



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE B-BETA EN LA ACTIVACIÓN Y EN LA ADQUISICIÓN DE
FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS T**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ ALEJANDRO CISNEROS SEGURA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Martínez Álvarez, Julio Cesar**

VOCAL: **Profesor: Pérez Montesinos, Gibran**

SECRETARIO: **Profesor: Crispín Acuña, José Carlos**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Rosa Camacho, Sandoval**

2° SUPLENTE: **Profesor: Castro Escamilla, Octavio**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN. DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Carlos Crispín Acuña

Firma:

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. Noé Rodríguez Rodríguez

Firma:

SUSTENTANTE:

José Alejandro Cisneros Segura

Firma:

Este proyecto se llevó a cabo gracias a un financiamiento de CONACyT recibido en el marco de la Convocatoria de Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-1 (#549), titulado: Mecanismos que Limitan la Duración de la Respuesta Inmune y su Participación en el Desarrollo de Autoinmunidad.

*“The secret of genius is to carry the spirit of the child
into old age, which means never losing your
enthusiasm.”*
Aldous Huxley

Índice

1. Resumen	1
2.1. Expansión y contracción clonal	3
2.1.1. Activación de células T y expansión clonal	3
2.1.2. Control de la expansión clonal	5
2.2. Fosfatasa PP2A.....	8
2.2.1. Estructura.....	8
2.2.2. Subunidades catalíticas	9
2.2.3. Subunidades estructurales.....	10
2.2.4. Subunidades reguladoras	10
2.3. PP2A y LEG	11
2.4. PP2A B β	13
2.5. PP2A B β y Akt	14
2.6. Modelo de estudio	14
3. Objetivos	17
3.1. General.....	17
3.2. Particulares	17
4. Materiales y métodos	18
4.1. Ratones	18
4.2. Aislamiento de RNA y PCR	18
4.3. Tinciones para citometría.....	20
4.4. Activación de células T <i>ex vivo</i>	20
4.5. Proliferación celular	20
4.6. Diferenciación hacia células T cooperadoras	20
4.7. Fosforilación Akt	21
4.8. Apoptosis celular.....	22
4.9. Infección con <i>Listeria monocytogenes-OVA</i>	22
5. Resultados	23
5.1. Activación de células T <i>ex vivo</i>	23
5.2. Proliferación celular	25
5.3. Diferenciación hacia células T cooperadoras	27
5.4. Fosforilación de Akt	31
5.5. Apoptosis.....	33
5.6. Infección con <i>Listeria monocytogenes-OVA</i>	34
6. Discusión	40
7. Conclusiones.....	46
8. Bibliografía.....	47

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Expansión clonal.....	3
<i>Figura 2.</i> Presentación antigénica.....	4
<i>Figura 3.</i> La homeostasis de células T se mantiene mediante homeostasis.....	6
<i>Figura 4.</i> Estructura trimérica de PP2A.....	9
<i>Figura 5.</i> Estructura de PP2A.....	10
<i>Figura 6.</i> Proceso de recombinación.....	15
<i>Figura 7.</i> Activación <i>ex vivo</i> de células CD3 ⁺	23
<i>Figura 8.</i> Activación <i>ex vivo</i> de células CD8 ⁺	24
<i>Figura 9.</i> Activación <i>ex vivo</i> de células CD4 ⁺	25
<i>Figura 10.</i> Proliferación de células CD8 ⁺	26
<i>Figura 11.</i> Proliferación de células CD4 ⁺	27
<i>Figura 12.</i> Diferenciación hacia Th0.....	28
<i>Figura 13.</i> Diferenciación hacia Th1.....	28
<i>Figura 14.</i> Diferenciación hacia Th2.....	29
<i>Figura 15.</i> Diferenciación hacia Th17.....	30
<i>Figura 16.</i> Diferenciación hacia iTregs.....	32
<i>Figura 17.</i> Western Blot de pAkt.....	32
<i>Figura 18.</i> pAkt.....	32
<i>Figura 19.</i> pAkt.....	32
<i>Figura 20.</i> Apoptosis <i>in vitro</i>	33
<i>Figura 21.</i> Número de células OT-I.....	35
<i>Figura 22.</i> Viabilidad Celular.....	36
<i>Figura 23.</i> Células T de memoria.....	37
<i>Figura 24.</i> Células KLRG1.....	38
<i>Figura 25.</i> Producción de IFN- γ	39
<i>Figura 26.</i> Producción de IL-2.....	39

Abreviaturas

AP1	<i>Proteína activadora 1</i>
APC	<i>Célula presentadora de antígenos</i>
CaMK	<i>Proteína cinasa dependiente de calmodulina/Ca²⁺</i>
CD	<i>Clúster de diferenciación</i>
Cdk	<i>Cinasa dependientes de ciclinas</i>
CWID	<i>Muerte celular inducida por privación de citocinas</i>
Elf1	<i>Factor de transcripción tipo ETS 1</i>
FcRγ	<i>Receptor de Fc gamma</i>
IFN	<i>Interferón</i>
IL	<i>Interleucina</i>
KLRG1	<i>Marcador tipo lectina de células citotóxicas</i>
KO	<i>Knockout</i>
LEG	<i>Lupus Eritematoso Generalizado</i>
MAPK	<i>Proteína cinasa activada por mitógenos</i>
MHC	<i>Complejo Principal de histocompatibilidad</i>
MOMP	<i>Permeabilización de la membrana externa mitocondrial</i>
mRNA	<i>RNA mensajero</i>
mTOR	<i>Blanco mamífero de la rapamicina</i>
NF-κB	<i>Factor nuclear-κB</i>
NFAT	<i>Factor nuclear de células T activadas</i>
OVA	<i>Ovoalbúmina</i>
P.I.	<i>Post-infección</i>
PP2A	<i>Proteína Fosfatasa 2A</i>
RICD	<i>Muerte celular inducida por re-estimulación</i>
RT-PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real</i>
SFB	<i>Suero Fetal Bovino</i>
SOCS	<i>Supresor de señalización de citocinas</i>
STAT	<i>Señal transductora y activadora de la transcripción</i>
T_{CM}	<i>Célula T de memoria central</i>
TCR	<i>Receptor de célula T</i>
T_{EM}	<i>Célula T de memoria efectora</i>
TGF-β	<i>Factor de crecimiento transformante beta</i>

Th *Célula T cooperadora*

Tregs *Células T reguladoras*

T_{RM} *Célula T residente de memoria*

1. Resumen

PP2A es una fosfatasa de serinas y treoninas, altamente conservada, que participa en la regulación de diversos procesos celulares. Consta de tres subunidades: estructural (PP2Aa), catalítica (PP2Ac) y reguladora (PP2Ab). Una amplia variedad de proteínas, agrupadas en tres familias, pueden funcionar como subunidades reguladoras de PP2A. Éstas se asocian en forma mutuamente excluyente con el heterodímero PP2Aa/c y determinan la especificidad de la enzima y su distribución intracelular. Una de ellas, la subunidad reguladora B β (B55 β), codificada por el gen *PPP2R2B*, se induce en células T humanas activadas en respuesta a la disminución en los niveles de IL-2. Su expresión es necesaria y suficiente para la iniciación de apoptosis en respuesta a la privación de IL-2. La inducción de B β es deficiente en pacientes con la enfermedad autoinmune lupus eritematoso generalizado y este defecto se asocia a resistencia a apoptosis. Las células T en reposo expresan niveles bajos de B β , lo que indica que esta subunidad podría participar en la regulación de la activación de las células T. En objetivo de este proyecto fue analizar si B β juega un papel regulador durante la activación de células T CD4.

Para interrogar la función de B β , comparamos la activación, la proliferación, la diferenciación hacia subtipos efectores y la inducción de apoptosis en células T de ratones normales (WT) y de ratones con deficiencia condicional de B β en las células T (KO).

Para conocer el efecto de la deficiencia de B β en ratones no manipulados, analizamos el perfil de activación de células T de ratones KO y WT. Observamos que la deficiencia de B β se asocia a un incremento en la abundancia de células T activadas (CD4⁺ y CD8⁺). La ausencia de B β no afectó la proliferación de las células. Sin embargo, la deficiencia de B β causó un incremento en la fosforilación de Akt (basal e inducida por activación de CD3). Además se detectó mayor producción de interleucina 17 y, paradójicamente, a mayor expresión de FoxP3 en cultivos de

diferenciación a los linajes Th17 y células T reguladoras, respectivamente. La ausencia de B β se asoció a una menor tasa de apoptosis tanto en ensayos in vitro como en un modelo in vivo de infección aguda por *Listeria monocytogenes*. En este último pudimos observar que B β es necesaria para la correcta contracción del sistema inmune, en particular de células T CD8⁺ con fenotipo efector.

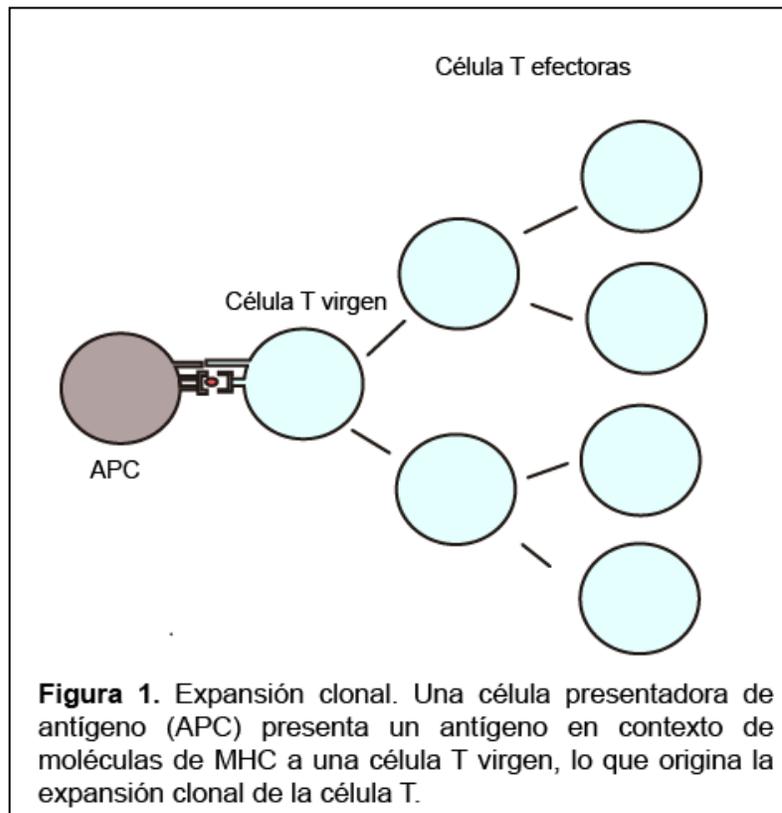
En conclusión, nuestros resultados indican que B β no está involucrado en la regulación de la proliferación celular, pero si juega un papel modulador en la diferenciación de células T CD4⁺, probablemente a través de controlar la actividad de Akt. Probablemente su papel más importante sea la regulación de la vida de las células T activadas. Estos resultados refuerzan y amplían las observaciones hechas en humanos, en donde se ha propuesto a B β como un regulador de la apoptosis de células T activadas y una molécula que evita el desarrollo de autoinmunidad.

2. Introducción

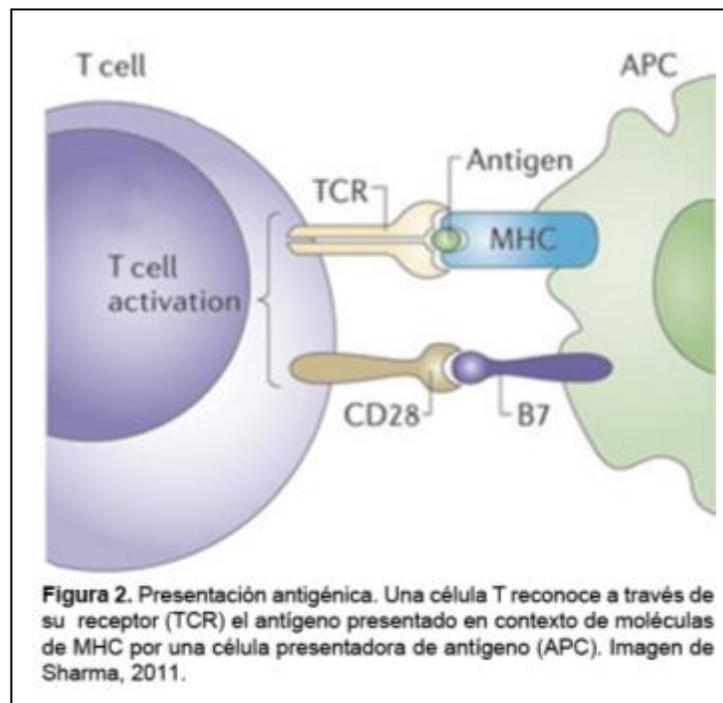
2.1. Expansión y contracción clonal

2.1.1. Activación de células T y expansión clonal

El sistema inmune adaptativo está formado por una gran cantidad de linfocitos T y B que expresan receptores antigénicos únicos, generados al azar. Esto permite al sistema tener un repertorio de receptores sumamente amplio. Sin embargo, la frecuencia de cada receptor es muy baja. Con el fin de montar respuestas inmunes efectivas, el sistema depende de que las pocas células que reconocen a un antígeno proliferen rápidamente. Este fenómeno, llamado expansión clonal^{1,2}, permite que células individuales generen poblaciones de células específicas activadas con la capacidad de controlar un reto antigénico (Figura 1)³.



Las células T CD4 se activan a través de su receptor (receptor de células T, TCR) por antígenos presentados en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en células presentadoras de antígenos (APC). Las consecuencias funcionales de dicha activación varían dependiendo de la presencia de otras señales simultáneas. Así, la activación óptima de la célula T requiere de la interacción de moléculas de co-estimulación (e.g. CD28) con ligandos presentes en la APC (e.g. CD80 y CD86) y de la presencia de citocinas como la interleucina (IL)-12, el interferón (IFN)- α y la IL-15 (Figura 2). La integración de dichos estímulos durante el reconocimiento antigénico permite a la célula T diferenciarse en una célula con capacidades específicas capaz de llevar a cabo una respuesta adecuada al patógeno que la desencadenó^{4,5}.



Tras su activación, las células T CD4 vírgenes se diferencian hacia diferentes subtipos funcionales a través de un proceso finamente balanceado, controlado por el TCR, las moléculas de co-estimulación, y por el tipo de citocinas presentes en el microambiente⁶. Diferentes citocinas inducen la expresión de factores de transcripción específicos que determinan el tipo de diferenciación. Así, T-bet, GATA-3, ROR- γ T y Foxp3 inducen programas genéticos mutuamente excluyentes que

conducen a fenotipos diferentes que se han llamado, respectivamente, Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Tregs)^{7,8}.

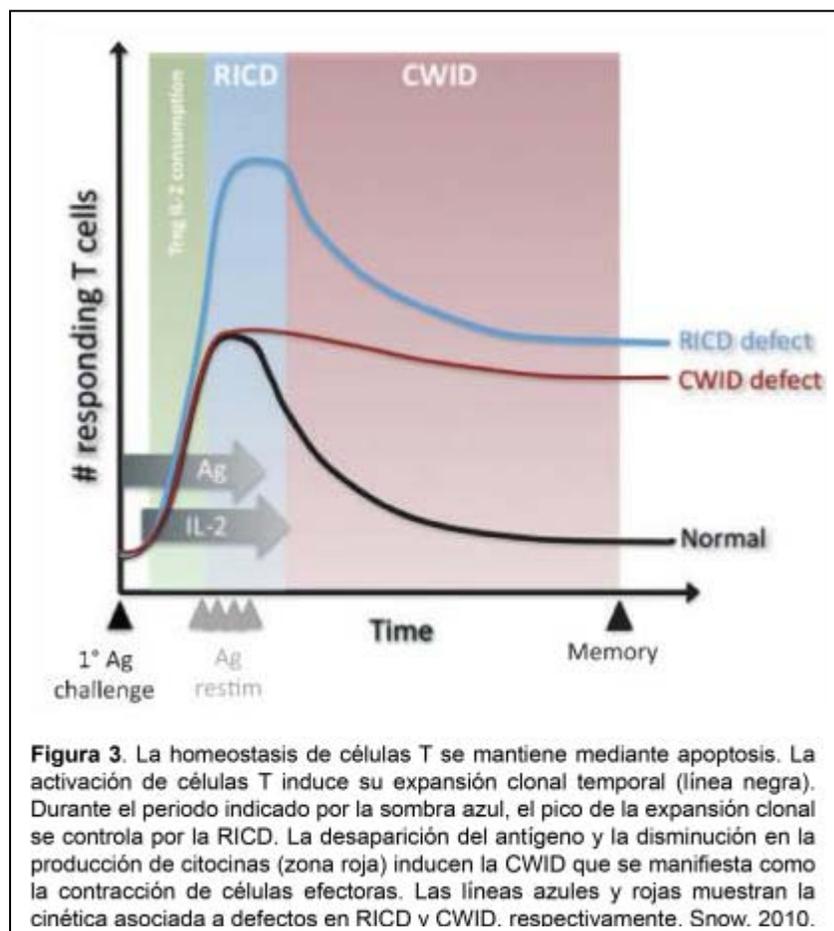
La activación de las células T por antígenos específicos induce en ellas cambios profundos en procesos celulares fundamentales como el ciclo celular y vías metabólicas. Estos se acompañan de cambios en la expresión de diversas moléculas, por ejemplo en las tres cadenas del receptor de IL-2: IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) y γ c (CD132) conocida también como cadena γ común. También se observan cambios en la expresión de moléculas de adhesión lo que permite a las células salir de tejidos linfoides y entrar en tejidos inflamados⁹. Los cambios en las vías metabólicas son marcados. Las células T vírgenes producen energía principalmente a través de la fosforilación oxidativa y la β -oxidación, pero la activación incrementa la entrada de nutrientes y la activación de múltiples vías metabólicas que tienen como meta cumplir con la demanda biosintética que ocurre durante la expansión clonal y funciones efectoras⁷.

2.1.2. Control de la expansión clonal

La magnitud de la expansión de clonas de células T activadas se regula a dos niveles. En primer lugar se controla la cantidad de células que se producen durante la expansión. En segundo, se controla la duración de la expansión. Esto se logra a través de dos mecanismos, la muerte celular inducida por re-estimulación (RICD) y la muerte celular inducida por privación de citocinas (CWID). La RICD depende de la cantidad de antígeno presente en el microambiente y del estado de activación de las células T. El segundo mecanismo se basa en la dependencia que tienen las células T activadas en la presencia de citocinas (e.g. IL-2). La RICD controla la amplitud de la expansión durante el pico de la respuesta inmune, mientras que la CWID regula la duración de la respuesta (Figura 3)¹⁰.

En la CWID participan las Treg que expresan Foxp3 (Foxp3⁺) Estas controlan la respuesta al inducir apoptosis en las células activadas a través de regular la producción de citocinas y consumir los factores que promueven la supervivencia de las células activadas¹¹.

La IL-2 es una citocina clave para la proliferación y supervivencia de las células T. Su interacción con el receptor trimérico de IL-2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) activa diversas vías de señalización (e.g. JAK, STAT, MAPK y PI3K) que promueven la progresión del ciclo celular y la expresión de proteínas anti-apoptóticas¹².



La privación de citocinas incrementa la expresión de moléculas pro-apoptóticas (e.g. Bim) lo que altera el balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas. Esto induce la despolarización de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo-C, lo que culmina con apoptosis^{10,13}.

Lenardo y colaboradores demostraron que la incubación de células T activadas con Tregs causaba desfosforilación de Akt y apoptosis en las células activadas. Esto es porque Akt fosforilado (activo) promueve la supervivencia celular al fosforilar e inhibir a Bad¹¹. La falla en estos mecanismos que controlan la respuesta inmune y aseguran el mantenimiento de la homeostasis puede conducir a la acumulación de células T activadas y al desarrollo de inmunopatología y autoinmunidad¹⁰.

La contracción clonal elimina a la inmensa mayoría de las células producidas durante la respuesta inmune. Sin embargo, tras la culminación de la respuesta inmune aguda sobreviven células que son específicas a los antígenos que desencadenaron la respuesta. Estas células, llamadas de memoria, tienen la capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo largos y de montar respuestas inmunes rápidas y efectivas en caso de un nuevo encuentro con el mismo antígeno¹⁴. Existen varios subtipos de células de memoria que difieren en sus funciones y localización: células T de memoria central (T_{CM}), células T de memoria efectora (T_{EM}), células T residentes (T_{RM})¹⁵.

La población T_{CM} permanece en los ganglios linfáticos y, aunque tiene una función efectora limitada, posee una gran capacidad de proliferar y dar lugar a células efectoras cuando es activada. En contraste, las células T_{EM}, que residen en tejidos periféricos, tienen una capacidad efectora elevada, pero limitada capacidad proliferativa¹⁶. Estas poblaciones se definen por la expresión de marcadores de superficie: las células T_{CM} son CD44^{high} CD62L⁺ CCR7⁺ CD127⁺ CD69⁻, mientras que las T_{EM} presentan CD44^{high} CD62L⁻ CCR7⁻ CD127⁺ CD69⁻ CD103⁻¹⁷.

2.2. Fosfatasa PP2A

PP2A es la fosfatasa de serinas y treoninas más abundante y más ubicuamente expresada en células eucariotas¹⁸. Juega un papel importante en muchos procesos celulares: controla el metabolismo al regular enzimas involucradas en la glucólisis y el metabolismo de lípidos. También regula el ciclo celular, la replicación del DNA, la transcripción y traducción, vías de señalización, la dinámica del citoesqueleto y la apoptosis¹⁹.

Se considera que PP2A actúa como supresor de tumores, ya que la administración de ácido ocadáico, un inhibidor de PP2A, a ratones provocó la aparición de tumores. De hecho, la capacidad oncogénica de varios virus se ha atribuido a su capacidad de desplazar las subunidades reguladoras de la holoenzima²⁰. Asimismo, se ha reportado que PP2A juega un papel dual en apoptosis, ya que dependiendo de las subunidades que componen la holoenzima, puede tener efectos pro- o anti-apoptóticos²¹.

2.2.1. Estructura

PP2A está compuesta por un heterotrímero formada por una subunidad estructural o de andamiaje (PP2Aa o A), una subunidad catalítica (PP2Ac o C) y una subunidad reguladora (PP2Ab o B). El heterodímero A/C está constitutivamente expresado, pero la especificidad de sustrato y actividad completa son conferidas por la subunidad reguladora B (Figura 4)²¹.

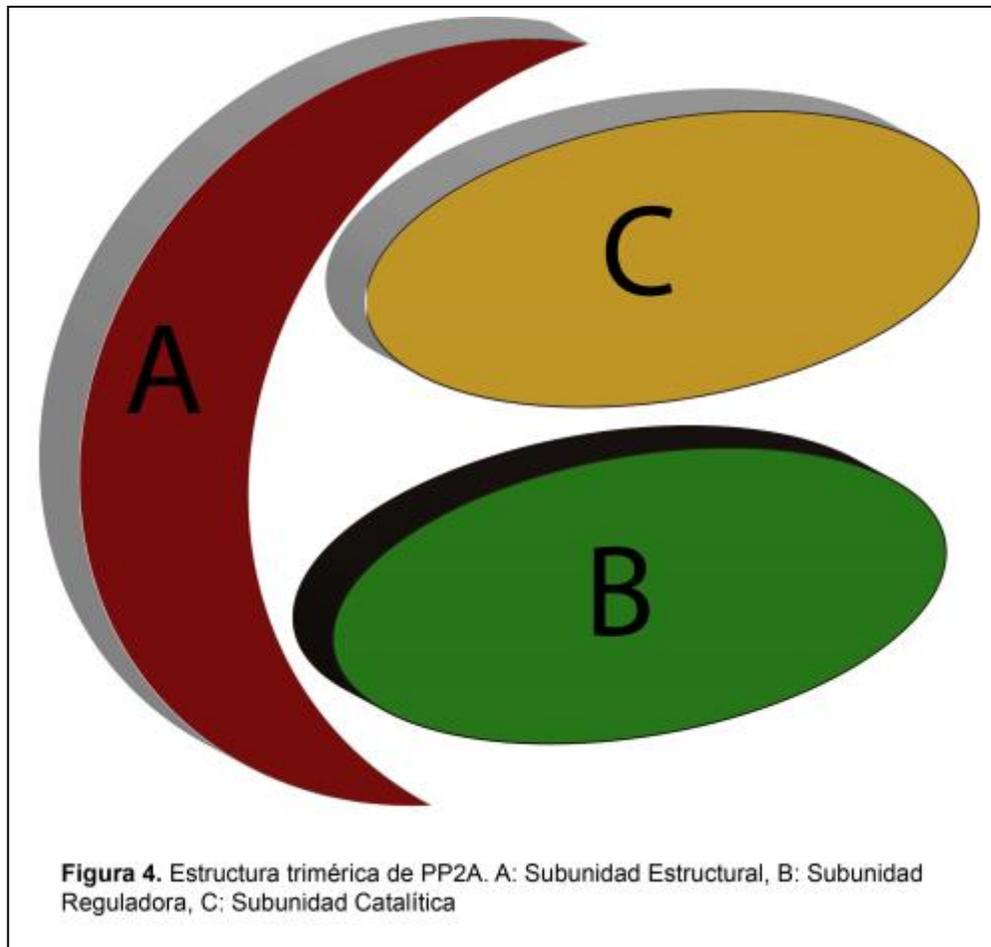


Figura 4. Estructura trimérica de PP2A. A: Subunidad Estructural, B: Subunidad Reguladora, C: Subunidad Catalítica

2.2.2. Subunidades catalíticas

Están codificadas por dos genes homólogos, altamente conservados, que dan origen a las isoformas α y β . Ambas tienen un peso molecular de 35 kDa y comparten 97% de su secuencia primaria. Esta subunidad tiene un dominio conservado que forma el sitio activo para la hidrólisis fosfo-éster. Tiene como blanco grupos fosfato en residuos de serina o treonina. El reclutamiento de la subunidad reguladora al núcleo de la holoenzima está estrictamente regulado por patrones de metilación y fosforilación en el extremo C-terminal de la subunidad catalítica ²⁰.

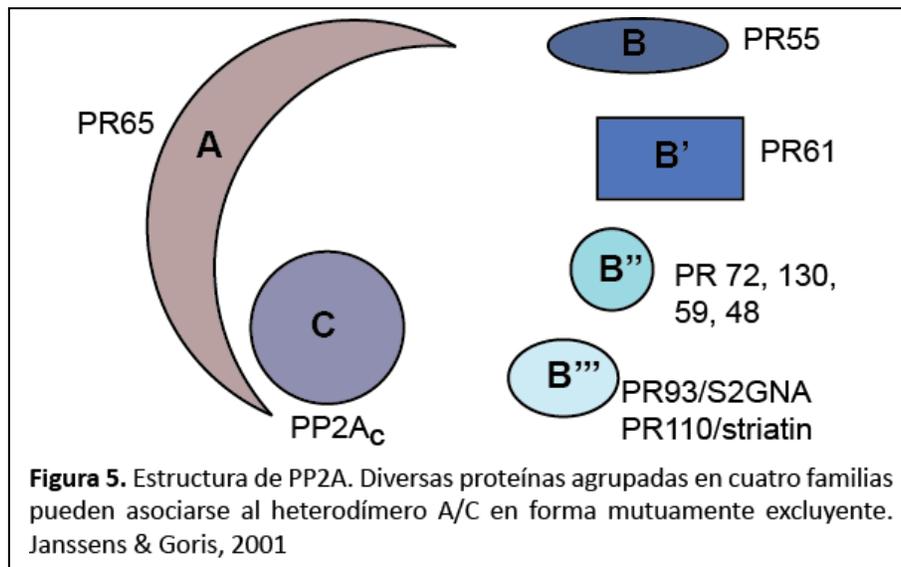
2.2.3. Subunidades estructurales

Están codificadas por dos genes, que dan origen a dos isoformas: PR65 α y PR65 β . Después de la formación del núcleo de la holoenzima, la subunidad estructural se pliega formando una estructura tipo herradura que permite a la subunidad catalítica tener acceso al sustrato que es reclutado por la subunidad reguladora ²⁰.

2.2.4. Subunidades reguladoras

Existen pocas variantes para las subunidades catalíticas y estructural, pero en humanos existen al menos 26 diferentes subtipos de la subunidad reguladora (Figura 5). Dichas variantes son producto de transcritos de al menos 15 genes, agrupados en cuatro familias:

- B/B55/PR55
- B'/B56/PR61
- B''/B72/PR72
- B'''/PR93



Los niveles de expresión de estas isoformas son altamente variables y dependen del tipo celular y tejido. La selección de subunidad reguladora provee a la enzima un nivel importante de regulación, ya que determina la ubicación celular y la especificidad de sustrato^{19,21,22}.

2.3. PP2A y LEG

Defectos en la expresión o función de PP2A se han asociado a diversas enfermedades como cáncer^{19,23}, recientemente se ha reportado defectos en la expresión y función de PP2A, en las células T de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG)²⁴⁻²⁸.

El LEG es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva²⁹⁻³¹ siendo más común en afroamericanos, afrocaribeños, asiáticos, e hispanos que en caucásicos³⁰. Las células del sistema inmunológico de pacientes con LEG presentan diversas anormalidades moleculares que contribuyen a la patogenia de la enfermedad, entre las que se encuentran la presencia de autoanticuerpos producidos por células B autorreactivas³². Las células T presentan diversas anormalidades moleculares entre las que se encuentra defectos en la expresión de la cadena ζ de CD3 que es remplazada por el receptor de las inmunoglobulinas (FcR γ) resultando hiperactivación de células T³³. Las citocinas contribuyen a la patogenia mediante diversos mecanismos, uno de estos es la producción anormalmente baja de IL-2 en células T de pacientes con LEG³⁴ contribuyendo a la reducción del número de células T reguladoras observado en esta enfermedad³⁵. Otra citocina es la IL-17, que se encuentra aumentada en el suero de pacientes con LEG contribuyendo a la enfermedad a través de mecanismos como la facilitación de la respuesta inflamatoria en respuesta a complejos inmunes y quizá la activación de células B autorreactivas^{36,37}.

PP2A contribuye a la patogenia del LEG mediante diversos mecanismos ya que se han reportado diversos defectos en la función y expresión de las subunidades que conforman a esta fosfatasa²⁴⁻²⁸.

Existe un incremento en los niveles de expresión de la subunidad catalítica (PP2Ac), que se ha asociado a diversos defectos en células T, entre los que se incluyen anomalías en la producción de citocinas²⁸. Un análisis del promotor de *PP2Ac*, (que se encuentra regulado por metilación de una isla CpG) realizado en pacientes con LEG y controles sanos, encontró una disminución en la metilación del mismo en las células de pacientes con LEG¹⁸. También existen defectos en la producción de una de una de las subunidades reguladoras, B55 β lo cual se ha asociado con defectos en la apoptosis de células T de pacientes con LEG²⁴.

La producción de IL-2 está regulada a nivel transcripcional por diversos factores (NF-AT, AP-1, NF- κ B, CREB)³⁸. En pacientes con LEG la actividad del promotor de *IL2* se encuentra anormalmente disminuida. Esto es causado por una disminución en la actividad de NF- κ B y AP-1 y por un incremento en la unión del represor CREM al sitio -180 del promotor de *IL2*. En células T sanas este sitio se encuentra principalmente ocupado por pCREB lo cual incrementa la actividad del promotor. PP2A es la fosfatasa principal que regula la desfosforilación de pCREB. Se ha propuesto que en células T de pacientes con LEG, el incremento anormal en la concentración y en la actividad de PP2Ac favorece la desfosforilación (y por ende la inactivación) de pCREB y la disminución en la transcripción de IL-2²⁵.

Como ya se mencionó, en LEG existen defectos en la señalización a través del TCR, en particular, una disminución en los niveles de expresión de CD3 ζ y un aumento recíproco en FcR γ ³³. La transcripción de la cadena CD3 ζ está regulada por un factor de transcripción de la familia Ets denominado Elf-1. La unión de este factor a la región promotora de *CD247*, el gen que codifica CD3 ζ , favorece la transcripción. Análisis del promotor de *FCER1G*, el gen que codifica para FcR γ , demostró que Elf-1 también participa en la regulación de dicho promotor, donde puede funcionar como

potenciador o represor. Elf-1 se encuentra presente en dos formas, una de 80 y una de 98kDa. La diferencia entre ellas es fosforilación extensa. En LEG hay una disminución de la forma activa de Elf-1 (98kDa). Esto se ha asociado al incremento en PP2A. Así, el aumento anormal de PP2A se asocia a menor actividad transcripcional de Elf-1 y a menor expresión de CD3 ζ ²⁶.

La sobre-expresión transgénica de la subunidad catalítica (PP2Ac) en células T en un modelo *in vivo*, demostró que el aumento en la actividad de PP2Ac altera el fenotipo de las células T. Las células T del ratón transgénico mostraban un incremento anormal en la producción de IL-17A e IL-17F y mayor susceptibilidad al daño renal inmune en el contexto de glomerulonefritis inducida por anticuerpos ²⁷. Análisis posteriores demostraron que el mecanismo a través del cual PP2Ac facilita el incremento en la producción de IL-17 es la facilitación de su transcripción ya que induce cambios epigenéticos en el locus de *Il17* que lo hacen más permisivo a la unión de factores de transcripción²⁸.

2.4. PP2A B β

Una de las subunidades de PP2A que recientemente se han relacionado al LEG es la subunidad B β (B55 β), que pertenece a la familia B (PR55)^{19,24}. Un estudio realizado en 2011, encontró que una de las subunidades reguladoras de PP2A expresadas en células T, B β mostraba una cinética peculiar. Sus niveles en células T quiescentes son bajos y su expresión disminuye horas después de la activación celular. Ausente en células T activadas, se expresa a niveles altos durante la privación de IL-2. Análisis subsecuentes en donde su expresión se forzaba o silenciaba, demostraron que la expresión de B β es suficiente para inducir apoptosis en células T activadas, mientras que su silenciamiento induce resistencia a la apoptosis por privación de IL-2 ²⁴.

Al analizar la cinética de apoptosis por privación de IL-2 en células T de pacientes con LEG se encontró que las células T de algunos pacientes eran resistentes a la

apoptosis y que dicho defecto correlaciona con falta de inducción de B β ²⁴. Estos estudios indican que B β es una molécula que regula la supervivencia de las células T activadas en respuesta a las concentraciones de IL-2 y sugieren que defectos en su expresión o función podría contribuir a la autoinmunidad.

2.5. PP2A B β y Akt

PP2A controla la actividad de diversas cinasas, incluyendo a la cinasa de proteínas B (PKB o Akt), C (PKC), p70 S6, las cinasas dependientes de calmodulina (CaMK), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las ciclinas dependientes de cinasas (Cdk)³⁹.

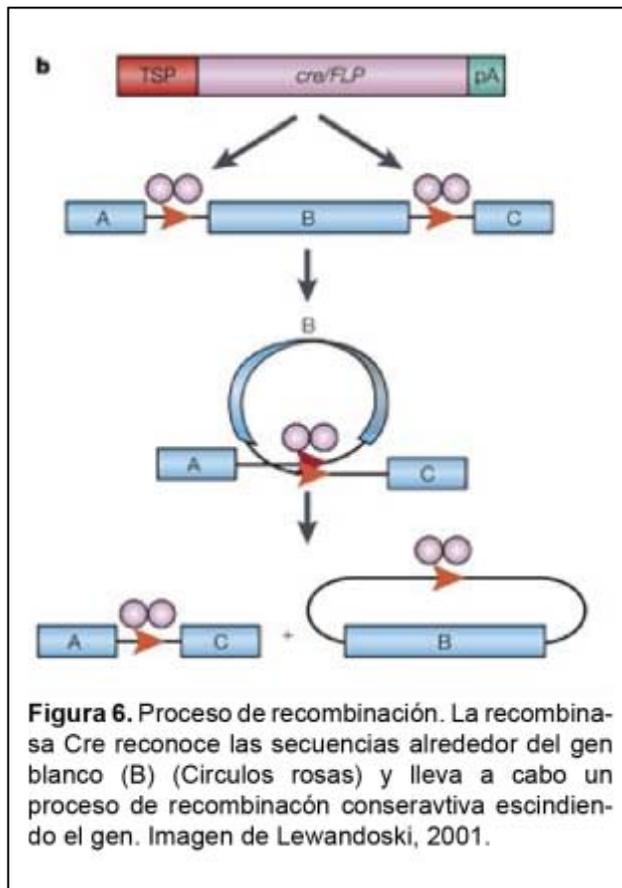
La activación de Akt es regulada por fosforilación en dos sitios: un residuo de treonina en la posición 308 (T308) y uno de serina en la posición 473 (S473) (Lifen Yang et al., 2011). Resultados no publicados de Crispín y colaboradores demuestran que la privación de IL-2 en células T activadas causa la desfosforilación de Akt en las posiciones T308 y S473. También demuestran que la desfosforilación de Akt, específicamente del residuo S473, es mediada por B β , ya que el silenciamiento de B β con shRNAs específicos bloquea la desfosforilación de Akt S473 inducida por privación de IL-2. Por otro lado, se ha reportado que la fosforilación de Akt T308 es regulada por PP2A acoplada a la subunidad reguladora B55 α ⁴¹.

2.6. Modelo de estudio

Avances en ingeniería genética, en particular en la generación de ratones con deficiencias genéticas (knockout; KO), han ayudado a entender de una manera más detallada la forma en la que el sistema inmune funciona⁴². Cre es una recombinasa de la familia de las integrasas, proveniente del Bacteriófago P1, que cataliza una

recombinación conservativa de DNA entre dos sitios de reconocimiento de 34 pb (*loxP*) que no requiere de proteínas accesorias o cofactores (Figura 6)⁴³.

Se adquirió del proyecto KOMP (Knockout mouse Project) un ratón de la cepa C57BL/6 con sitios *loxP* a los lados del 3er exón del gen que codifica para B β (*Ppp2r2b*). Dicho ratón, *Ppp2r2b^{fl/fl}*, se cruzó con un ratón que expresa en forma transgénica la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Cd4* (*Cd4-Cre*). Todas las células T con receptor $\alpha\beta$ progresan a través de una etapa en la que expresan simultáneamente los co-receptores CD4 y CD8⁴⁴. Por esta razón, la expresión de Cre asociada al promotor de CD4 realiza la recombinación en todas las células T con TCR- $\alpha\beta$. Así, la cruce del ratón *Ppp2r2b^{fl/fl}* y el ratón *Cd4-Cre*, que carece de B β específicamente en células T, se denominó C57BL/6.*Ppp2r2b^{fl/fl}*.CD4-Cre.



Hipótesis

La evidencia disponible indica que la subunidad reguladora de PP2A, B β , se expresa en niveles bajos en células T en reposo y en niveles altos cuando baja la concentración de factores de crecimiento, en particular IL-2. Su expresión es necesaria y suficiente (cuando es en niveles altos) para la inducción de apoptosis. La manera en la que induce apoptosis es a través de la modulación de la actividad de Akt. La importancia de este proceso está ejemplificada por el hecho de que defectos en su inducción y, por consiguiente, en la inducción de apoptosis en respuesta a privación de IL-2, se asocian a la presencia de LEG.

El hecho de que B β sea capaz de regular la actividad de Akt, que se exprese en células T en reposo y que la activación celular disminuya sus niveles, representan las bases de este trabajo cuya hipótesis es que B β modula la activación temprana de células T y que defectos en su expresión podrían alterar la capacidad de proliferación y/o diferenciación de las células T.

3. Objetivos

3.1. General

- Determinar cuáles son las funciones de B β durante la activación, proliferación y apoptosis de células T murinas.

3.2. Particulares

- Analizar si la ausencia de B β afecta la activación de células T murinas.
- Determinar si la ausencia de B β afecta la proliferación de células T murinas inducida por la activación del TCR.
- Investigar si la ausencia de B β afecta la diferenciación de células T CD4⁺ murinas.
- Comprobar si B β modula la activación de AKT durante la activación de células T.
- Comprobar si la ausencia de B β afecta la apoptosis de células T murinas en respuesta a la privación de IL-2.
- Comprobar si la ausencia B β afecta la cinética de contracción de la respuesta inmune empleando un modelo *in vivo*.

4. Materiales y métodos

4.1. Ratones

Se emplearon ratones C57BL/6.*Ppp2r2b^{fl/fl}*.CD4-Cre y C57BL/6.*Ppp2r2b^{+/+}*.CD4-Cre (como control). Para la infección con *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbumina (rLM-OVA) se emplearon ratones OT-I, que expresan un TCR transgénico dependiente de moléculas de MHC clase I y que reconoce un antígeno presente en la OVA. Estos ratones se cruzaron con los ratones deficientes de B β para obtener ratones C57BL/6.*Ppp2r2b^{fl/fl}*.CD4-Cre-OT-I. Todos los ratones que se emplearon tenían entre 8 y 12 semanas de edad.

4.2. Aislamiento de RNA y PCR

Se aisló RNA total usando TRIzol (Sigma). El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA con el cDNA Synthesis Kit de Jena Bioscience. Los análisis de PCR de tiempo real se realizaron empleando SYBR Green de ThermoFisher empleando primers específicos (Tabla 1).

Para determinar el nivel de expresión de los transcritos, se empleó Δ Ct como medida de expresión, para calcularlo se empleó como gen de referencia la β -actina, al obtener los Ct tanto de la actina como del gen a determinar se calculó de la siguiente manera: Δ Ct= Ct_{gen}-Ct_{actina}.

Tabla 1. Lista de primers empleados para evaluar la diferenciación de células CD4

Subtipo Cooperador	Gen	Secuencia	Sentido
Th0	<i>Il2</i>	GCTGTTGATGGACCTACAGGA	+
		TTCAATTCTGTGGCCTGCTT	-
Th1	<i>Tbx21</i>	CAACCAGCACCAGACAGAGA	+
		ACAAACATCCTGTAATGGCTTG	-
	<i>Ifng</i>	GAGGTCAACAACCCACAGGT	+
		GGACAATCTCTTCCCCACC	-
Th2	<i>Gata3</i>	TTATCAAGCCCAAGCGAAG	+
		TGGTGGTGGTCTGACAGTTC	-
	<i>Il4</i>	AAACGTCCTCACAGCAACGA	+
		GCATCGAAAAGCCCGAAAGA	-
	<i>Il3</i>	TGCCATCTACAGGACCCAGA	+
		CTCATTAGAAGGGGCCGTGG	-
Th17	<i>Rorc</i>	ACCTCTTTTCACGGGAGGA	+
		TCCCACATCTCCCACATTG	-
	<i>Il17a</i>	GGCTGACCCCTAAGAAACCC	+
		AAGCAGTTTGGGACCCCTTT	-
	<i>Il17f</i>	CCCAGGAAGACATACTTAGAAGAAA	+
		CAACAGTAGCAAAGACTTGACCAT	-
iTregs	<i>Foxp3</i>	TCAGGAGCCCACCAGTACA	+
		TCTGAAGGCAGAGTCAGGAGA	-
	<i>Il10</i>	TAAGTGCACCCACTTCCCAG	+
		AGGCTTGGCAACCCAAGTAA	-
	<i>Tgfb1</i>	TGGAGCAACATGTGGAATC	+
		GTCAGCAGCCGGTTACCA	-
	<i>Tgfb3</i>	GGACTTCGGCCACATCAAGA	+
		ATAGGGGACGTGGGTCATCA	-

4.3. Tinciones para citometría

Para teñir antígenos extracelulares se empleó una dilución 1:100 de los anticuerpos en PBS con 2% de suero bovino fetal (SFB). Las células se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad. Para las tinciones intracelulares para factores de transcripción y citocinas se emplearon los kits: Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set de eBioscience y BD Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Golgi Plug protein transport inhibitor) de BD respectivamente, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

4.4. Activación de células T *ex vivo*

Para analizar el estado de activación de células recién aisladas, se tiñeron células de bazo con anticuerpos anti-CD62L y CD44 como marcadores de activación. Los análisis se realizaron mediante citometría de flujo en un citómetro BD Fortessa o Life Technologies Attune NxT.

4.5. Proliferación celular

Células T de bazo y ganglios linfáticos inguinales y axilares se purificaron mediante Kit MagniSort® Negative Selection, eBioscience (kits similares se emplearon para aislar otras poblaciones celulares en experimentos sucesivos). Posteriormente las células fueron teñidas con Cell Trace Far Red y estimuladas con anti-CD3 (2 µg/mL) y anti-CD28 (2 µg/mL) unidos a placa en RPMI completo a una concentración de 2 millones de células/500µL. La proliferación se analizó mediante citometría de flujo analizando las poblaciones CD4 y CD8 a los días 3, 4 y 5.

4.6. Diferenciación hacia células T cooperadoras

Células T CD4 vírgenes se diferenciaron hacia los diferentes subtipos cooperadores agregando los cocteles de citocinas descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Combinaciones de citocinas empleadas para inducir diferenciación

Subtipo Cooperador	Citocina	Concentración
Th0	IL-2	100 U/mL
Th1	IL-2	100 U/mL
	IL-12	10 ng/mL
Th2	IL-4	10 ng/mL
Th17	IL-6	25 ng/mL
	TGF- β 1	5 ng/mL
iTregs	TGF- β 1	10 ng/mL
	IL-2	100 U/mL

Las células se sembraron en medio RPMI completo a una concentración de 300 mil células en 200 μ L. A las 48 horas se suplementó el medio con las citocinas indicadas. La diferenciación se analizó al quinto día mediante citometría de flujo y cuantificación de mRNA.

4.7. Fosforilación de Akt

Las células T purificadas se estimularon con anti-CD3 (2 μ g/mL) y con un anticuerpo entrecruzador (cross-linker, anti-Fc; 5 μ g/mL). Las células se lisaron en los siguientes tiempos: basal, 10 y 30 minutos. Se analizó el estado de fosforilación mediante Western Blot, empleando anticuerpos anti-pAKT-S473 y anti-panAKT (para medir cantidad total de Akt).

4.8. Apoptosis celular

Células T purificadas se estimularon con anti-CD3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) unidos a placa en RPMI completo durante tres días. Al día 3 se triplicó el medio y se agregó IL-2 (100 U/mL). Los días 5, 7 y 9 se duplicó el medio y se agregó IL-2. Al día 10 las células se lavaron con PBS frío y se contaron. Posteriormente se sembraron a una concentración de 1 millón de células en 500 μL de RPMI sin añadir IL-2, en presencia de un anticuerpo anti-IL-2 neutralizante (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La apoptosis se cuantificó basalmente, 24 y 48 horas después empleando Anexina V y Sytox.

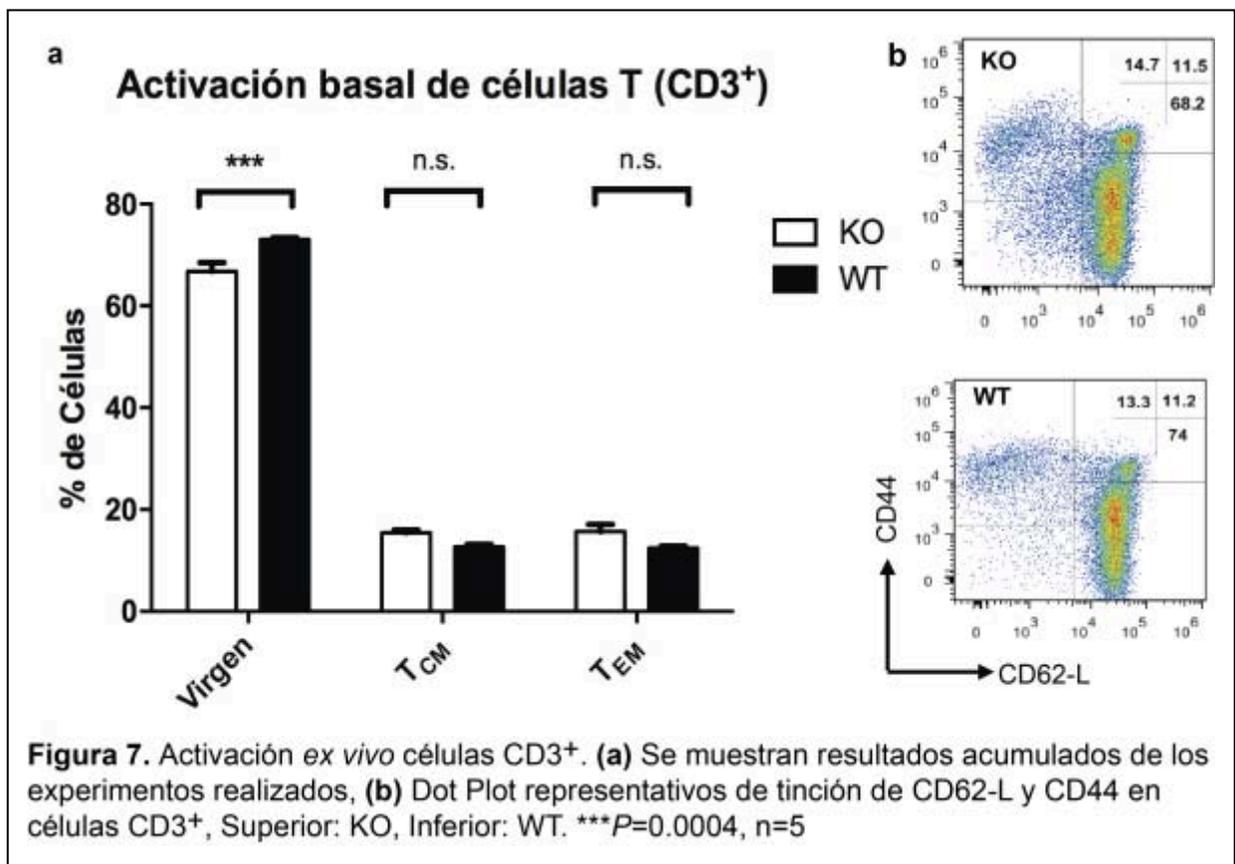
4.9. Infección con *Listeria monocytogenes*-OVA

Se transfirió 1 millón de células CD8⁺ OT-I (deficientes en B β o control) en 200 μL de PBS, por vía intravenosa, a ratones B6. Al día siguiente se infectaron los ratones con 10 mil UFC (en 200 μL de PBS) de rLM-OVA. Los ratones se sacrificaron los días 7, 14 y 30 post-infección. Para los análisis se obtuvieron células T de bazos y se analizó la producción de citocinas, activación y apoptosis *ex vivo*.

5. Resultados

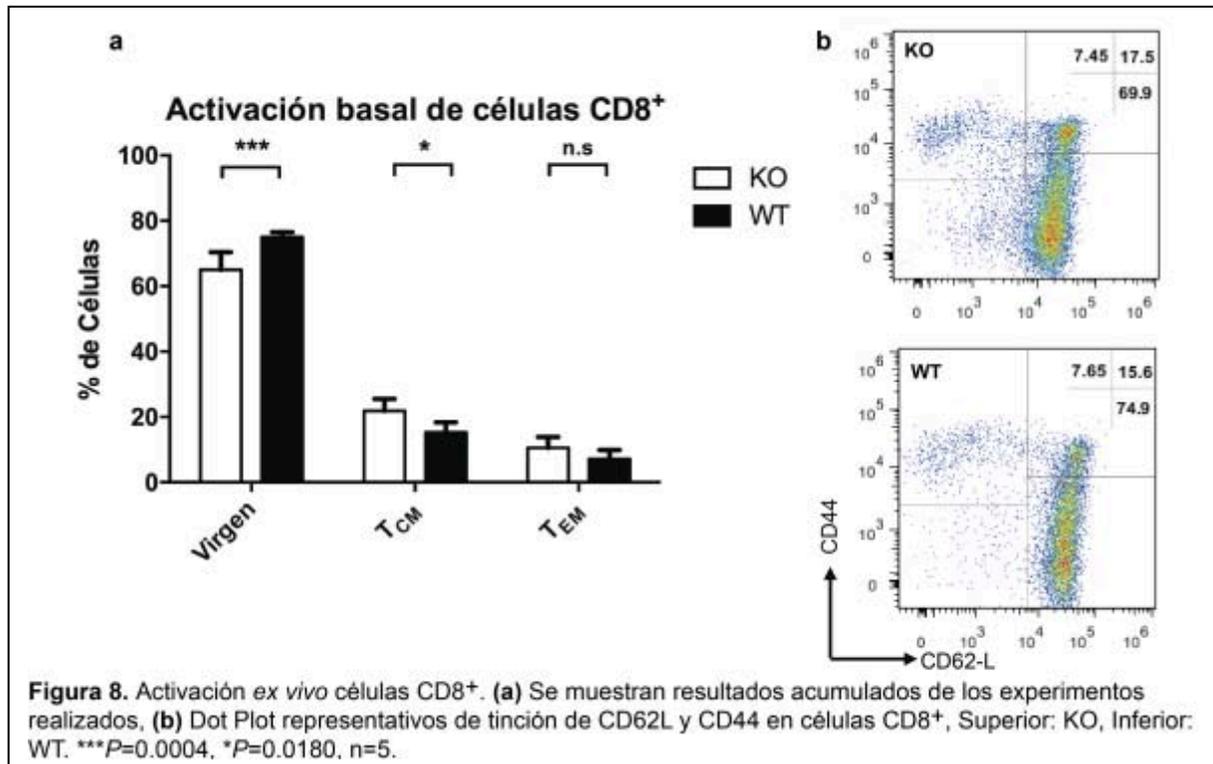
5.1. Activación de células T *ex vivo*

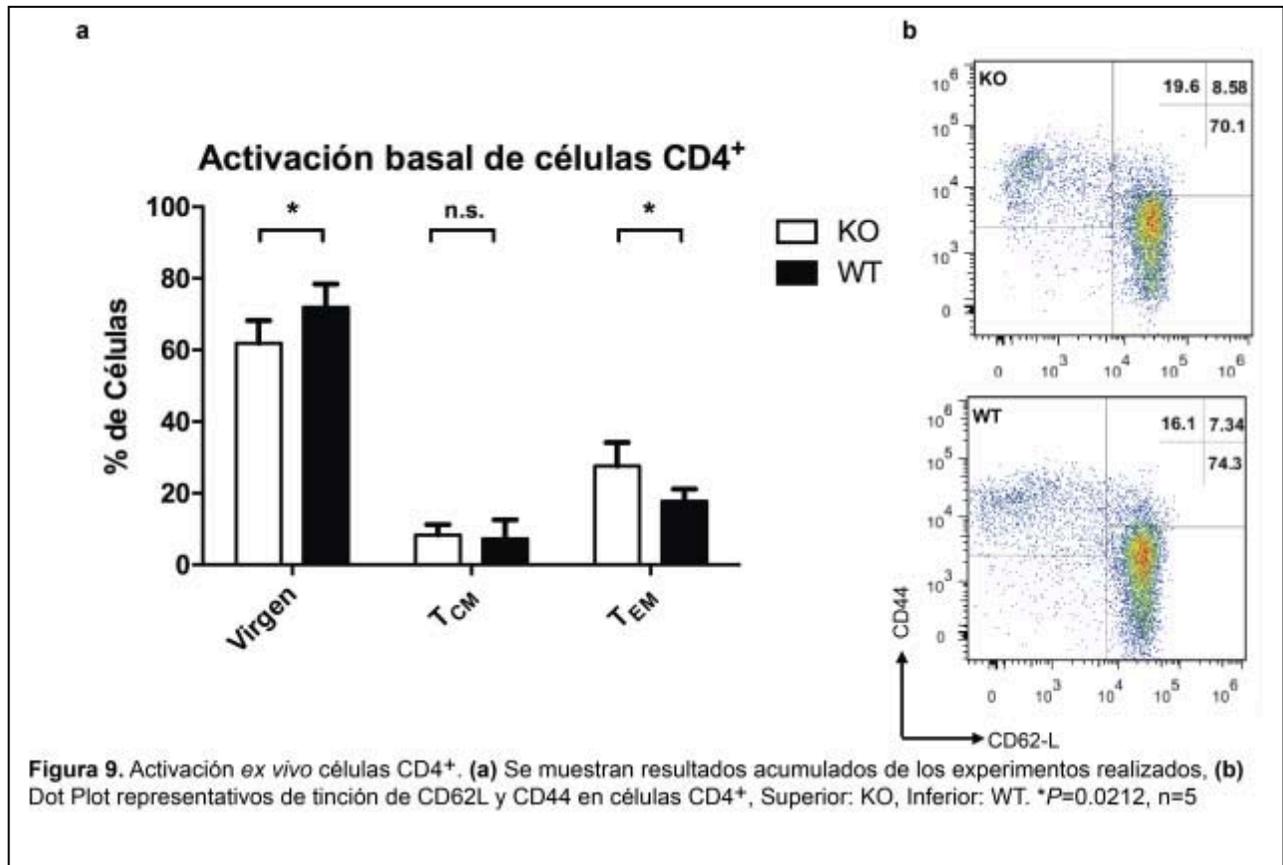
Para determinar si la deficiencia de $B\beta$ causa un incremento en la activación de células T en ratones en estado basal, analizamos el fenotipo de las poblaciones de células T (células T totales: $CD3^+$; células CD4: $CD3^+ CD4^+$; células CD8: $CD3^+ CD8^+$), usando los marcadores de activación y de memoria CD62L y CD44 en ratones KO y control directamente *ex vivo*. Esto se hizo en ratones que tenían entre 8 y 12 semanas de edad, en células del bazo y ganglios linfáticos axilares e inguinales. Con base en la expresión de los marcadores CD62L y CD44, definimos las poblaciones de células T vírgenes ($CD44^- CD62L^+$), T_{CM} ($CD44^{high} CD62L^+$) y T_{EM} ($CD44^{high} CD62L^-$).



Como se muestra en la Figura 7, la deficiencia de B β se asoció a una disminución moderada, pero estadísticamente significativa en la frecuencia de células T vírgenes (CD3⁺ CD44⁻ CD62L⁺) (KO 66.74 \pm 1.7 vs. Control 73.06 \pm 0.304, $P=0.0004$). Asimismo, observamos un incremento no significativo, en los porcentajes de células T de memoria efectora (KO 15.7 \pm 1.41 vs. Control 12.4 \pm 0.389, $P=0.0803$) y central (KO 15.4 \pm 0.533 vs. Control 12.7 \pm 0.45, $P=0.1784$).

El análisis de la población CD8 mostró una tendencia similar al de las células T totales (CD3⁺). Así, observamos una disminución en la frecuencia de células CD8 vírgenes (KO 65.04 \pm 2.39 vs. Control 75.04 \pm 0.67, $P=0.0004$) y un incremento recíproco en la abundancia de células T_{CM} (KO 21.9 \pm 1.6 vs. Control 15.2 \pm 1.39, $P=0.0180$). Estos resultados indican que la deficiencia de B β podría contribuir a la acumulación de células T activadas (Figura 8). Resultados similares se observaron en la población CD4: disminución en el porcentaje de células T vírgenes (KO 61.9 \pm 2.803 vs. Control 71.9 \pm 2.909, $P=0.0212$) y aumento en el de células T_{EM} (KO 27.5 \pm 2.9 vs. Control 17.7 \pm 1.496, $P=0.0250$) en los ratones con deficiencia condicional de B β (Figura. 9).



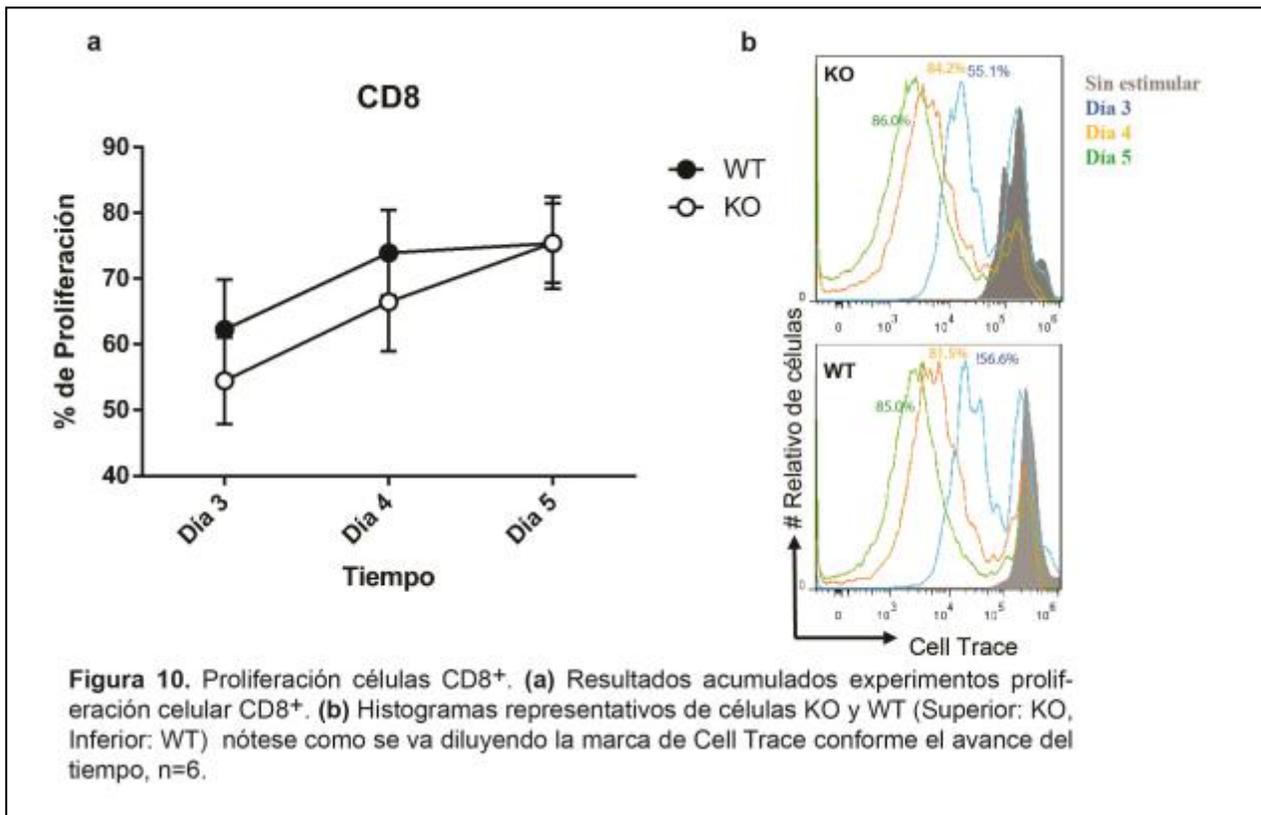


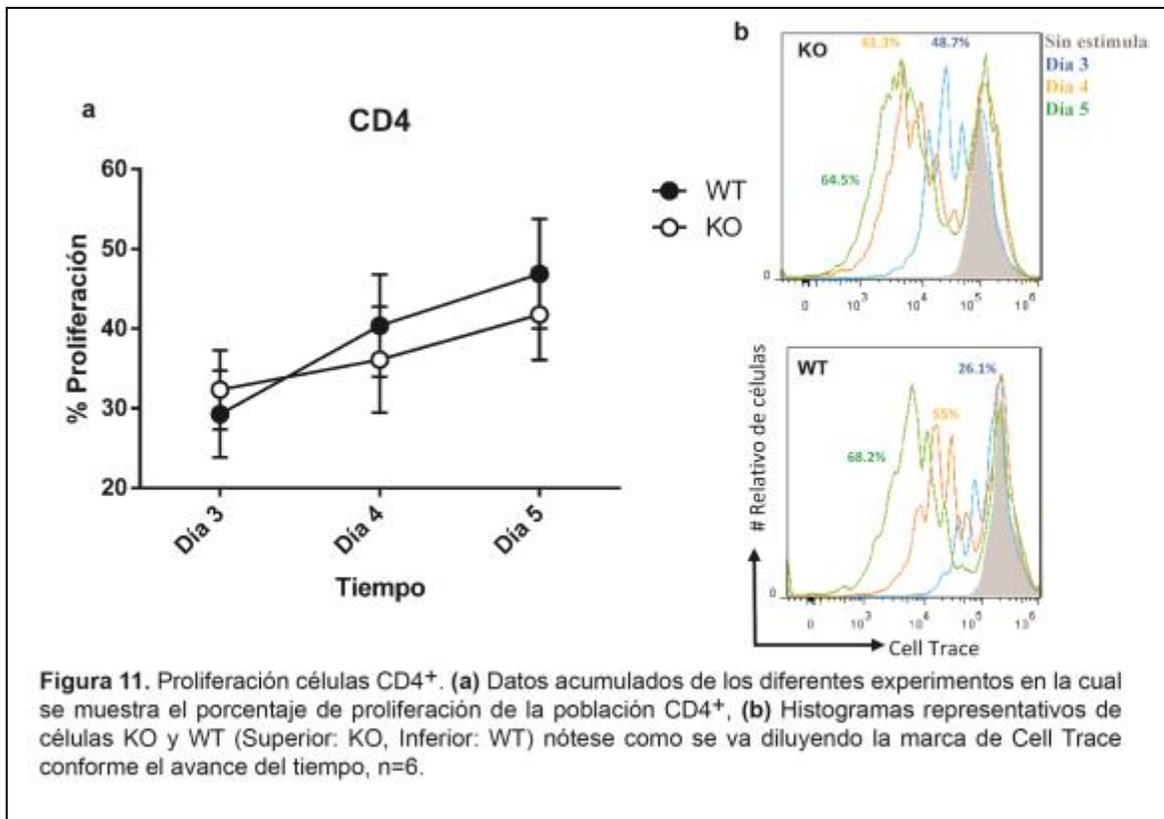
5.2. Proliferación celular

La expresión de B β se reduce horas después de la activación celular y se induce robustamente durante la privación de IL-2²⁴. Para determinar si B β juega algún papel durante la proliferación de células T, teñimos células T (del ratón con deficiencia condicional de B β y del control) con Cell Trace Far Red. Este reactivo fluorescente entra a las células y reacciona con los grupos amino de las proteínas uniéndose de forma irreversible a estas pero sin interferir con la función de las mismas. Así, las células comienzan el cultivo con niveles altos de fluorescencia que van disminuyendo conforme proliferan y las células hijas diluyen el fluorocromo. Indujimos la proliferación de las células T al cultivarlas en placas recubiertas de anti-CD3 y anti-CD28. A los 3, 4 y 5 días cuantificamos la dilución de la fluorescencia del marcador Cell Trace Far Red mediante citometría de flujo, como marcador subrogado de proliferación celular. Nótese que a medida que una célula prolifera, la

cantidad de Cell trace disminuye ~50% y en consecuencia la intensidad de fluorescencia de las células que lo contienen.

Como se muestra en las Figuras 10 y 11, no observamos diferencias en la proliferación de células CD4⁺ y CD8⁺ al comparar células KO y WT. La única diferencia evidente fue que las células CD8⁺ proliferaron más que las células CD4⁺, pero este fenómeno se observó tanto en ratones KO como en los WT.

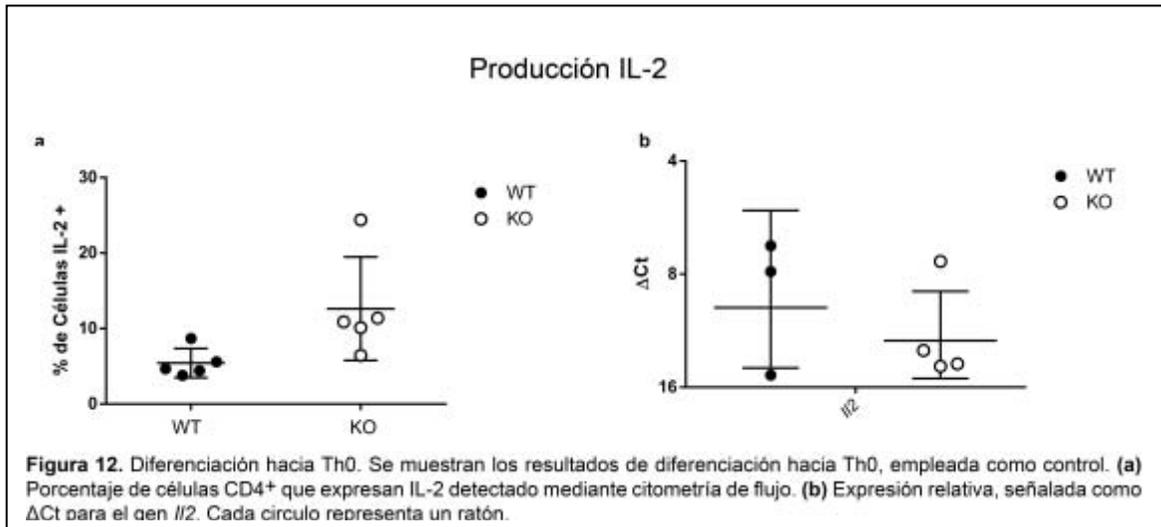




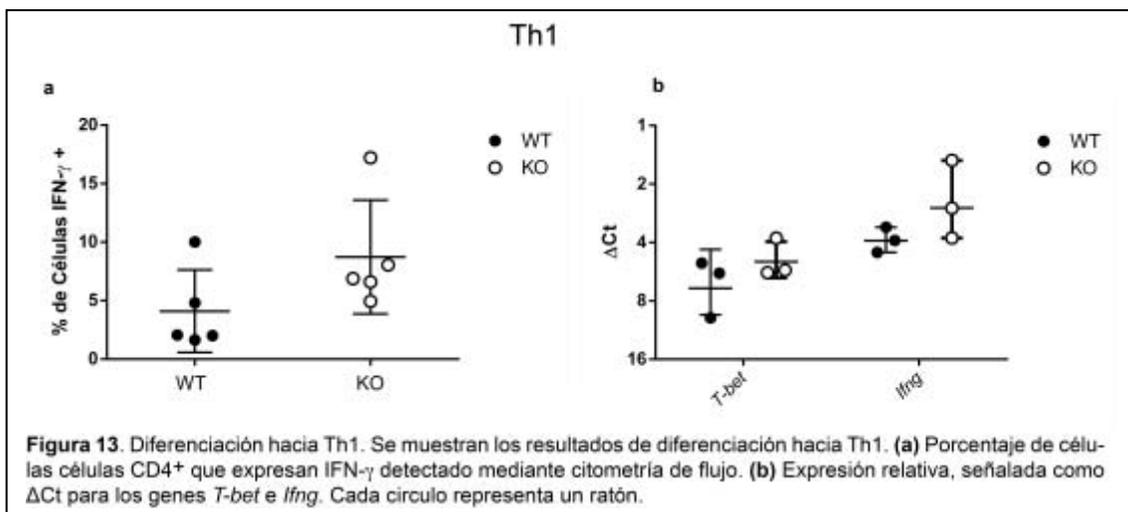
5.3. Diferenciación hacia células T cooperadoras

Para determinar si la ausencia de la subunidad B β afecta la diferenciación hacia los subtipos cooperadores de células T (Th1, Th2, Th17, iTregs), analizamos la diferenciación de células T CD4 vírgenes hacia los subtipos efectores mencionados. Para este fin, aislamos células T CD4⁺ vírgenes de ratones KO y WT y las estimulamos con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de diferentes combinaciones de citocinas: IL-2; IL-2 e IL-12; IL-4; IL-6 y TGF- β 1, y IL-2 y TGF- β 1 para diferenciarlas hacia Th0, Th1, Th2, Th17 e iTregs respectivamente. Cuantificamos la diferenciación de acuerdo al porcentaje de células productoras de las citocinas principales de cada subtipo y con base a la expresión de factores de transcripción específicos (citometría de flujo). Además, medimos los transcritos de citocinas y de factores de transcripción con RT-PCR en tiempo real.

Para todos los análisis mediante citometría de flujo se seleccionó la población celular CD4⁺ y posteriormente se determinó el porcentaje de diferenciación correspondiente. Para cuantificar la diferenciación hacia Th0, que se empleó como control, se cuantificó la producción de IL-2. Como se muestra en la Figura 12, no observamos diferencias significativas entre células WT y KO.

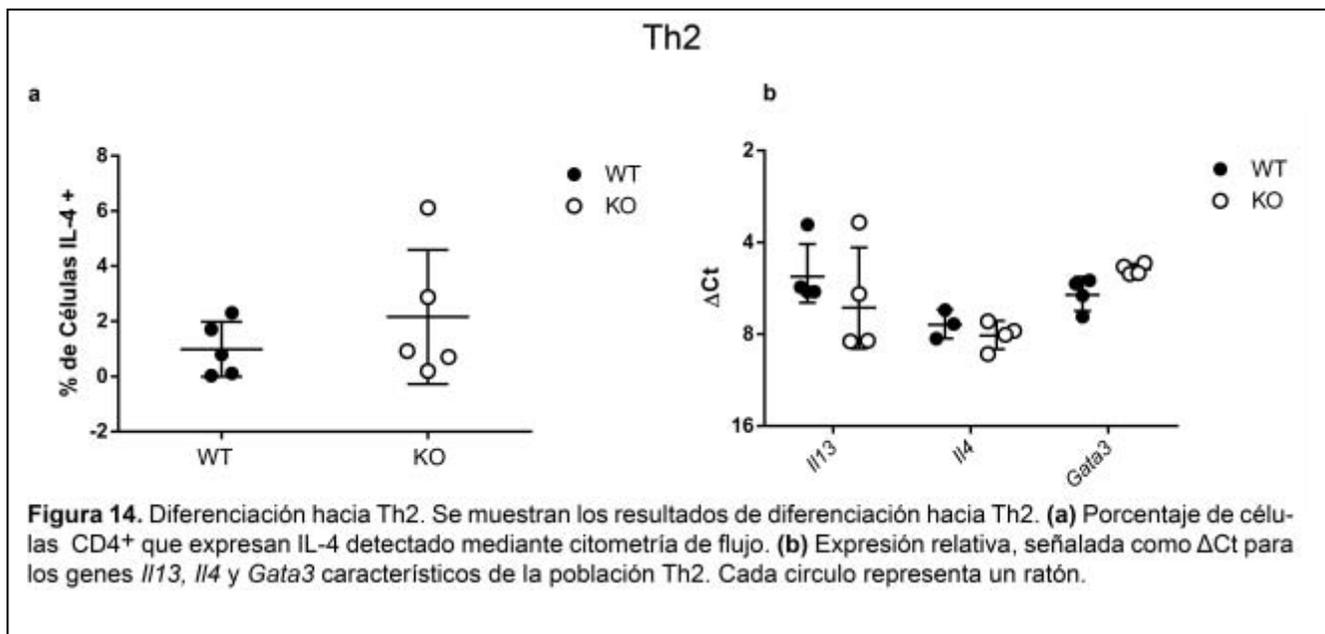


Las células Th1 expresan el factor de transcripción T-bet, codificado por *Tbx21*, y producen IFN-γ (codificado por *Ifng*)⁶. Cuando activamos a las células CD4 vírgenes en condiciones que favorecen la diferenciación Th1, observamos que las células KO producían más IFN-γ, tanto a nivel de proteína como mRNA. La diferencia fue, sin



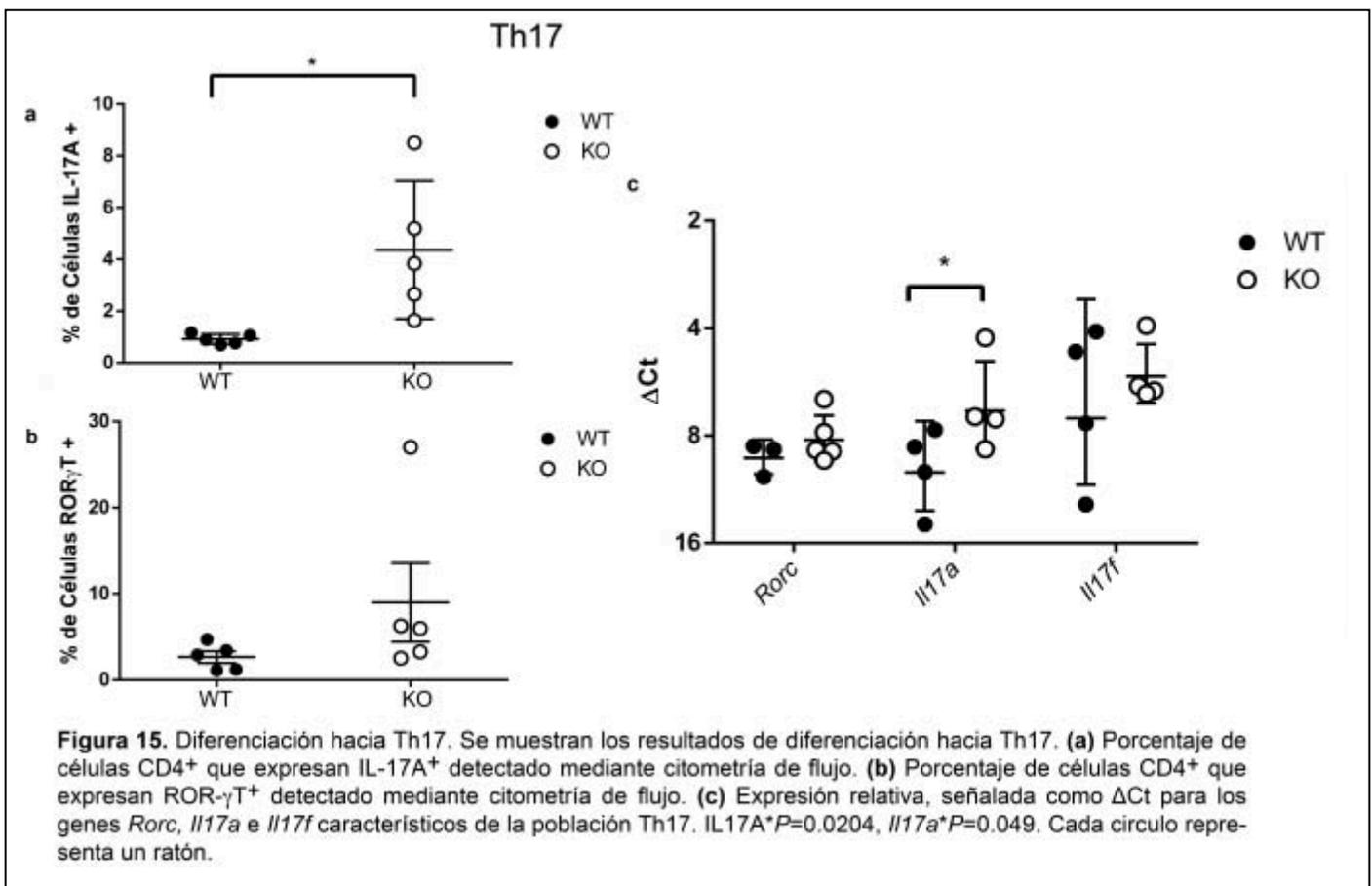
embargo, modesta y no alcanzó a ser estadísticamente significativa. La expresión de *Tbx21* tampoco fue diferente entre WT y KO (Figura 13).

Para evaluar la diferenciación a Th2 cuantificamos la inducción del factor de transcripción GATA-3, que se induce después la activación a través del TCR por la presencia de IL-4. Este factor guía la diferenciación hacia este linaje celular al promover la producción de citocinas como IL-4, IL-15 e IL-13⁶. Cuantificamos la producción de IL-13 (*Il13*) e IL-4 (*Il4*) y del factor de transcripción GATA-3 (*Gata3*) por medio de RT-PCR y citometría de flujo (IL-4). Como se muestra en la Figura 14, no observamos ninguna diferencia en la expresión de GATA-3, IL-4 o IL-13.



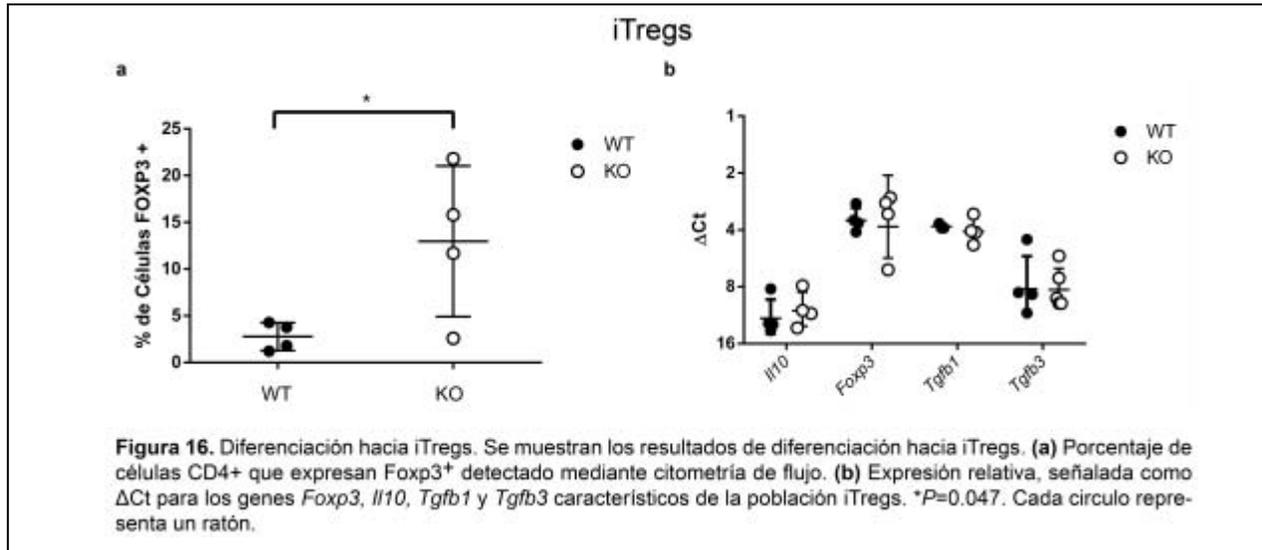
Una población que tiene un papel importante en LEG es la Th17. Se ha propuesto que estas células contribuyen a la enfermedad mediante la producción de IL-17A, que amplifica la respuesta inflamatoria⁴⁵. La población celular Th17 se caracteriza por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Estas células se diferencian en presencia de IL-6 y TGF- β , en forma dependiente del factor de transcripción ROR- γ T que se ha definido como el regulador maestro de este linaje.

Al analizar la expresión, a nivel de mRNA, de las citocinas *Il17a* e *Il17f*, únicamente observamos diferencias significativas en la producción de IL-17A obteniendo valores de ΔCt (KO 6.8 ± 0.9 vs. Control 10.1 ± 1.4 , $P=0.049$). Como se muestra en la Figura 15, la producción de esta citocina fue mayor en células derivadas del ratón KO. Este efecto no se acompañó de diferencias en la expresión de ROR- γ T (*Rorc*). Al analizar la producción de citocinas mediante citometría de flujo, observamos una mayor producción de IL-17A (KO 4.36 ± 1.12 vs. Control 0.91 ± 0.086 , $P=0.0204$) en células KO.



Las células T reguladoras inducidas (iTregs), se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y por la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β . Al analizar la diferenciación de células CD4 hacia iTregs, no observamos diferencias en la expresión (mRNA) de *Foxp3*,

Tgfb1, *Tgfb3* e *Il10*. Sin embargo, cuando analizamos la expresión de FoxP3 a nivel de proteína (citometría de flujo), sí encontramos una mayor cantidad de células positivas para dicho marcador entre las células obtenidas del ratón KO (KO 12.97 ± 4.32 vs. Control 2.7 ± 0.7 , $P=0.047$). (Figura 16).



5.4. Fosforilación de Akt

Resultados no publicados del laboratorio indican que la privación de IL-2 induce en células T activadas la desfosforilación de Akt en los residuos S473 y T308. Experimentos de silenciamiento genético mostraron que este efecto es dependiente de B β . Por esa razón, analizamos si la deficiencia de B β causa cambios en la fosforilación de Akt en células T en reposo y tras la activación a través del TCR.

Observamos que la fosforilación de Akt (S473) era mayor en las células T derivadas del ratón KO, tanto en estado basal como tras la activación del TCR (10 y 30 minutos) (Figuras 17 y 18).

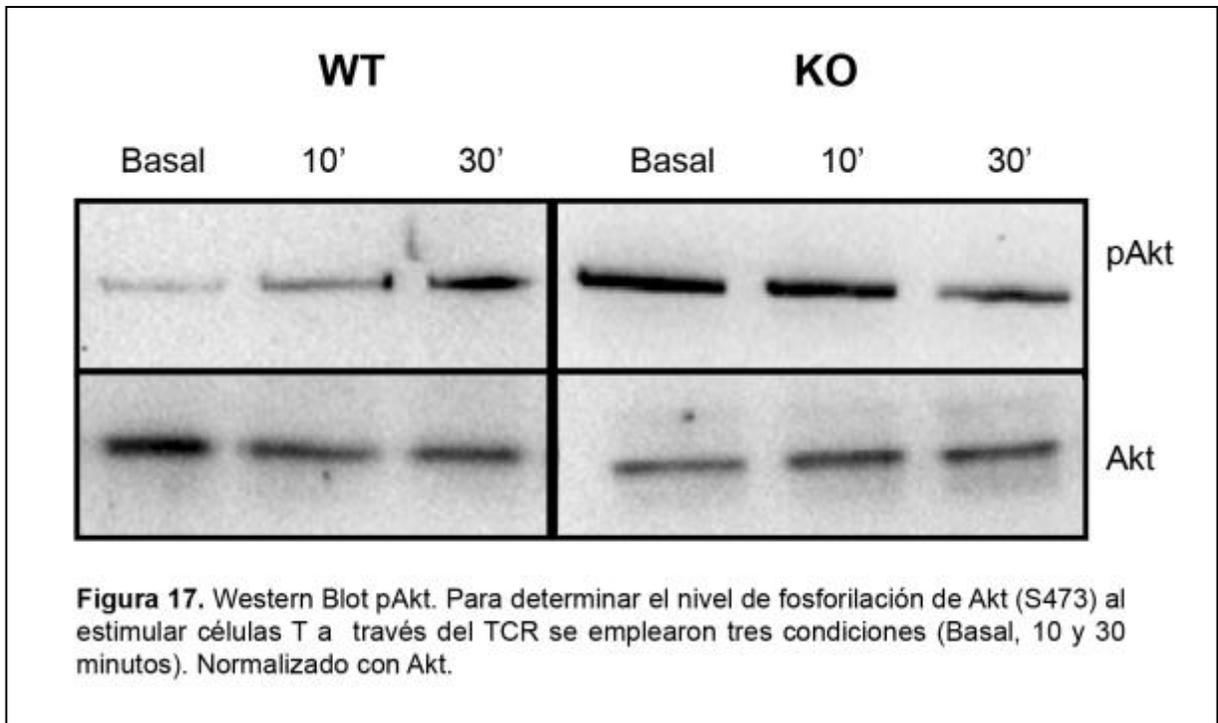


Figura 17. Western Blot pAkt. Para determinar el nivel de fosforilación de Akt (S473) al estimular células T a través del TCR se emplearon tres condiciones (Basal, 10 y 30 minutos). Normalizado con Akt.

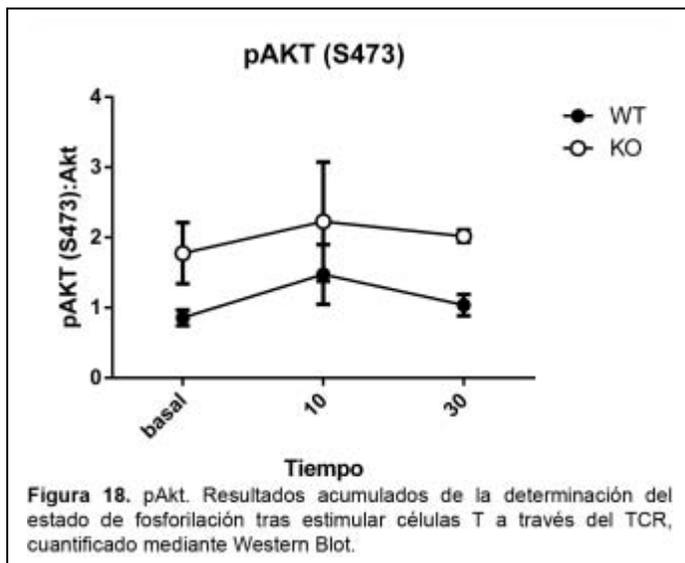


Figura 18. pAkt. Resultados acumulados de la determinación del estado de fosforilación tras estimular células T a través del TCR, cuantificado mediante Western Blot.

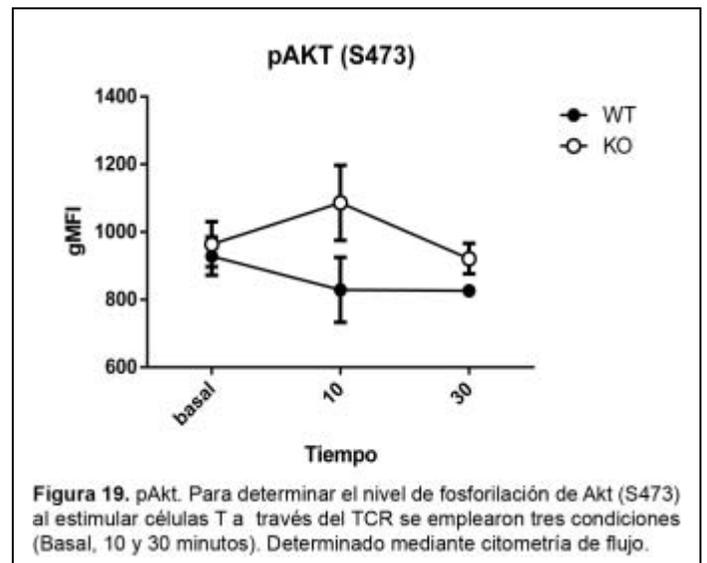


Figura 19. pAkt. Para determinar el nivel de fosforilación de Akt (S473) al estimular células T a través del TCR se emplearon tres condiciones (Basal, 10 y 30 minutos). Determinado mediante citometría de flujo.

Para confirmar el resultado anterior, analizamos la fosforilación de Akt por medio de citometría de flujo. Como su muestra en la Figura 19, la intensidad media de fluorescencia (gMFI) de pAKT S473 fue mayor en las células del ratón deficiente de B β .

5.5. Apoptosis

En células T humanas activadas, la reducción en la expresión de B β causa resistencia a la apoptosis inducida por privación de IL-2²⁴. Para determinar si en el sistema murino B β tiene el mismo efecto, activamos y expandimos células T de ratones KO y WT en presencia de IL-2. A los 10 días de cultivo, indujimos apoptosis al cultivar las células T en RPMI libre de IL-2, en presencia de un anticuerpo que bloquea IL-2. Cuantificamos la frecuencia de células apoptóticas antes de la privación de IL-2, así como a las 24 y 48 horas.

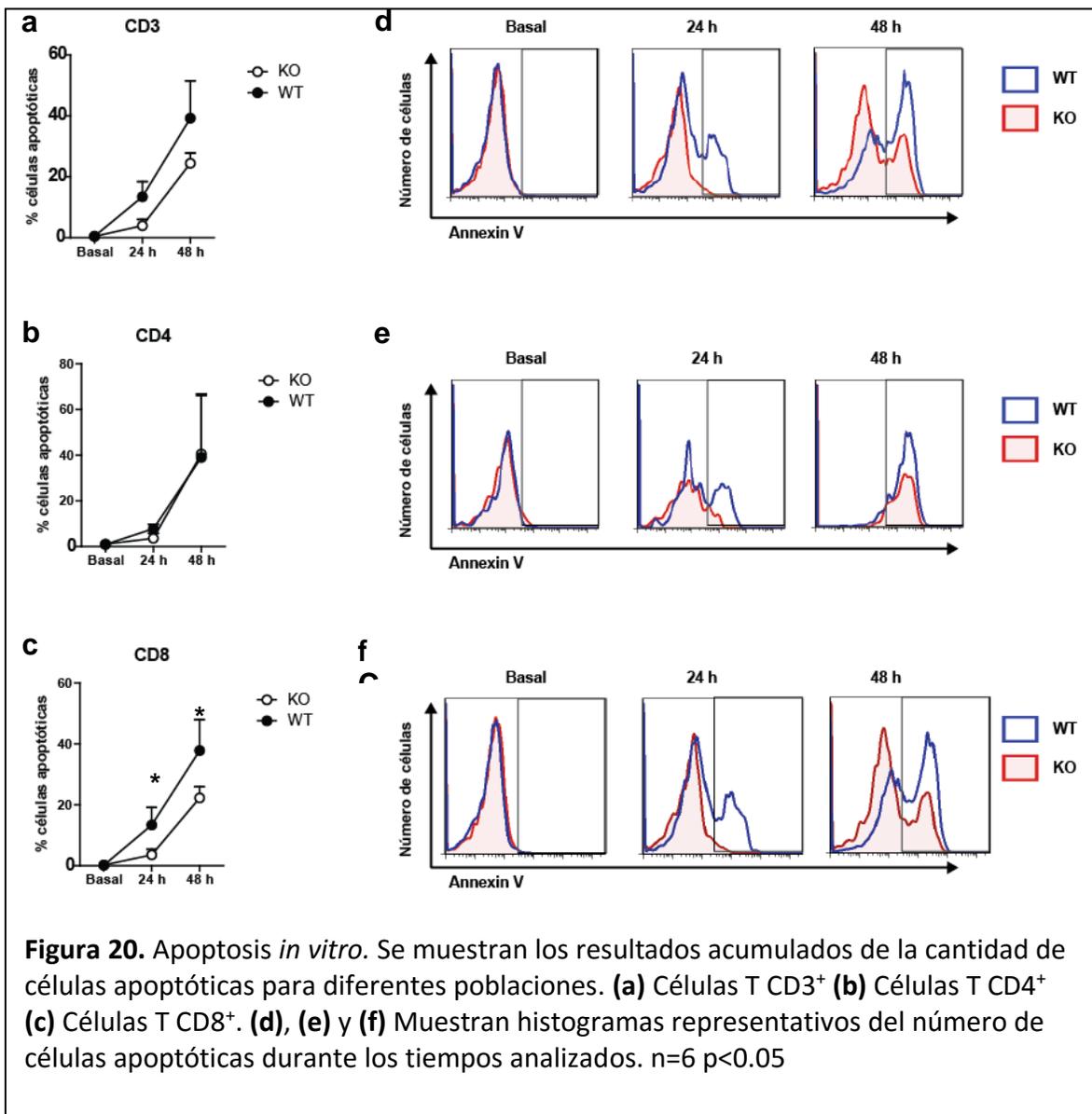


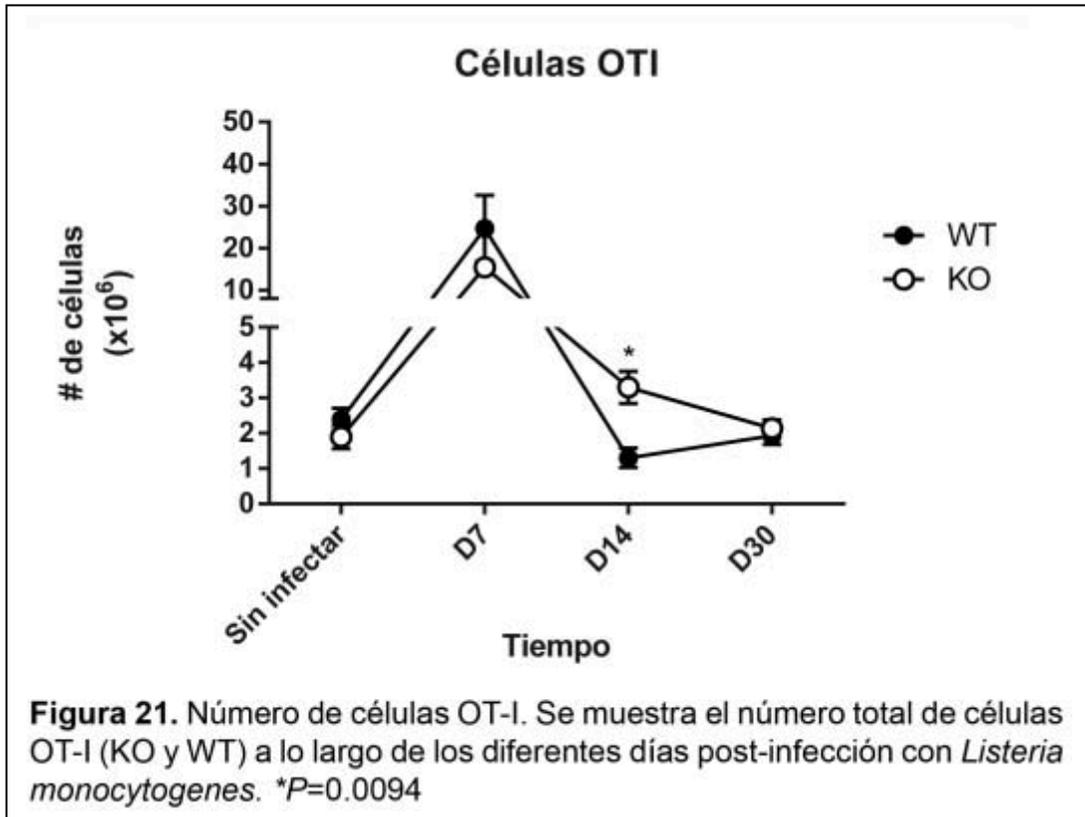
Figura 20. Apoptosis *in vitro*. Se muestran los resultados acumulados de la cantidad de células apoptóticas para diferentes poblaciones. **(a)** Células T CD3⁺ **(b)** Células T CD4⁺ **(c)** Células T CD8⁺. **(d)**, **(e)** y **(f)** Muestran histogramas representativos del número de células apoptóticas durante los tiempos analizados. n=6 p<0.05

Como se muestra en la Figura 20, la cinética de apoptosis inducida por privación de IL-2 fue más lenta en las células T derivadas del ratón KO que en las células T provenientes de un ratón WT (a las 24 horas: KO $3.93 \pm 2.0\%$ vs. Control 13.41 ± 5.0 ; a las 48 horas: KO $24.43 \pm 3.4\%$ vs. Control 39.23 ± 12.3). Cuando se analizó la cinética de apoptosis en células T CD4⁺ y CD8⁺ por separado, no observamos diferencias en la apoptosis de células CD4⁺ (a las 24 horas: KO $3.54 \pm 2.1\%$ vs. Control 7.7 ± 1.9 ; a las 48 horas: KO $40.47 \pm 26.3\%$ vs. Control 38.9 ± 27.2), pero sí en la apoptosis de células CD8⁺ (a las 24 horas: KO $3.6 \pm 1.8\%$ vs. Control 13.4 ± 5.7 ; a las 48 horas: KO $22.3 \pm 3.6\%$ vs. Control 37.83 ± 10.0).

5.6. Infección con *Listeria monocytogenes*-OVA

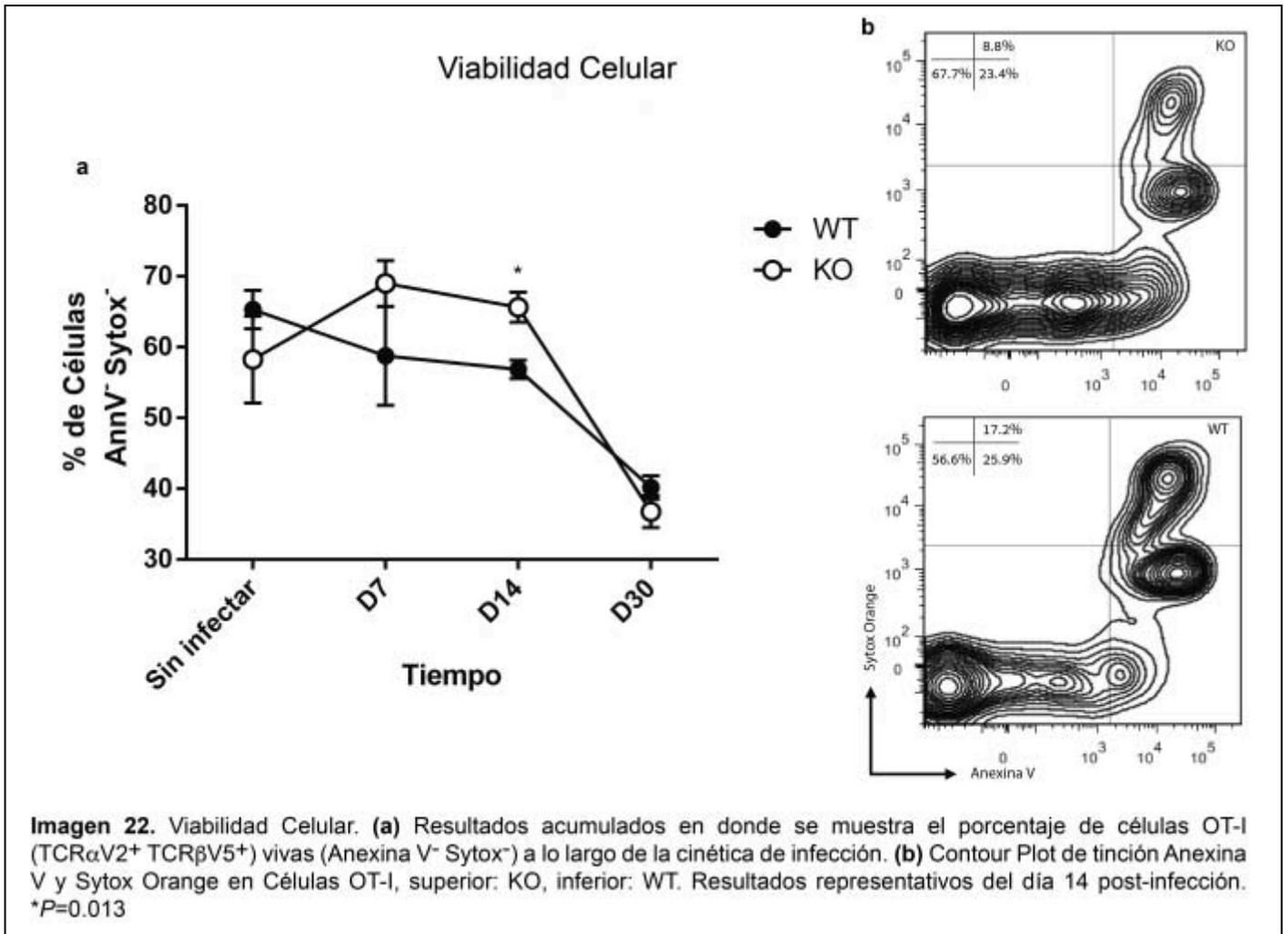
En los experimentos *in vitro*, la ausencia de B β causó una disminución en la cinética de apoptosis inducida por privación de IL-2 específicamente en células CD8⁺ (Figura 20c). Para determinar la relevancia de B β en la inducción de apoptosis y en particular en el control de la contracción de la respuesta inmune, utilizamos un sistema *in vivo*. Generamos ratones C57BL/6.*Ppp2r2b*^{fl/fl}.CD4-Cre que expresan un TCR que reconoce un péptido derivado de la ovoalbúmina (OVA), presentado en el contexto de MHC de clase I (OT-I). Transferimos células OT-I (deficientes de B β o control) a ratones B6 y los infectamos con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa constitutivamente OVA. Este modelo de infección aguda permite analizar la expansión y contracción de células T CD8⁺ específicas al antígeno durante el desarrollo de una respuesta inmune aguda mediante el uso de anticuerpos que reconocen el TCR OT-I (TCR α V2⁺ TCR β B5⁺).

En la infección por *L. monocytogenes*, la respuesta inmune alcanza el máximo el día 7 y después comienza la contracción de las clonas activadas ⁴⁶. Por esta razón analizamos la frecuencia y el fenotipo de las células CD8 transferidas los días 7, 14 y 30 post-infección (p.i.).



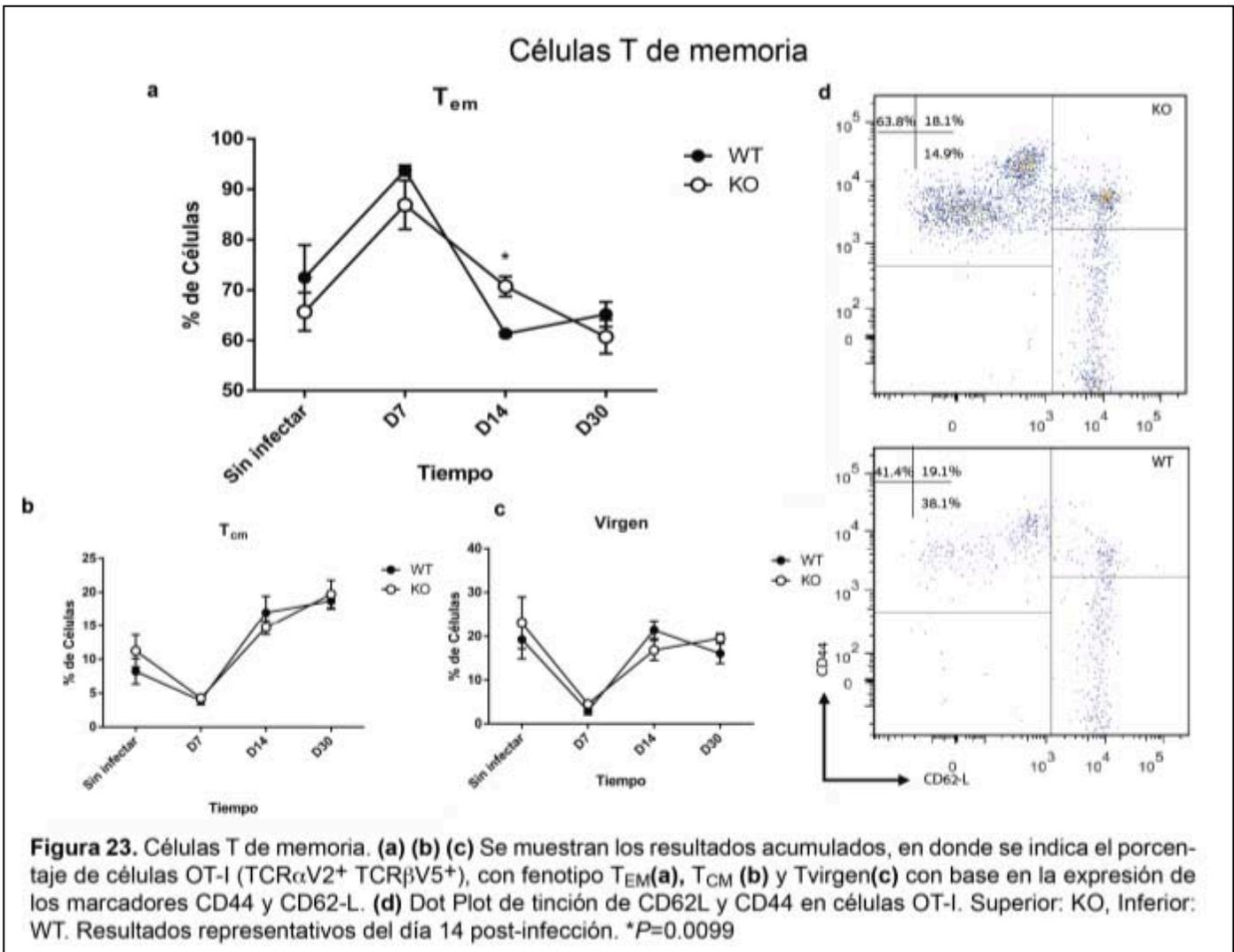
Como se muestra en la Figura 21, las células T CD8⁺ se activaron y proliferaron en respuesta a la infección por *L. monocytogenes*. No observamos diferencias en la expansión de las células al día 7. Como era esperable, al día 14 p.i. la cantidad de células CD8 específicas a OVA había disminuido. Sin embargo, la magnitud de la disminución fue significativamente mayor en el ratón WT que en el deficiente de B β (KO 3.29 ± 0.45 vs. Control 1.36 ± 0.27 , $P=0.0094$). Al día 30 p.i. no observamos diferencias.

Como experimento complementario, analizamos la frecuencia de células apoptóticas durante el curso de la infección. Para este fin, empleamos Anexina V y Sytox como marcadores de apoptosis y muerte celular. Como se muestra en la Figura 22, observamos una mayor cantidad de células vivas (Ann V⁻ Sytox⁻) en las células de ratones KO el día 14 p.i (KO 65.6 ± 2.1 vs. Control 56.8 ± 1.3, P=0.013).



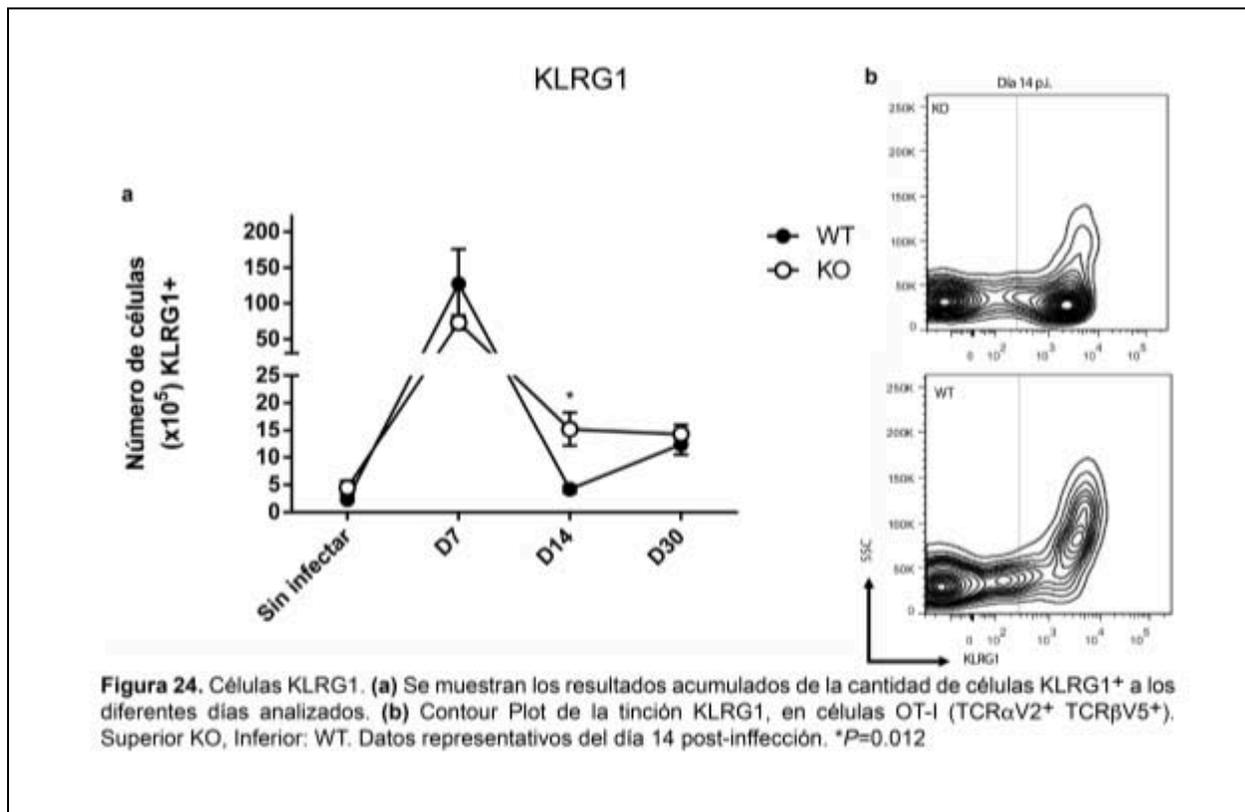
Para determinar el estado de activación de las células a lo largo de la infección, empleamos los marcadores CD62L y CD44, además del marcador tipo lectina de células citotóxicas (KLRG1); este último permite identificar a las células efectoras totales^{47 48}.

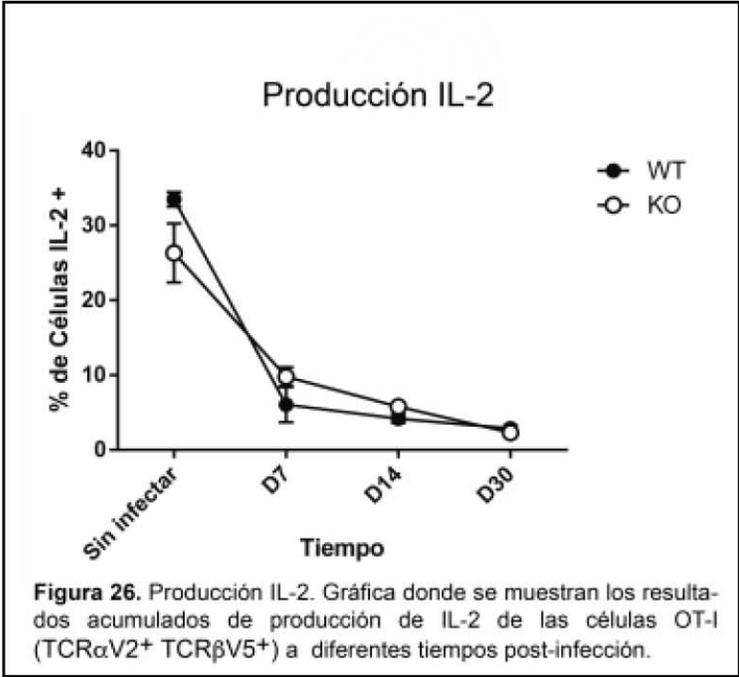
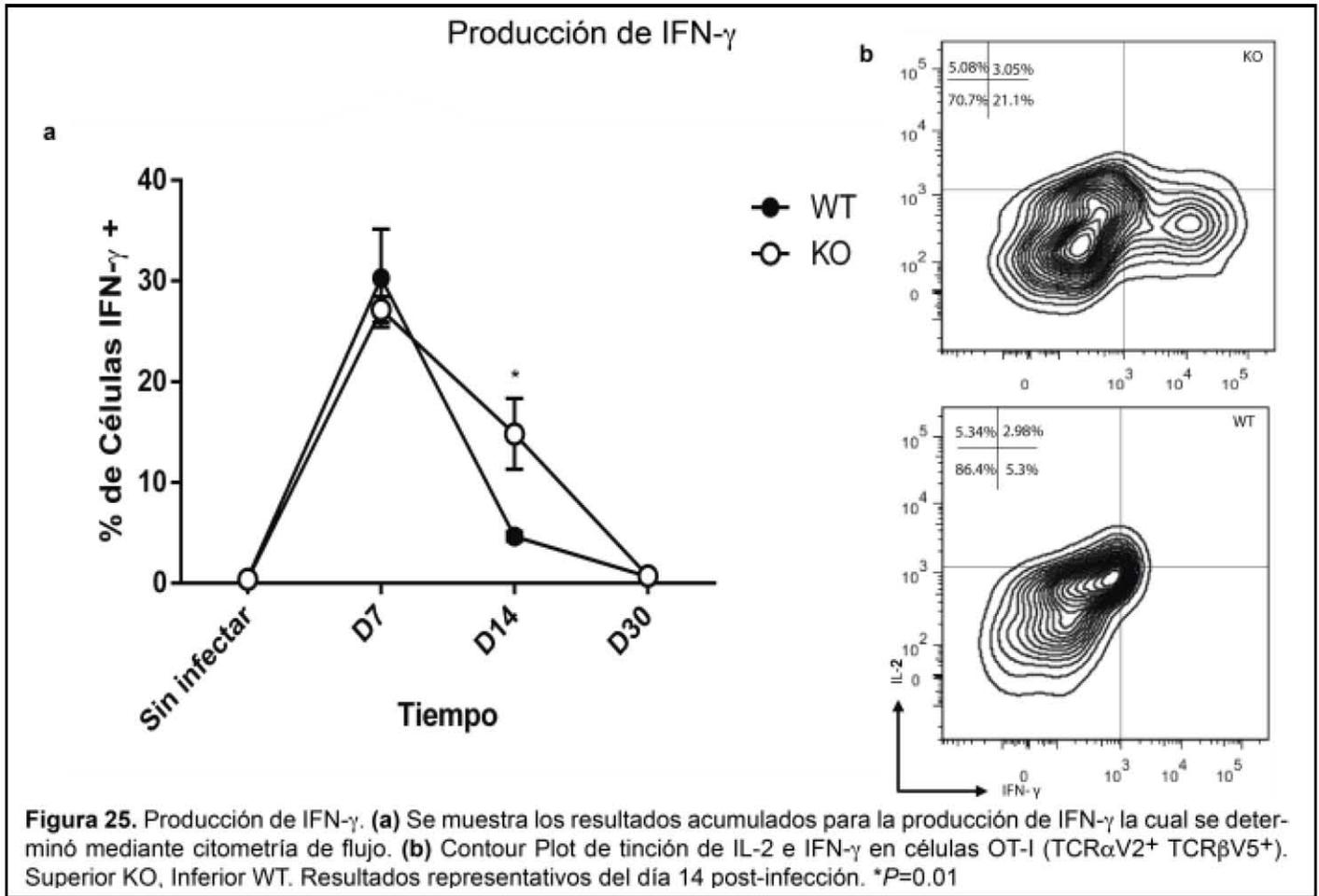
Observamos que la deficiencia de B β indujo la acumulación células T_{EM} al día 14 p.i (Figura 23) (KO 70.7 \pm 1.9 vs. Control 61.3 \pm 0.43, $P=0.0099$). Al observar el número de células KLRG1⁺, se observó mayor número de estas al día 14 p.i. en ratones que habían recibido células KO (Figura 24) (KO 15.21 \pm 3.05 vs. Control 4.2 \pm 0.0646, $P=0.012$).



Finalmente, analizamos la producción de las citocinas IFN- γ e IL-2. Para esto se obtuvieron las células del bazo y se estimularon *ex vivo* con el péptido SIINFEKL, que es el antígeno derivado de OVA que reconocen las células OT-I.

Observamos una mayor producción de IFN- γ al día 14 p.i. en las células KO (Figura 25) (KO 14.83 ± 3.52 vs. Control 4.6 ± 0.47 , $P=0.01$). No observamos diferencias en la producción de IL-2 (Figura 26).





6. Discusión

En este trabajo analizamos la función de B β , una subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A, en la activación de células T y durante la contracción clonal en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Nuestros resultados indican que B β regula la diferenciación hacia los subtipos cooperadores de células T CD4⁺, además, nuestros resultados indican que B β juega un papel importante en la inducción de apoptosis en células CD8⁺ en respuesta a la privación de IL-2 e, *in vivo*, en la contracción de la respuesta inmune. Así como regular el estado de fosforilación de Akt tras su estimulación a través del TCR, lo cual podría contribuir a las diferencias observadas en la diferenciación de los subtipos cooperadores de células T CD4⁺.

Las respuestas inmunes agudas inducen la expansión de clones específicas de células T¹⁷. Esta respuesta depende de que las células entren al ciclo celular, un proceso finamente controlado por diversas proteínas entre las que se encuentran ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk)⁴⁹. La estimulación del TCR y de moléculas de co-estimulación, así como la presencia de citocinas como IL-2 e IL-4, inducen proliferación en las células T⁴⁹. Nuestros resultados indican que B β no participa en la regulación de la proliferación celular, ya que la deficiencia de B β no afectó la cinética de proliferación de células T CD4⁺ o CD8⁺. Estos resultados contrastan con lo reportado en otros sistemas. Un estudio realizado en células de cáncer colorrectal encontró que la hipermetilación del gen que codifica para B β (*PPP2R2B*) se asocia a la desregulación de vías oncogénicas requeridas para la supervivencia y proliferación celular²³. Otro estudio realizado en líneas celulares derivadas de cáncer de mama demostró que la expresión incrementada de B β promueve la estabilización de la ciclina E1 y la proliferación celular⁵⁰. Las diferencias en nuestros resultados podrían reflejar diferencias metodológicas, o podrían indicar que en diferentes linajes celulares B β tiene distintos blancos y funciones.

La fosforilación de Akt en células T, inducida por estímulos a través del TCR y de moléculas de co-estimulación/citocinas, desencadena la activación de diversas vías

importantes en el control de proliferación, metabolismo y apoptosis^{40,51,52}. Observamos que la fosforilación de Akt era mayor en las células T derivadas del ratón KO en estado basal y tras la activación del TCR. Estos resultados son acordes a resultados no publicados de nuestro grupo en donde se ha observado que B β regula la fosforilación de Akt S473. Un trabajo publicado muestra que B α , que pertenece a la misma familia de B β , regula el estado de fosforilación del residuo T308 de Akt en líneas celulares hematopoyéticas y fibroblastos⁴¹. Lo cual podría indicar que PP2A controla el estado de fosforilación de Akt, y que los residuos que determinan el estado de activación (S473 y T308) están regulados por diferentes subunidades reguladoras que se unen al dímero A/C de PP2A.

La expresión de una forma constitutivamente activa de Akt incrementa la diferenciación hacia diferentes subtipos cooperadores de células T, entre ellos las células Th17⁵³. Así, el incremento en la actividad de Akt tiene efectos en diversas vías, por ejemplo en la diferenciación hacia Th17 a través del eje mTORC2-Akt-FoxO1/3a, ya que FoxO1/3a regula positivamente la diferenciación hacia Tregs pero impide la diferenciación a Th17 y Akt inhibe la actividad transcripcional de FoxO1/3a^{51,53} ya que al fosforilarlo permite su asociación y secuestro citoplásmico por las proteínas 14-3-3⁵⁴. Los factores de transcripción FoxO regulan diversos procesos entre los que se encuentran la apoptosis y la diferenciación hacia Tregs^{55,56}. Nosotros observamos que durante la diferenciación de células CD4⁺ vírgenes, la ausencia de B β facilitaba la producción de IL-17A.

Encontramos que la ausencia B β se asociaba a un mayor porcentaje de células FoxP3⁺ en los cultivos de diferenciación hacia Tregs. Es poco probable que la ausencia de B β facilite la diferenciación hacia Tregs, porque las células deficientes en B β tienen mayor fosforilación de Akt, que es un inhibidor de la diferenciación hacia iTregs^{53,57}. Otro resultado que apoya que la ausencia de B β no facilita la diferenciación hacia iTregs es que no encontramos más expresión de genes asociados a Tregs (*Il10*, *Tgfb1*, *Tgfb3*, *Foxp3*) en los cultivos de diferenciación. Es posible que la B β influya en la supervivencia de las células durante el cultivo y que

en su ausencia mueran menos células. Este fenómeno sería particularmente importante en los cultivos con TGF- β ya que esta citocina ejerce efectos negativos en la proliferación y supervivencia de las células⁵⁸. Es posible que la falta de B β favorezca la supervivencia celular de tal manera que al final del cultivo más células expresen FoxP3. Más experimentos encaminados a analizar los efectos de B β en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular en cultivos con TGF- β permitirán entender mejor estos resultados.

Alternativamente, otra explicación podría radicar en la relación PP2A-Pim. La cinasa Pim es un blanco de la fosfatasa PP2A. La inhibición de PP2A provoca la estabilización de Pim. Ésta, a su vez, fosforila a SOCS1, lo que resulta en su activación⁵⁹. SOCS1 promueve la diferenciación hacia Th17 al suprimir los efectos antagónicos que el IFN- γ ejerce en STAT3 y Smad⁶⁰. SOCS1 también promueve la diferenciación hacia Tregs ya que mantiene la expresión de Foxp3⁶¹. Se puede plantear la hipótesis de que la deficiencia de B β provoca la estabilización de la cinasa Pim que está a su vez activa a SOCS1, teniendo como resultado un incremento en la diferenciación de iTregs y Th17, futuros experimentos determinarán si existe relación entre el eje PP2A:B β -Pim-SOCS1.

Durante la diferenciación se emplearon las condiciones empleadas por Sokratis y colaboradores²⁸, sin embargo al analizar mediante citometría de flujo la frecuencia de células positivas para las citocinas de los diferentes subtipos cooperadores de células T CD4+ no se observó gran producción de citocinas, futuros experimentos determinarán la causa que origina este resultado.

La duración de la respuesta inmune aguda se limita por apoptosis de la gran mayoría de las células T producidos durante la expansión clonal. Durante esa fase de contracción, se eliminan las células activadas y perduran las células T de memoria¹⁰. Esto permite que, de existir un nuevo encuentro con el patógeno que originó la respuesta, el sistema inmune responda más rápido y mejor en la llamada respuesta secundaria¹⁴. Así también las células Tregs al participar en la CWID reducen la intensidad de la respuesta inmune lo que puede prevenir autoinmunidad

y así mantener la homeostasis¹⁰. Los ratones que se analizaron durante los experimentos se mantienen en condiciones libres de patógenos específicos. Lo anterior implica que las células T activadas presentes en los ratones se han activado por encuentros con antígenos derivados de microorganismos comensales o con autoantígenos. La presencia de un número anormalmente alto de células T de memoria (T_{CM} y T_{EM}) en los ratones KO sugiere la presencia de clonas autorreactivas (Figura 8A y 9A) inadecuadamente controladas.

El proceso de apoptosis que elimina a las células T efectoras al final de la respuesta inmune se desencadena por diferentes estímulos (e.g. ausencia de antígeno) que se coordinan de una manera que no comprendemos completamente. Uno de los elementos que se considera importante para iniciar la apoptosis de las células T activadas es la concentración de citocinas, en particular IL-2. Así, la reducción en los niveles de esta citocina provoca un desequilibrio en los niveles de moléculas pro- y anti- apoptóticas que desencadena la apoptosis a través de un proceso que se ha denominado la vía intrínseca¹³.

La apoptosis por la vía intrínseca se regula principalmente a nivel mitocondrial. El incremento relativo en la abundancia de moléculas pro-apoptóticas (e.g. Bax, Bak, Bim) conlleva a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) lo que permite la liberación del citocromo C. La presencia de esta molécula en el citosol inicia una cascada de proteasas (caspasas) que culmina en la apoptosis^{13,62}.

Resultados previos del laboratorio, realizados en células humanas, sugieren que $B\beta$ es una molécula clave para la iniciación de la apoptosis inducida por privación de IL-2²⁴. En experimentos *in vitro* activamos y expandimos células T de ratones KO y WT y les indujimos apoptosis. Pudimos observar que en el sistema murino, $B\beta$ juega un papel análogo ya que las células de los ratones KO murieron con una cinética significativamente más lenta (Figura 20). Cuando analizamos por separado a células CD4 y CD8, observamos que sólo las CD8 dependen de $B\beta$ para iniciar la apoptosis en respuesta a privación de IL-2.

La infección aguda por la bacteria *L. monocytogenes* representa un modelo que permite evaluar *in vivo* la cinética de una respuesta inmune aguda⁶³. A la dosis empleada, la infección por *L. monocytogenes* dura aproximadamente una semana. Después, la bacteria es eliminada por el sistema inmune. Para los fines de este trabajo, empleamos una cepa de *L. monocytogenes* que expresa constitutivamente ovoalbúmina. Esto nos permitió analizar la conducta de una población monoclonal de células T específicas a ovoalbúmina, la OT-I. Después de infectar a los ratones por vía intravenosa, analizamos la cantidad y el fenotipo de las células T OT-I en un rango de tiempo que nos permitió abarcar las etapas de expansión y contracción de la respuesta inmune.

Primero, evaluamos la activación de las células OT-I (CD8⁺) al día 7 de la infección. No observamos diferencias en la cantidad de células, ni en características fenotípicas que indican activación y capacidad efectora. Estos resultados son congruentes con los experimentos realizados *in vitro*, en los que se demostró que la proliferación celular no se altera por la ausencia de B β .

Al día 14 después de la infección, cuando la respuesta inmune aguda ha concluido y la bacteria ha sido eliminada, observamos diferencias grandes en la cantidad de células T_{EM}, en las células efectoras KLRG1⁺ y en las células productoras de IFN- γ . El empleo de otros marcadores como CD127 (IL7R α) conjuntamente con KLRG1, nos permitiría clasificar a las células en los diferentes subtipos para la generación de células efectoras o memoria^{48,64}.

En los ratones que habían recibido células OT-I deficientes en B β , la cantidad de estas células, tanto en números absolutos como porcentuales, se encontraba significativamente elevada.

En el último punto de tiempo que evaluamos, el día 30 post-infección, nos encontramos con un problema técnico. La frecuencia de la población OT-I en los ratones receptores era ya muy baja, por lo que era difícil de distinguir de la población endógena que expresa receptores de células T conformados por las cadenas alfa y beta de la misma familia que el OT-I (reconocidas por los mismos anticuerpos). Por

esta razón, de existir alguna diferencia entre la frecuencia y/o fenotipo de las células OT-I suficientes y deficientes en B β , no fuimos capaces de detectarla, experimentos similares empleando ratones CD45.1 nos permitirán distinguir las poblaciones celulares transferidas a día 30.

La presencia de una mayor cantidad células KLRG1⁺ en los ratones que recibieron células KO sugiere que la deficiencia de B β fomenta la acumulación de células T CD8⁺ con un fenotipo efector.

La reducción en la expresión de Bim permite la supervivencia de células de memoria CD8⁺⁶⁵. Dado que la expresión de Bim está controlada por FoxO3a⁶⁶, una mayor fosforilación de FoxO (secundaria a una mayor actividad de Akt en las células deficientes en B β) podría contribuir a la mayor abundancia de células con un fenotipo efector (entre las que se encuentran células T_{EM} y KLRG1⁺) en los ratones KO.

7. Conclusiones

En este trabajo analizamos la función de B β , una subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A, durante la activación de células T y durante la inducción de apoptosis por privación de IL-2.

Los resultados que presentamos indican que B β modula la actividad de Akt a través de regular su fosforilación en el residuo S473. La deficiencia de B β provoca cambios en las frecuencias de las poblaciones celulares al analizar el estado de activación *ex vivo* de las células. Así mismo se presentaron cambios modestos en la diferenciación de células T CD4 vírgenes (por ejemplo, mayor producción de IL-17A en condiciones de polarización hacia Th17).

Los efectos más marcados de la falta de B β se observaron durante la inducción de apoptosis de células T CD8⁺, tanto en un sistema *in vitro* como en un sistema *in vivo*. En este último, la deficiencia de B β causó la acumulación de células T con fenotipo efector (KLRG1⁺ e IFN- γ ⁺) lo que indica que B β representa una molécula muy importante para que suceda la contracción de las células T activadas al término de las respuestas inmunes agudas.

8. Bibliografía

1. Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* **20**, 67–69 (1976).
2. Reiner, S. L. & Adams, W. C. Lymphocyte fate specification as a deterministic but highly plastic process. *Nat. Publ. Gr.* **14**, 699–704 (2014).
3. Polonsky, M., Chain, B. & Friedman, N. Clonal expansion under the microscope: studying lymphocyte activation and differentiation using live-cell imaging. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 242–9 (2016).
4. Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 180–190 (2012).
5. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–12 (2012).
6. Rautajoki, K. J., Kylaniemi, M. K., Raghav, S. K., Rao, K. & Lahesmaa, R. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann. Med.* **40**, 322–35 (2008).
7. Man, K. & Kallies, A. Synchronizing transcriptional control of T cell metabolism and function. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 574–584 (2015).
8. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
9. Prlic, M. & Jameson, S. C. Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: Common ends by different means? *Microbes Infect.* **4**, 531–537 (2002).
10. Snow, A. L., Pandiyan, P., Zheng, L., Krummey, S. M. & Lenardo, M. J. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol. Rev.* **236**, 68–82 (2010).
11. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated

- apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
12. Smigielski, K. S., Srivastava, S., Stolley, J. M. & Campbell, D. J. Regulatory T-cell homeostasis: Steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol. Rev.* **259**, 40–59 (2014).
 13. Krammer, P. H., Arnold, R. & Lavrik, I. N. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 532–542 (2007).
 14. Sprent, J. & Surh, C. D. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 248–254 (2001).
 15. Chang, J. T., Wherry, E. J. & Goldrath, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, (2014).
 16. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 326–332 (2005).
 17. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 137–161 (2013).
 18. Sunahori, K., Juang, Y.-T., Kyttaris, V. C. & Tsokos, G. C. Promoter hypomethylation results in increased expression of protein phosphatase 2A in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **186**, 4508–17 (2011).
 19. Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K. & Batra, S. K. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* **335**, 9–18 (2013).
 20. Eichhorn, P. J. A., Creighton, M. P. & Bernards, R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1795**, 1–15 (2009).
 21. Kiely, M. & Kiely, P. A. PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers (Basel)*. **7**, 648–669 (2015).

22. Janssens, V. & Goris, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**, 417–39 (2001).
23. Tan, J. *et al.* B55 β -Associated PP2A Complex Controls PDK1-Directed Myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer. *Cancer Cell* **18**, 459–471 (2010).
24. Crispín, J. C., Apostolidis, S. A., Finnell, M. I. & Tsokos, G. C. Induction of PP2A B β , a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12443–8 (2011).
25. Katsiari, C. G., Kyttaris, V. C., Juang, Y.-T. & Tsokos, G. C. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **115**, 3193–3204 (2005).
26. Juang, Y.-T. *et al.* PP2A dephosphorylates Elf-1 and determines the expression of CD3zeta and FcRgamma in human systemic lupus erythematosus T cells. *J. Immunol.* **181**, 3658–64 (2008).
27. Crispín, J. C. *et al.* Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* **188**, 3567–71 (2012).
28. Apostolidis, S. A., Rauen, T., Hedrich, C. M., Tsokos, G. C. & Crispín, J. C. Protein phosphatase 2A enables expression of interleukin 17 (IL-17) through chromatin remodeling. *J. Biol. Chem.* **288**, 26775–26784 (2013).
29. Danchenko, N., Satia, J. a & Anthony, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* **15**, 308–318 (2006).
30. Petri, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pr. Res Clin Rheumatol* **16**, 847–858 (2002).

31. Mok, C. C. & Lau, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* **56**, 481–90 (2003).
32. Arbuckle, M. R. *et al.* Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **349**16349, 1526–33 (2003).
33. Rother, N. & Van der Vlag, J. Disturbed T cell signaling and altered Th17 and regulatory T cell subsets in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **6**, 1–10 (2015).
34. Alcocer-Varela, J. & Alarcón-Segovia, D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **69**, 1388–92 (1982).
35. Apostolidis, S. a., Lieberman, L. a., Kis-Toth, K., Crispín, J. C. & Tsokos, G. C. The Dysregulation of Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Interf. Cytokine Res.* **31**, 769–779 (2011).
36. Garrett-Sinha, L. A., John, S. & Gaffen, S. L. IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **20**, 519–25 (2008).
37. Júlio Antonio Pereira Araujo, Danilo Mesquita Jr, Wilson de Melo Cruvinel, Karina Inacio salmazi, Esper George Kallas, L. E. C. A. Th17 cells and CD4 + multifunctional T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev. Bras. Reumatol.* 1–9 (2015).
38. Tsokos, J. C. C. and G. C. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *October* **141**, 520–529 (2008).
39. Lechward, K., Awotunde, O. S., Świątek, W. & Muszyńska, G. Protein phosphatase 2A: Variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 921–933 (2001).
40. Lifan Yang, Guilin Qiao, Haiyan Ying, Jian Zhang, F. Y. TCR-Induced Akt Serine 473 Phosphorylation is Regulated by Protein Kinase C-Alpha. *Biochem*

Biophys Res Commun (2011).

41. Kuo, Y. C. *et al.* Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* **283**, 1882–1892 (2008).
42. Mak, T. W., Penninger, J. M. & Ohashi, P. S. Knockout Mice: A Paradigm Shift in Modern Immunology. *Nat Rev Immunol.* **1**, 1–9 (2001).
43. Lewandoski, M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743–755 (2001).
44. Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–322 (2002).
45. Crispín, J. C. & Tsokos, G. C. Interleukin-17-producing T cells in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**, 499–503 (2010).
46. Mannering, S. I., Zhong, J. & Cheers, C. T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* **106**, 87–95 (2002).
47. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
48. Olson, J., McDonald-Hyman, C., Jameson, S. & Hamilton, S. Effector-like CD8+ T Cells in the Memory Population Mediate Potent Protective Immunity. *Immunity* **38**, 1250–1260 (2013).
49. Shi, M., Lin, T. H., Appell, K. C. & Berg, L. J. Cell Cycle Progression following Naive T Cell Activation Is Independent of Jak3/Common γ -Chain Cytokine Signals. *J. Immunol.* **183**, 4493–4501 (2009).
50. Tan, Y. *et al.* PP2A-B55 β Antagonizes Cyclin E1 Proteolysis and Promotes its Dysregulation in Cancer. *Cancer Res.* **74**, 2006–2014 (2014).
51. Kim, J. S. *et al.* Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by

- Akt and mTOR pathways. *Nat. Immunol.* **14**, 611–618 (2013).
52. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* **23**, 1515–1527 (2011).
 53. Nagai, S., Kurebayashi, Y. & Koyasu, S. Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1280**, 30–34 (2013).
 54. Tzivion, G., Dobson, M. & Ramakrishnan, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1938–1945 (2011).
 55. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1978–1986 (2011).
 56. Ohkura, N. & Sakaguchi, S. Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. *Immunity* **33**, 835–837 (2010).
 57. Haxhinasto, S., Mathis, D. & Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J. Exp. Med.* **205**, 565–74 (2008).
 58. Tischner, D., Wieggers, G., Fiegl, H., Drach, M. & Villunger, A. Mutual antagonism of TGF-beta and Interleukin-2 in cell survival and lineage commitment of induced regulatory T cells. *Cell Death Differ.* **19**, 1277–1287 (2012).
 59. Losman, J. A., Chen, X. P., Vuong, B. Q., Fay, S. & Rothman, P. B. Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 4800–4805 (2003).
 60. Tanaka, K. *et al.* Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *J. Immunol.* **180**, 3746–3756 (2008).
 61. Takahashi, R. *et al.* SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- and IL-17A production.

J. Exp. Med. **208**, 2055–2067 (2011).

62. Tait, S. W. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. cell Biol.* **11**, 621–632 (2010).
63. Stavru, F., Archambaud, C. & Cossart, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: Novel insights. *Immunol. Rev.* **240**, 160–184 (2011).
64. Kurtulus, S., Tripathi, P. & Hildeman, D. A. Protecting and rescuing the effectors: Roles of differentiation and survival in the control of memory T cell development. *Front. Immunol.* **3**, 1–13 (2012).
65. Liu, Q. *et al.* PP2A-dependent control of transcriptionally active FOXO3a in CD8+ central memory lymphocyte survival requires p47phox. *Cell Death Dis.* **3**, e375–e375 (2012).
66. Pradelli, L. A., Bénétteau, M. & Ricci, J.-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1589–1597 (2010).