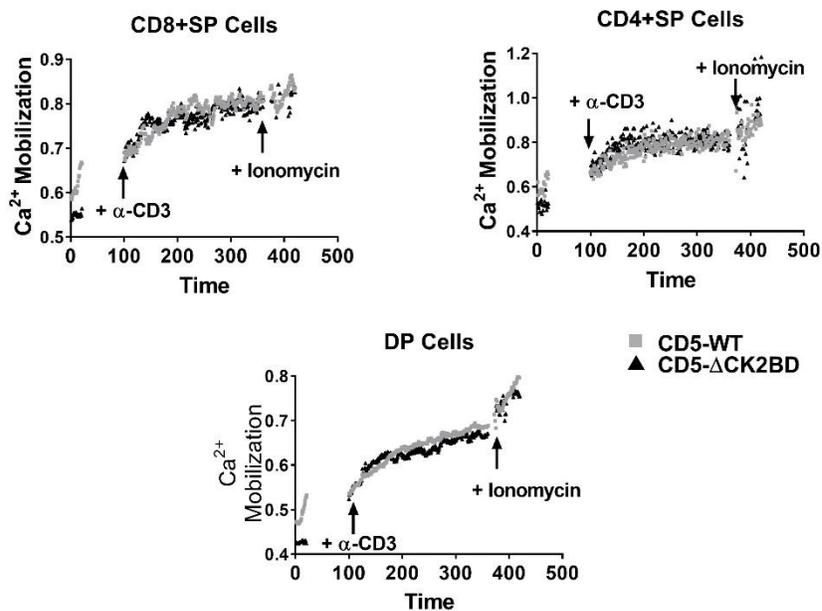


Figura 30. La ausencia del dominio de unión a CK2 de CD5 no afecta las señales proximales del TCR. Se realizaron ensayos de movilización de Calcio en las diferentes subpoblaciones CD4+, CD8+ y DP de ratones CD5WT vs CD5ΔCK2BD tras la estimulación con 1 μg de α-CD3. Se muestran los tiempos de estimulación con α-CD3 y de Ionomycin como control positivo. (n=3) Ratones de 8-12 semanas

Como se muestra en la figura 30, los niveles de pERK intracelular no correlacionan con incrementos en los flujos de Ca²⁺. Estos datos muestran por primera vez que existen regiones dentro de la región citoplasmática de CD5 que son capaces de regular los procesos de selección tímica y supervivencia sin afectar en su totalidad las señales del TCR, sino más bien modulando moléculas involucradas en las vías del TCR por medio de mecanismos alternativos.

Determinación subcelular de pERK en los timocitos de ratones CD5 WT vs CD5-CK2ΔBD

Trabajos publicados previamente, han mostrado la capacidad de CK2 para regular la entrada de ERK al núcleo, por medio de la fosforilación de algunos residuos de esta proteína [103]. Debido a que ERK requiere de la entrada a núcleo

para ejercer la mayoría de sus funciones sobre otros factores de transcripción como AP-1 o EGR1, decidimos analizar por medio de citometría de flujo acoplada a imágenes si ERK se encuentra dentro del núcleo o no en los ratones deficientes del dominio de unión a CK2.

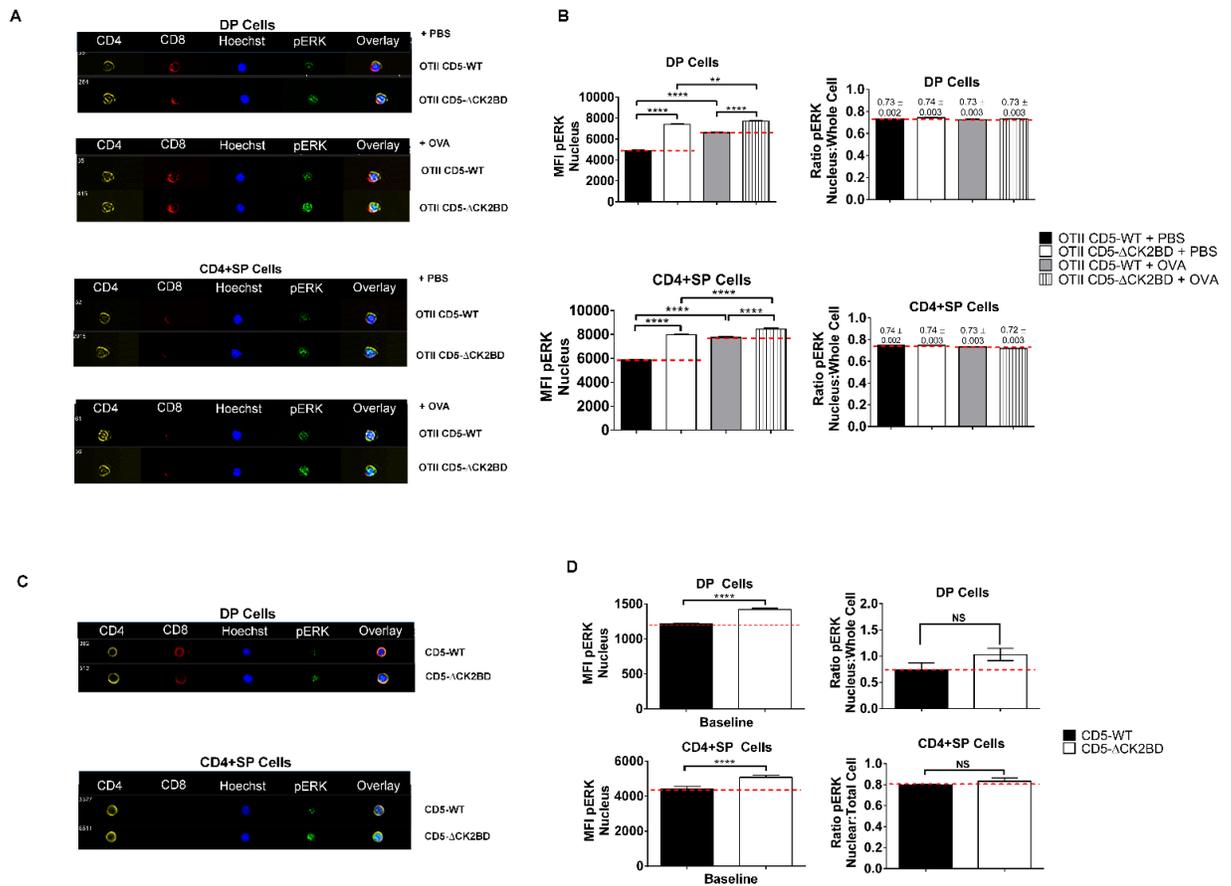


Figura 31. Los timocitos de los ratones *CD5ΔCK2BD* presentan una elevación de pERK en el núcleo. (A-B) Niveles de pERK en el Núcleo de los timocitos de los ratones OTII *CD5WT* vs OTII *CD5ΔCK2BD*. Relación de los niveles de pERK Nuclear:Célula total. Tras 24h de inyección de PBS (Control) o péptido OVA (300 μg) (C-D) Niveles de pERK basales en timocitos de los ratones *CD5WT* vs *CD5ΔCK2BD*. Relación de los niveles de pERK Nuclear:Célula Total. (n=3) Ratones de 8-12 semanas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$**

Para realizar el análisis se determinó la región nuclear de los linfocitos T, y se denominó al resto como región citoplasmática. Los resultados muestran que pERK se encuentra incrementado a nivel total (Figura 31A), y en núcleo (Figura

31B y 31D), lo que demuestra que el dominio de unión a CK2 de CD5 no afecta la entrada de pERK al núcleo. Estos resultados sugieren, que a pesar de la ausencia de CK2 unido a CD5, el resto del CK2 que aún se encuentra en la célula parece ser el más relevante para ejercer este efecto sobre las células.

Determinación de la fosforilación de Zap70, JNK, P38, ERK y niveles de Bcl-2 en ratones neonatos CD5 WT vs CD5-CK2 Δ BD

Finalmente, se ha descrito previamente que la activación e inducción de muerte en los linfocitos T de ratones adultos se puede encontrar afectada por los niveles de activación elevada en periferia. Para determinar que los efectos previamente observados en ausencia del dominio de unión a CK2 se deban a un efecto intrínseco de los timocitos y no a través de la activación indirecta por la activación y muerte de células periféricas, se decidió realizar la activación de los timocitos en ratones recién nacidos (24h máximo). Debido al volumen máximo para inyectar neonatos (25 μ L), y a que previamente se han publicado modelos utilizando esta técnica, se decidió utilizar α -CD3 (20 μ g) como un método de activación de estas células. Los resultados se muestran a continuación [104, 105].

Como se puede observar, los ratones neonatos presentan menores niveles de pERK basalmente (Figura 33B), lo que correlaciona directamente con los bajos niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura 33F), sugiriendo que durante esta fase del desarrollo de los linfocitos T (neonatal) pERK basalmente ayuda para la supervivencia de los linfocitos T. Sin embargo, tal como se observó en adultos, la estimulación aguda del TCR induce un incremento mayor de la fosforilación de ERK 1/2 en los ratones deficientes del dominio de unión a CK2 comparado con los ratones WT. Adicionalmente, se puede observar que los ratones CD5-CK2 Δ BD presentan un incremento en la fosforilación de la proteína JNK (Figura 33C), más no de la proteína p38 (Figura 33D) lo que afecta diferencialmente los procesos de selección antes visto (en específico la selección negativa). Finalmente, no se observan diferencias significativas en la fosforilación de Zap70 (Figura 33E), lo que sugiere que las señales proximales del TCR no se encuentran afectadas, como se observó anteriormente por los flujos de Ca²⁺.

Con respecto a la supervivencia de los linfocitos T, se puede observar que los linfocitos T DP de los ratones deficientes del dominio de unión a CK2 presentan mayor muerte (Figura 33A, Panel Medio), y que este efecto es intrínseco a los timocitos y no debido a una excesiva cantidad de activación y/o muerte en periferia (los ratones neonatos tienen 0.5% de Linfocitos T en periferia). Interesantemente los linfocitos T CD4+ positivo presentan mayor muerte en los ratones silvestre (Figura 33A, panel de la derecha), algo similar a lo observado en adultos donde hay mayores porcentajes de CD4+, pero no afectaciones en números totales (Figura 23A y 23B).

En conjunto, los datos observados en el ratón deficiente del dominio de unión a CK2 sugieren que este dominio es importante para modular directamente la activación de ERK 1/2, sin afectar las señales proximales del TCR. Adicionalmente, este dominio es importante para modular la selección de linfocitos CD4+ sobre CD8+, lo cual es consistente con los elevados niveles de pERK 1/2 en ausencia de este dominio. Finalmente, el dominio de unión a CK2 de CD5 es importante para regular la supervivencia de los linfocitos T en desarrollo, aunque por el momento no es posible decir si esto depende totalmente de la actividad de ERK 1/2 o no.

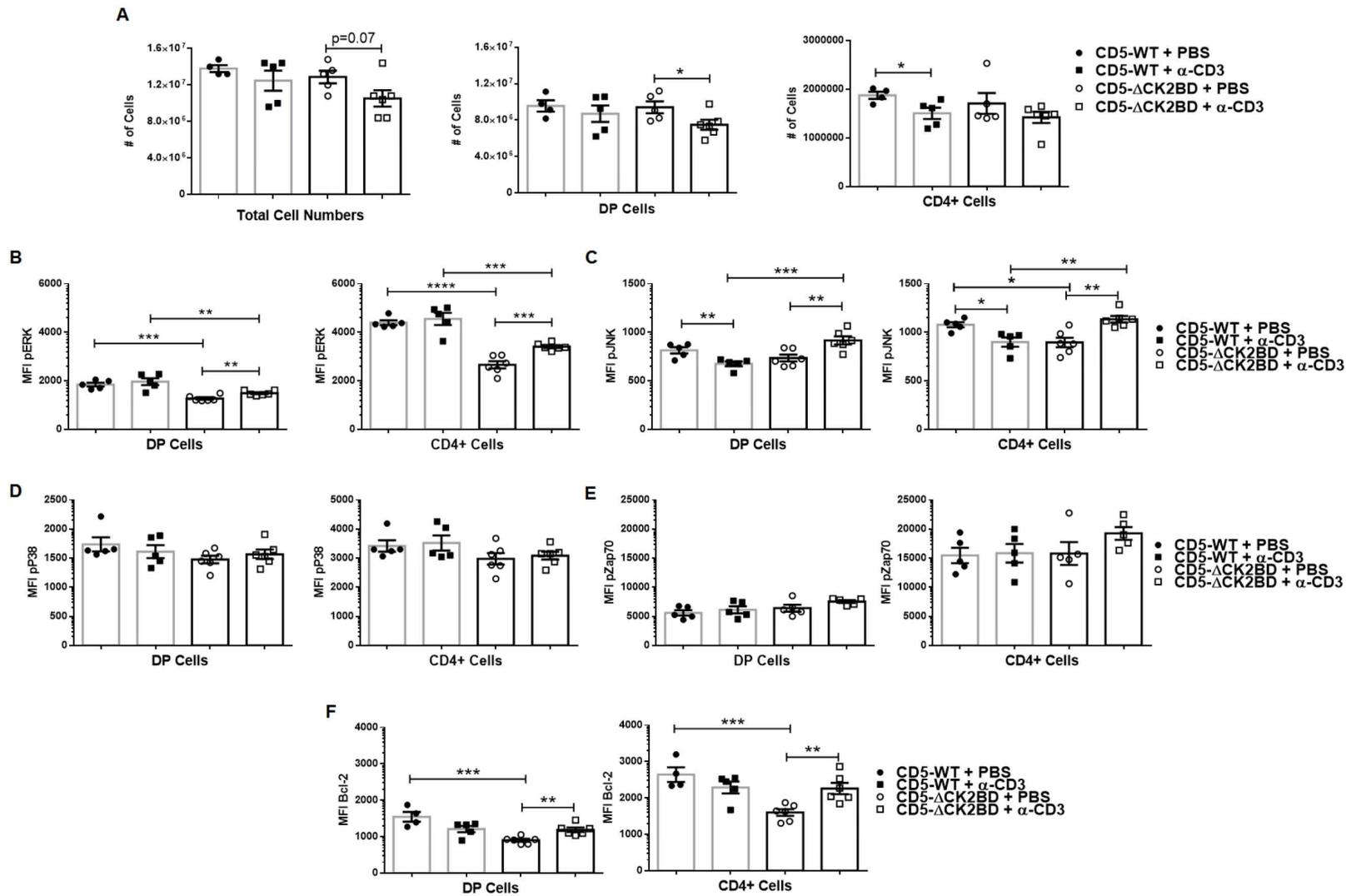


Figura 33 Incremento en la muerte celular en los ratones neonatos CD5 Δ CK2BD. Incremento en la fosforilación de ERK tras la activación con α -CD3. (A) Números totales de timocitos, timocitos DP y CD4+, tras la inyección con 20 μ g de α -CD3. (B) Determinación de los niveles de pERK en timocitos de ratones neonatos después de la inyección de PBS (control) o 20 μ g de α -CD3 (C) pJNK (D) pP38 (E) pZap70 (F) Bcl-2 (n=5) Ratones de 24h de edad *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

DISCUSIÓN

Papel de los residuos de Tirosina 429, 441, 463 en la supervivencia de los linfocitos T: Mecanismos moleculares.

CD5 es un receptor expresado en linfocitos T (maduros y en desarrollo), B1a y aberrantemente en linfocitos T y B presentes en algunas patologías como leucemias. Como se mencionó anteriormente en la introducción, la principal función descrita para este receptor es la regulación negativa de las señales del TCR. Sin embargo, evidencias recientes [91, 95, 100] han demostrado que uno de los efectos relevantes que tiene CD5 sobre los linfocitos T, maduros y en desarrollo, es la regulación de la supervivencia celular. Sin embargo, solo existe evidencia del rol del dominio de unión a CK2 en la supervivencia de los linfocitos T en periferia, más no el efecto que tiene este dominio en el desarrollo tímico. Adicionalmente, el rol de los residuos de tirosina ubicados en la región citoplasmática de CD5 sobre la supervivencia de los linfocitos T, no ha sido estudiado.

El timo es un órgano fundamental para el adecuado funcionamiento y selección de los linfocitos T durante toda su vida en periferia. La correcta eliminación de células autorreactivas y la selección de la mayoría de las clonas no autorreactivas, garantiza, en la mayoría de las ocasiones, un adecuado funcionamiento del sistema inmune adaptativo en la fase extra tímica de los linfocitos T. Sin embargo, para que esto suceda, existen diversas moléculas encargadas de asegurar estos procesos de selección. CD5 juega un papel fundamental en la modulación de las señales del TCR y por ende en la eliminación de células autorreactivas. Además, se postula que CD5 de manera intrínseca e independiente del TCR podría modular la supervivencia de estas células autorreactivas, proveyendo de un mecanismo aún más eficiente de selección. Los mecanismos por los cuales CD5 regula estos efectos no habían sido dilucidados previamente, hasta la realización de esta tesis.

Para determinar cómo es que los diversos residuos de tirosina ubicados en la región citoplasmática de CD5 son capaces de modular la supervivencia de los linfocitos T, se utilizaron diferentes mutantes puntuales de CD5h. A pesar de que CD5 es una de las moléculas más antiguas descritas en la biología de los linfocitos T, poco se sabe sobre las moléculas que interactúan con estos residuos. En este contexto, se ha postulado que el residuo Y429 podría interaccionar con el regulador negativo de las señales del TCR Ras-GAP, así como con la subunidad p85 de PI3K [81, 87, 88]. Debido a la presencia de una secuencia muy similar a la presente en algunos ITAMs, como la cadena ζ del TCR, y a que muchas de las proteínas que se asocian a la región Y429 de CD5 son importantes para la activación de diversas vías de señalización, la región Y429-441 de CD5 se postuló como un pseudo-ITAM inicialmente. En el contexto del dominio Pseudo-ITAM de CD5 (Y429-441) se ha postulado que el residuo Y441 no es relevante para la unión de alguna proteína, ya que la fosforilación de CD5 y reclutamiento de otras proteínas hacia la región Pseudo-ITAM no se ve afectado en ausencia de este residuo. Finalmente la Y463 se demostró como un sitio de reclutamiento de c-Cbl, una ubiquitin ligasa que regula negativamente las señales del TCR, así como un posible sitio de reclutamiento de PI3K, lo que podría afectar la supervivencia.

Nuestros resultados muestran que aún sin ningún estímulo externo, la ausencia tanto de Y429, Y441 o Y463 afecta la supervivencia de los timocitos. Más aún, la estimulación del TCR con α -CD3 o α -CD3 + α -CD28 muestra el mismo efecto. Estos datos demuestran que los tres residuos de tirosina ubicados dentro de la región citoplasmática de CD5 son muy relevantes para la supervivencia de los linfocitos T. Al comparar la estimulación del TCR contra los niveles basales de muerte en cada una de las clonas podemos observar que sobresale la clona Y429 como la más relevante en regular la supervivencia de los timocitos. Esto se puede observar ya que tanto en la clona Y441, como en la clona Y463 se observó un incremento en la muerte celular inducida por activación tras el estímulo con α -CD3, sugiriendo que la mayor parte de la muerte se debe a un efecto basal y no por AICD, mientras que la tirosina Y429 si presenta una mayor activación del TCR, hasta alcanzar los mismos niveles que tras la activación con α -CD3 + α -CD28. Este dato

sugiere fuertemente que la ausencia de este residuo impide regular negativamente las señales del TCR, por lo que aún con una estimulación única con α -CD3 se pueden alcanzar los efectos observados con α -CD3 + α -CD28. En este contexto, previamente se ha descrito que el residuo Y429 es importante para la regulación negativa de las señales del BCR mediada por el receptor CD5 [86]. Adicionalmente, podemos observar que el otro residuo que se encuentra en el llamado "Pseudo-ITAM", la tirosina 441, presenta un incremento significativo de AICD comparado con el resto de las clonas al estimular con α -CD3 + α -CD28 apoyando aún más la idea de que en esta región se encuentra alguna forma de regulación negativa de las señales del TCR.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la ausencia de CD5 genera una disminución en la fosforilación de la proteína AKT en el residuo S473 [100]; además, esta disminución se encuentra relacionada con la disminución en la supervivencia de los linfocitos T en desarrollo. Análisis de las diversas regiones de CD5 que pudieran involucrar mecanismos de supervivencia de los linfocitos T han mostrado que la Y429 y la Y463 son sitios posibles de reclutamiento de la vía PI3K/AKT [87]. De forma adicional, evidencias indirectas por nuestro grupo de trabajo sugieren que la región carboxi-terminal de CD5 (que contiene las Y463 y el sitio de unión a CK2) es relevante para la unión de una proteína de 85 kDa, presumiblemente la subunidad p85 de PI3K [106], lo que convierte a esta región como un sitio importante de regulación de la supervivencia de los timocitos, ya sea de forma dependiente o independiente de las señales del TCR. La vía PI3K/AKT es una de las vías más importantes en la regulación de supervivencia de diversos tipos celulares. De manera general, se inicia con la activación de PI3K y concluye con la activación de AKT y la subsecuente fosforilación de diversos sustratos por medio de esta última. Adicionalmente, se han descrito mecanismos alternos de activación de AKT dependientes de la MAPK p38 [107]. Sin embargo, como se discutirá más adelante, nuestros datos sugieren que en la línea EL4 los residuos Y429 y Y463 no son los encargados de modular la actividad de AKT, por lo cual la supervivencia mediada por los diversos residuos dependerá de otras moléculas.

En los ratones deficientes de CD5, al igual que en las diversas mutantes generadas, se ha observado una disminución en la supervivencia de los timocitos, medida por la unión de anexina V y 7-AAD. Interesantemente, se ha observado que este incremento en apoptosis se encuentra relacionado con los niveles de activación de la Caspasa 3 [108, 109]. La Caspasa 3 es un miembro de la familia de las proteasas de cisteína y ácido aspártico. De manera general esta familia de proteasas participa en la degradación de diversas proteínas relevantes, la caspasa 3 al igual que la caspasa 6 y 7 son denominadas caspasa ejecutoras pues son las encargadas de degradar a la mayoría de las proteínas durante el proceso apoptótico. Debido a los antecedentes observados en el ratón deficiente de CD5 decidimos analizar la activación de la Caspasa 3 activa en cada una de las mutantes de CD5h. De manera interesante, sólo la ausencia de todas las tirosinas de la región citoplasmática de CD5 (YYY/AAA) resultó en un incremento de la activación de caspasa 3. Adicionalmente, la ausencia de la tirosina 463 (Y463A) resulta en un incremento de la activación basal de caspasa 3. Estos datos son interesantes ya que muestran que al mutar cada una de las tirosinas individualmente y por separado, contrario a cuando uno elimina CD5 por completo, no se observa un incremento en la activación de caspasa 3, con la excepción de la activación basal en la Y463A. Adicionalmente se puede observar que al estimular con α -CD3 solo la mutante de las tres tirosinas (YYY/AAA) tiene un incremento en la activación de caspasa 3 comparado con la activación basal. En conjunto estos datos sugieren que, tal vez, la ausencia individual de cada tirosina no es suficiente para ejecutar la apoptosis vía activación de caspasa 3 y que por lo tanto la muerte mediada por caspasa 3 es dependiente de la ausencia de las 3 tirosinas, y en las mutantes individuales no es tan prominente como la muerte inducida por otras vías. En este contexto, no podemos descartar la activación mediada por CD5 de otras caspasas efectoras como son la caspasa 6 o 7. También, existen reportes en linfocitos T en los cuales se observa muerte celular, medida por la exposición de fosfatidil serina (unión de Annexina V), en las cuales no existe activación ni de Caspasa 3 y Caspasa 8 [110], lo que sugiere mecanismos de muerte independientes de las vías de caspasa 3 y 8, más no de otras caspasas ejecutoras como 6 o 7. Adicionalmente, la regulación de supervivencia de B-CLL mediada por CD5 parece no depender en

la activación de Caspasas [111]. De esta forma, nuestros datos sugieren que la forma de CD5 para regular la supervivencia de los timocitos, por medio de sus residuos de tirosina, involucra mecanismos que pueden ser más complejos que la activación de algunas caspasas (Piroptosis, paraptosis, autofagia, entre otros).

Como se mencionó anteriormente, CD5 es capaz de regular la intensidad de las señales transducidas a través del TCR y como se mostró anteriormente, por medio de sus residuos de tirosina también es capaz de regular la supervivencia de los linfocitos T. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que permitan decir si estos dos procesos se encuentran relacionados entre sí. Para determinar si existe alguna forma de relacionar o diferenciar estos eventos se realizó la estimulación con α -CD3 para mimetizar las señales del TCR y se decidió medir los niveles de fosforilación/activación de dos proteínas relevantes para la supervivencia de los linfocitos T; una ampliamente relacionada con el TCR como ERK y otra que podría sugerir un mecanismo independiente como AKT.

Al analizar los datos obtenidos en las diferentes mutantes de CD5h, se pudo observar que, tras ningún estímulo, y tampoco de manera basal, existe una afectación en la fosforilación de AKT y por ende en su activación. Este hallazgo es sorprendente, ya que los datos previamente observados sugieren fuertemente que la ausencia de CD5 resulta en una disminución de la fosforilación de AKT y por ende en un incremento en la muerte de los linfocitos T. Sin embargo, con los hallazgos obtenidos podemos decir que los residuos de tirosina de la región intracelular de CD5 no son la región principal encargada de modular la activación de la cinasa AKT en la línea celular EL4. En este contexto, se ha descrito previamente que la región de unión a CK2 dentro de la región carboxi-terminal de CD5 modula la actividad de AKT, ya que la ausencia de este dominio de unión resulta en una disminución en la activación de AKT [93, 96, 97]. Sin embargo, como se discutirá más adelante al eliminar el dominio de unión a CK2 en los linfocitos T en desarrollo no se observa un efecto en la fosforilación de AKT. Dentro de la biología de CD5 existen algunos residuos adicionales que podrían participar en la activación de vías de señalización de pueden modular la actividad de PI3K y por ende AKT, como son la Treonina 410 y 412 [83]; sin embargo, no existen evidencias

de una posible participación de estos residuos en la supervivencia mediada por CD5. Finalmente, existe un residuo adicional, denominado V471, el cual es una variante natural de CD5h (CD5 SNP), el cual se ha asociado con un peor pronóstico en algunas enfermedades autoinmunes (V471A); sin embargo, al igual que los residuos de treonina 410 y 412 se requieren estudios adicionales para determinar el efecto que tienen estos en la activación de AKT y protección de muerte de los timocitos.

Finalmente, para determinar si las señales del TCR afectan de alguna forma la supervivencia de los linfocitos T, se realizó la medición de la forma fosforilada de la proteína ERK 1/2, la cual es un sustrato río abajo del TCR y que además es capaz de modular la supervivencia de los linfocitos T.

Como se muestra en la sección de resultados la ausencia de la tirosina Y429, contenida en el llamado "Pseudo-ITAM" (ver discusión pag 84) resulta en un incremento de la fosforilación de ERK 1/2, clona Y429A en la cual también se observa más muerte. Estos resultados muestran por primera vez, que al igual que en linfocitos B, el residuo de tirosina Y429 es el encargado de regular negativamente las señales transducidas a través del BCR/TCR [86]. Adicionalmente, los resultados muestran que al menos uno de los mecanismos de regulación de la supervivencia de los linfocitos T, mediada por CD5, involucra la hiperactivación del TCR, incrementando la AICD (Muerte celular inducida por activación). En este contexto se ha demostrado que a pesar de que ERK se ha postulado como una molécula anti-apoptótica [112], dependiendo de la activación o falta de activación de diversas vías de señalización, la activación aguda de ERK 1/2 puede conducir a un proceso pro-apoptótico. Con respecto al residuo 441, también contenido dentro del "Pseudo-ITAM" se ha observado previamente que de manera natural este residuo no se encuentra fosforilado por Lck, por lo que se ha postulado que no juega un papel relevante en las vías de señalización y/o supervivencia mediadas por CD5; sin embargo, se ha demostrado que algunos "ITAMs" cuando se encuentran hemi-fosforilados pueden comportarse como "ITIMs" (cambio de activador de vías de señalización a inhibidor de vías de

señalización) y de esta forma regular negativamente algunas vías de transducción de señales [113].

En resumen, la primera parte de la tesis muestra que CD5 juega un papel muy relevante en la modulación de la supervivencia de los linfocitos T, y no solo de la regulación negativa de las señales del TCR. Más aún, los datos de esta tesis demuestran que la forma por la cual los residuos de tirosina regulan la supervivencia de los linfocitos T involucran la regulación negativa de las señales del TCR a través del residuo 429, por lo que con esto, el dogma que la región 429-441 de CD5 actúa como un “Pseudo-ITAM” (pag. 84) es incorrecto ya que se demostró que esta región funciona como un “Pseudo-ITIM/Regulador Negativo de las Señales del TCR”, ya que su ausencia genera un incremento en la muerte mediada por la activación de ERK 1/2. Adicionalmente también se muestra que CD5 no solo regula la supervivencia de los timocitos a través de sus residuos de tirosina por medio de la regulación negativa de las señales del TCR, sino que deben existir otros mecanismos por los cuales ejerza esta función [114].

Papel del dominio de unión a CK2 del receptor CD5 (CD5-CK2BD) en el desarrollo y supervivencia de los linfocitos T.

Para determinar el papel del dominio de unión a CK2 en los timocitos, se utilizó un diseño experimental in vivo. En este, se generó un ratón en el cual el receptor CD5 se encuentra expresado de manera fisiológica, es decir al igual que en un ratón silvestre, y modulado por las mismas señales y factores de transcripción. Sin embargo, el receptor CD5 expresado en este ratón, carece del dominio de unión a la proteína CK2 [96, 97].

CK2 es una cinasa de serina/treonina involucrada principalmente en la regulación de los procesos y moléculas involucrados en supervivencia y proliferación/entrada a ciclo celular de diversos tipos celulares. Al día de hoy se conocen más de 300 sustratos de CK2, por lo cual, a pesar de tener un rol principal en la regulación de supervivencia de diversos tipos celulares, esta cinasa puede tener diversos efectos sobre otros procesos celulares no relacionados con la supervivencia celular [92, 94]. Trabajos previos han mostrado que la cinasa CK2 se

encuentra constitutivamente asociada al receptor CD5 a través de un dominio (S458-461) de la región carboxi-terminal de CD5, a través de su cadena β . Además, se ha demostrado que tras la activación del TCR aumenta la asociación de esta cinasa con CD5 [79, 115]. Los efectos que tiene esta cinasa en la biología de CD5 se han estudiado recientemente. Entre estos efectos destacan la capacidad de regular la supervivencia de los linfocitos T en periferia, en un modelo de EAE, así como regular la polarización de los linfocitos T activados en periferia por medio de la modulación de los niveles de pAKT. Sin embargo, el rol de esta cinasa y su unión a CD5 en el desarrollo, función y supervivencia de los timocitos no se ha estudiado hasta el momento [95, 96].

Como se puede observar en los resultados, los niveles de CD5 encontrados en los ratones silvestres y en los ratones deficientes del dominio de unión a CK2 son similares y se regulan de la misma forma (distintos niveles en las distintas subpoblaciones de timocitos), lo que permite que este ratón sea un buen modelo para el estudio del desarrollo de los linfocitos T. Adicionalmente, como se utilizaron tanto ratones TCR policlonales, como TCR transgénicos (OTII, específicos para OVA), se puede observar que el porcentaje de expresión del TCR transgénico es muy similar en los ratones TCR transgénicos Silvestres y deficientes del dominio de unión a CK2.

Como se puede observar en el análisis de las diversas subpoblaciones de timocitos, los linfocitos DP se encuentran reducidos en porcentajes mientras que los linfocitos T CD4+ se encuentran aumentados. Debido a que este efecto puede deberse a un incremento en los linfocitos T Dobles Positivos que están siendo seleccionados positivamente, se realizó el análisis específico de la subpoblación post-selección positiva. Para esto, se utilizaron los marcadores CD5 y CD69 como detectores de los niveles de linfocitos DP Post-seleccionados, ya que se ha descrito previamente que tras recibir una señal del TCR (proceso fundamental para la selección positiva y para evitar la muerte por negligencia), los linfocitos T incrementan la molécula CD69, y de manera simultánea incrementan la expresión del mismo receptor CD5 [34]. Como se menciona en la introducción, la modulación de CD5 en los linfocitos T es totalmente dependiente de las señales del TCR, lo

que significa que a más señales del TCR más CD5 se exprese en la superficie de los linfocitos T.

Nuestros resultados muestran claramente un incremento en los linfocitos T DP post-selección positiva, lo que comprueba que una de las causas de la disminución de los linfocitos DP en la ausencia del dominio de unión a CK2 es el rápido progreso hacia linfocitos T CD4+ SP. Es importante señalar que las discrepancias entre los números totales de CD4+ (sin diferencia) y el porcentaje de estas células (% CD4+ incrementado) sugiere que existe un efecto en la supervivencia de los linfocitos T CD4+, regulado por el dominio de unión a CK2, lo cual se discutirá más adelante.

Como se indica en la relación de linfocitos T CD4+:CD8+, se puede observar un incremento en la proporción de linfocitos T CD4+ en un ambiente de TCR policlonal y un ambiente de TCR monoclonal (OTII). Estos datos proveen un mecanismo para un resultado previamente observado en el cual el ratón deficiente de CD5 en un ambiente deficiente de MHC II es aún capaz de generar una población CD4+ CD8int [116], aun cuando no debería existir esa población de CD4+ en ausencia de clase II, ya que CD5 afecta el compromiso al linaje CD4 vs CD8. Este trabajo, fue el primero en sugerir que CD5 regula la elección de linaje CD4+ vs CD8+, pues en ratones deficientes de MHC II, en los cuales los linfocitos T CD4+ no son seleccionados, la ausencia de CD5 generaba la inducción de linfocitos CD4+, por un mecanismo que no se había estudiado. Más aún, estos datos sugieren que el dominio de unión a CK2 podría estar modulando las señales del TCR.

Análisis de las subpoblaciones maduras de linfocitos CD4+, por medio de los marcadores CD62L y CD69, nos permitió distinguir entre las subpoblaciones de CD4+ que ya sufrieron el proceso de selección negativa y maduraron o aquellas más inmaduras. Previamente se ha descrito que el egreso de los linfocitos T es dependiente del esfingolípido 1 fosfato (S1P), el cual a su vez solo es capaz de inducir el egreso de los timocitos hacia perifera cuando estos han disminuido sus niveles de CD69. Tomando en cuenta esto, se analizó como la subpoblación más

madura y Post-Selección de Linfocitos CD4+ a aquella que expresa altos niveles de CD62L (L-Selectina requerida para homing a ganglios) y bajos niveles de CD69 [46]. Interesantemente, se puede observar que esta población se encuentra disminuida en ausencia del dominio de unión a CK2 en los ratones con TCR policlonal. Para explicar esta observación se pensó en dos posibilidades, la primera, que la mayoría de las células contenidas en esta subpoblación madura, presentaran un incremento en la salida de timo, por lo cual se debería encontrar un mayor número de células CD4+ en periferia; sin embargo, análisis previos de las subpoblaciones de linfocitos T muestran que al igual que en timo, la población recientemente madura de linfocitos T CD4+ se encuentra disminuida en periferia [96]. Considerando esto, la segunda posibilidad sugiere que esta subpoblación CD62LhiCD69lo se encuentra disminuida por que durante el proceso de selección negativa una gran cantidad de linfocitos T CD4+ son eliminados, probablemente debido a un incremento en las señales del TCR. Además, esta hipótesis explica porque a pesar de tener una mayor proporción de linfocitos T CD4+ SP no se tiene una mayor cantidad en números totales.

Finalmente, con respecto a la caracterización de los timocitos Dobles Negativos, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones silvestres y entre los ratones con la deficiencia del dominio de unión a CK2. Este resultado es esperado, ya que a pesar de que CD5 se expresa desde el estadio DN3, los niveles son considerablemente mayores hasta que se alcanza el estadio DP.

Hasta ahora, los datos analizados sugieren un incremento en las señales del TCR, ya que como se ha descrito en trabajos previamente publicados, el incremento en selección positiva de los linfocitos DP requiere de altas señales de pERK 1/2, mientras que la elección de linaje hacia CD4+, también requiere altos niveles de activación de las señales del TCR, como se describió en la introducción. Sin embargo, una de las mejores lecturas del incremento de todas las señales del TCR es el incremento en la expresión de CD5 en la superficie de los linfocitos T, y como se mencionó anteriormente no se encontraron diferencias entre ambos ratones [34, 36, 56], lo que es indicativo que el dominio de unión a CK2 puede

modular las respuestas del TCR de manera diferente a la previamente observada en el ratón deficiente de CD5.

Adicionalmente, se sabe que una subpoblación de linfocitos T, conocida como células T reguladoras naturales, requiere de altas señales del TCR para generarse [117]. Esto está demostrado en el ratón deficiente de CD5, en el cual el número de células T reguladoras está claramente incrementado comparado con un ratón silvestre. Interesantemente, el análisis de esta población no muestra diferencias en la ausencia del dominio de unión a CK2 demostrando que los efectos descritos previamente no se deben a una regulación negativa de las señales del TCR como en el ratón CD5 KO.

Como se postuló anteriormente, uno de los principales efectos de la cinasa CK2 es la regulación de la supervivencia celular. Adicionalmente, al analizar las discrepancias entre los números totales y los porcentajes observados se decidió analizar los niveles de apoptosis en los timocitos tanto de manera basal como en desarrollo. Como se puede observar en los resultados, al cultivar por 24 horas los linfocitos T obtenidos tanto de los ratones WT como de los ratones CD5-CK2BD la ausencia del dominio de unión a CK2 genera un incremento en la mortalidad de los timocitos. Sin embargo, en el caso del TCR policlonal se puede observar que el efecto solo se da tras la activación del TCR en los linfocitos T CD4+ y DP, mientras que se da también de manera basal en los linfocitos CD8+. Este hallazgo es interesante, ya que recientemente se demostró que una de las razones por las cuales existe una mayor cantidad de células CD4+ que CD8+ en periferia es por una muerte asimétrica de los timocitos en desarrollo, es decir durante la fase tímica del desarrollo de linfocitos T, las células CD8+ mueren más; sin embargo, las vías de señalización y procesos involucrados en esto permanece sin resolver [118]. Estos datos sugieren que CD5, a través de su dominio de unión a CK2 podría ser una proteína importante en la modulación de esta relación CD4:CD8.

Entre las vías principales descritas para que CK2 proteja a diversos tipos celulares de la muerte se encuentra la vía de activación de pCDC37 y pAKT [93, 119]. Además, hallazgos en periferia han demostrado que la ausencia de CK2

genera una disminución de células Th17, las cuales requieren de Akt para su generación [97]. Sorprendentemente, nuestros resultados muestran que en timocitos tanto CDC37 como AKT no presentan defectos en su fosforilación en la ausencia del dominio de unión a CK2. En este contexto, se ha demostrado que durante el desarrollo de nTregs la actividad de AKT regula negativamente la generación de estas células, lo cual se ha demostrado en los ratones CD5KO, sin embargo, en los ratones CD5-CK2BD no existen diferencias en los niveles de pAKT y por ende esto podría ser una explicación de por qué no hay diferencias en los niveles de nTregs [120].

Otra de las moléculas relevantes en las vías de señalización del TCR, y como se demostró anteriormente, también en la biología de CD5 es pERK 1/2. Debido a esto y a que el incremento en la actividad de esta molécula, promueve la selección positiva de DP, incrementa la selección negativa de CD4+ y promueve la elección de linaje a CD4+, se analizaron los niveles de fosforilación de esta proteína [56, 121]. De manera interesante, nuestros hallazgos muestran que ERK 1/2 se encuentra hiperfosforilada aún de manera basal en los ratones deficientes del dominio de unión a CK2. Estos hallazgos comprueban la hipótesis de que CK2 está modulando los procesos de selección tímica; sin embargo, sugieren que lo hace de una forma distinta a la descrita en los ratones deficientes de CD5. En los ratones deficientes de CD5 se ha descrito la hiperfosforilación de diversas proteínas, lo cual se debe a un incremento de las señales del TCR desde la parte proximal de la vía de señalización, lo que se determinó por un incremento en la fosforilación de Zap70 y un incremento en los flujos de Ca²⁺ [84]. Para determinar si el dominio de unión a CK2, de alguna forma está regulando las señales proximales del TCR, se realizó la medición de los flujos de calcio en las distintas subpoblaciones tímicas tanto de ratones WT como de ratones CK2. Como se puede observar en nuestros resultados, la movilización de Ca²⁺ intracelular se da de manera idéntica en ambos ratones, demostrando por completo que a pesar de que el dominio de unión de CK2 regula procesos de selección altamente relacionados con las señales del TCR, la forma en la que este dominio regula estos procesos no es a través de la modulación de todas las señales del TCR sino muy probablemente de la vía de las MAPK río

debajo de la región proximal del TCR y de una forma no canónica a lo previamente descrito para CD5.

Adicionalmente, debido a que en ratones adultos se ha descrito que la supervivencia de los timocitos se ve disminuida cuando se da una hiperactivación en periferia y muerte celular inducida por activación en periferia, decidimos analizar ratones neonatos (menos de 24h de edad) para determinar que los efectos observados son intrínsecos a los timocitos y no dependen de la muerte celular inducida en periferia. Como se observa en los resultados, al inyectar α -CD3 y activar los timocitos de los ratones *in vivo*, la población de linfocitos DP de los ratones deficientes del dominio de unión a CK2 se ve disminuida, lo que comprueba que la susceptibilidad a la muerte por parte de estas células sí es algo intrínseco y no solamente un efecto regulador por la activación en periferia. Más aún, el análisis de ERK mostró un mayor incremento tras la activación con α CD3 en los ratones CD5-CK2 Δ BD, comparados con los ratones WT, mismo efecto observado en adultos. Interesantemente, los niveles de ERK basal son menores en los ratones CD5-CK2BD neonatos, lo cual difiere de los adultos y sugiere que durante las distintas fases del desarrollo de los ratones (fase neonatal), ERK puede jugar un papel más importante en regular las señales del TCR vs apoptosis [104, 105]. Para determinar si los niveles de ERK se relacionan con otras señales del TCR o supervivencia se determinaron los niveles de Bcl-2, pJNK y pP38. Interesantemente, los niveles de ERK basales y tras activación correlacionaron perfectamente con los niveles de Bcl-2 basales y tras activación, sugiriendo un papel importante de ERK para modular supervivencia en esta fase del desarrollo. Adicionalmente, se observó que los niveles de pJNK son muy similares a los niveles de pERK, ambas proteínas participan de manera similar y fundamental en los procesos de selección, en este caso los ratones CD5-CK2BD siempre presentaron mayores niveles de pJNK tras activación, no así de pP38 que permaneció sin afectarse [57, 122], lo que podría explicar, al menos parcialmente, el incremento en la muerte de los linfocitos CD4⁺ SP (mayor selección negativa). Finalmente, el análisis de Zap70 como efector de las señales proximales del TCR mostró que a pesar de que en DP existe una tendencia a tener más pZap70 en ausencia del

dominio de unión a CK2, este dominio de CD5 no parece afectar de manera relevante las señales proximales del TCR.

Finalmente y debido a que se ha descrito que CK2 es capaz de regular la entrada de ERK al núcleo y ERK requiere estar en el núcleo para ejercer su función sobre algunos factores de transcripción (AP-1), decidimos analizar si de alguna forma la ausencia del dominio de unión a CK2 afectaba la entrada de pERK al núcleo [103]. Como se puede observar en los datos de citometría de flujo acoplada a imágenes, al cuantificar la cantidad de pERK presente en el núcleo vs total o citoplasma vs total, siempre se encontró un incremento en todas las localizaciones subcelulares (incluyendo citoplasmático y nuclear), por lo que es muy probable que es el CK2 no unido a CD5 el que modula la entrada de esta proteína al núcleo.

Debido a que no se encontraron diferencias en las señales proximales del TCR, debe existir un mecanismo por el cual CK2 regule de manera más directa las vías de señalización que involucran a las MAPK. En este contexto se ha observado que CK2 α interactúa con la fosfatasa PP2A y que esto modula los niveles de ERK, lo que podría explicar por qué solo se ve afectada la vía de ERK y JNK; sin embargo, se requieren más estudios para poder determinar si este es el mecanismo principal de acción del dominio de unión a CK2 de CD5.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis demuestran un papel fundamental de CK2 en la regulación de la selección de los linfocitos T, así como de su supervivencia por medio del control de los niveles de pERK independientemente de las señales proximales del TCR. Estos datos también sugieren que no todos los procesos de selección modulados por CD5 están afectados por las señales proximales del TCR, lo que sugiere que existen dominios encargados de modular esas señales (Pseudo-ITIM), así como existen dominios encargados de modular los procesos de selección de otra forma.

CONCLUSIONES

1. CD5 es capaz de modular la supervivencia de los linfocitos T por medio de las tirosinas Y429, Y441, Y463 así como del dominio de unión a CK2.
2. Los residuos de tirosina pueden modular la supervivencia de los linfocitos T aún sin afectar los niveles de activación de Caspasa 3.
3. Las tirosinas Y429/441 de CD5 protegen a los linfocitos T de la muerte celular inducida por activación (AICD).
4. El dominio comprendido por las tirosinas Y429/441 regula negativamente los niveles de las señales del TCR, medido por ERK, por lo cual su previa denominación como Pseudo-ITAM debe ser substituida por Pseudo-ITIM.
5. A pesar de que CD5 regula la fosforilación de AKT en timocitos, no es a través de las tirosinas Y429, 441, 463 ni del dominio de unión a CK2 que lleva a cabo estas funciones.
6. El dominio de unión a CK2 modula los procesos de selección positiva, selección negativa, y elección de linaje de los linfocitos T por medio de un mecanismo que modula la fosforilación de ERK sin afectar las señales proximales del TCR.
7. El CD5-CK2BD regula la supervivencia de los linfocitos T por medio de la modulación de proteínas como Bcl-2 y de la activación de la Caspasa 3.
8. La unión de CK2 a CD5, no regula la entrada de pERK 1/2 al núcleo en respuesta a la activación del TCR.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha demostrado por primera vez el rol de las tirosinas Y429 y Y441 en la regulación de la supervivencia de los timocitos y en la modulación a través del dominio “Pseudo-ITIM” de las señales del TCR. Sin embargo, es importante señalar que estos hallazgos solo demuestran un mecanismo que tiene lugar en líneas celulares de timoma *in vitro* y no pueden extrapolarse directamente a como afectará este dominio al desarrollo de los linfocitos T *in vivo*. Adicionalmente, se ha mencionado que el ratón deficiente de CD5 presenta un incremento en diversas proteínas el cual depende de las señales proximales del TCR (incremento en Zap70 y flujos de Calcio); sin embargo, nuestros datos no muestran un incremento en flujos de calcio en ausencia del dominio de unión a CK2.

Para resolver estas preguntas, se ha diseñado un ratón que posee mutaciones puntuales Y/A en los residuos 429 y 441 del dominio ITIM, utilizando una estrategia experimental similar a la de la generación del ratón CD5-CK2BD. En este ratón se podrá determinar si este dominio es el encargado de regular las señales proximales del TCR, así como observar su efecto en el desarrollo de los linfocitos T.

Otros aspectos de la biología de CD5 que quedan aún por resolver, es si el dominio CD5-CK2BD como el dominio pseudo-ITIM regulan la generación de células T reguladoras inducidas en periferia. Para esto, la utilización de ambos ratones será fundamental.

Finalmente, la Tirosina 463, podría tener una relevancia especial en los mecanismos de protección a apoptosis, dado su potencial de reclutar a PIR3K y c-Cbl, ya que se ha demostrado, regula la fosforilación y reclutamiento de esta última. Por ello, la función de este residuo debe ser estudiada más a fondo *in vivo*. Debido a que por el momento no se tiene un modelo *in vivo* que permita estudiar los efectos de esta tirosina en la supervivencia y desarrollo *in vivo* de los linfocitos T, se ha decidido recurrir a la reconstitución de ratones sub-lealmente irradiados con progenitors de ratones CD5KO transducidos retroviralmente con la mutante Y463A.

REFERENCIAS

1. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
2. Yin, Q., et al., *Structural biology of innate immunity*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 393-416.
3. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. Eighth edition. ed. 2015, Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. viii, 535 pages.
4. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *Encyclopedia of immunology*. 2nd ed. 1998, San Diego: Academic Press.
5. Boehm, T., *Thymus development and function*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 178-84.
6. Romano, R., et al., *FOXP1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 187.
7. Takada, K., et al., *Development and function of cortical thymic epithelial cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **373**: p. 1-17.
8. Anderson, G., et al., *Mechanisms of thymus medulla development and function*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **373**: p. 19-47.
9. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
10. Bleul, C.C. and T. Boehm, *Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3371-9.
11. Liu, C., et al., *The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi*. Blood, 2005. **105**(1): p. 31-9.
12. Wurbel, M.A., et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2626-32.
13. Ara, T., et al., *A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4649-55.
14. Rossi, F.M., et al., *Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 626-34.
15. Plotkin, J., et al., *Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4521-7.
16. Zlotoff, D.A., et al., *CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1897-905.
17. Krueger, A., et al., *CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1906-12.
18. Petrie, H.T. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 649-79.
19. Porritt, H.E., K. Gordon, and H.T. Petrie, *Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 957-62.
20. Wang, H., L.J. Pierce, and G.J. Spangrude, *Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T-cell differentiation culture system*. Exp Hematol, 2006. **34**(12): p. 1730-40.
21. Schmitt, T.M., et al., *Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 469-79.

22. Livak, F., et al., *Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2575-80.
23. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Determining gammadelta versus alphass T cell development*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 657-63.
24. Uehara, S., et al., *A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2811-9.
25. Uehara, S., et al., *Premature expression of chemokine receptor CCR9 impairs T cell development*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 75-84.
26. Benz, C., K. Heinzl, and C.C. Bleul, *Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development*. Eur J Immunol, 2004. **34**(12): p. 3652-63.
27. Petrie, H.T., et al., *T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 121-7.
28. Saint-Ruf, C., et al., *Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene*. Science. 1994. 266: 1208-1212. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5165-9.
29. Mallis, R.J., et al., *Pre-TCR ligand binding impacts thymocyte development before alphabetaTCR expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(27): p. 8373-8.
30. Petrie, H.T., et al., *Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 615-22.
31. Egerton, M., R. Scollay, and K. Shortman, *Kinetics of mature T-cell development in the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2579-82.
32. Egerton, M., K. Shortman, and R. Scollay, *The kinetics of immature murine thymocyte development in vivo*. Int Immunol, 1990. **2**(6): p. 501-7.
33. Azzam, H.S., et al., *CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2301-11.
34. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
35. Gavin, M.A. and A.Y. Rudensky, *Dual TCR T cells: gaining entry into the periphery*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 109-10.
36. Singer, A., S. Adoro, and J.H. Park, *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 788-801.
37. Chan, S.H., et al., *Another view of the selective model of thymocyte selection*. Cell, 1993. **73**(2): p. 225-36.
38. Davis, C.B., et al., *Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes*. Cell, 1993. **73**(2): p. 237-47.
39. Irie, H.Y., et al., *The cytoplasmic domain of CD8 beta regulates Lck kinase activation and CD8 T cell development*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 183-91.
40. Itano, A., et al., *The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 731-41.
41. Yasutomo, K., et al., *The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 506-10.
42. Kurobe, H., et al., *CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 165-77.
43. Mouchess, M.L. and M. Anderson, *Central tolerance induction*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **373**: p. 69-86.
44. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 457-62.
45. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1181-5.

46. Love, P.E. and A. Bhandoola, *Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(7): p. 469-77.
47. Love, P.E. and E.W. Shores, *ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?* Immunity, 2000. **12**(6): p. 591-7.
48. Hashimoto, K., et al., *Requirement for p56lck tyrosine kinase activation in T cell receptor-mediated thymic selection*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 931-43.
49. Negishi, I., et al., *Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes*. Nature, 1995. **376**(6539): p. 435-8.
50. Zhang, W., et al., *Essential role of LAT in T cell development*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 323-32.
51. Shirane, M., et al., *Deficiency of phospholipase C-gamma1 impairs renal development and hematopoiesis*. Development, 2001. **128**(24): p. 5173-80.
52. Oukka, M., et al., *The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 295-304.
53. Lucas, J.A., L.O. Atherly, and L.J. Berg, *The absence of Itk inhibits positive selection without changing lineage commitment*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6142-51.
54. Bettini, M., et al., *Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1713-20.
55. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1336): p. 127-34.
56. McNeil, L.K., T.K. Starr, and K.A. Hogquist, *A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13574-9.
57. Rincon, M. and G. Pedraza-Alva, *JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 131-42.
58. Rincon, M., et al., *The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1817-30.
59. Sugawara, T., et al., *Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes*. Immunity, 1998. **9**(4): p. 565-74.
60. Johnson, A.L., et al., *Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 831-9.
61. Fu, G., et al., *Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 441-5.
62. Paster, W., et al., *A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival*. EMBO J, 2015. **34**(3): p. 393-409.
63. Fu, G., et al., *Fine-tuning T cell receptor signaling to control T cell development*. Trends Immunol, 2014. **35**(7): p. 311-8.
64. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
65. Hogquist, K.A. and S.C. Jameson, *The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function*. Nat Immunol, 2014. **15**(9): p. 815-23.
66. Reinherz, E.L., et al., *A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells*. J Immunol, 1979. **123**(3): p. 1312-7.
67. Boumsell, L., et al., *An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic lymphocytic leukemic cells. Distribution on normal and malignant lymphoid cells*. J Exp Med, 1980. **152**(1): p. 229-34.
68. Soldevila, G., C. Raman, and F. Lozano, *The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(3): p. 310-8.

69. Van de Velde, H., et al., *The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5*. Nature, 1991. **351**(6328): p. 662-5.
70. Brown, M.H. and E. Lacey, *A ligand for CD5 is CD5*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 6068-74.
71. Azzam, H.S., et al., *Fine tuning of TCR signaling by CD5*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5464-72.
72. Tung, J.W., et al., *The regulation of CD5 expression in murine T cells*. BMC Mol Biol, 2001. **2**: p. 5.
73. Ledbetter, J.A., et al., *T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views*. J Exp Med, 1980. **152**(2): p. 280-95.
74. Ceuppens, J.L. and M.L. Baroja, *Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3*. J Immunol, 1986. **137**(6): p. 1816-21.
75. Spertini, F., et al., *Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5*. J Immunol, 1991. **146**(1): p. 47-52.
76. Simarro, M., et al., *The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4307-15.
77. Simarro, M., et al., *Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5149-55.
78. Raman, C. and R.P. Kimberly, *Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5817-20.
79. Raman, C., et al., *Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19183-9.
80. Calvo, J., et al., *Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II*. Journal of immunology, 1998. **161**(11): p. 6022-9.
81. Dennehy, K.M., et al., *Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5*. Int Immunol, 2001. **13**(2): p. 149-56.
82. Vila, J.M., et al., *Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1191-8.
83. Vila, J.M., et al., *Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 396-402.
84. Tarakhovsky, A., et al., *A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection*. Science, 1995. **269**(5223): p. 535-7.
85. Tarakhovsky, A., W. Muller, and K. Rajewsky, *Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice*. Eur J Immunol, 1994. **24**(7): p. 1678-84.
86. Gary-Gouy, H., et al., *CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 232-9.
87. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5*. Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 679-86.
88. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1617-25.
89. Bamberger, M., et al., *A new pathway of CD5 glycoprotein-mediated T cell inhibition dependent on inhibitory phosphorylation of Fyn kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30324-36.

90. Zhou, X.Y., et al., *CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1260-8.
91. Axtell, R.C., et al., *Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2928-32.
92. Trembley, J.H., et al., *Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1858-67.
93. Di Maira, G., et al., *Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB*. Cell Death Differ, 2005. **12**(6): p. 668-77.
94. Ahmad, K.A., et al., *Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis*. Adv Enzyme Regul, 2008. **48**: p. 179-87.
95. Axtell, R.C., et al., *CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8542-9.
96. Sestero, C.M., et al., *CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2918-30.
97. McGuire, D.J., et al., *CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization*. Eur J Immunol, 2014. **44**(4): p. 1137-42.
98. Friedlein, G., et al., *Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6821-7.
99. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
100. Ordonez-Rueda, D., et al., *Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2233-47.
101. Barnden, M.J., et al., *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements*. Immunol Cell Biol, 1998. **76**(1): p. 34-40.
102. Heriche, J.K., et al., *Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha*. Science, 1997. **276**(5314): p. 952-5.
103. Plotnikov, A., et al., *Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(17): p. 3515-30.
104. Xue, Y., et al., *Anti-CD3 induced thymocyte apoptosis in vivo require the antibody Fc domain*. Scand J Immunol, 2000. **51**(5): p. 441-6.
105. Shi, Y.F., B.M. Sahai, and D.R. Green, *Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes*. Nature, 1989. **339**(6226): p. 625-6.
106. Roa, N.S., et al., *The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **432**(1): p. 52-9.
107. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. Science, 2008. **320**(5876): p. 667-70.
108. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
109. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4).
110. Ferraro-Peyret, C., et al., *Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4805-10.

111. Tibaldi, E., et al., *Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. *Leukemia*, 2011. **25**(11): p. 1768-81.
112. Teixeira, E. and M.A. Daniels, *ERK and cell death: ERK location and T cell selection*. *FEBS J*, 2010. **277**(1): p. 30-8.
113. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, *You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(7): p. 1646-53.
114. Mier-Aguilar, C.A., et al., *Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015.
115. Calvo, J., et al., *Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6022-9.
116. Chan, S., et al., *An influence of CD5 on the selection of CD4-lineage T cells*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(9): p. 2916-22.
117. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
118. Sinclair, C. and B. Seddon, *Overlapping and asymmetric functions of TCR signaling during thymic selection of CD4 and CD8 lineages*. *J Immunol*, 2014. **192**(11): p. 5151-9.
119. Miyata, Y. and E. Nishida, *CK2 binds, phosphorylates, and regulates its pivotal substrate Cdc37, an Hsp90-cochaperone*. *Mol Cell Biochem*, 2005. **274**(1-2): p. 171-9.
120. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
121. Luckey, M.A., et al., *The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(7): p. 638-45.
122. Rincon, M., R.A. Flavell, and R.A. Davis, *The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(9): p. 1328-37.

PUBLICACIONES



Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival



Carlos A. Mier-Aguilar^a, Benjamin Vega-Baray^a, Erica Burgueño-Bucio^a, Francisco Lozano^b, Eduardo A. García-Zepeda^a, Chander Raman^c, Gloria Soldevila^{a,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico

^b Servei d'Immunologia, Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBABS), Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^c Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Departments of Medicine, and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2015

Accepted 5 September 2015

Available online 9 September 2015

Keywords:

CD5
TCR
Signaling
Tyrosines
Apoptosis
Phosphorylation

ABSTRACT

CD5 has been mainly described as a negative regulator of TCR and BCR signaling and recent evidence has shown an important role for this receptor in delivering pro-survival signals. However, the molecular mechanisms underlying these processes remain unresolved. TCR crosslinking leads to phosphorylation of three tyrosine residues within the cytoplasmic tail of CD5 (Y429, Y441 and Y463) leading to the recruitment of signaling molecules like PI3K, c-Cbl and RasGAP; nevertheless, the role of these residues in T cell survival has not yet been assessed. In this study, we show that alanine-scanning mutagenesis of such tyrosine residues, either singly or in combination, leads to an increased thymocyte cell death with or without α -CD3 stimulation. Remarkably, the T-cell death observed with each individual tyrosine mutant was Caspase 3-independent. Furthermore, Y429 mutation resulted in a hyper-phosphorylation of ERK suggesting that this tyrosine residue regulates cell survival through down modulation of TCR signaling. Mutation of Y441 or Y463 did not induce hyper-responsiveness to TCR activation, indicating that they promoted T-cell survival by a TCR signal-independent pathway. Our results show that three tyrosine-based domains within CD5 cytoplasmic tail promote T-cell survival through non-overlapping mechanisms. This study also reveals that Y429 domain of CD5, previously described as a “pseudo ITAM”, is functionally an ITIM domain in T cells.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

CD5 is a 67 kDa receptor, expressed both in developing and mature T cells and in a subset of B cells known as B1a cells. Additionally, an aberrant expression of this receptor has been observed both in T cell and B cell malignancies, such as B cell chronic lymphocytic leukemias (BCLL) and some T cell leukemias [1]. Despite it has been described as a major negative regulator of both BCR and TCR signaling it does not possess an intrinsic catalytic activity and thus its signaling properties rely on the binding of other proteins to its different cytoplasmic residues (reviewed in Ref. [2]).

Several Serine/Threonine and Tyrosine residues within the CD5 cytoplasmic tail enable signal transduction both dependently and/or independently of TCR signaling. Three major signal transduction-related motifs can be found within the cytoplasmic region of CD5. First, a “pseudo-ITAM” domain, comprising Y429 and Y441 residues; second, a Casein Kinase 2 (CK2) binding domain (S458–S461) (CK2-BD) near the carboxy-terminal region of CD5 [3] and finally a distal Y463 residue [4,5]. Upon TCR engagement, these domains become phosphorylated allowing the recruitment of several signaling proteins including p56lck, TCR ζ chain, PI3K, c-Cbl, RasGAP [6,7] and CK2 [8]. Deletion of CD5 results in an enhanced phosphorylation of different TCR mediators, such as PLC γ , TCR ζ , ERK as well as enhanced mobilization of Ca²⁺ in both B cells and T cells [9,10] demonstrating its role in TCR signaling down modulation *in vivo*.

In addition to its role as negative regulator, growing evidence supports the function of CD5 in protection from apoptosis in T and B

* Corresponding author. Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México, Distrito Federal, CP04510, México.

E-mail address: soldevi@unam.mx (G. Soldevila).

cells (reviewed in Ref. [2]). Interestingly, a nonsynonymous SNP (rs2229177; V471A) was identified in B cell chronic Leukemia (B-CLL) patients showing poor prognosis after chemotherapy [11], which appears to be functionally relevant for TCR mediated signaling and autoimmunity [12,13]. Furthermore, experiments performed in an EAE model demonstrated that the absence of CD5 resulted in enhanced activation induced cell death (AICD) of autoreactive T lymphocytes, leading to a less severe disease [14]. Moreover, utilization of a CD5 Δ CK2BD deficient mouse showed that this domain plays a central role in peripheral T cell survival, as deletion of this region resulted in enhanced apoptosis in response to CD3-crosslinking, which correlated with a reduction of Akt and GSK3 β phosphorylation [14–16]. Recently, our group has demonstrated that deletion of CD5 also decreases survival of developing thymocytes, which show impaired Akt phosphorylation in response to CD3 plus CD28 crosslinking [17]. The molecular mechanisms by which CD5 affects the PI3K/Akt pathway in thymocytes remain unresolved, despite some data argue in favor of the carboxy-terminal region playing a role in PI3K activation [18,19]. One report showed that MAPK ERK1/2 plays a role in protection from apoptosis in thymocytes by a mechanism that involves Bcl2 up-regulation [20], although the residues within CD5 cytoplasmic tail responsible for this effect are currently unknown. Interestingly, MAPK p38 was also shown to promote thymocyte survival by inactivation of GSK3 β independently of Akt activation [21], although the involvement of CD5 in this pathway was not assessed.

Despite the increasing evidence of CD5 as a modulator of TCR signaling and T cell survival it is unknown whether the tyrosine residues present in the cytoplasmic tail of CD5 play a role in these functions. In this work, we demonstrate that Y429, Y441 and Y463 are relevant for CD5-mediated thymocyte survival independently of Akt phosphorylation. Furthermore, we provide the first evidence that in T cells, Y429 is required for CD5-negative regulation of TCR signaling, providing a link between CD5-mediated TCR activation and thymocyte survival. In contrast, Y441 and Y463 appeared to promote thymocyte survival by an alternative mechanism unrelated to ERK phosphorylation downstream the TCR.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

α -mouse CD3 ϵ PE-Cy5 (α -mCD3) (145-2C11), α -mouse CD5 AF647 (α -mCD5) (53-7.3), biotin-labeled α -mouse CD3 ϵ (α -CD3), biotin-labeled α -mouse CD28 (α -CD28) (37.51) and 7-AAD were purchased from Biolegend (San Diego, CA). α -Akt PE (pS473) (M89-61) (α -pAkt), α -ERK1/2 (pT202/pY204) (α -pERK), α -Active Caspase-3 PE (C92-605) were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Annexin V-FITC was purchased from Beckman Coulter (Brea, CA). The following secondary reagents were used: goat α -mouse IgG-FITC (ZyMax™ Grade, Invitrogen, Carlsbad, CA); mouse α -human CD5 (α -hCD5) mAb (Cris-1) and biotin-labeled mouse α -human CD5 (α -hCD5), as previously described [22]. Immunopure® Streptavidin Affinity Purified was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

2.2. Cell lines and transfection

We used the EL4 cell line for transfection and generation of different CD5 mutant expressing clones. The transfection process was previously described in Ref. [19]. Briefly, 10^7 EL4 cells were transfected with 10 μ g of Nde-I linearized wild-type and mutant CD5 constructs. The generation and cloning of human CD5 constructs (WT, Y429A, Y441A, Y463A and YYY/AAA) was done as previously reported [4]. Using G418 as a selection marker, clones were enriched; after this, the different mutants were selected for similar mCD3^{hi} and hCD5^{hi} expression using a FACSAria I Cell Sorter (BD Biosciences).

2.3. Annexin V/7-AAD assay

EL4-transfected hCD5 mutants were maintained either unstimulated (control), or stimulated with 10 μ g/mL of α -CD3 \pm 10 μ g/mL of α -CD28 + 10 μ g/mL of Immunopure Streptavidin for 24 h in DMEM 10%. After the incubation period, apoptosis determination

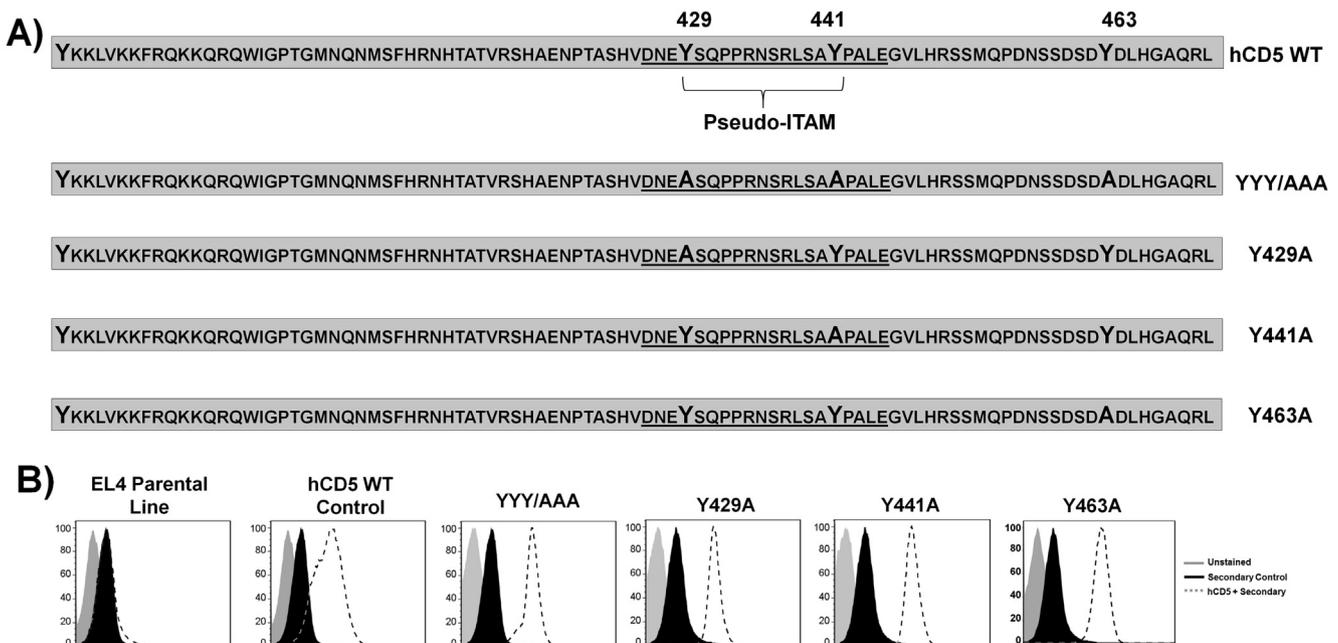


Fig. 1. Generation of EL4 cells expressing tyrosine hCD5 mutants. (A) Schematic representation of the CD5 cytoplasmic region, indicating the mutants used in this study. Pseudo-ITAM region is underlined on the different mutants. (B) Surface hCD5 expression demonstrates similar levels in all mutant clones and absence of expression in the parental thymoma line EL4.

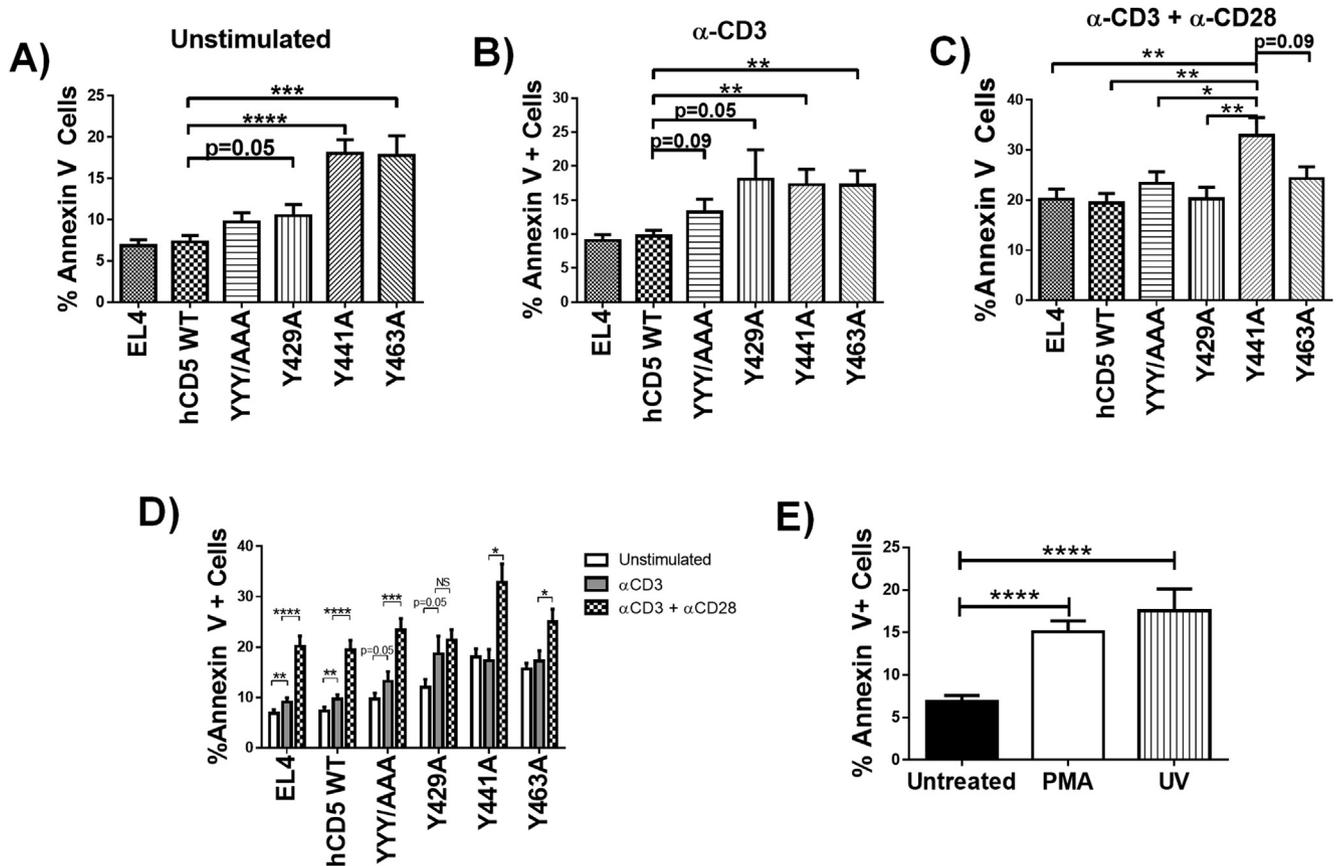


Fig. 2. CD5 residues Y429, Y441 and Y463 promote thymocyte survival. (A–E) The parental EL4 line and hCD5 tyrosine mutants were analyzed for apoptosis by using Annexin V and 7-AAD staining. (A) Apoptosis levels in the different mutants in absence of stimulation (B) Annexin V+ cells after anti-CD3 stimulation of the different hCD5 mutants for 24 h. (C) Co-stimulation of hCD5 mutants and parental line with α -CD3 + α -CD28 antibodies in the different hCD5 mutants for 24 h, Annexin V+ cells are represented. (D) Representation of the different stimulation conditions of all the hCD5 mutants and EL4 parental line. (E) As positive control for apoptosis EL4 cells were stimulated with PMA (1 μ g/mL for 24 h) or exposed to UV-light (15 min). Data represent mean values \pm SEM (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

was performed using Annexin V and 7-AAD as previously described in Ref. [23]. Briefly, staining was performed in EL4-hCD5 mutants with Annexin V FITC and 7-AAD in the presence of a Ca^{2+} enriched solution, Annexin V Binding Buffer from Beckman Coulter. Immediately after, samples were acquired in an Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) and analyzed with FlowJo Software (Treestar, Inc., Ashland, OR).

2.4. Active Caspase 3 determination

The same protocol used for Apoptosis determination with Annexin V/7-AAD was utilized to stimulate the EL4-hCD5 mutants for active Caspase 3 determination. After the incubation period, α -active Caspase-3 staining was performed. PMA stimulation was used as positive control of Caspase 3 activation. Briefly, cells were fixed with 0.5% paraformaldehyde and then stained-permeabilized with α -active Caspase 3 diluted in 0.01% saponin. Immediately after, samples were acquired in an Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) and analyzed with FlowJo Software[®] (Treestar, Inc.).

2.5. ERK and Akt phosphorylation

To assess if there were differences in ERK and Akt phosphorylation between the different mutants, acute stimulation of the TCR was performed. To do this, α -CD3 \pm α -CD28 cross-linking (5 min) with Immunopure Streptavidin was performed; different amounts

of α -CD3 and α -CD28 were used to perform the ERK assays and Akt assays. For ERK phosphorylation 10 μ g/mL of α -CD3 and α -CD28 were used; for Akt phosphorylation 5 μ g/mL of each antibody were used. To perform the intracellular staining we used the phosphoflow protocol (BD Biosciences), as previously described [19]. Samples were acquired in an Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) and analyzed with FlowJo Software (Treestar, Inc.).

2.6. Statistical analysis

Statistical Analysis was performed using the Prism Graph Pad Software. Unpaired, two-tailed Student t test was used for statistical analysis. P values $p < 0.05^*$ were considered as statistically significant. Asterisks were used to indicate $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$.

3. Results and discussion

3.1. Y429, Y441 and Y463 promote CD5-mediated thymocyte survival

To address the role of the cytoplasmic tyrosines in CD5-dependent T cell survival, we transfected a thymocyte-derived cell line (EL4) with human CD5 (hCD5) expression constructs encoding WT hCD5 or mutant hCD5 in which nucleotides encoding the three tyrosines of the CD5 cytoplasmic tail were singly or in combination mutated to encode alanines (Fig. 1A). Stable EL-4

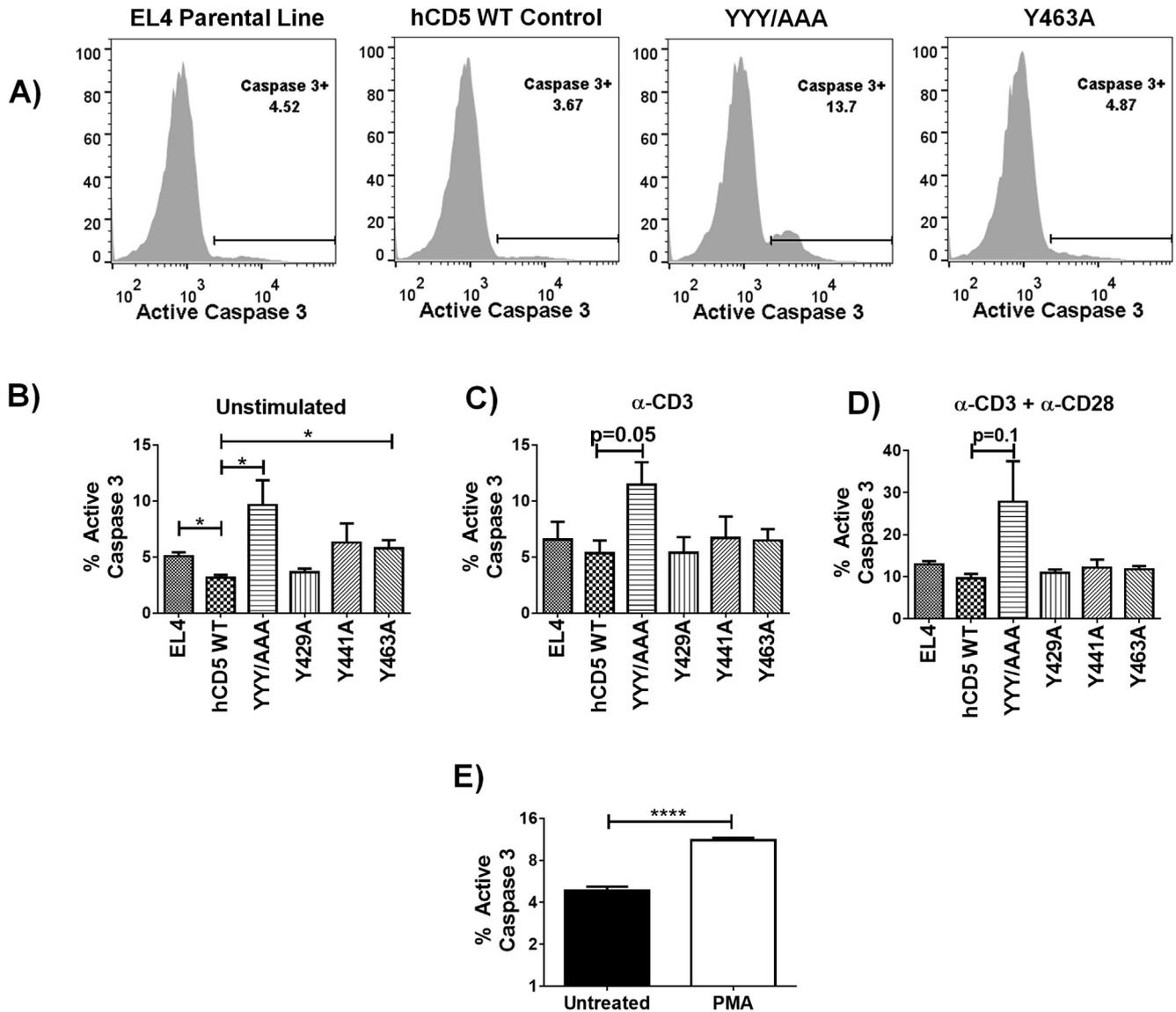


Fig. 3. Simultaneous deletion of Y429, Y441 and Y463 results in enhanced Caspase 3 activation. (A) Representative histograms showing the intracellular levels of active Caspase 3 in the EL4 parental line, hCD5 WT, YYY/AAA and Y463A mutants. (B) Active Caspase 3 levels in the different mutants under basal conditions (C) or after 24 h of α -CD3 stimulation (D) or α -CD3 + α -CD28 costimulation. (E) As a positive control for activation of caspase 3 EL4 cell line was stimulated with PMA (1 μ g/ml). Data represent mean values \pm SEM (n = 4 independent experiments). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

clones were selected for equivalent expression of hCD5 (Fig. 1B) (see materials and methods). In comparison to untransfected or hCD5 WT expressing EL4 cells, basal and α -CD3 induced apoptosis was significantly greater in EL4 cells expressing hCD5 with Y429A, Y441A or Y463A mutations (Fig. 2A and B). Remarkably, Y441A and Y463A mutant hCD5 expressing EL4 cells displayed higher levels of apoptosis under basal conditions that was not further increased by α -CD3, indicating that these tyrosines promoted survival independently of TCR signaling (Fig. 2A,B and D). However, cell death in EL4 cells expressing either wild-type or triple Y-mutated hCD5 was not significantly altered under both basal and α -CD3 stimulation conditions. CD28 co-stimulation, which amplifies TCR/CD3 induced T cell activation (reviewed in Ref. [24]), resulted in higher apoptosis only in Y441A transfectants when compared to other EL4 transfected cells (Fig. 2C). Furthermore, comparing the levels of apoptosis induced by α -CD3 vs α -CD3 + CD28 stimulation, Y429A transfectants were the only ones in which CD28 costimulation did not enhance apoptosis (Fig. 2D). This observation raises the

possibility that Y429 regulates proximal TCR/CD3 induced activation independently of CD28-mediated costimulatory signals, even though suboptimal CD3 stimulation conditions should be used to confirm this possibility. Altogether, the data suggest that different CD5 cytoplasmic tyrosines promote survival through independent mechanisms.

3.2. Simultaneous deletion of Y429, Y441 and Y463 results in enhanced Caspase 3 activation

Previous work by our group demonstrated that thymocytes from CD5^{-/-} mice display enhanced apoptosis, as demonstrated by Annexin V/7-AAD staining, which correlated with an increased percentage of thymocytes expressing the active form of Caspase 3 [17]. Therefore, we analyzed activation of Caspase 3 in the EL4 clones expressing the different hCD5 mutants (Fig. 3). In contrast to that observed with Annexin V staining, the absence of all CD5 cytoplasmic tyrosines (YYY/AAA) resulted in an enhanced

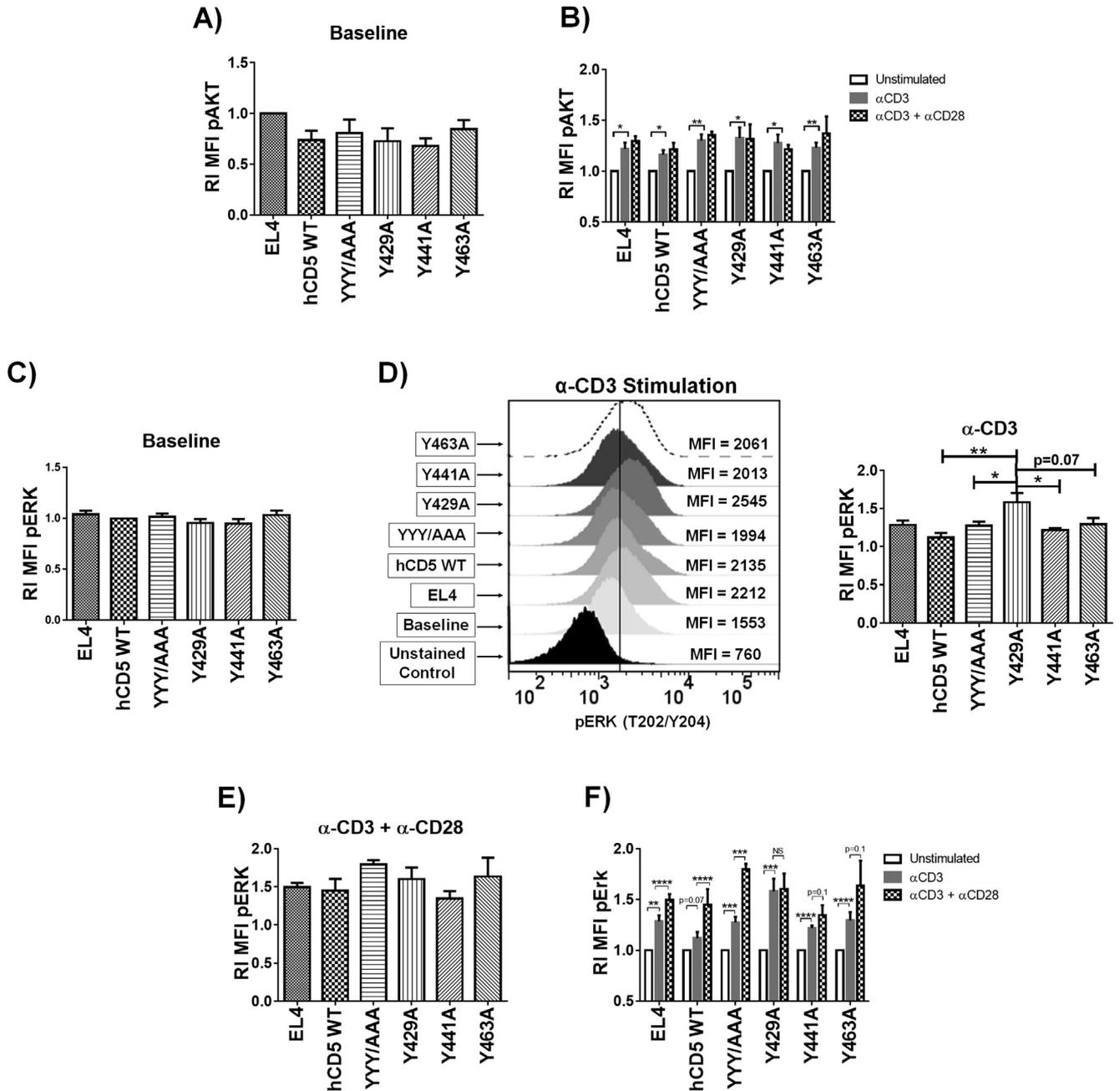


Fig. 4. The absence of Y429 induces enhanced TCR mediated Erk phosphorylation, without affecting p-Akt levels. (A) Akt S473 phosphorylation baseline in the EL4 parental line and the different CD5 mutants. (B) Summary of Akt (S473) phosphorylation levels in the EL4 parental line and hCD5 clones without stimulation, after α -CD3 stimulation and α -CD3 plus α -CD28 stimulation. (C) ERK 1/2 baseline phosphorylation in EL4 parental line and hCD5 mutants. (D) Left, representative experiment of ERK 1/2 phosphorylation levels after α -CD3 stimulation in the EL4 parental line and the different hCD5 mutants; right, graph representing the summary of the data. (E) ERK 1/2 phosphorylation levels after co-stimulation with α -CD3 plus α -CD28 in the EL4 parental line and hCD5 mutants. (F) Summary of ERK 1/2 phosphorylation showing baseline, α -CD3 stimulation or α -CD3 plus α -CD28 co-stimulation. Values are expressed as relative MFI (Mean Fluorescence Intensity), calculated by dividing the MFI from each clone by that of hCD5 WT clone (baseline). For stimulated clones, MFI of each stimuli was divided by basal MFI for each clone. Data represent mean values \pm SEM (n = 4 independent experiments). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

activation of Caspase 3 under basal conditions. On the other hand, the mutation of Y463 recapitulated the effect observed with Annexin V staining, showing increased cell death in unstimulated cells (Fig. 3B). As the Y463 residue is located juxtaposed to the CD5-CK2 binding domain, to which CK2 is constitutively associated [8], the alanine substitution of Y463 might either directly or indirectly affect survival, as it is yet unknown whether the CD5-CK2BD may affect the biology of the Y463 residue or vice versa.

As an alternative method to detect apoptosis, we also performed analysis of active Caspase 3 after TCR activation, which has been

previously used as an indicator of thymocyte cell death induced during negative selection [25]. EL4 cells stimulated with PMA were used as control (Fig. 3E). Unexpectedly, individual mutations of the cytoplasmic tyrosines of CD5 did not result in an enhanced activation of Caspase 3 (Fig. 3C and D), in contrast to the result with Annexin V staining and to our previous report in CD5^{-/-} mice [17]. This could be explained by differences in sensitivity of apoptosis detection between active Caspase 3 and Annexin V staining or might indicate different detection kinetics. Alternatively, the data may indicate that CD5 tyrosines regulate both Caspase 3-independent

and -dependent cell death, with caspase 3-cell death being less prominent and therefore requiring absence of more than one tyrosine to be detectable. Moreover, it has been reported that surface phosphatidylserine (PS) expression in T cells does not always correlate with the activation of effector caspases (Caspases 3 and 8) and that their effect on PS exposure might depend upon the apoptotic triggering event or signaling pathways related to it [26]. On the other hand, the apoptosis induced by inhibition of SHP-1 recruitment to CD5 in B-CLLs was shown to be independent of caspase activation. Therefore, CD5-mediated survival does not always correlate with the levels of caspase activation [27]. Finally, though Caspase 3 has been long recognized as an effector caspase in thymocyte apoptosis, we cannot rule out the possibility of other effector caspases, such as Caspase 6 or 7 [28] being involved in CD5-mediated survival in thymocytes.

3.3. Mutation of Y249, Y441 and Y463 residues do not affect Akt phosphorylation

Our group and others have previously described a possible relationship between CD5 and the PI3K/Akt pathway [6,17]. Moreover, we have recently reported that deletion of the carboxy-terminal region of CD5 is required for c-Cbl association and Vav degradation, which would presumably associate with CD5 through the recruitment of PI3K to the Y463 [19]. Since PI3K/Akt is a major cell survival pathway we sought to determine whether substitution of any of the hCD5 tyrosines resulted in defects in Akt activation. Surprisingly, we did not observe any differences in Akt phosphorylation between WT and tyrosine-mutated hCD5 either at basal conditions or after stimulation (Fig. 4A). These data are contrary to our previous report that demonstrated that the increased apoptosis of CD5^{-/-} thymocytes was correlated with impaired Akt phosphorylation [17]. Furthermore, as shown in Fig. 4B, CD28 costimulation did not increase Akt phosphorylation compared to α -CD3 stimulation alone in any of the clones, similarly to the response observed in murine thymocytes (not shown). Altogether, the data indicate that CD3-dependent phosphorylation is not influenced by the status of CD5 tyrosine residues and that phospho-Akt levels cannot explain the increased apoptosis observed in these hCD5 mutant EL-4 clones. However, it has been recently demonstrated that p38 MAPK might be an alternative pathway for Akt-related survival pathways such as GSK3 β inactivation [21]. The activation of p38 through a CD5-dependent pathway remains a possibility that needs to be further explored. In this context, it has been postulated that p38 might be activated downstream of CD5 signaling through a Calmodulin-dependent kinase IV (CaMKIV) [29,30].

3.4. Y429 down regulates ERK phosphorylation in response to TCR stimulation

As the TCR signaling threshold has a central role in regulating survival versus cell death during thymocyte development, CD5 may protect from apoptosis by regulating TCR downstream effectors. Thus, we analyzed ERK phosphorylation in response to α -CD3 or α -CD3 + CD28 stimulation as a read-out for TCR signaling. Even though ERK1/2 signaling may act as a pro-survival pathway in different cell types [31], acute activation of this pathway in T cells can result in cell death [32]. We found no differences in basal ERK phosphorylation among transfectants expressing WT or mutated hCD5 (Fig. 4C). α -CD3 induced ERK1/2 phosphorylation was significantly greater in Y429A transfectants than in any of the controls or other hCD5 tyrosine mutants (Fig. 4D). Notably, CD28 costimulation further increased the levels of pERK in Y441A, Y463A and YYY/AAA mutants and the CD5WT, but not in the Y429A. This

finding reflects the absence of increased apoptosis in hCD5 Y429A following CD28 co-stimulation (Fig. 2D). Overall the result indicates that the motif embedding Y429 would behave functionally as an ITIM rather than as ITAM. Based on data here presented and that of a previous study showing increased levels of phospho-c-Cbl in the absence of Y429 [19], we propose renaming this domain to “pseudo-ITIM” from “pseudo-ITAM”. Indeed, the “pseudo-ITAM” region of hCD5 was postulated to play a crucial role in RasGAP-mediated TCR downregulation, through a mechanism that involves the inactivation of ERK [21]. This possibility is in agreement with the demonstration that Y441, unlike Y429 and Y463, is not phosphorylated by Lck upon TCR activation [4,5]. In this context, the pseudo-ITAM of CD5 is not encoded by a single exon as classical ITAMs are [4]. Moreover, when hemi-phosphorylated, some ITAM regions can behave as ITIM regions [33]. Of note, our results resemble the previously reported effect of Y429 deficiency in B cells, where this residue was demonstrated to act as negative regulator of BCR signaling [34].

In summary, our data suggest that the pro-survival role of CD5 may be mediated both by the down modulation of TCR signaling effectors (reviewed in Ref. [2]), and by the effects of survival related proteins, that may associate with CD5 independently of TCR signals [8]. Our study contributes to a better understanding of the molecular basis of CD5-dependent T cell survival and supports the potential role of CD5 in the development of T and B cell malignancies.

Acknowledgments

We want to thank Biol. J. Ramsés Chávez-Ríos for technical support and QFB Carlos Castellanos for technical assistance in FACS sorting experiments. This work was supported by a grant from Conacyt, Mexico (#166024) to GS, and Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Nacional I+D+i, SAF2013-46151-R) co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF, to FL and from the National Institutes of Health Grant AI1076562 to CR. Carlos A. Mier-Aguilar is a student of the Ph.D Program “Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México” and was supported by CONACYT (#245318/303389). This work was part of Carlos A. Mier-Aguilar graduate thesis. Erica Burgueño-Bucio is a student of the Ph.D Program “Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México” and was supported by CONACYT (#513171).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.033>.

References

- [1] L. Boumsell, H. Coppin, D. Pham, B. Raynal, J. Lemerle, J. Dausset, A. Bernard, An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic lymphocytic leukemic cells. Distribution on normal and malignant lymphoid cells, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 229–234.
- [2] G. Soldevila, C. Raman, F. Lozano, The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 310–318.
- [3] J. Calvo, J.M. Vilda, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K.S. Campbell, C. Ausseil, F. Lozano, Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II, *J. Immunol.* 161 (1998) 6022–6029.
- [4] J.M. Vila, I. Gimferrer, O. Padilla, M. Arman, L. Places, M. Simarro, J. Vives, F. Lozano, Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 1191–1198.
- [5] K.M. Dennehy, W.F. Ferris, H. Veenstra, L.A. Zuckerman, N. Killeen, A.D. Beyers, Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5, *Int. Immunol.* 13 (2001) 149–156.
- [6] K.M. Dennehy, R. Broszeit, W.F. Ferris, A.D. Beyers, Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-

- activating protein with CD5, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 1617–1625.
- [7] K.M. Dennehy, R. Broszeit, D. Garnett, G.A. Durrheim, L.L. Spruyt, A.D. Beyers, Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 679–686.
- [8] C. Raman, R.P. Kimberly, Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation, *J. Immunol.* 161 (1998) 5817–5820.
- [9] A. Tarakhovskiy, S.B. Kanner, J. Hombach, J.A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, K. Rajewsky, A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection, *Science* 269 (1995) 535–537.
- [10] G. Bikah, J. Carey, J.R. Ciallella, A. Tarakhovskiy, S. Bondada, CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells, *Science* 274 (1996) 1906–1909.
- [11] G.S. Sellick, R. Wade, S. Richards, D.G. Oscier, D. Catovsky, R.S. Houlston, Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis, *Blood* 111 (2008) 1625–1633.
- [12] E. Carnero-Montoro, L. Bonet, J. Engelken, T. Bielig, M. Martinez-Florensa, F. Lozano, E. Bosch, Evolutionary and functional evidence for positive selection at the human CD5 immune receptor gene, *Mol. Biol. Evol.* 29 (2012) 811–823.
- [13] M.C. Cenit, M. Martinez-Florensa, M. Consuegra, L. Bonet, E. Carnero-Montoro, N. Armiger, M. Caballero-Banos, M.T. Arias, D. Benitez, N. Ortego-Centeno, E. de Ramon, J.M. Sabio, F.J. Garcia-Hernandez, C. Tolosa, A. Suarez, M.A. Gonzalez-Gay, E. Bosch, J. Martin, F. Lozano, Analysis of ancestral and functionally relevant CD5 variants in systemic lupus erythematosus patients, *PLoS One* 9 (2014) e113090.
- [14] R.C. Axtell, M.S. Webb, S.R. Barnum, C. Raman, Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice, *J. Immunol.* 173 (2004) 2928–2932.
- [15] R.C. Axtell, L. Xu, S.R. Barnum, C. Raman, CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system, *J. Immunol.* 177 (2006) 8542–8549.
- [16] C.M. Sestero, D.J. McGuire, P. De Sarno, E.C. Brantley, G. Soldevila, R.C. Axtell, C. Raman, CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy, *J. Immunol.* 189 (2012) 2918–2930.
- [17] D. Ordonez-Rueda, F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E.A. Garcia-Zepeda, G. Soldevila, Increased numbers of thymic and peripheral CD4+CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 2233–2247.
- [18] S.I. Gringhuis, L.F. de Leij, P.J. Coffey, E. Vellenga, Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 1725–1735.
- [19] N.S. Roa, D. Ordonez-Rueda, J.R. Chavez-Rios, C. Raman, E.A. Garcia-Zepeda, F. Lozano, G. Soldevila, The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432 (2013) 52–59.
- [20] X.Y. Zhou, Y. Yashiro-Ohtani, K. Toyo-Oka, C.S. Park, X.G. Tai, T. Hamaoka, H. Fujiwara, CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage, *J. Immunol.* 164 (2000) 1260–1268.
- [21] T.M. Thornton, G. Pedraza-Alva, B. Deng, C.D. Wood, A. Aronshtam, J.L. Clements, G. Sabio, R.J. Davis, D.E. Matthews, B. Doble, M. Rincon, Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation, *Science* 320 (2008) 667–670.
- [22] J.M. Vila, J. Calvo, L. Places, O. Padilla, M. Arman, I. Gimferrer, C. Aussel, J. Vives, F. Lozano, Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling, *J. Immunol.* 166 (2001) 396–402.
- [23] L.F. Span, A.H. Pennings, G. Vierwinden, J.B. Boezeman, R.A. Raymakers, T. de Witte, The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique, *Cytometry* 47 (2002) 24–31.
- [24] C.E. Rudd, A. Taylor, H. Schneider, CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 12–26.
- [25] T.M. McCaughy, T.A. Baldwin, M.S. Wilken, K.A. Hogquist, Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 2575–2584.
- [26] C. Ferraro-Peyret, L. Quemeneur, M. Flacher, J.P. Revillard, L. Genestier, Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes, *J. Immunol.* 169 (2002) 4805–4810.
- [27] E. Tibaldi, A.M. Brunati, F. Zonta, F. Frezzato, C. Gattazzo, R. Zambello, E. Gringeri, G. Semenzato, M.A. Pagano, L. Trentin, Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, *Leukemia* 25 (2011) 1768–1781.
- [28] S. Kumar, Caspase function in programmed cell death, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 32–43.
- [29] H. Enslen, H. Tokumitsu, P.J. Stork, R.J. Davis, T.R. Soderling, Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 10803–10808.
- [30] S.I. Gringhuis, L.F. de Leij, G.A. Wayman, H. Tokumitsu, E. Vellenga, The Ca2+/calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31809–31820.
- [31] E. Teixeira, M.A. Daniels, ERK and cell death: ERK location and T cell selection, *FEBS J.* 277 (2010) 30–38.
- [32] T.K. Starr, S.C. Jameson, K.A. Hogquist, Positive and negative selection of T cells, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 139–176.
- [33] A.D. Barrow, J. Trowsdale, You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1646–1653.
- [34] H. Gary-Gouy, J. Harriague, A. Dalloul, E. Donnadieu, G. Bismuth, CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, *J. Immunol.* 168 (2002) 232–239.

FULL TITLE:

T Cell Maturation in Thymus Revisited: Functional Requirement for CD5-CK2 signaling

RUNNING TITLE

Role of CD5-CK2 signaling during thymocyte development.

Carlos A Mier-Aguilar^{*,†}, Kevin S Cashman^{‡,1}, Chander Raman^{†,‡,2} and Gloria Soldevila^{*,2}

^{*}Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Distrito Federal, México; [†]Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Departments of Medicine, and Microbiology[‡], University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294

¹Current address: Emory University Division of Rheumatology. Lowance Center for Human Immunology. 255 Whitehead Biomedical Research Building 615. Michael St, Atlanta GA 30322.

²These authors contributed equally to this work.

This work was supported by Grants from Conacyt (#166024) (GS), Mexico and National Institutes of Health AI 1076562 (CR). Support also came from NIH P30 AR048311 and P30 AI027767 to the University of Alabama at Birmingham Comprehensive Arthritis, Musculoskeletal and Autoimmunity Center (CAMAC) Analytic and Preparative Cytometry Facility, Analytic Imaging Immunoreagent Core, and Analytic Genomics and Transgenics Core, and NIH G20 RR025858 and RR022807 to the University of Alabama at Birmingham Animal Resources.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Gloria Soldevila or Dr. Chander Raman: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional

Autónoma de México, Mexico City, Distrito Federal, México, 04510 (G.S) or Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Departments of Medicine, and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294 (C.R). E-mail: soldevi@unam.mx (G.S) or craman@uab.edu (C.R)

Abbreviations used in this article: CK2, Casein Kinase 2; TCR, T cell receptor; ITIM, Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif; DN, Double Negative Thymocytes; DP, Double Positive Thymocytes; SP, Single Positive; ERK, Extracellular-Signal-Regulated-Kinases; CDC37, Cell Division Cycle 37; OVA, Ovalbumin; WT, Wild Type; Tg, Transgenic

Keywords: Thymus, CD5, CK2, ERK, Positive Selection, Apoptosis.

Abstract

CD5 is well recognized for its role in thymic selection. Although this property of CD5 has been attributed to its ITIM-domain dependent regulation of TCR-signal strength, the mechanism has not been established. A second major signaling domain within the cytoplasmic tail of CD5 is a CK2 binding/activation domain (CD5-CK2BD). Using a gene-targeted mouse in which the CD5-CK2BD is selectively ablated (CD5- Δ CK2BD), we previously showed that CD5-CK2 signaling in mature T cells is necessary for efficient TCR-induced proliferation, Th2 and Th17 differentiation and survival. In this study we determined that loss of function of CD5-CK2 signaling in a MHC-II selecting TCR transgenic (OT-II) mouse resulted in decrease in double positive (DP) thymocytes. Remarkably, DP cells expressing high levels of CD5 and CD69 and single positive (CD4+SP) T cells were expanded in CD5- Δ CK2BD mice indicating that CD5-CK2 signaling regulates positive selection to SP cells and/or promotes survival. Consistent with this possibility, we determined that the activation and nuclear localization of ERK, as well as apoptosis was greater in thymic populations from OTII CD5- Δ CK2BD mice than OTII CD5-WT mice following injection of OVA₃₂₃₋₃₃₉-peptide. The mobilization of Ca²⁺, an early event of TCR activation, was not altered by the loss of CD5-CK2 signaling. Collectively, these data demonstrate that the CD5-CK2 signaling axis regulates positive selection of DP thymocytes and CD4+SP lineage commitment by modulating activation of ERK and promoting survival independent of proximal TCR signals.

Introduction

T cell differentiation in the thymus is a developmental process tightly regulated by key selection checkpoints, which ensures the generation of a diverse self-restricted and autotolerant T cell repertoire. During this process, TCR mediated signaling has a central role in the final outcome of a functional T cell repertoire, whereby recognition of self-MHC/peptides complexes with low affinity/avidity rescues developing T cells from apoptosis by positive selection, while the absence of recognition of self-ligands leads to death by neglect (1). Alternatively, recognition of self-ligands with high avidity promotes death by apoptosis through the process of negative selection or rearrangement of the α chain locus to express a different TCR and enter a new selection process (2). Finally, positively selected thymocytes undergo lineage commitment to become CD4+SP (Single Positive) or CD8+SP mature thymocytes by a process that depends on TCR and co-receptor signaling, although the molecular mechanisms underlying this process still remain controversial (reviewed in (3)). In addition, the thymus also provides the environment required for the selection of self-reactive cells including nTregs, CD8 $\alpha\alpha$ +IEL and NKTs under conditions of high avidity (reviewed in (4))

The TCR signaling threshold during thymocyte development is mainly regulated by CD5 (5). This 67 KDa glycoprotein is expressed on the surface of thymocytes from the double negative (DN) stage, and is upregulated upon pre-TCR signaling and positive selection (6). Indeed, CD5 expression has been used as a marker for post-selected thymocytes and correlates with the intensity of TCR-mediated signaling during self-peptide/MHC recognition at the DP stage (reviewed in (7)). Several signaling domains within the cytoplasmic tail of CD5 have been proposed to mediate its role as negative regulator of TCR signaling. Among them, an (ITIM)-like

motif (pseudo-ITIM) comprising tyrosines 429-441, as well as the carboxy-terminal region containing Y463 (8).

CD5, in addition to regulating TCR signaling, also plays a crucial role in protecting developing thymocytes from apoptosis by a mechanism that involves Akt phosphorylation (9). Moreover, CK2 a prominent serine/threonine kinase that acts as a major modulator of cell cycle progression and survival, is constitutively associated to S459-S461 residues within the carboxy-terminal region of CD5. We previously demonstrated that the selective absence of CD5-CK2 signaling recapitulated the enhanced AICD in autoreactive T cells and lower EAE severity observed in CD5^{-/-} mice and thereby establishing the relevance of CD5 engaging CK2 to regulate apoptosis (10). In addition, we recently showed that CD5-CK2 signaling regulates the threshold of T cell activation and T cell differentiation, demonstrating a role for the CD5-CK2 axis in TCR signaling (11).

CK2 constitutively associates with the 458-SSDSD-462 motif within the carboxy-terminal region of CD5 and following CD5 ± CD3 crosslinking becomes activated and phosphorylates CD5 cytoplasmic Ser 459 and 461. Very little is known regarding the CK2 downstream effectors involved in CD5 signaling. In this context, we recently showed that peripheral T cells require CK2 binding to CD5 for optimal Akt activity (12), however these studies were not performed in thymocytes. Therefore, here we sought to determine the role of CD5-CK2 signaling during thymocyte development using a CD5 knock-in mouse in which the nucleotides corresponding to the CK2 binding domain (S458-S461) were deleted.

Our data demonstrate for the first time that CK2 binding to the CD5 cytoplasmic tail has a specific role during thymocyte selection to negatively regulate ERK phosphorylation and rescue thymocytes from apoptosis. However, signaling pathways downstream the TCR such as

Akt, and calcium mobilization were not affected in the absence of CD5-CK2 signaling. This shows that CD5 does not merely act as a negative regulator of TCR signaling, but, controls pERK levels through the association and activation of CK2, modulating the processes of T cell selection and lineage commitment.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice (CD5-WT) were purchased from the National Cancer Institute Frederick Cancer Research and bred in our colony. C57BL/6 CD5- Δ CK2BD mice were previously described (11). The OTII TCR^{OVA} (OTII CD5WT) transgenic mice have been previously described (13). 8-10 week-old mice were used in this study. All animals were housed and treated in accordance with National Institutes of Health and University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee guidelines.

Flow Cytometry

Staining was performed on thymic and peripheral lymphoid populations after live/dead staining with fixable viability dye eFluor 780 (eBioscience, San Diego, CA). To characterize distinct cellular subpopulations the following Abs were used: anti-CD4 Pacific Blue (RM4-5), anti-CD8 Brilliant Violet 650 (53-6.7), anti-CD69 PE (H1.2F3), anti-TCRV α 2 AF 647 (B20.1) and Streptavidin Brilliant Violet 605 all from Biolegend (San Diego, CA); and anti-CD5 PE-Cy7 (53-7.3), anti-CD25 PerCP-Cy5.5 (PC61.5), anti-CD44 FITC (IM7), anti-CD62L bn (MEL-14), from eBioscience. The Foxp3 intranuclear staining was performed as stated in the eBioscience Foxp3 kit. The following antibodies were utilized to characterize the different thymocyte populations: anti-CD4 Alexa 647 (GK1.5), anti-CD8 PerCP (53-6.7), anti-CD25 FITC (PC61), all from Biolegend, and anti-FoxP3 PE (FJK-16s) from eBioscience. Analysis of phospho-p44/42 MAPK (pERK, Thr202/Tyr204) (D13.14.4E, Cell Signaling), phospho-CDC37 (Ser13; Cell Signaling), phospho-Akt (Ser473; D9E, Cell Signaling) was performed as described previously (11). All samples were collected using either an LSRII flow cytometer (BD

Biosciences) or a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (Treestar).

***In vitro* and *in vivo* apoptosis assay**

The cells obtained from the thymus of C57BL/6 CD5-WT and the C57BL/6 CD5- Δ CK2BD mice were plated to 96-well plates to a density of 200×10^3 cells in 200 μ L. Thymocytes were stimulated for 24h by antibody crosslinking with anti-CD3 (145-2C11, 0.1 μ g/mL or 1 μ g/mL) and anti-CD5 (53-7.3, 5 μ g/mL). Apoptosis was assessed with Annexin/7-AAD staining kit (Biolegend) following the manufacturer's protocol. *In vivo* activation induced cell death (AICD) assay of T lymphocytes was performed by injecting i.p. OTII CD5WT and OTII CD5 Δ CK2-BD with 300 μ g OVA peptide (323-339 ISQAVHAAHAEINEAGR, OVAp; CPC Scientific). After 24 hours, the mice were sacrificed and thymus and spleen were obtained for detection of active caspase 3 (eBioscience) in gated populations as previously described (9).

Imaging Flow Cytometry

IMAGESTREAM technology was used to analyze intranuclear localization of pERK. Cells were stained with pERK and Hoechst as for flow cytometry. 10,000 cells were acquired using a MARKII Amnis Imagestream (EMD Millipore, MA). For quantitative analysis, between 900 and 1500 pictures were taken of each thymocyte subpopulation. By creating appropriate masks we differentially quantitated cytoplasmic versus nuclear ERK as well as the ratio of nuclear to total pERK, as shown in the representative histograms. IDEAS software was used to analyze the obtained data.

Calcium Mobilization Assay

Calcium mobilization in thymocyte suspensions from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice were performed as described previously (11). Briefly, thymocytes were stained for CD4 and CD8 and loaded with fluo-4 AM. Ca mobilization in CD4 and/or CD8 gated cells maintained at 37°C using a specially designed water-jacket was determined using a BD-LSRII flow cytometer.

Statistical Analysis

Results were analyzed for statistical significance using a Student *t* test using the Graph Pad Software (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Results

Ablation of CD5-CK2 signaling alters thymocyte development and CD4⁺ T lineage commitment.

We examined the contribution of CD5-CK2 signaling in thymic development by breeding the CD5- Δ CK2BD mouse with the TCR^{OVA} transgenic (OTII) mouse. As we previously showed, the inability of CD5 to engage CK2 did not alter the expression of CD5 on any of the thymic T cell populations in TCR transgenic or non-transgenic mice (Fig. S1A). A previous study showed that in contrast to CD5-WT mice, thymocytes in CD5^{-/-} mice had a greater proportion of transgenic TCR β associating with endogenous TCR α (14). Here we show that the selective loss of CD5-CK2 signaling did not increase the expression of endogenous V α or the expression of transgenic V α 2 on all CD4⁺ thymic populations (Fig. S1B). The lack of CD5-CK2 signaling also had no significant effect on total DN cell numbers or DN subpopulations in OTII TCR-Tg mice or non-transgenic mice (Fig. S2). However, we did find that both proportion and absolute cell numbers of DP thymocytes were significantly lower in CD5- Δ CK2BD compared to CD5-WT OTII TCR-Tg mice (Fig. 1A). This contribution of CD5-CK2 signaling on DP cells was also observed in non TCR-Tg mice however, only the differences in proportion were significant (Fig. 1B). In OTII TCR-Tg mice the lack of CD5-CK2 signaling resulted in greater frequency and numbers of CD4⁺ SP T cells and significantly fewer CD8⁺ SP T cells (Fig 1A). This relative increase in frequency of CD4⁺ SP T cells was also observed in CD5- Δ CK2BD non TCR-Tg mice with no change in CD8⁺ SP T cells (Fig. 1B). The data suggest that CD5-CK2 signaling regulates CD4⁺ SP versus CD8⁺ SP lineage commitment. Further analysis of the CD4:CD8 ratio in the absence of CD5-CK2 signaling showed a 3-fold increase in the proportion of CD4 versus CD8 cells in the TCR transgenic background (Fig. 1C) and about 1.5-fold in the polyclonal

background (Fig.1D).

CD5-CK2 signaling regulates positive selection and maturation of post-selected thymocytes without altering the generation of nTregs.

The strength of TCR signaling at the DP stage sets the threshold for positive/negative selection and nTreg generation (reviewed in (15)). We therefore investigated whether the reduction in DP thymocytes in the absence of CD5-CK2 signaling was the result of increased positive selection. To address this question, we analyzed the expression of CD5 and CD69 on the surface of the DP subpopulation, which identifies post-selected thymocytes (16). Interestingly, the analysis of CD5- Δ CK2BD OTII thymocytes showed a significant increase in the frequency of the DP post-selected subpopulation (CD69^{hi} CD5^{hi}) (Fig. 2A) compared to CD5 WT OTII although numbers were not affected (Fig. S3). As a final step of maturation, CD4+SP thymocytes down modulate CD69 to acquire competence for emigration from the thymus and home to the peripheral lymphoid organs. To characterize this stage of development, also known as recent thymic emigrants (RTE), we evaluated the expression of CD62L and CD69 on CD4+SP T cells (17). We observed a trend towards a decrease in the frequency of CD4+CD62L^{hi}CD69^{lo} T cells between CD5 WT OTII TCR-Tg and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice (Fig. 2C and D, upper graphs, p=0.1) and a statistically significant decrease in this mature CD4+SP subpopulation CD5- Δ CK2BD non transgenic mice compared to CD5WT (Fig 2C and D, bottom graphs), suggesting an increase in CD4+ T cell export or a defect in CD4+ maturation or survival. In this context, increased levels of CD69 were observed in CD4+SP thymocytes, indicating a defect in final CD69 downregulation, which is a prerequisite for thymic export (Fig. S3C).

Within CD4+SP thymocytes, high TCR avidity selects for nTreg cells and this population is expanded in mice lacking CD5 (18). In peripheral T cells, CD5-CK2 signaling modulates Akt activity (12), a signaling pathway down regulated during the generation of nTreg (19, 20). We observed no difference in frequency or numbers of nTreg cells (CD4+CD25+Foxp3+) between CD5-CK2 Δ BD and CD5 WT mice (Fig. 3). This result suggests that the CD5-CK2 signaling axis is not involved nTreg selection in the thymus; however, other domains within the cytoplasmic tail of CD5 shown to regulate TCR signaling, such as the ITIM (Y429-441) domain or the carboxy-terminal Y463, may regulate nTreg generation.

Increased *in vitro* and *in vivo* apoptosis in the absence of CD5-CK2 signaling

CD5 has been shown to function as a pro-survival receptor in thymocytes (reviewed in (21)). In peripheral T cells, this function is compromised if CD5-CK2 signaling is ablated (10, 11). Therefore, the lower numbers of DP cells observed in CD5- Δ CK2BD mice may reflect enhanced activation induced cell death (AICD) during selection. We tested for this possibility using *in vitro* and *in vivo* approaches. Thymic T cells from CD5-WT mice and CD5- Δ CK2BD mice were cultured for 24 hours in the presence or absence of anti-CD3 \pm anti-CD5 and apoptosis was quantitated using Annexin V and 7-AAD. We found that under all stimulation conditions DP and SP (CD4+ and CD8+) thymocytes obtained from the CD5- Δ CK2BD mice exhibited higher apoptosis than CD5-WT thymic populations (Fig. 4A). CD5- Δ CK2BD thymocytes in media alone had higher apoptotic T cells, but the difference from CD5-WT thymocytes was significant only for CD8+ SP cells. The enhanced cell death within CD8+ SP thymocytes probably reflects ‘asymmetric’ apoptosis of CD4+SP vs CD8+SP cells (22). To test for susceptibility to AICD *in vivo*, we injected OTII TCR-Tg mice with PBS (control) or OVA

peptide (300 μ g) and measured expression of active caspase 3. We found that DP and CD4⁺ SP thymocytes from CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice had a slight increase in the proportion of cells expressing elevated levels of active caspase 3 at basal conditions (PBS injected) which was statistically significant following injection with OVA peptide compared to CD5-WT OTII TCR-Tg mice (Fig. 4B). These results show a prominent role of the CD5-CK2 signaling axis in promoting thymocyte survival.

CD5-CK2 mediated thymocyte survival is independent of Akt and CDC37 activation.

Akt, a substrate of CK2 (23) and a downstream effector of TCR signaling, is a key regulator of cell death in thymocytes (18). In peripheral T cells, CD5-CK2 signaling is necessary for efficient TCR-induced activation of Akt to promote cell survival (12). We found no difference in the activation of Akt in DP or SP thymocytes under basal conditions or following OVAp injection between CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice (Fig. 5A). CDC37, activated by CK2, functions as a co-chaperone for heat shock protein 90 (HSP90) to promote survival (24). We found that loss of CD5-CK2 signaling had no effect on OVAp induced pS13-CDC37, the site of CK2 phosphorylation (Fig. 5B). These findings suggest pAkt/pCDC37 signaling axis is not regulated via CD5-CK2 signaling in developing T lymphocytes unlike previous findings in peripheral T lymphocytes (12).

Elevated ERK activation in the absence of CD5-CK2 signaling.

Among the CK2 downstream effectors, ERK is a protein relevant for TCR signaling and survival, (23). Sustained pERK levels are required for positive selection of thymocytes and

CD4+SP lineage commitment (25), however acute activation of ERK leads to apoptotic death (26). In CD5- Δ CK2BD mice, DP and CD4+SP cells had higher basal levels of pERK compared to CD5-WT that was significantly increased after OVAp injection (Fig. 5A). The higher basal pERK correlates with the enhanced positive selection to CD4+SP thymocytes in CD5- Δ CK2BD mice and CD4+SP differentiation, and might also be responsible for the increased cell death observed in CD5- Δ CK2BD thymocytes.

To investigate whether increased pERK was the result of enhanced TCR proximal signaling, we evaluated TCR-induced calcium mobilization in thymocytes from CD5- Δ CK2BD mice. The absence of CD5-CK2 signaling did not affect calcium flux (Fig. 6B), thus suggesting an alternative CD5-dependent mechanism for the regulation of ERK activation. Overall, the data suggest that CD5-CK2 signaling promotes thymocyte survival by regulating acute activation of ERK.

Nuclear pERK localization is not regulated through CD5-CK2 binding domain in developing T lymphocytes.

The phosphorylation of ERK by CK2 on two Ser residues promotes translocation into the nucleus where it exerts its function as a modulator of transcriptional activity (27-29). We used imaging flow cytometry to quantitatively assess whether the subcellular localization of pERK was altered in the absence of CD5-CK2 signaling. Validating the flow cytometry data, we found that the total pERK levels in DP and CD4+ SP thymocytes were higher in CD5- Δ CK2BD mice at basal and following *in vivo* activation using OVAp (Fig. S4A). We quantitatively distinguished the levels of pERK in the cytoplasm and nucleus at basal and following OVAp

injection to determine if pERK entry to the nucleus was altered in thymocytes from CD5- Δ CK2BD mice. The data showed higher basal (Fig. 7A,B and C, D) and OVAp (Fig. 7A, B) induced pERK levels in the nuclei of DP and SP populations from CD5- Δ CK2BD compared to CD5 WT mice. OVAp injection increased pERK levels in both CD5-WT and CD5- Δ CK2BD OTII-Tg mice, however, the magnitude of increase was greater in CD5-WT thymocytes (Fig. 7A,B). Remarkably, the ratio between nuclear and total pERK was similar between CD5- Δ CK2BD and CD5-WT mice (Fig. 6E). This indicates that CD5 dependent CK2 activation is not involved in ERK translocation into the nucleus.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Discussion

We previously reported that ablation of the ability of CD5 to engage and activate CK2 in peripheral T cells attenuated EAE disease severity by enhancing T cell death and hampering differentiation to encephalitogenic Th17 cells (10, 11). However, we did not investigate the role of CD5-CK2 signaling in thymocyte development. In this study we report that in CD5- Δ CK2BD mice the proportion of CD5^{hi}CD69^{hi} DP and CD4 SP thymocytes is increased showing that the CD5-CK2 signaling pathway regulates positive selection. The increase in CD4+SP thymocytes in CD5- Δ CK2BD mice indicated an enhanced CD4+ lineage commitment, as demonstrated by the significant increase in the CD4:CD8 ratio. Our results provide a mechanism for previous findings that showed expanded numbers of transitional CD4+CD8^{int} thymocyte population in CD5^{-/-} MHC Class II^{-/-} mice (30). Thus, the increased CD4:CD8 ratio observed in the absence of CD5-CK2 signaling might be the result of enhanced TCR mediated signals. Positive selection and CD4+ lineage commitment requires sustained ERK activation (25). Therefore, the increased ERK phosphorylation observed in CD5- Δ CK2BD mice supports the role for CD5-CK2 signaling in down regulation of positive selection (31) and in restraining CD4+SP lineage commitment, in agreement with the signal strength model of CD4 versus CD8 commitment (reviewed in (3)).

In contrast to CD5^{-/-} T cells in which TCR crosslinking resulted in increased calcium mobilization and hyperphosphorylation of TCR ζ , ZAP70, PLC- γ (14) and ERK (18, 32), CD5-CK2 signaling deficient T cells had normal TCR-induced calcium flux, arguing in favor of an alternative CD5-CK2-dependent pathway of pERK downregulation. In this context, CK2 α has been shown to interact with PP2A, a negative regulator of ERK signaling (33), which was also shown to co-immunoprecipitate with CD5 in human Jurkat T cells (34).

The maturation and emigration of post-selected SP thymocytes requires cessation of TCR signaling and downregulation of CD69 expression (reviewed in (35)). CD69 expression is upregulated by AP-1 a nuclear downstream target of ERK (36). Therefore, the reduced proportion of CD4⁺CD62L^{hi}CD69^{lo} thymocytes observed in CD5-ΔCK2BD mice is consistent with the sustained levels of elevated ERK phosphorylation, correlating with increased surface levels of CD69 within CD4+SP subpopulation. An alternative hypothesis to explain for fewer CD69^{lo} CD4+ post-selected CD5-ΔCK2BD thymocytes is enhanced thymic export; however, our previous results found that CD4+ population in periphery is reduced in the absence of CD5-CK2 signaling (11). Overall our data support a requirement for CD5-CK2 signaling for efficient maturation of post-selected thymocytes.

CD5 expression strongly correlates with the strength of TCR signaling (6). Interestingly, the lack of CD5-CK2 signaling had no effect on expression of CD5 on any thymic subpopulation. This indicates that CK2 associated to CD5 does not regulate proximal TCR signals including calcium mobilization. Thus, surface expression of CD5 correlating with TCR-induced calcium mobilization is likely to be linked to other CD5 cytoplasmic regions, like the CD5-ITIM domain (37). The elevated basal pERK led us to predict that nTreg numbers would be expanded in CD5-ΔCK2BD thymus, as we previously showed in CD5^{-/-} mice (18). Several TCR proximal downstream effector are required for optimal nTreg generation, including PLCγ1 (38), LAT (39), arguing in favor of the need of a strong signal threshold for their selection (reviewed in (40)). However, we found no expansion of nTreg cells in the absence of CD5-CK2 signaling indicating that other than ERK, proximal TCR signals, unaffected in CD5-ΔCK2BD mice, are involved in nTreg generation. Additionally, inhibition of the Akt/mTOR axis is required during nTreg selection (19), which was unaltered in CD5-ΔCK2BD mice. Finally, although CK2 is

highly expressed in nTregs compared to effector T cells, our results show that CK2 associated with CD5 is not relevant for nTreg selection (41).

CD5 has been described as a pro-survival receptor in T cells (reviewed in (21)). Among the possible molecules involved in CD5-mediated survival, CK2 (10, 11), Akt (18) and ERK (42) are postulated to play a role in this process. CDC37 and Akt are two major intracellular proteins shown to be crucial for CK2 mediated survival (23, 43). However, the phosphorylation of these molecules was not altered in the absence of CD5-CK2BD, suggesting that other CD5 dependent CK2 downstream effectors are involved. In thymus, unlike in peripheral T cells, the efficient activation Akt, is independent of CD5-CK2 signaling (12). While sustained activation of ERK is necessary for thymocyte survival and positive selection, acute activation of ERK activation such as during negative selection results in cell death (44). Our data showed that CD5-CK2 signaling regulates both sustained and acute activation of ERK, thus having an impact on positive selection and thymocyte survival. Although, phosphorylation of pERK by CK2 is shown to promote its entry into the nucleus (27), we found that this was not altered in CD5- Δ CK2BD thymocytes, which may be explained by the fact that only CK2 associated to CD5 is affected in these mice.

Collectively, our data demonstrate a key role of CK2 in CD5-mediated regulation of thymocyte selection and survival, by controlling the phosphorylation of ERK independent of proximal TCR signals. This result also reveals an important function of CK2 in thymocyte selection. We also suggest that the dogma stating that CD5 dependent negative regulation of TCR proximal signals is primarily involved in thymocyte selection, insufficiently addresses the mechanism by which CD5 modulates thymic development. A knock-in mouse in which the ITIM

domain of CD5 is selectively mutated will be an important tool to discriminate between CD5-ITIM and CD5-CK2 signaling activities.

Acknowledgements

We would like to thank Erica Burgueño for critical reading of the manuscript. We also want to thank Donald McGuire for expert assistance in calcium flux experiments. Carlos A. Mier-Aguilar is a student of the Ph.D Program “Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México” and was supported by CONACYT (#245318/303389). This work was part of Carlos Mier-Aguilar graduate thesis.

REFERENCES

1. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21: 139-176.
2. McGargill, M. A., J. M. Derbinski, and K. A. Hogquist. 2000. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* 1: 336-341.
3. Singer, A., S. Adoro, and J. H. Park. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature reviews. Immunology* 8: 788-801.
4. Hogquist, K. A., and S. C. Jameson. 2014. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nature immunology* 15: 815-823.
5. Azzam, H. S., J. B. DeJarnette, K. Huang, R. Emmons, C. S. Park, C. L. Sommers, D. El-Khoury, E. W. Shores, and P. E. Love. 2001. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *Journal of immunology* 166: 5464-5472.
6. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 188: 2301-2311.
7. Hogquist, K. A., and S. C. Jameson. 2014. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nat Immunol* 15: 815-823.
8. Roa, N. S., D. Ordonez-Rueda, J. R. Chavez-Rios, C. Raman, E. A. Garcia-Zepeda, F. Lozano, and G. Soldevila. 2013. The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 432: 52-59.
9. Ordonez-Rueda, D., F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E. A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2009. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol* 39: 2233-2247.
10. Axtell, R. C., L. Xu, S. R. Barnum, and C. Raman. 2006. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with

diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *Journal of immunology* 177: 8542-8549.

11. Sestero, C. M., D. J. McGuire, P. De Sarno, E. C. Brantley, G. Soldevila, R. C. Axtell, and C. Raman. 2012. CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *Journal of immunology* 189: 2918-2930.
12. McGuire, D. J., A. L. Rowse, H. Li, B. J. Peng, C. M. Sestero, K. S. Cashman, P. De Sarno, and C. Raman. 2014. CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization. *Eur J Immunol* 44: 1137-1142.
13. Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 76: 34-40.
14. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269: 535-537.
15. Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14: 377-391.
16. Stritesky, G. L., Y. Xing, J. R. Erickson, L. A. Kalekar, X. Wang, D. L. Mueller, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2013. Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4679-4684.
17. Fink, P. J. 2013. The biology of recent thymic emigrants. *Annu Rev Immunol* 31: 31-50.
18. Ordonez-Rueda, D., F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E. A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2009. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol* 39: 2233-2247.
19. Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *The Journal of experimental medicine* 205: 565-574.
20. Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z. A. Knight, B. S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K. M. Shokat, A. G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7797-7802.
21. Soldevila, G., C. Raman, and F. Lozano. 2011. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Current opinion in immunology* 23: 310-318.
22. Sinclair, C., I. Bains, A. J. Yates, and B. Seddon. 2013. Asymmetric thymocyte death underlies the CD4:CD8 T-cell ratio in the adaptive immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2905-2914.
23. Meggio, F., and L. A. Pinna. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 349-368.
24. Miyata, Y., and E. Nishida. 2004. CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37. *Molecular and cellular biology* 24: 4065-4074.
25. McNeil, L. K., T. K. Starr, and K. A. Hogquist. 2005. A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13574-13579.
26. Zhuang, S., and R. G. Schnellmann. 2006. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 991-997.
27. Plotnikov, A., D. Chuderland, Y. Karamansha, O. Livnah, and R. Seger. 2011. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology* 31: 3515-3530.
28. Whitmarsh, A. J. 2011. Casein kinase 2 sends extracellular signal-regulated kinase nuclear. *Molecular and cellular biology* 31: 3512-3514.

29. Yoon, S., and R. Seger. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* 24: 21-44.
30. Chan, S., C. Waltzinger, A. Tarakhovskiy, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. An influence of CD5 on the selection of CD4-lineage T cells. *Eur J Immunol* 29: 2916-2922.
31. Fischer, A. M., C. D. Katayama, G. Pages, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick. 2005. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23: 431-443.
32. Au-Yeung, B. B., H. J. Melichar, J. O. Ross, D. A. Cheng, J. Zikherman, K. M. Shokat, E. A. Robey, and A. Weiss. 2014. Quantitative and temporal requirements revealed for Zap70 catalytic activity during T cell development. *Nat Immunol* 15: 687-694.
33. Heriche, J. K., F. Lebrin, T. Rabilloud, D. Leroy, E. M. Chambaz, and Y. Goldberg. 1997. Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 276: 952-955.
34. Raman, C., A. Kuo, J. Deshane, D. W. Litchfield, and R. P. Kimberly. 1998. Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J Biol Chem* 273: 19183-19189.
35. Love, P. E., and A. Bhandoola. 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol* 11: 469-477.
36. Castellanos, M. C., C. Munoz, M. C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. Lopez-Cabrera, and M. O. de Landazuri. 1997. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *Journal of immunology* 159: 5463-5473.
37. Teutsch, M., M. Higer, D. Wang, and H. W. Wortis. 1995. Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *International immunology* 7: 381-392.
38. Fu, G., Y. Chen, M. Yu, A. Podd, J. Schuman, Y. He, L. Di, M. Yassai, D. Haribhai, P. E. North, J. Gorski, C. B. Williams, D. Wang, and R. Wen. 2010. Phospholipase C γ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *The Journal of experimental medicine* 207: 309-318.
39. Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203: 119-129.
40. Hsieh, C. S., H. M. Lee, and C. W. Lio. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* 12: 157-167.
41. Ulges, A., M. Klein, S. Reuter, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, N. Grebe, V. Staudt, N. Stergiou, T. Bohn, T. J. Bruhl, S. Muth, H. Yurugi, K. Rajalingam, I. Bellinghausen, A. Tuettenberg, S. Hahn, S. Reissig, I. Haben, F. Zipp, A. Waisman, H. C. Probst, A. Beilhack, T. Buchou, O. Filhol-Cochet, B. Boldyreff, M. Breloer, H. Jonuleit, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp. 2015. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive T2 responses in vivo. *Nature immunology*.
42. Zhou, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, K. Toyo-Oka, C. S. Park, X. G. Tai, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 2000. CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage. *Journal of immunology* 164: 1260-1268.
43. Di Maira, G., M. Salvi, G. Arrigoni, O. Marin, S. Sarno, F. Brustolon, L. A. Pinna, and M. Ruzzene. 2005. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* 12: 668-677.
44. McNeil, L. K., T. K. Starr, and K. A. Hogquist. 2005. A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13574-13579.

Figures to legends

Fig 1. Ablation of CD5-CK2 binding domain alters thymic development. Thymic DN, DP and SP (CD4⁺ and CD8⁺) populations (dot plots), proportions and absolute numbers (graphs) in CD5-WT OTII and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice (A) and CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice (B). Ratio of CD4:CD8 SP cells in CD5-WT OTII and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice (C) and CD5-WT and CD5- Δ CK2BD non-TCR Tg mice (D). The dot plots are representative of one of five mice from each strain. The graphs represent data from five independent animals from each strain. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Fig 2. CD5-CK2 signaling regulates positive selection and maturation of post-selected thymocytes. (A) Dot plots of CD5 and CD69 expression gated on DP cells from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg (upper) and non-transgenic (lower) mice. Inset polygon represents the CD5^{hi}CD69^{hi} post-selected thymocytes within the DP population. (B) Scatter plot shows the frequency of DP CD5^{hi}CD69^{hi} population from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD OTII TCR transgenic (upper) and non-transgenic (lower) mice. Each dot represents an individual mouse. (C and D) Fewer terminally differentiated CD4⁺ SP (CD62L^{hi}CD69^{lo}) cells in CD5- Δ CK2BD mice. (C) Representative dot plot showing expression of CD69 and CD62L in CD4⁺SP gated cells from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD non-TCR transgenic (upper) and OTII TCR transgenic (lower) mice. The inset polygon represents CD62L^{hi}CD69^{lo} terminally differentiated cells. (D) Scatter plot of proportion of CD4⁺ SP cells with CD62L^{hi}CD69^{lo} phenotype from different strains as designated. Each dot represents a mouse. Data are representative of at least 5 independent experiments (n=7 mice). Numbers are presented as mean \pm SEM. **p<0.01.

Fig 3. Generation of nTregs is not affected by the absence of CD5-CK2 binding domain. (A)

Dot plots (upper) of CD25 and FoxP3 expressing cells within CD4 gated cells. Scatter plots showing proportion and total cell numbers of CD4+CD25+FoxP3+ (lower). Each dot represents one mouse. Data are representative of at least 4 independent experiments (n=7 mice). Numbers are presented as mean \pm SEM; NS = not significant.

Fig 4. Enhanced *in vitro* and *in vivo* thymocyte apoptosis in the absence of the CD5-CK2BD. (A)

Apoptosis (Annexin V⁺ 7-AAD^{-/+}) in thymocytes from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice following culture for 24h in the presence of α -CD3 and/or α -CD5 or medium alone. The graphs show apoptosis in gated DP, CD4+SP and CD8+SP and populations. Data represent mean \pm SEM from 2 independent experiments (n= 4-5 mice). (B) Histograms (lower left) show proportion of cells with elevated active caspase 3 levels relative to unstained cells within DP and CD4+SP thymocytes obtained from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice after i.p injection with either PBS or OVAp. Solid vertical lines are drawn to reflect unstained MFI and to identify the active caspase 3 on the highest expressing population. Scatter plots show MFI of active caspase 3 levels in DP cells (top), proportion of DP cells expressing high levels of active caspase 3 (middle) and MFI of high active caspase 3 expressing CD4+ SP cells (bottom). Data are representative of at least 4 independent experiments (n=5 mice). Each dot represents a mouse; mean \pm SEM, *p<0.05.

Fig 5. AKT and CDC37 activation is unaffected by loss of CD5-CK2 signaling pathway.

Scatter plot of pAKT(S473) levels (A) and pCDC37 (S13) levels (B) within DP or CD4+SP

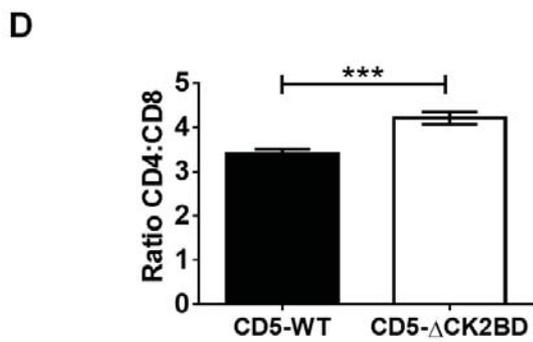
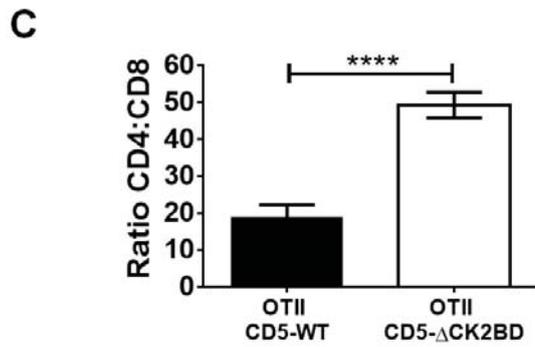
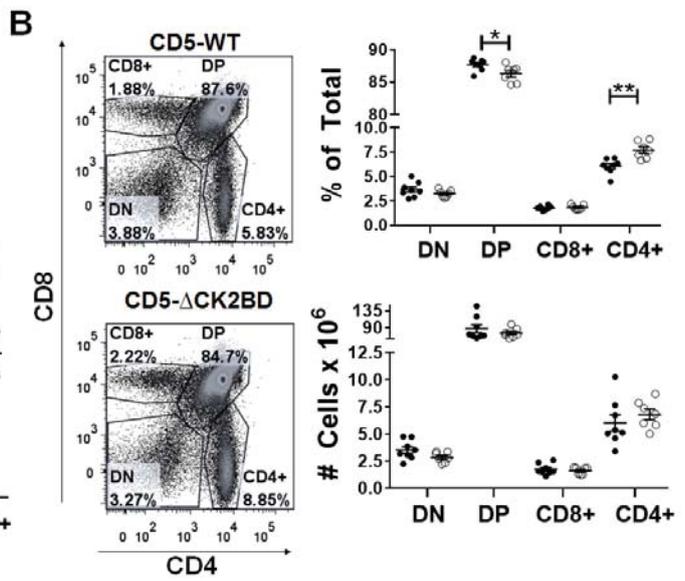
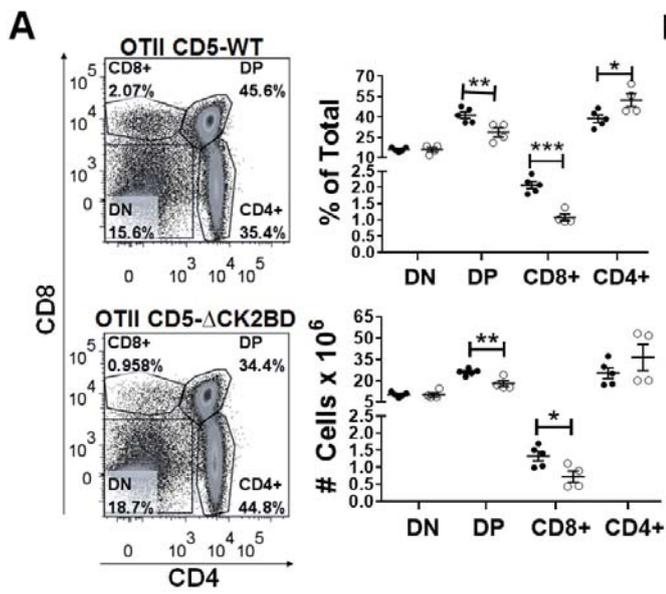
thymocytes obtained from CD5-WT OTII and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice after injection with PBS (control) or 300 μ g of OVAp. Data are representative of at least 4 independent experiments (n=5 mice). Each dot represents an independent mouse. NS= not significant.

Figure 6. Deletion of the CD5-CK2BD results in increased basal and induced ERK phosphorylation in the absence of enhanced TCR proximal signaling. (A) Histograms (upper left) show pERK levels within DP or CD4+SP thymocytes obtained from CD5-WT OTII and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice after PBS or OVAp injection. Vertical solid lines are drawn to identify the MFI of unstained cells and the MFI of cells from PBS treated mice. Scatter plots (right) show data from five individual mice. (B) Calcium mobilization in DP, CD4+SP and CD8+SP thymocytes from CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice following stimulation with α -CD3. Each graph is representative of 3 independent experiments (n=3 mice). Inset arrows denote time point of addition of α -CD3 or ionomycin. *p<0.05, **p<0.01.

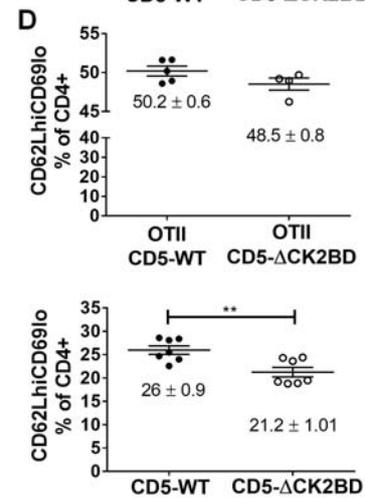
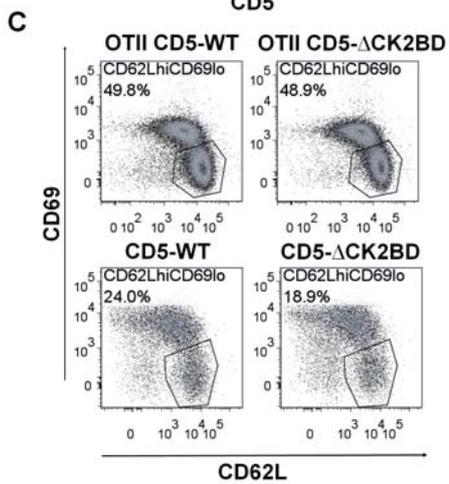
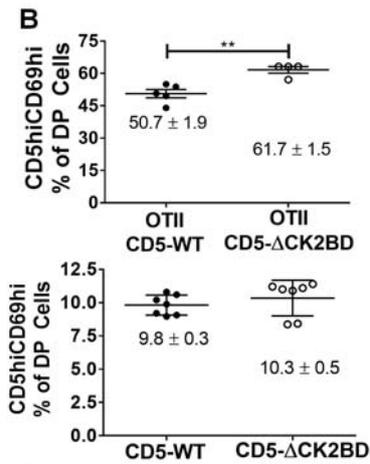
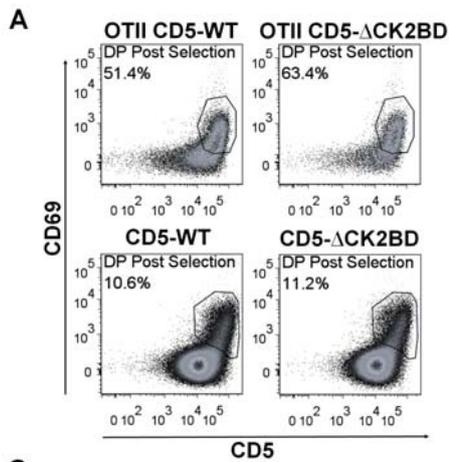
Fig 7. Nuclear translocation pERK is independent of CD5-CK2 signaling. (A) Images of DP and CD4+SP thymocytes obtained from PBS or OVAp injected CD5-WT OTII and CD5- Δ CK2BD OTII TCR-Tg mice and analyzed by imaging flow cytometry. The images show each channel individually represented as well as an overlay of all channels. The data are representative of at least 900 images each from 3 independent experiments. (B) Quantitative representation of all events represented in (A). The graphs reflect mean \pm SEM pERK levels inside the nucleus (left panels) or ratio of pERK in nucleus to whole cell (right panels) within DP (upper panels) or CD4+SP (lower). (C) Images of pERK in DP and CD4+SP thymocytes obtained from non-TCR transgenic CD5-WT and CD5- Δ CK2BD mice. The images are

representative of 900-1500 images from 3 independent experiments (n=3 mice). (D) Quantitative representation analyzed similar to (B). **p<0.01 ****p<0.0001

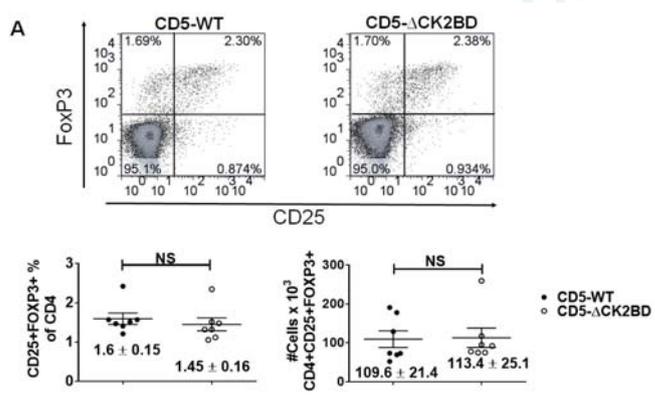
For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.



FOI

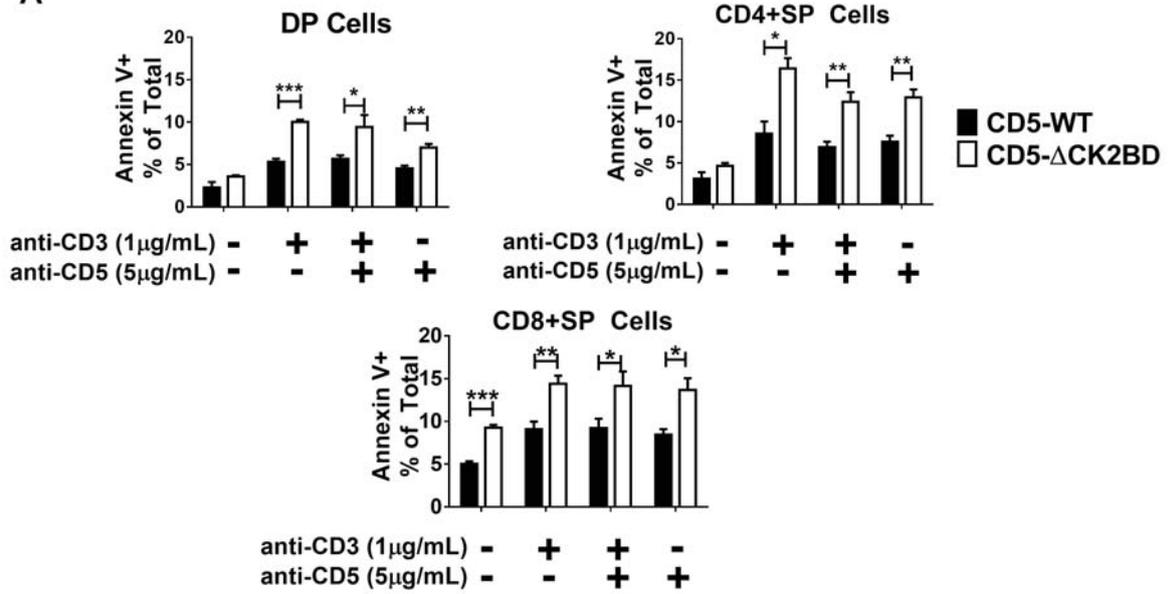


destroy after use.

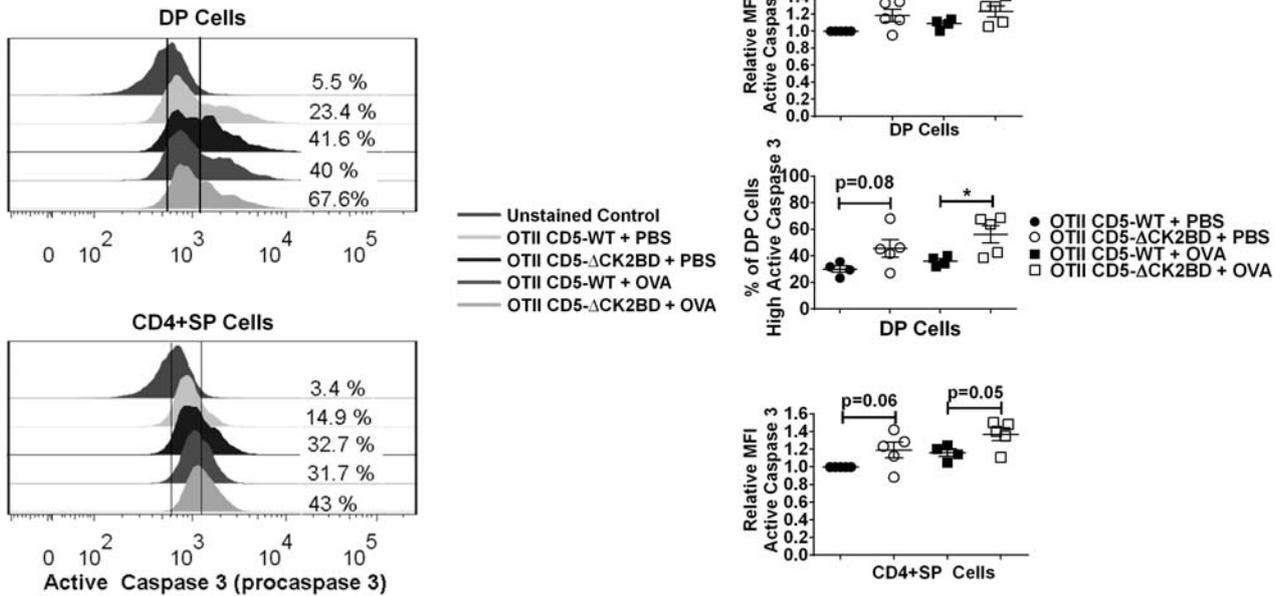


For Peer Review.

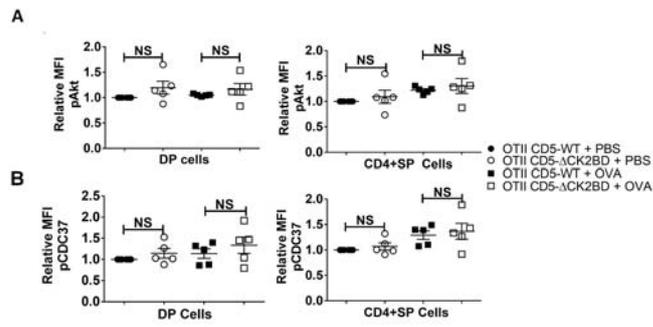
A



B

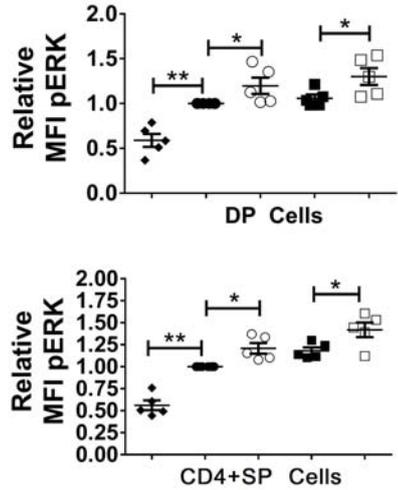
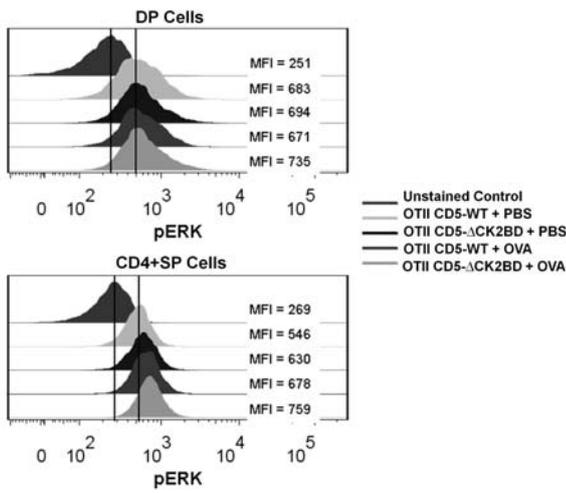


Destroy after use.



For Peer Review. Do not

A



- ◆ Unstained Control
- OTII CD5-WT + PBS
- OTII CD5-ΔCK2BD + PBS
- OTII CD5-WT + OVA
- OTII CD5-ΔCK2BD + OVA

B

