

00524
171



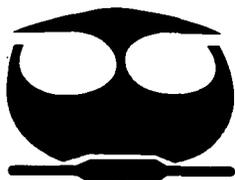
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LA CINASA DE TIROSINA
JAK3 EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA
POR QUIMIOCINAS EN EL TIMO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MEXICO, D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

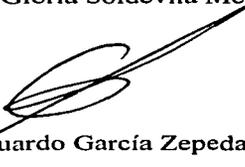
Presidente	Profesor José Sulivan López Gonzales
Vocal	Profesor Saturnino de León Chapa
Secretario	Profesora Maria Gloria Soldevila Melgarejo
Primer Suplente	Profesor Jorge Fernando Paniagua Solís
Segundo Suplente	Profesora Mónica Berenice Heras Chavarria

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de la Dra. Gloria Soldevila, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria, UNAM



Asesor del Tema: Dra. Ma. Gloria Soldevila Melgarejo



Supervisor Técnico: Dr. Eduardo García Zepeda



Sustentante: Alfonso Rafael Salgado Aguayo

El presente trabajo fue financiado por DGAPA IN221199

El estudiante Alfonso R. Salgado Aguayo fue apoyado por el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura (PROBETEL) en el periodo que comprendió de julio a diciembre del 2001

Se agradece el apoyo brindado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas para la realización del presente trabajo.

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a la Facultad de Química por los recursos dedicados a mi formación.

**Esta tesis está dedicada a la memoria de
SJG, CS, y los +125**

Agradezco sinceramente el apoyo brindado por:

Mis padres

Mis tutores

Nohemí

La familia

Los primos y tod@s l@s amig@s

Ileana

...y a tod@s l@s que creyeron

Gracias a ustedes este trabajo obtuvo su nombre.

Y a manera de explicación:

*Cuando las puertas de la percepción sean limpiadas, los hombres verán las cosas como realmente son:
infinitas.*

William Blake

*There is no reality except the one contained within us. That is why so many people live such an unreal life.
They take the images outside them for reality and never allow the world within to assert itself*

H. Hesse

CONTENIDO

Abreviaturas.....	6
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 El sistema inmune	7
1.2 El timo y el desarrollo de los linfocitos T.....	9
1.3 La familia de las cinasas de Janus.....	15
1.4 Las quimiocinas y sus receptores.....	24
1.5 Expresión y funciones de quimiocinas y sus receptores en el timo.....	29
2 HIPÓTESIS	35
3 OBJETIVOS	36
4 METODOLOGÍA	37
5 RESULTADOS	
5.1 Tipaje de ratones Jak3 -/-.....	40
5.2 Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones tímicas.....	42
5.3 Quimiotáxis.....	43
5.4 Incremento en la concentración del calcio intracelular como consecuencia de la estimulación por quimiocinas.....	46
5.5 Fosforilación de jak3 en respuesta a quimiocinas.....	50
5.6 Expresión de receptores de quimiocinas en ratones Jak3 -/-.....	59
6 DISCUSIÓN	65
7 CONCLUSIONES	75
8 APÉNDICES	
Apéndice i: medios de cultivo.....	76
Apéndice ii: reactivos y soluciones.....	87
Apéndice iii: oligonucleótidos y condiciones de reacción.....	91
9 BIBLIOGRAFÍA	93

ABREVIATURAS

AM	Acetoximetil-ester	PLC	Fosfolipasa C
BCR	Receptor de linfocitos B	PTX	Toxina B. pertussis
BSA	Albumina sérica bovina	PVDF	Fluoruro de Polivinidileno
CCR	Receptor para quimiocinas tipo CC	RAG	Genes activadores de la recombinación
CD	Grupo de diferenciación	RANTES	Regulada en activación, expresada y secretada por linfocitos T normales
CXCR	Receptor para quimiocinas tipo CXC	RNA	Ácido ribonucleico
DAG	Diacil-glicerol	rpm	Revoluciones por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato	RSS	Secuencia de señal de recombinación
DMSO	Dimetil sulfóxido	SCF	Factor de células estaminales
DN	Dobles Negativos	SCID	Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SDF-1	Factor derivado de células de estroma-1
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfatos	SFB	Suero Fetal Bovino
DP	Dobles Positivos	SH2	Dominio de homología de la familia Src
DTT	Ditiotreitol	SHP	Fosfatasa con dominios SH2
ECM	Matriz extracelular	SLC	Quimiocina de tejidos linfoides secundarios
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético	SP	Positivos Sencillos
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares.	STAM	Moléculas adaptadoras transductoras de señales
FAK	Cinasa de adhesión focal.	STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción
yc	Cadena gama común.	TAE	Solución de Tris-Acetato-EDTA
GDP	Difosfato de Guanosina	TBS	Solución amortiguadora de Tris
GRK	Cinasa de receptores unidos a proteína G	TCR	Receptor de linfocitos T
GTP	Trifosfato de Guanosina	TECK	Quimiocina expresada en el timo
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks	TK	Dominio de cinasa en tirosina
HPRT	Hipoxantina-fosforibosiltransferasa	TNF	Factor de necrosis tumoral
HRP	Peroxidasa de rábano	VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
Ig	Inmunoglobulina	VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
IL	Interleucina		
IP3	Inositol trifosfato		
IRF-1	Factor de transcripción regulado por interferón		
Jak	Cinasa de Janus		
JH	Dominio de homología de la familia Jak		
JNK	Cinasa de Jun		
KL	Dominio tipo cinasa		
MAPK	Cinasa de la proteína activada por mitógenos		
MCP-1	Proteína quimioatrayente de macrófagos		
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos		
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad		
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos		
NK	Asesinos Naturales		
PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida		
PARC	Quimiocina pulmonar y regulada por activación		
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
PI3K	Cinasa del 3-Fosfatidilinositol		
PKC	Cinasa de proteínas C		

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL SISTEMA INMUNE.

Los seres vivos están expuestos constantemente a una gran cantidad de microorganismos y sustancias ajenas al organismo potencialmente dañinas. Para hacer frente a estos peligros, los vertebrados poseen una variedad de mecanismos de defensa conocidos como el sistema inmune. Desde el nacimiento, poseen barreras no específicas que son efectivas contra una gran cantidad de microorganismos, conocidas en conjunto como inmunidad innata. También existe la inmunidad adquirida o adaptativa, que es específica para microorganismos o moléculas particulares y se desarrolla a lo largo de la vida del individuo, en respuesta a retos de patógenos.

Las barreras que conforman la inmunidad innata son anatómicas (como la piel), fisiológicas (como la temperatura, pH, tensión de oxígeno, y factores solubles como complemento, lisozimas, etc.), y fagocíticas; la fagocitosis es un proceso por medio del cual un material particulado es engullido por una célula, y la llevan a cabo células especializadas conocidas como fagocíticas, que son de origen mieloide, como macrófagos y neutrófilos.

La inmunidad adaptativa tiene características que la diferencian de la inmunidad innata. La respuesta inmune en este caso es específica contra el patógeno, es decir, se genera una gran diversidad en la capacidad de reconocimiento de moléculas extrañas y el sistema inmune discrimina moléculas propias de extrañas. Además se genera memoria inmunológica, gracias a la cual la respuesta inmune será más rápida y efectiva en un segundo encuentro con el patógeno. Las células más importantes para montar una respuesta adaptativa son los linfocitos T y B. Estas células tienen receptores de superficie muy diversos que les permiten reconocer moléculas extrañas. Cuando dichos receptores se unen a un antígeno con la suficiente afinidad por el receptor, los linfocitos se activan y proliferan, dando como resultado una progenie que expresa el mismo receptor (clona); a este proceso se le conoce como selección clonal y es el principio central en la función de los linfocitos.

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y una vez activados, se diferencian a linfocitos B de memoria, capaces de responder rápidamente al encontrar por segunda vez el antígeno, y a células plasmáticas, que producen los anticuerpos, proteínas solubles que se

unen al antígeno y pueden desencadenar respuestas específicas por parte de otras células del sistema inmune. Su receptor de membrana específico (BCR) es de hecho un anticuerpo anclado a la membrana por una porción transmembranal.

Los linfocitos T expresan un receptor conocido como TCR, y reconocen en otras células péptidos asociados a la molécula del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones: linfocitos T ayudadores y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T ayudadores se caracterizan por expresar una glicoproteína de membrana llamada CD4 y reconocen péptidos asociados a moléculas del MHC tipo II; al ser activados secretan citocinas, proteínas solubles capaces de regular la actividad de otras células del sistema inmune. Cabe mencionar que distintos patrones de expresión de citocinas resultan en diferencias cualitativas en cuanto al tipo de respuesta. Los linfocitos T citotóxicos expresan la glicoproteína CD8 y reconocen péptidos asociados a moléculas del MHC tipo I; una vez activados, destruyen células propias alteradas, como aquellas que han sido infectadas por un parásito intracelular o que se han transformado y son potencialmente cancerosas.

Los receptores BCR y TCR, con capacidad de reconocer una gran diversidad de antígenos, surgen como resultado de rearreglos al azar de segmentos de los genes para estas proteínas. En el caso de los linfocitos T, este proceso se lleva a cabo en el timo, donde además se define el fenotipo del linfocito T y se eliminan las clonas capaces de reaccionar con autoantígenos que podrían provocar una respuesta inmune contra células propias del organismo (autoinmunidad).

Las células NK (Natural Killer, de origen linfoide) no expresan receptores variables para antígenos. Estas células son capaces de matar a ciertas células tumorales, y son importantes en la inmunidad innata contra virus y otros patógenos intracelulares, así como en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ expresa un marcador de células NK, la proteína NK 1.1. Estos linfocitos, conocidos como linfocitos T CD4 NK1.1, expresan TCR con variabilidad limitada, responden a moléculas parecidas a las del MHC de clase I, y son los productores principales de ciertas citocinas (como Interleucina 4) en las fases tempranas de la respuesta inmune.

1.2 EL TIMO Y EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T

1.2.1 Anatomía del timo.

El timo es un órgano linfoide primario ubicado en la porción anterosuperior de la cavidad torácica, sobre el corazón, en la línea media del cuerpo. Es un órgano aplanado y bilobulado; cada lóbulo está rodeado de una cápsula y dividido en lobulillos, separados entre sí por tejido conectivo conocido como trabécula. Contiene gran cantidad de linfocitos T en desarrollo (timocitos) que se mueven a través del estroma tímico, el cual está formado de células epiteliales, células provenientes de la médula ósea (macrófagos y células dendríticas), fibroblastos y tejido conectivo. Las células epiteliales forman una porción importante del estroma tímico, a diferencia de los órganos linfoides secundarios, en los que el estroma está formado por células derivadas del mesénquima.

El estroma tímico surge durante el desarrollo embrionario a partir de las capas endo- y ectodérmicas de la tercera bolsa faríngea y el tercer arco branquial, a partir del décimo día de desarrollo embrionario en ratones [111]. El timo rudimentario del embrión pronto se ve poblado por gran variedad de células de diversos linajes, como timocitos, células dendríticas y macrófagos. La llegada de estas células provee las señales necesarias para la organización de las células epiteliales tímicas en una estructura reticular característica del timo que, a diferencia de muchos otros órganos, no presenta una membrana basal [111]. En humanos, el timo está completamente desarrollado antes del nacimiento y su crecimiento continúa hasta la pubertad, para después atrofiarse lentamente: en niños puede llegar a pesar hasta 70 gramos, mientras que en ancianos no es raro que pese solo 3 gramos; sin embargo la eficiencia en producción de linfocitos T por gramo de tejido se mantiene más o menos constante durante la vida del individuo, independientemente del tamaño del pool de linfocitos en la periferia y de los antígenos presentes [21].

La función principal del timo como órgano linfoide primario es proveer el micro ambiente necesario para lograr la maduración de los linfocitos T hasta que éstos posean una especificidad antigénica determinada y sean inmunocompetentes, es decir, capaces de montar una respuesta inmune. Los timocitos en distintos estadios de diferenciación influyen la organización típica de los micro ambientes tímicos; en otras palabras los timocitos regulan la expansión y posicionamiento de las células epiteliales en los distintos micro ambientes [111]. Los micro ambientes en donde se lleva a cabo el desarrollo de los

timocitos se diferencian por su localización dentro del timo en dos zonas: la corteza y la médula, separados por la unión cortico-medular y caracterizados por las subpoblaciones de timocitos que se encuentran en estas zonas. Según el patrón de expresión de moléculas de superficie, los timocitos se dividen en Dobles Negativos (DN, CD4⁻ CD8⁻) y Dobles Positivos (DP, CD4⁺ CD8⁺), localizados en la corteza, y Positivos Sencillos (SP CD4⁺ ó CD8⁺), localizados en la médula.

1.2.2 Fase temprana en la diferenciación de timocitos.

Los progenitores de los timocitos, o células estaminales, llegan desde la periferia (médula ósea o de hígado durante el desarrollo fetal) al timo por la sangre, migrando a través de los vasos para entrar al estroma en la unión córtico-medular. Se cree que la llegada de estas células, así como su migración, se debe a la interacción de factores quimioatrayentes que actúan de forma soluble o unidos a la matriz extracelular (ECM), compuesta de proteínas como colágena I y IV, laminina, fibronectina, vimentina y merosina [5], cuya expresión depende de la localización dentro del timo. Los progenitores, una vez dentro del timo, migran al espacio subcapsular, el más externo dentro del lobulillo tímico, donde comienzan su proceso de maduración.

En el humano, los progenitores de médula ósea se caracterizan por la presencia de CD34, mientras que en el ratón se ha definido una población de progenitores multipotentes con el fenotipo Sca-1⁺, Thy 1.1^{lo}, c-kit⁺, Lin⁻ (Lin se refiere a una serie de marcadores de superficie restringidos según el linaje). No está claro aún que tan comprometidos están los precursores al linaje linfóide al salir de la médula ósea, pues solo se ha podido aislar de la médula una población con capacidad de producir linfocitos T y B, así como células NK y algunos tipos de células dendríticas pero no células eritroides y mieloides [93].

En el timo de embriones de ratón se han detectado precursores capaces de formar linfocitos T y B, así como macrófagos [80], lo cual indica que el timo (al menos en el desarrollo embrionario) contiene células estaminales multipotenciales. En el adulto, se calcula que los precursores intratímicos se reemplazan a un ritmo de 2-3% al día [29]. Una vez en el timo, las células progenitoras, conocidas como triples negativos por no expresar CD3 ni los correceptores (CD4 o CD8, ver más adelante), pasan por un periodo de proliferación, y por una serie de estadios fenotípicamente distinguibles según la expresión de las moléculas de superficie CD25 y CD44. Además estos progenitores expresan IL-7R y

CD117 o c-kit, un receptor con actividad de cinasa de tirosina cuyo ligando es el factor de células estaminales (*Stem Cell Factor* o SCF) [4]. CD44 es una proteína que media la adhesión de leucocitos a ácido hialurónico, y es expresada junto con CD117 en los progenitores linfoides tímicos recién llegados, en el primer estadio de los timocitos DN o dobles negativos (estadio T1, ver figura 1.1). La cadena α del receptor para IL-2 (CD25) comienza a expresarse en el segundo estadio de los DN (también conocidos como T2 o células Pro-T) junto con CD44; no se sabe si la expresión transitoria de esta proteína cumple alguna función en particular. En este estadio, los timocitos son inducidos a proliferar y presentan un fenotipo parecido al de los linfocitos T maduros activados por antígeno [131]; probablemente estos timocitos reciben señales de factores solubles como IL-7 que los induce a sobrevivir y a hacer accesibles los genes necesarios para el rearreglo VDJ (ver más adelante) y SCF, que los induce a proliferar. En el siguiente estadio, conocido como T3 o de células pequeñas Pre-T tempranas, se dejan de expresar CD117 y CD44. Estas células han comenzado a rearreglar el locus de la cadena β del TCR, y lo expresan ensamblado con una cadena invariable conocida como pre-T α , junto con CD3 (formado por una cadena δ , una γ y dos ϵ) y un homodímero de la cadena ζ . En el siguiente estadio (T4 o células Pre-T tardías) dejan de expresar CD25 se seleccionan las células que poseen una cadena β funcional del TCR (selección β), las cuales maduran al estadio de dobles positivos o DP (expresan los correceptores CD4 y CD8, ver fig 1.1). Las células en este estadio incrementan su tamaño y pasan por algunas rondas de replicación. En un timo murino adulto normal los timocitos DN representan aproximadamente del 5% al 10% del total de timocitos.

1.2.3 Rearreglo de los genes del TCR

El TCR está constituido por dos cadenas variables (α y β) asociadas al complejo CD3, además durante el reconocimiento del antígeno participan, entre otras moléculas, los correceptores CD4 y CD8. Las cadenas α y β del TCR se dividen en dos dominios, uno variable y uno constante; la interacción del TCR con el complejo péptido/MHC ocurre por la región variable, que está en el extremo más alejado de la membrana citoplasmática.

Los genes que codifican la región variable de las cadenas α y β se dividen en segmentos V y J para la cadena α y en segmentos V, D y J para la cadena β . Las enzimas codificadas por los genes activadores de la recombinación (RAG), RAG-1 y RAG-2,

rompen la hebra de DNA que es re-ligada eliminando las regiones no codificantes y los segmentos que hubiera entre las señales de recombinación unidas. Dado que hay muchos segmentos V, D y J que pueden unirse al azar, la recombinación es la base de la variabilidad en el gen de las cadenas α y β del TCR, aunque existe otro proceso que genera variabilidad: la diversidad en la región de unión ("*junctional diversity*"), generada al unirse los segmentos V, D y J, pues en ese proceso se pueden añadir y eliminar nucleótidos al azar. Frecuentemente se producen proteínas no funcionales dada la variabilidad generada, así que los timocitos solo rearreglan la cadena α del TCR una vez que han producido una cadena β funcional. La cadena β se expresa en la membrana celular acompañada de una proteína constante llamada cadena pre-T α (gp33), y transduce señales que promueven el rearreglo de la cadena α , proceso conocido como selección β , en el que solo sobreviven los timocitos con un rearreglo efectivo de β . Los timocitos que sobreviven el proceso de selección β (estadio T3 tardío y T4) se dividen unas 6 a 8 veces, tras lo cual se lleva a cabo el rearreglo de la cadena α del TCR, la cual se dimeriza con la cadena β para formar el TCR, que al principio se expresa en bajas cantidades en timocitos DP CD69^{lo} (CD69 es una lectina de tipo C de función desconocida, fig. 1.1). En caso de que el rearreglo obtenido no sea funcional, se rearregla el gen correspondiente al otro cromosoma. Este proceso es muy astringente, en cuanto a que solo se rearregla el gen del segundo cromosoma si no se obtuvo una proteína funcional en el primer rearreglo; a este proceso se le conoce como exclusión alélica, y asegura que un linfocito T determinado exprese receptores con cadenas α y β únicas.

1.2.4 Procesos de selección de los timocitos.

Para que se dé el reconocimiento TCR-antígeno, la molécula del TCR tiene que reconocer la molécula del MHC propio que asocian péptidos no propios unido a ella. La autorreactividad se elimina ya que los linfocitos T son seleccionados durante su maduración en el timo [129]. Aquellos timocitos que expresan TCR que no reconocen moléculas del MHC propias asociadas a un péptido endógeno sufren un proceso apoptótico conocido como "muerte por negligencia". Los timocitos con un TCR que reconoce moléculas del MHC asociadas a un péptido endógeno reciben señales de sobrevivencia (selección positiva), pero si reconocen con alta avidéz el MHC asociado a un péptido endógeno, los

timocitos mueren por apoptosis (selección negativa) a fin de evitar procesos patológicos debidos al autoreconocimiento [69].

Aparentemente, el proceso de selección positiva es responsable de comprometer a los timocitos a un linaje determinado. Aún no se esclarece totalmente como se da la elección entre ambos fenotipos (CD4 o CD8), pero se han propuesto varias teorías para explicar este fenómeno. El modelo instructivo propone que cuando el TCR de un timocito DP se une al complejo péptido/MHC, solo el correceptor adecuado se unirá a la molécula del MHC, dando una señal para mantener la expresión de ese correceptor y disminuir la expresión del otro. Este modelo asume que el timocito podrá diferenciar el correceptor que reconoció a la molécula del MHC. Un segundo modelo conocido como estocástico, sugiere que uno de los dos correceptores se deja de expresar al azar; si el correceptor que se continua expresando es capaz de reconocer a la molécula del MHC, se darán las señales necesarias para la sobrevivencia en la selección positiva, pero si se mantiene la expresión del correceptor incorrecto, el timocito morirá por negligencia. Existe evidencia favorable para apoyar ambos modelos. Un tercer modelo, conocido como de compromiso asimétrico, sugiere que el compromiso hacia el linaje CD4 puede ser un proceso por omisión capaz de llevarse a cabo incluso en ausencia de moléculas del MHC, mientras que el desarrollo de timocitos CD8⁺ dependerá de señales determinadas [40].

1.2.5 Migración de los timocitos hacia la periferia.

Los timocitos SP CD62L^{lo} entran a la médula del timo para madurar hasta convertirse en linfocitos T SP CD62^{hi} (ver fig. 1.1) que son exportados a la periferia, sufriendo cambios en la expresión de moléculas de adhesión, de receptores de quimiocinas (ver más adelante) y de otras moléculas, entre las que cabe resaltar CD45, (fosfatasa de tirosina con dominio transmembranal que se expresa en los linfocitos T). Estos cambios probablemente promueven la migración de los linfocitos T *naive* a los nódulos linfáticos, proceso importante para mantener la homeostasis de linfocitos T en la periferia. Se estima que aproximadamente un 95% de los timocitos muere en el timo durante los procesos de selección, y solo una pequeña proporción se exporta a la periferia. Aproximadamente un 80% del total de timocitos mueren por negligencia, ya que no pueden reconocer moléculas de MHC con un péptido. Se estima que cada día un millón de timocitos nuevos salen del

timo a la circulación en ratones jóvenes normales, que tienen cerca de 100 millones de timocitos en el timo.

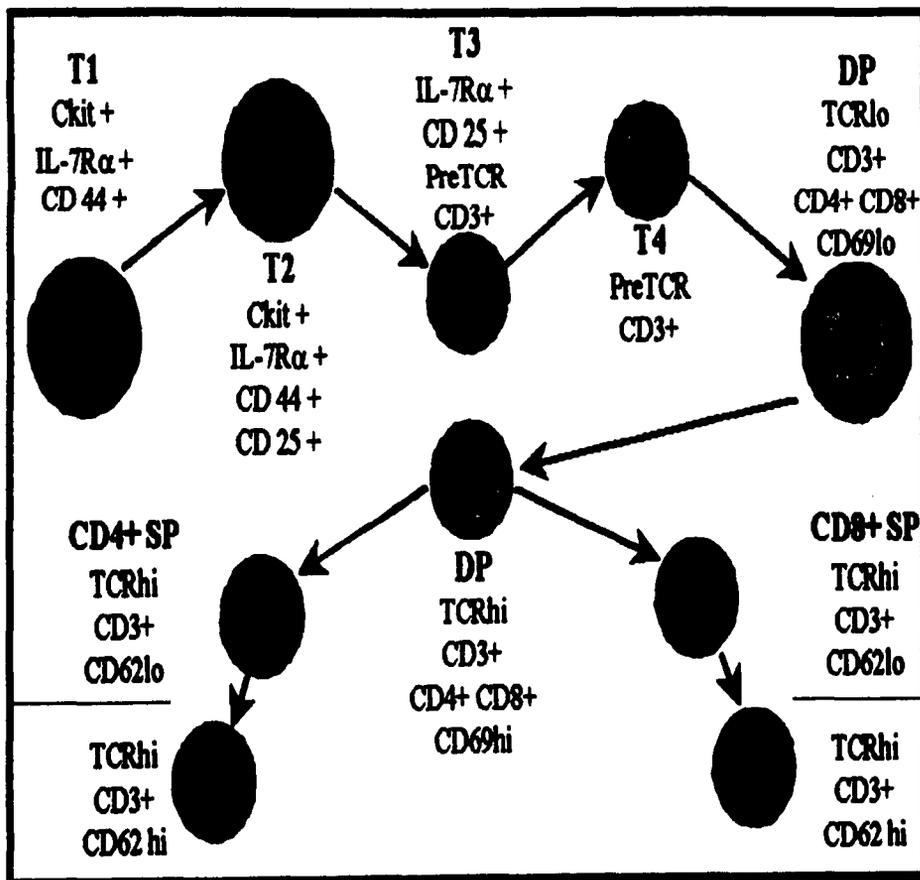


Figura 1.1: Distintas etapas en el desarrollo de los timocitos. Únicamente se muestran las moléculas de superficie consideradas como las más relevantes para definir el estadio en que se encuentran los timocitos. Un signo + representa que la molécula se expresa en la superficie celular. Hi representa una expresión alta en la superficie celular, mientras que Lo representa baja expresión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3 LA FAMILIA DE LAS CINASAS DE JANUS

En mamíferos se conocen cuatro miembros de la familia de cinasas de Janus (Jak): Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. Sus pesos moleculares varían de 110 a 140 kDa. Jak3 se expresa principalmente en células hematopoyéticas, pero el resto de los miembros de esta familia se expresan de manera más generalizada. Se han encontrado mRNA para las Jaks en muchas especies de vertebrados, incluidos aves y peces, e incluso se ha descrito una proteína homóloga a las Jaks en *Drosophila* [11]. También se han descrito homólogos de algunos sustratos de las Jaks (proteínas llamadas STAT, *Signal Transducers and Activators of Transcription*, ver más abajo) en *Dictyostelium* [54], lo cual sugiere un origen evolutivo muy antiguo de la vía de señalización Jak-STAT.

1.3.1 Estructura de los miembros de la familia de cinasas Jak

Estructuralmente, las proteínas de la familia Jak se dividen en tres regiones: la amino-terminal (N), seguida de un dominio tipo cinasa (KL) inactivo y por último un dominio de cinasa de tirosina (TK, figura 1.2). Los cuatro miembros de esta familia poseen siete regiones de homología, llamadas (del extremo carboxi- al amino-terminal) JH1 a JH7. La región N incluye las regiones JH3 a JH7, el dominio KL a JH2 y el dominio TK a JH1. La región N tiene aproximadamente 550 residuos de aminoácidos. Los primeros 200-250 residuos confieren la especificidad de unión al receptor de citocinas (aproximadamente las regiones JH7 y JH6). Secuencias en JH3 y JH4 tienen ciertas características estructurales en común con los dominios SH2. Existe un dominio de banda 4.1 (denominado JEF) que se extiende de JH7 a la mitad de JH4. Se sabe que el dominio JEF puede mediar interacciones intramoleculares, y se supone que podría tener un papel en la asociación reportada de Jak2 con FAK y en la interacción constitutiva entre Jak3 y Pyk2 [72]. Deleciones y mutaciones puntuales en la región N y en el dominio KL cambian el estado de fosforilación y actividad de la cinasa, lo que sugiere que tanto N como KL contribuyen a la regulación del dominio TK [30]. La región N, por ejemplo, podría influir en la accesibilidad de la porción catalítica de la enzima. Además, se ha demostrado con el uso de proteínas quiméricas que lo más importante para determinar la especificidad del sustrato de Jak es la localización de la proteína Jak en el complejo receptor-cinasa (debido a su región N) [60].

El dominio KL es muy similar al dominio de cinasa, pero le faltan motivos críticos para la actividad catalítica. Diversos estudios en humanos y animales de experimentación

han sugerido que el dominio KL puede tener funciones reguladoras en las proteínas Jak, como el estabilizar una configuración determinada de receptor-cinasa, regular negativamente la cinasa, funcionar como un dominio de unión a las proteínas STAT, etc. [16] y [34].

La actividad máxima de las cinasas Jak se obtiene al fosforilar residuos de tirosina conservados en todos los miembros de esta familia, localizados en un bucle de activación (bucle A) en el dominio TK [48]. En Jak3 se conocen dos tirosinas reguladoras localizadas en este bucle (fig. 1.2): Y980, que actúa como un regulador positivo, y Y981, que actúa como un regulador negativo [127].

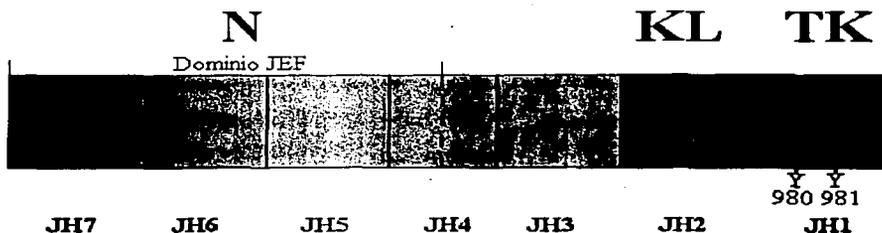


Figura 1.2: Representación esquemática de las proteínas Jak. Del lado izquierdo se encuentra el extremo N- terminal y del lado derecho se encuentra el extremo C- terminal.

1.3.2 Activación de la vía Jak-STAT

Entre las señales capaces de activar la vía Jak-STAT destacan las citocinas, mediadores solubles intercelulares que comparten una estructura α -hélice y utilizan un grupo de receptores estructuralmente relacionados. Esta familia de receptores está formada por polipéptidos con un único dominio transmembranal y con motivos extracelulares comunes importantes para la unión al ligando. No poseen actividad catalítica intrínseca, pero se encuentran asociadas de manera constitutiva a las Jaks, cinasas capaces de transducir el evento extracelular de unión del ligando al receptor en una señal intracelular. En la región intracitoplásmica proximal a la membrana, hay motivos ricos en prolina importantes para la asociación con las Jaks. Estas cinasas se acercan entre sí debido a una dimerización u oligomerización inducida por el ligando del receptor, o quizá por cambios conformacionales inducidos por ligando de dímeros preexistentes [84]. Una vez activadas, las cinasas Jak fosforilan residuos de tirosinas en los receptores así como a otros sustratos,

siendo los STAT los sustratos más estudiados. Los STAT son reclutados a la proximidad de las Jaks por su capacidad de unirse, por medio de un dominio SH2, al residuo de tirosina fosforilado en el receptor de citocinas. Después de ser fosforilados, los STATs pueden homo y/o heterodimerizarse, para luego translocarse al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de DNA y activan la transcripción de ciertos genes [25]. En la figura 1.3 puede apreciarse de forma esquemática la activación de la vía Jak/STAT. Se conocen además otras moléculas capaces de interaccionar con las proteínas Jak para mediar sus señales. Se ha reportado la interacción de muchas proteínas con las cinasas Jak, entre las que se cuentan Shc, Grb2, SHP-2, Vav, IRS, Pyk2 y las moléculas adaptadoras transductoras de señales (STAM). También se ha detectado la activación de cinasas de la familia Src (como Fyn y Lck), y de JNK y la cinasa p38, aunque no se ha demostrado la relevancia *in vivo* de tales eventos (revisado en Hofmeister [47]).

Se ha asociado a las proteínas Jak con otro tipo de receptores, como algunos receptores para factores de crecimiento con actividad de cinasa de tirosina intrínseca, y de manera especialmente relevante para el presente trabajo, con receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G, como el receptor de angiotensina [68], de serotonina [42], de la hormona estimulante de α -melanocitos [14], y recientemente descrito, con receptores de quimiocinas [115]. Además, se ha descrito la activación de la vía Jak/STAT en respuesta a TNF, al choque osmótico, a la estimulación por MHC-I y CD40 (Revisado en Leonard [63]), así como la asociación de Jak3 con la cadena ζ del TCR y su activación al estimular el TCR [107].

1.3.3 Regulación de la vía Jak-STAT

En cuanto a la regulación negativa, se ha demostrado que las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 (así nombradas por que poseen dominios SH2 de unión a fosfotirosina) juegan un papel central en la desactivación del complejo receptor/Jak. Se ha detectado asociación directa de la fosfatasa SHP-1 con Jak2 y Tyk2 y de la fosfatasa SHP-2 con Jak1 y Jak2, así como el reclutamiento de SHP-1 a motivos que contienen fosfotirosina en receptores de citocinas activados [125]. En conjunto, estos datos indican que estas fosfatasas catalizan la desactivación de las cinasas Jak, así como la defosforilación de los motivos de unión a STAT en la región citoplasmática de los receptores.

Se conoce también una familia de proteínas (CIS/JAB/SOCS/SS1) que modula negativamente la señalización por citocinas por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa: la expresión de estas proteínas, que también contienen dominios SH2, es inducida por citocinas, y se ha demostrado que algunas de ellas regulan negativamente las vías Jak/STAT, actuando en el receptor o en las Jak [31].

Existen otros mecanismos reguladores que podrían jugar un papel en la señalización por la vía Jak/STAT. Se ha sugerido que para los receptores de citocinas, la internalización y la señalización debida al receptor son procesos independientes; se ha demostrado con el empleo de una proteína Jak2 mutante que no se puede unir al receptor de la IL-5, que la internalización del receptor no depende de la actividad de la vía Jak-STAT. Esto supondría que la endocitosis del receptor no es una forma principal de regulación de esta vía [102]. No se considera que el sistema ubiquitina-proteasoma juegue un papel importante en la regulación de la actividad de las cinasas Jak, ya que no se ha demostrado ubiquitinación directa de estas proteínas, aunque el uso de inhibidores del proteasoma da como resultado una activación prolongada de Jak [126]. La presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida provocan que la actividad de Jak2 se prolongue por horas, lo que sugiere que se requiere una síntesis de proteínas mantenida para atenuar la señal de fosforilación de las cinasas Jak [33]. La actividad de Jak2 también se prolonga en presencia de inhibidores de la fosfolipasa C (PLC), lo cual sugiere un papel de la PLC o de lípidos modificados por esta en la regulación negativa de Jak 2 [33].

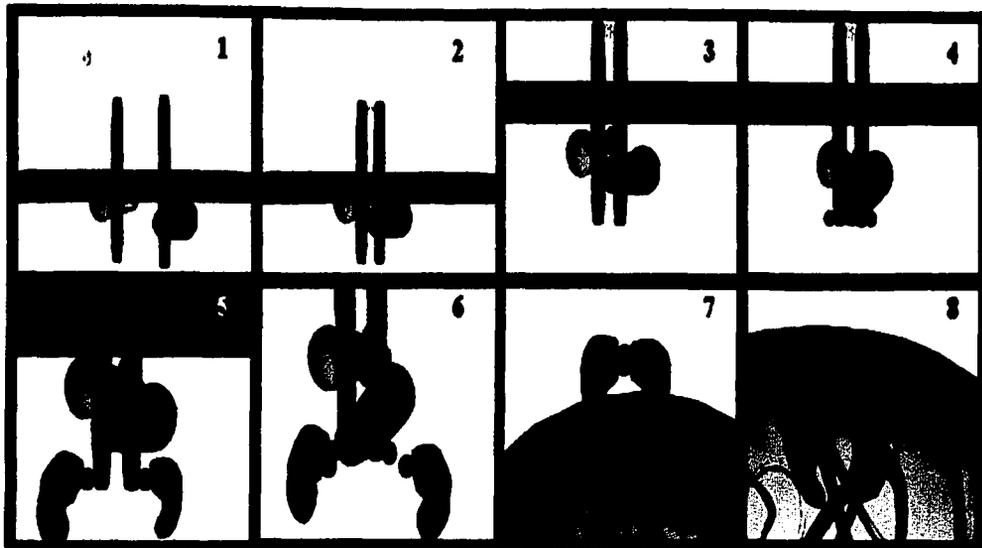


Figura 1.3: Vía Jak/STAT de transducción de señales. 1) Las enzimas de la familia Jak (mostradas en naranja) se encuentran asociadas constitutivamente en la porción intracelular de los receptores (en verde). 2) La llegada del ligando produce la asociación de las cadenas del receptor. 3) Ya en proximidad, las cinasas se autofosforilan en residuos de tirosina (esferas rojas), activándose. 4) Una vez activadas, fosforilan residuos de tirosina en el receptor. Estos residuos, junto con los residuos adyacentes, forman puntos de asociación para las proteínas STAT (en azul). 5) Por medio de su dominio SH2, las proteínas STAT se asocian a las cadenas del receptor. 6) Las enzimas Jak fosforilan residuos de tirosina en las proteínas STAT, provocando la disociación de las STAT fosforiladas del receptor. 7) Las proteínas STAT fosforiladas interaccionan por medio de sus dominios SH2, homo o heterodimerizándose. El dímero es translocado al núcleo. 8) Una vez en el núcleo, el dímero de STAT funciona como un activador de transcripción de los genes blanco.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.4 Activación de Jak3 por Interleucina-7

La interleucina 7 (IL-7) es una citocina con funciones críticas en el desarrollo linfoide. Esta proteína tiene una acción trófica en precursores linfoides, manteniendo la viabilidad de las células precursoras de manera independiente a la división celular [58]. La IL-7 se descubrió en base a su actividad inductora de proliferación en células pro-B murinas [75]. Se sabe ahora que la IL-7 tiene un papel fundamental en el desarrollo de linfocitos T y B en el ratón, y de linfocitos T, pero no B, en el humano. Los tres primeros estadios de desarrollo del linfocito T (pro-T1, T2 y T3, figura 1) requieren IL-7 para su supervivencia [58].

El timo es el órgano donde se encuentra la mayor producción de IL-7 [75]; se presume que el tipo celular que la produce corresponde al subtipo de células epiteliales corticales [78]. El receptor para IL-7 consiste de dos componentes: una cadena que une a la IL-7 (la cadena α o IL-7R α), y la cadena γ c, compartida con los receptores para IL-2, IL-4, IL-9 e IL-15; ambas cadenas son miembros de la familia de receptores de citocinas de clase II. Asociados a estas cadenas se encuentran Jak1 (asociado a la cadena α) y Jak3 (asociado a la cadena γ c). El mecanismo de activación de estas cinasas es probablemente el siguiente: IL-7 se une de manera específica a IL-7R α , con lo que se promueve su heterodimerización con γ c, yuxtaponiendo Jak3 con IL-7R α ; Jak3 entonces fosforila a IL-7R α y a Jak1; Jak3 también resulta fosforilado aunque no está claro si se autofosforila o es fosforilado por Jak1. Los residuos de tirosina fosforilados en las cadenas del receptor dan lugar a sitios de anclaje para las proteínas STAT3 y STAT5 [88]. Es importante mencionar que la eliminación de las STATs no provoca cambios en el desarrollo tímico, por lo que parecen no ser indispensables para el desarrollo de timocitos [101].

La cadena α del receptor para IL-7 (IL-7R α) es expresada en timocitos DN, pero no en DP [97]. Es muy probable que la cadena IL-7R α transduzca señales de supervivencia a los timocitos DN y promueva su expansión; se ha observado que las señales mediadas por IL-7R inducen la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica de gran importancia en la supervivencia de los timocitos. Bcl-2 se expresa en niveles altos en timocitos DN, disminuyendo su expresión en los DP para ser expresado nuevamente por los SP, en una manera coincidente con la expresión de IL-7R α . La pérdida de IL-7R α en el estadio de DP permitiría una eliminación eficaz de aquellos timocitos que no se seleccionan. Además de

inducir a Bcl-2, IL-7 juega un papel importante en la recombinación V(D)J pues se ha demostrado que timocitos fetales que no expresan IL-7 no son capaces de expresar los genes *Rag* [73] y [20], y los ratones deficientes en γc o en Jak3 tienen una reducción en la recombinación del "cluster 1" de TCR γ [67]. Además, aparentemente IL-7 induce desmetilación del locus de TCR γ , reacción que facilita el corte en la cadena de DNA mediado por RAG (Revisado en [47]).

1.3.5 Fenotipo de los ratones Jak3 -/-

Tanto los ratones deficientes en Jak3 (Jak3 -/-) como los deficientes en la cadena γc (γc -/-) presentan números muy reducidos de linfocitos B maduros en la médula ósea y en la periferia. Dado que este fenotipo también se da en los ratones deficientes para IL-7 e IL-7R α , se postuló que la deficiencia pudiera deberse a la falta de señalización por IL-7R. Este defecto induce un bloqueo en los estadios pre-B y pro-B del desarrollo de los linfocitos B [19]. Además, los ratones Jak3 -/- o γc -/- no tienen células NK, linfocitos T $\gamma\delta$ ni placas de Peyer, y sus nódulos linfáticos son muy pequeños y están pobremente poblados [105; 103; 104; 106]. Se ha demostrado que IL-7 es necesaria para el rearrreglo de la cadena γ del TCR [66], lo cual explica la ausencia de linfocitos T $\gamma\delta$. La cadena γc forma parte del receptor para IL-15, citocina necesaria para la generación de células NK, lo cual explica la falta de estas células. Durante el desarrollo fetal en ratones IL-7R α -/- o Jak3 -/- no es posible detectar el rudimento que dará origen a las placas de Peyer, caracterizado en sus etapas más tempranas por la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 (CD106) en ciertos puntos del intestino; aparentemente la IL-7 provee una señal esencial para el desarrollo temprano de la formación del rudimento de las placas de Peyer, en el estadio VCAM-1+ [1].

El timo de los ratones Jak3 -/- o γc -/- es hipoplásico, con una celularidad de aproximadamente una centésima parte de la correspondiente a ratones normales. Sin embargo, la diferenciación de linajes de linfocitos T parece transcurrir normalmente de acuerdo al análisis de las subpoblaciones definidas por la expresión de CD4 y CD8 ([105] [28]). Es probable que, al menos en parte, el fenotipo observado se deba a la imposibilidad de los timocitos de responder a IL-7, dado el parecido de estos ratones con los IL-7 e IL-7R α -/- ([82; 117]). Se ha detectado que el número de timocitos Lin- c-Kit+ DN (los más tempranos) se encuentra reducido, lo cual indica que hay menos progenitores en el timo con

respecto a un ratón normal [79]. Un análisis más detallado de los timocitos DN demostró que existe reducción importante en las células entre los estadios T1 y T2 y los estadios T3 y T4 [43]. Se ha demostrado un retraso en el desarrollo de los timocitos a partir del día 15 de gestación; mientras que en ratones normales se detectan timocitos en el estadio DN T3 desde el día 15, en ratones Jak3 $-/-$ se detectan timocitos en ese estadio hasta el día 16. Al día de gestación 16 en ratones normales se detectan timocitos DP, mientras que en los ratones Jak3 $(-/-)$ se detectan hasta el día 17 (fig. 1.4) [7]. En resumen, hay dos defectos en el desarrollo de los linfocitos T. El primero es la reducción en número de los timocitos DN más inmaduros, debida quizá a la ausencia de señales de sobrevivencia brindadas por IL-7 o bien a un reclutamiento deficiente de progenitores. El segundo es el retraso en la maduración de T2 a T3, quizá también debido a la ausencia de las señales de IL-7, hipótesis apoyada por el hecho de que en ratones deficientes en la cadena γ c y con expresión constitutiva de Bcl-2 se observa una recuperación parcial en los números de timocitos T3 [59]. Dado que los progenitores T1 normalmente no están proliferando, y la proliferación en T2 y T3 es idéntica en ratones Jak3 $-/-$ y normales, se propuso que el defecto podría deberse al bloqueo en la llegada de progenitores al timo, pero la inyección directa al timo de células de médula ósea de ratones Jak3 $-/-$ no restauró el desarrollo normal de los timocitos, lo que indica defectos de desarrollo independientes al reclutamiento de progenitores al timo [7], aunque no se excluye que el reclutamiento se vea comprometido en estos ratones. En un estudio reciente se detectó que en ratones Jak3 $-/-$ hay proliferación intensa de timocitos justo antes del inicio del rearreglo de la cadena β del TCR, al mismo tiempo que se incrementa la apoptosis de timocitos en la selección de la cadena β del TCR de manera concurrente a una reducción significativa en los niveles de expresión de Bcl-2; la expresión de un transgén rearreglado para esta cadena recuperó parcialmente el número de timocitos, lo que indica que posiblemente el papel de Jak3 es crítico hasta antes de la señalización mediada por el pre-TCR [32].

El número de linfocitos T en la periferia es normal en ratones Jak3 $-/-$ [17], aunque estas células presentan un fenotipo alterado: los linfocitos en los ratones Jak3 $-/-$ son en promedio más grandes que los linfocitos T de ratones normales y expresan niveles elevados de CD44 y CD69 y disminuidos de CD62L, fenotipo característico de linfocitos T activados. Los linfocitos T de ratones Jak3 $-/-$ o γ c $-/-$ son anérgicos y no responden a

estímulos mitogénicos. Además, sufren de procesos apoptóticos a un ritmo elevado con respecto a linfocitos T de ratones normales [95]. Los linfocitos T y los timocitos Jak3 $-/-$ producen cantidades disminuidas de IL-2 con respecto a células normales debido principalmente al mayor porcentaje de células apoptóticas [105].

Por último, cabe mencionar un modelo en el que se ha reconstituido la expresión de Jak3 únicamente en el timo usando un promotor proximal para Lck; se observó que la celularidad en el timo se recuperó, aunque conforme estos ratones transgénicos maduran, los linfocitos T en periferia pierden el Jak3 transgénico y el fenotipo de los linfocitos se acerca al de los ratones Jak3 $-/-$, indicando que la expresión de Jak3 en linfocitos T maduros es necesaria para la homeostasis de estas células [103].

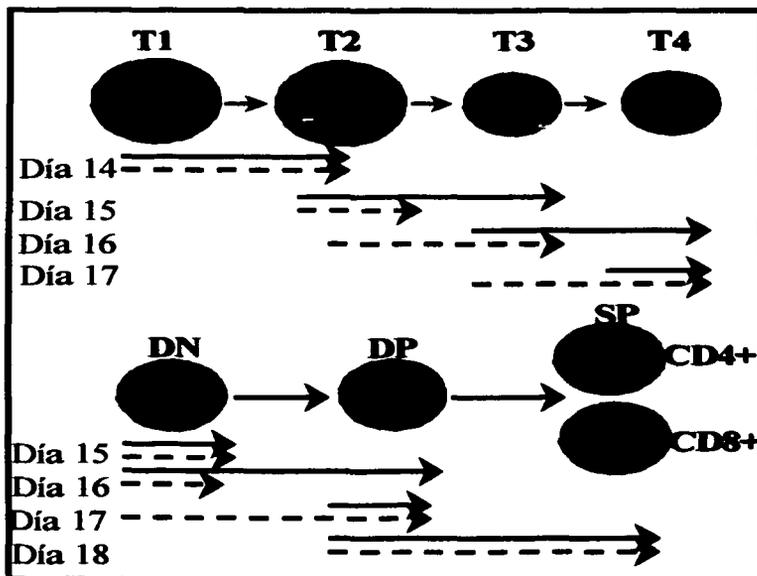


Figura 1.4: Retraso en la desregulación de CD44 y CD25, y en la progresión al estadio de DP en fetos de ratones Jak3 $-/-$ comparados con fetos de ratones Jak3 $+/+$. Las flechas sólidas representan el estadio alcanzado al día de desarrollo embrionario indicado en los timocitos obtenidos de fetos Jak3 $+/+$; las flechas discontinuas indican el estadio alcanzado por los timocitos Jak3 $-/-$.

1.4 LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES

1.4.1 Las quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular (entre 6 y 14 kDa) cuya función principal es la regulación de tráfico de leucocitos (de ahí su nombre, abreviación de citocinas quimiotácticas); se han descrito otras funciones para estas proteínas, entre las que se encuentran la regulación, proliferación y movilización de células progenitoras hematopoyéticas [57; 56], angiogénesis, desarrollo fetal y activación de leucocitos [6].

La familia de las quimiocinas consta de aproximadamente 50 miembros con secuencias conservadas. Esta familia se ha dividido en 4 subfamilias que tienen entre dos y cuatro residuos de cisteína muy conservados en el extremo amino. La subfamilia CXC (también llamada subfamilia α) tiene los dos primeros residuos de cisteína separados por un residuo de aminoácido variable. En la subfamilia CC (o β) los residuos de cisteína están juntos. La subfamilia C (o γ), compuesta únicamente por la linfotactina, solo tiene una cisteína conservada, y la subfamilia CX₃C (o δ), compuesta por la fractalcina, tiene las dos cisteínas separadas por tres residuos de aminoácidos. En el humano los genes de las quimiocinas CXC se encuentran en el cromosoma 4, y los de las quimiocinas CC, en el cromosoma 17.

La estructura monomérica de las quimiocinas es relativamente constante: un asa en el extremo amino-terminal, seguida de tres hojas β antiparalelas conectadas por asas, y una α -hélice en el extremo carboxi-terminal. Se ha reportado la existencia de dímeros y tetrámeros de quimiocinas a concentraciones fisiológicas [18], aunque existe evidencia de que algunas quimiocinas pueden tener actividad biológica como monómeros [83].

1.4.2 Receptores de Quimiocinas

Los receptores para las quimiocinas son proteínas con 7 dominios transmembranales asociados a proteínas G heterotriméricas. Estos receptores están formados por alrededor de 350 residuos de aminoácidos y tienen un peso molecular de alrededor de 40 kDa. De acuerdo a sus secuencias de aminoácidos, los receptores de quimiocinas se clasifican dentro de la familia de proteínas tipo rodopsina de clase A. Tienen varios motivos conservados, entre los que cabe resaltar el motivo DRYLAIV en la segunda asa intracelular. Todos los receptores de quimiocinas tienen dos cisteínas conservadas, una en el extremo amino-terminal y otra en la tercera asa extracelular;

probablemente estas cisteínas forman un puente bisulfuro necesario para tener la estructura tridimensional de la región de unión al ligando, la cual además requiere de las tres asas extracelulares de la proteína. Se ha demostrado con el uso de receptores quiméricos que el dominio amino-terminal es el principal responsable de la selectividad al ligando [62]. Se conocen cerca de 20 receptores, muchos de los cuales unen más de un ligando, aunque la promiscuidad de la unión de quimiocinas con receptores generalmente no se da entre distintas familias. La expresión de los receptores es heterogénea entre distintos leucocitos y se regula a nivel transcripcional [65]. Se ha reportado la regulación de la expresión de los receptores y quimiocinas por citocinas; recientemente se mostró que IL-15 induce la expresión de receptores para quimiocinas CC pero no de receptores para quimiocinas CXC, y, al igual que IL-2, induce la expresión de quimiocinas de ambas familias en linfocitos T periféricos [81]. En aparente contraste con este resultado se mostró que IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 inducen la expresión de CXCR4 en linfocitos T de memoria [51]. De manera interesante se describe que la activación de linfocitos T mediada por el complejo TCR/CD3 produce una disminución en la expresión de CXCR4 [10], lo cual indica que la expresión de CXCR4 no solo depende de la presencia de factores solubles, sino también del estado de activación de las células. Por último, cabe mencionar que IL-7 como SDF-1 (el ligando de CXCR4), se expresa en células del estroma tímico, y podrían actuar de manera sinérgica en ciertas funciones inmunes [94].

1.4.3 Actividad biológica de las quimiocinas.

Se han establecido papeles importantes para las quimiocinas en enfermedades inflamatorias [74], en hematopoyesis, angiogénesis, metástasis, rechazo a tumores [118], respuesta Th1 o Th2 [90], e infección por VIH [9]. Además, las quimiocinas también regulan funciones del sistema inmune no directamente relacionadas con la respuesta inflamatoria, como el tráfico de linfocitos de órganos linfoides primarios a secundarios, y de ahí a terciarios; cabe aclarar, sin embargo, que la conducta migratoria de los linfocitos se ve determinada por las acciones combinadas de quimiocinas y moléculas de adhesión [116; 120;5].

Se ha descrito un papel primordial de las quimiocinas en el proceso de extravasación de leucocitos. Por otro lado, la migración direccional y el posicionamiento de leucocitos en tejidos linfoides secundarios también están regulados por las quimiocinas y

sus receptores. En estos tejidos, una célula puede encontrar muchas señales de quimioatrayentes en patrones temporales y espaciales complejos; se ha demostrado que los neutrófilos utilizan de manera secuencial sus receptores para quimiocinas para moverse a través de distintos gradientes quimiotácticos en un proceso conocido como “Navegación en múltiples pasos” [37], proceso dependiente en gran medida de la desensibilización de un receptor mediada por su ligando. Esto explica la expresión simultánea de muchos tipos de receptores de quimiocinas observada en distintos leucocitos; dichos receptores serían requeridos para llevar a cabo distintos pasos en el proceso de migración.

Excepto la fractalcina, que puede encontrarse unida a la membrana por medio de un dominio transmembranal o ser secretada al espacio extracelular, todas las quimiocinas son secretadas. Dado que tienen carga neta positiva a pH fisiológico, se unen a los proteoglicanos sulfatados de la matriz extracelular. De esta forma, después de ser secretadas, las quimiocinas tienden a mantenerse concentradas de forma local, formando gradientes estables [90].

1.4.4 Señalización mediada por receptores de quimiocinas

En el movimiento de los leucocitos participan muchos procesos, como el cambio de la forma de la célula, en la afinidad de las integrinas, y el reciclaje de integrinas en el borde líder (“*Leading edge*”) de la célula [91]. Todos estos eventos requieren de una maquinaria de señalización intracelular compleja que comienza a trabajar cuando el ligando se une al receptor. De manera similar a lo observado en otros receptores pertenecientes a la misma familia, algunos receptores de quimiocinas se dimerizan en respuesta al ligando. Este hecho se demostró primero con CCR2, el receptor para la quimiocina MCP-1 [86], y este fenómeno se ha observado también en CCR5 y CXCR4 (Revisado en Mellado, [71]).

La dimerización de los receptores inducen la activación de diversos miembros de la vía Jak/STAT en líneas celulares transfectadas con diferentes receptores. Cuando se utilizan líneas celulares transfectadas con CCR5, se observó la fosforilación en tirosina del receptor en respuesta a la estimulación con la quimiocina RANTES, así como la asociación de Jak1, pero no Jak2 ni Jak3, al receptor, y la activación de STAT5b. En linfocitos T se observa la activación de STAT1 y STAT3 en respuesta a estímulos con RANTES y MIP-1 α . En células transfectadas con CCR2, se detecta la fosforilación y activación de Jak2 en respuesta su ligando, MCP-1. Por último, se ha detectado en células transfectadas con

CXCR4 la rápida activación y asociación de **Jak1** y **Jak2** al receptor, proceso que promueve la asociación al receptor y la activación de **STAT 1, 2, 3 y 5b** [71]. En **CCR2** se ha identificado a la tirosina **Y139**, dentro del motivo **DRYLAIV**, como el blanco principal de fosforilación por **Jak2**.

La toxina producida por la bacteria *B. pertussis* (toxina pertussis o **PTX**) inhibe de manera selectiva la acción de las proteínas **G_i** triméricas. El hecho de que la mayoría de las respuestas debidas a la estimulación con quimiocinas sean inhibidas al tratar a las células con **PTX** sugiere la participación de las proteínas **G_i** triméricas en las vías de señalización activadas por quimiocinas; esta teoría se ve apoyada con la demostración de la asociación física de la subunidad α de proteínas **G_i** a **CXCR1, CCR2, CCR5** y **CXCR4** en respuesta a sus ligandos (**IL-8, MCP-1, RANTES** y **SDF-1 α** , respectivamente [71]).

Después de la activación, la proteína **G** heterotrimérica se disocia en dos: por una parte en el complejo **G $\beta\gamma$** y por otra en la subunidad **G α_i** (asociada ahora a **GTP**), misma que se une al receptor como consecuencia de los cambios conformacionales promovidos en el receptor por la unión del ligando. La subunidad **G $\beta\gamma$** desencadena la activación de la fosfolipasa **C (PLC)** [49], que produce trifosfato de inositol (**IP₃**) y diacilglicerol (**DAG**). El **IP₃** se une a canales de calcio en el retículo endoplásmico, provocando su apertura y liberación de calcio del retículo endoplásmico. El **DAG** junto con el **Ca²⁺** activa varias isoformas de la Cinasa de Proteínas **C (PKC)**; la **PKC** activa a su vez una cascada de eventos de transducción de señales. Mientras tanto, la subunidad **G $\beta\gamma$** actúa como proteína de anclaje que facilita la interacción del receptor con otras vías de señalización, como la mediada por la cinasa de receptores unidos a proteínas **G (GRK)**, importante en procesos de desensibilización. La subunidad **G α** tiene actividad intrínseca de **GTPasa**, por lo que después de un tiempo el **GTP** asociado a la **G α** se hidroliza para producir **GDP**, promoviendo la disociación de **G α** con el receptor y la reasociación con **G $\beta\gamma$** , apagando las señales debidas a la proteína **G**. También se ha detectado la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (**PI3K**) y la asociación de su subunidad **p85** a **CXCR4** en respuesta a estimulación con **SDF-1** [114]. **PI3K** produce segundos mensajeros (lípidos fosforilados en 3) que activan a las cinasas **PKC** y **AKT**, y la vía **Ras**; esta activación se relaciona con adhesividad de las integrinas, con migración celular y con la polarización [27]; además otras proteínas afectadas por la activación de **PI3K** son las **GTPasas** de bajo

peso molecular como Rho, Rac y Cdc42, que participan en la regulación del citoesqueleto de actina y en la adhesión celular [52; 53]. La señalización mediada por CCR5 produce fosforilación y activación de Pyk2 (RAFTK), capaz de modular el sistema de cinasas JNK/SAPK [39]. La activación de las cinasas FAK resulta en la fosforilación de Paxilina, y en su asociación con el receptor. También se activa la cascada de las MAPK, y dado que MAPK puede activar factores de transcripción, se ha propuesto que las quimiocinas podrían regular la expresión de genes por esta vía [46].

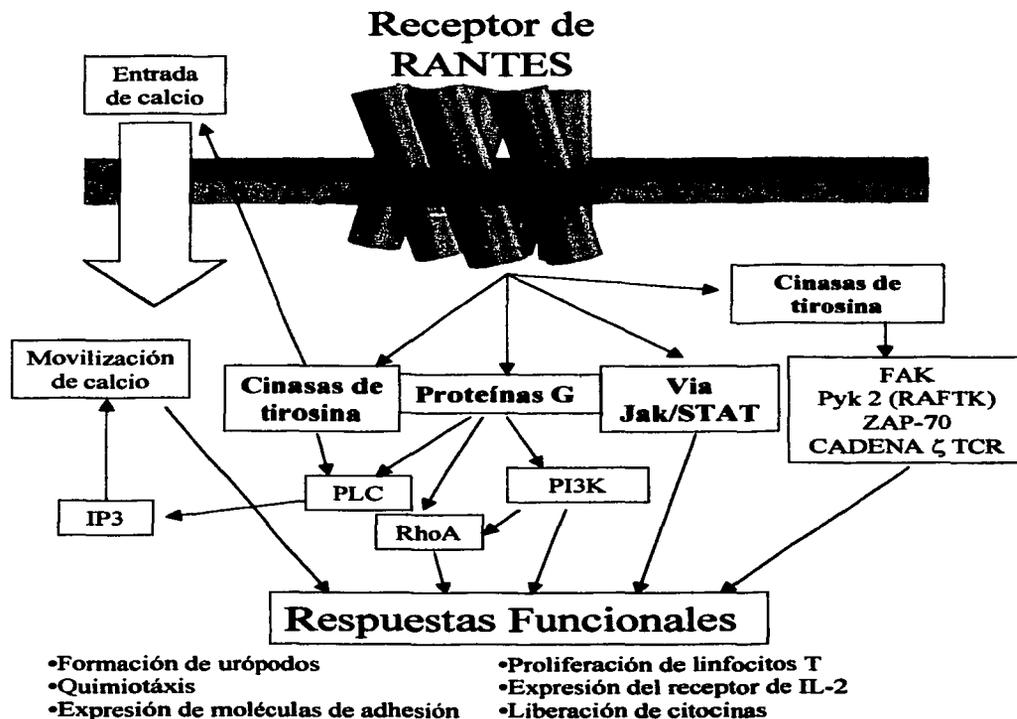


Figura 1.5: Representación esquemática de las vías de señalización activadas por RANTES en linfocitos T.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.5 EXPRESIÓN Y FUNCIONES DE QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES EN EL TIMO.

1.5.1 Introducción

El proceso de maduración de los timocitos se lleva a cabo en micro ambientes específicos dentro del timo. Los progenitores provenientes de la médula ósea (en el adulto) y/o el hígado fetal penetran al timo probablemente por vénulas post-capilares en la médula [110]. Los timocitos DN más inmaduros migran desde las vénulas en la médula hasta la región subcapsular de la corteza, aparentemente migrando a contracorriente del resto de timocitos más maduros. Posteriormente comienzan su migración desde la corteza hasta la médula mientras se llevan a cabo los procesos de maduración y selección, tras los cuales los timocitos maduros salen del timo por las vénulas de la médula. Es muy probable que estos procesos de migración ordenada se deban a la presencia localizada de quimiocinas en el timo, y a la expresión selectiva de sus receptores en distintos estadios de maduración de los timocitos. En la tabla 1.1 se resumen los conocimientos actuales sobre la expresión de quimiocinas y sus receptores en el timo.

1.5.2 Migración de timocitos DN en el timo

Los timocitos DN más inmaduros expresan CXCR4 y responden eficientemente a SDF-1 en ensayos de quimiotaxis [57]. La expresión de SDF-1 en ratones adultos parece estar restringida a la corteza externa, específicamente en fibroblastos tímicos [98]. Algunos grupos han observado que los timocitos DN T1 migran hacia SDF-1, lo que parece implicar a esta quimiocina en la migración de progenitores hacia el timo [57]. Sin embargo se ha reportado que los timocitos DN T1 expresan muy bajos niveles de CXCR4, mismos que aumentan apreciablemente en el estadio T2; estos datos indican que SDF-1 juega un papel en la migración de los timocitos recién llegados a la corteza externa, así como en la asociación de células DN con estroma subcortical (fig. 1.6) [98]. En ratones, la deficiencia de SDF-1 es letal *in utero*, pero el análisis de los fetos ha mostrado una timopoyesis normal. Los timocitos CXCR4 *-/-* introducidos en timos de ratones adultos normales irradiados se desarrollan normalmente [130], por lo tanto SDF-1 podría cumplir funciones redundantes en el timo, posiblemente actuando en conjunto con otras quimiocinas.

También se ha sugerido la participación de la quimiocina TECK y su receptor CCR9 en la migración de progenitores tímicos. En el ratón, TECK es expresado por células

epiteliales del timo fetal, y estimula la migración de timocitos fetales DN [120], aunque en el adulto la expresión de CCR9 en timocitos DN es muy baja y aumenta después de la señalización por el pre-TCR, siendo los timocitos DP los que responden más fuertemente a TECK [77]. Recientemente se generó un ratón CCR9 $-/-$ para investigar el papel de TECK en el desarrollo de linfocitos [122], y se observó que la falta de CCR9 no parece afectar ni el porcentaje ni la celularidad de las distintas subpoblaciones de timocitos, basándose en la expresión de CD4, CD8, CD25, CD44, CD5, CD62L y CD69. Se comprobó además que estos timocitos no respondían a TECK, por lo tanto CCR9 parece ser el único receptor en timocitos para esta quimiocina (Recientemente se ha descrito que TECK puede unirse a CCR11 [41]). Además, en los ratones CCR9 $-/-$ y $+/+$ se observó un retraso en la aparición de las primeras células DP en el desarrollo del timo fetal, a partir del día 16.5 de gestación, y una disminución leve en la cantidad de timocitos desde el día 14.5 de gestación, aunque a partir del día 18.5 en adelante los números se igualan. Este dato indica que quizá TECK contribuye a la colonización del rudimento tímico durante el desarrollo fetal en conjunto con otros factores [122].

1.5.3 Migración de timocitos desde la corteza externa hasta la corteza interna.

La transición del estadio DN al DP es un periodo muy dinámico durante el cual las quimiocinas podrían regular el movimiento de los timocitos desde la corteza externa hasta la corteza interna, así como la interacción con células epiteliales, facilitando la interacción con los complejos MHC/péptido; además podrían activar integrinas para promover la adhesión con el epitelio tímico. El RNA mensajero de CCR9 se induce de manera rápida después de estimular timocitos Rag2 $-/-$ con anticuerpos anti-CD3 ϵ (señal equivalente a la del pre-TCR) y en los DP hay un aumento en la expresión de la proteína de cerca de 10 veces con respecto a los DN [77]. Se ha demostrado que TECK se expresa de manera importante en células epiteliales corticales, con menores niveles de expresión en la médula [123], lo cual indica que TECK promueve la asociación de timocitos con el epitelio tímico.

Tabla 1.1 Expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas en el timo. Modificado de Norment, 2000 [76].

Receptor	Patrón de Expresión	Ligando	Patrón de Expresión
CXCR3	DN TCR ⁺	MIG (CXCL9) IP10 (CXCL10) ITAC (CXCL11)	Estroma Estroma ND
CXCR4	DN>DP>SP	SDF-1 (CXCL12)	Fibroblastos, corteza externa.
CCR3	DP, SP	Eotaxina (CCL11)	Corpúsculos de Hassal.
CCR4	CD69 ⁺ DP, CD69 ⁺ CD62L ^o CD4 SP	TARC (CCL17) MDC (CCL22)	Cels. dendríticas Cels. epiteliales medulares
CCR5	DP, SP	MIP-1A (CCL3) MIP-1B (CCL4) RANTES (CCL5)	DN ND ND
CCR6	CD 4 SP (baja expresión)	LARC (CCL20)	ND
CCR7	SP	ELC (CCL19) SLC (CCL21)	ND Cels. del estroma medular, vasos en unión CM
CCR8	DP (baja expresión), CD4 SP	I-309 (CCL1)	ND
CCR9	DP, SP	TECK (CCL25)	Cels corticales> epiteliales medulares, dendríticas.
XCR1	DN y/o CDS SP	Linfotactina (XCL-1)	ND

DN: Doble Negativo. DP: Doble positivo. SP: Positivo sencillo. ND: No determinado.

Al madurar al estadio DP, los timocitos disminuyen un poco la expresión de CXCR4, al mismo tiempo que aumentan la expresión de CCR5 [3], aunque no está claro si los timocitos DP responden menos a SDF-1 que los DN en ensayos de quimiotaxis. Los timocitos DP responden a MIP-1 β (ligando de CCR5) en ensayos de quimiotaxis y flujo de calcio, pero no hay datos sobre el patrón de expresión de MIP-1 β y RANTES dentro del timo, y el papel de este receptor en el desarrollo tímico no está claro, pues en humanos con mutaciones naturales en CCR5 (CCR5 Δ 32, característicos por su resistencia a la infección por VIH) no se ha detectado una deficiencia en el desarrollo de los linfocitos T ni en la función inmune en general.

1.5.4 Migración cortico-medular.

Después de la selección positiva, los timocitos migran a través de la unión cortico-medular, donde entran en contacto con células dendríticas de origen mieloide, y con células epiteliales medulares. En este punto se lleva a cabo la selección negativa, y las quimiocinas, además de estimular la migración cortico-medular, podrían facilitar la asociación de los timocitos con células presentadoras de antígeno. En el estadio post-selección (CD69⁺ DP), se adquiere capacidad de responder a MDC (ligando de CCR4), y la expresión de CXCR4 disminuye [15]. Probablemente la pérdida de la capacidad de responder a SDF-1 facilitaría la salida de la corteza de los DP seleccionados, aunque hay reportes que indican que los DP tanto CD69⁻ como CD69⁺ responden a SDF-1 en ensayos de quimiotaxis [57], hecho que dificulta la interpretación de la función de SDF-1. La capacidad de responder a MDC es adquirida cuando los timocitos maduran al estadio CD69⁺ DP, y continua hasta el estadio CD69⁺ CD62L^{lo} CD4⁺ SP, pero se pierde en el estadio CD69⁻ CD62L^{hi} CD4⁺ SP (fig. 1.6); la expresión de MDC parece localizarse en células epiteliales de la médula y en corpúsculos de Hassal (tabla 1.1)[23]. CCR4 juega un papel importante en la migración de intermediarios post-selección CD69⁺, facilitando su colocalización con células epiteliales.

Los timocitos DP y SP pueden migrar en respuesta a la Eotaxina, quimiocina presente en corpúsculos de Hassal y en células dendríticas en la médula [38] y posiblemente ésta juega un papel en la selección negativa. La quimiocina PARC (sin receptor conocido) también se expresa en el timo y posiblemente facilita la interacción de timocitos con células dendríticas y macrófagos, que la producen [2].

1.5.5 Migración en la médula y salida a la periferia

Es probable que las quimiocinas dirijan la emigración de los timocitos SP maduros hacia la periferia, ya que se ha demostrado en ratones transgénicos que la expresión de PTX de manera selectiva en timocitos inhibe la salida del timo de estas células. [22].

Los timocitos CD4⁺ SP inmaduros migran en respuesta a MDC y TECK, mientras que los timocitos CD4⁺ SP maduros no (fig. 1.6) [15], lo cual sugiere una disminución en la expresión de CCR4 y CCR9 durante la maduración de los SP; estos resultados además coinciden con la observación de una reducción en los niveles de mRNA de CCR9 en timocitos SP con respecto a los DP [77]. Es interesante notar que la respuesta a TECK se mantiene en timocitos maduros CD8⁺ SP, lo cual podría indicar que estos timocitos

podrían quedarse en el timo cumpliendo alguna función por el momento indefinida [76]. Es posible que CCR4 también se exprese de manera diferencial, pues los timocitos $CD3^+ CD4^+ CD8^{lo}$ migran en respuesta a MDC, mientras que los timocitos $CD3^+ CD4^{lo} CD8^+$ no lo hacen [23].

Los timocitos SP maduros también expresan CCR7 y responden a SLC y ELC [15]. SLC se expresa en células del estroma medular y se detecta en los vasos sanguíneos de la unión cortico-medular [99]. Además se ha demostrado claramente el papel de CCR7 y SLC en la movilización de linfocitos T *naive* a órganos linfoides periféricos [35]. Estos datos proponen a CCR7 como un buen candidato para mediar la salida del timo de los timocitos SP maduros, aunque ratones CCR7 $-/-$ tienen un desarrollo y exportación de timocitos normales, lo cual indica que CCR7 y SLC podrían ser no esenciales para la emigración de los timocitos [35].

Es importante considerar en que medida pueden competir las señales de quimioatracción con las señales mediadas por antígenos: en un estudio realizado con linfocitos T periféricos se mostró que ELC, SLC e IP-10 podían atraer linfocitos T aunque éstos estuvieran recibiendo una señal por su TCR, mientras que MDC, MCP-1, SDF-1 y RANTES no fueron capaces de hacerlo [13]. Se puede especular que en el timo quizá algunas quimiocinas, como MDC, atraen timocitos a células presentadoras de antígenos, mientras que otras quimiocinas, como ELC, separan a los timocitos de las presentadoras después de un tiempo determinado.

Los timocitos DP y $CD8^+$ SP expresan CCR5 y migran en respuesta a MIP-1 β [24], igual que los timocitos $CD4^+$ SP [100]. Es importante mencionar que la Eotaxina estimula la producción de MIP-1 β por parte de los timocitos, y CCR3 (receptor de la Eotaxina) también es expresado en los SP, lo cual muestra una red compleja de interacciones entre quimiocinas en este estadio [38]. Los timocitos $CD8^+$ SP activados producen linfotactina [55]. CCR8 se expresa a niveles altos en $CD4^+$ SP respecto a células DP, pero los linfocitos T *naive* de periferia no expresan CCR8; los ligandos de CCR8 (TCA3 en humano, I-309 en ratón) se expresan en el timo pero su patrón de expresión no está definido aún [128].

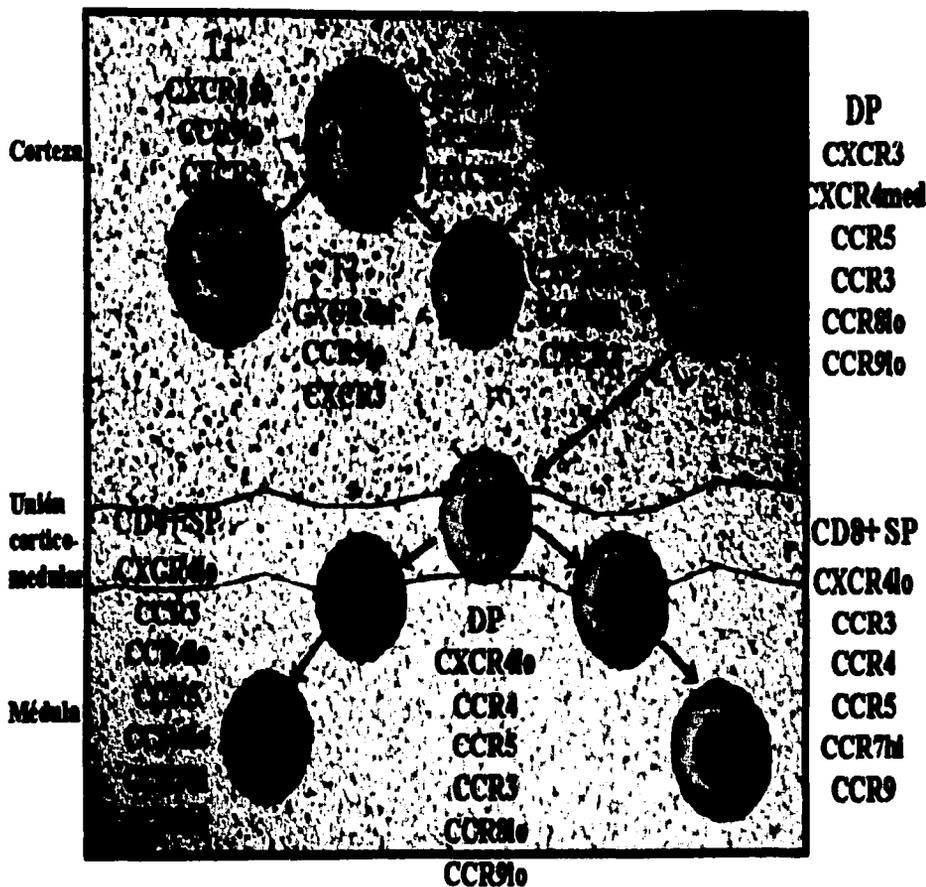


Figura 1.6: Expresión de receptores de quimiocinas en distintos estadios del desarrollo de timocitos. Se indican los receptores cuya expresión se ha detectado en el estadio correspondiente; *lo* indica baja expresión del receptor, *med* indica expresión media y *hi* indica expresión abundante del receptor en la superficie celular. Se muestra también la localización del timocito dentro del timo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2 HIPÓTESIS

La deficiencia del desarrollo tímico observado en los ratones Jak3 $-/-$ podría ser consecuencia de una respuesta disminuida a quimiocinas específicas y deberse bien a i) disminución en la migración de células progenitoras de los linfocitos T de la médula ósea al timo o ii) reducción en la migración durante el proceso de diferenciación en el timo.

3 OBJETIVOS

- Investigar y comparar la respuesta quimiotáctica frente a quimiocinas expresadas en el timo (en particular SDF-1 α y TECK) por parte de timocitos y/o progenitores de la médula ósea, obtenidos de ratones Jak3 -/- y Jak3 +/-
- Investigar si dichas quimiocinas son capaces de inducir movilización de calcio en timocitos, y si dicha movilización es diferente en timocitos Jak3 -/- comparados con ratones Jak3 +/-
- Investigar si la estimulación de timocitos con las quimiocinas mencionadas puede inducir fosforilación en tirosinas de la proteína Jak3.
- Determinar la expresión de mRNA de receptores de quimiocinas (en particular CXCR4, CCR7 y CCR9) en timocitos de ratones Jak3 -/- y Jak3 +/-

4 METODOLOGÍA

En el apéndice I se encuentra una descripción detallada de las metodologías empleadas en el presente trabajo.

4.1 TINCIÓN DE CO-RECEPTORES CD4 Y CD8 EN TIMOCITOS.

Para determinar el porcentaje de timocitos de cada subpoblación tímica (DN, DP y SP) en los timos de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$, se empleó inmunofluorescencia y citometría de flujo. Brevemente, los timocitos recién extraídos se lavaron y se incubaron con anticuerpos para CD4 o CD8 marcados con distintos fluoróforos. Se evaluó la fluorescencia de cada célula por medio de citometría de flujo.

4.2 GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES

Para determinar el genotipo de los ratones empleados se realizó una reacción de PCR, empleando oligonucleótidos para el gen de Jak3 y para el gen de neomicina (presente en los ratones con al menos uno de los alelos del gen de Jak3 eliminado). El tejido obtenido de la cola del ratón se digirió enzimáticamente y luego se purificó el DNA con una extracción fenol-cloroformo. El DNA así obtenido se empleó en la reacción de PCR (ver apéndice III)

4.3 ENSAYO DE QUIMIOTÁXIS

La capacidad migratoria de los timocitos en respuesta a quimiocinas se midió por medio de un ensayo de quimiotáxis en una cámara de Boyden modificada. Brevemente, en la parte inferior de la cámara se colocó diluciones seriales de quimiocinas, y en la parte superior se colocó una cantidad constante de timocitos; ambos compartimentos se separaron por una membrana porosa de policarbonatos. Después de incubar la cámara a 37°C por dos horas, se contaron las células adheridas a la membrana por el lado que estuvo en contacto con la solución de quimiocinas. El número de células que migraron en cada dilución de quimiocinas se normalizó con respecto a la cantidad de células que migraron en el blanco (medio sin quimiocinas).

4.4 MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Se considera que una de las primeras respuestas celulares a la estimulación con quimiocinas es la movilización de calcio intracelular. Para evaluar esta respuesta y comparar si era diferente en ratones Jak3 $-/-$ con respecto a los ratones Jak3 $+/-$, los

timocitos se tificaron con los fluoróforos permeables a la membrana celular Fura-Red y Fluo-3, cuya emisión de luz varía de acuerdo a la concentración de calcio presente en el medio. Estos fluoróforos permanecen en el citoplasma y no son incorporados en ningún organelo. La fluorescencia de las células antes y después del estímulo se evaluó en un citómetro de flujo. El cambio en la relación de ambas fluorescencias es una medida de la movilización del calcio intracelular.

4.5 ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN DE JAK3

Para saber si las quimiocinas son directamente capaces de activar a Jak3, se inmunoprecipitó y detectó su nivel de fosforilación por medio de un western blot con anticuerpos antifosfotirosina. Brevemente, una suspensión de timocitos fue estimulada con medio (control negativo), con IL-7 (control positivo), y con las quimiocinas. Después de estimular un tiempo variable, las células se lisaron y el sobrenadante que contenía las proteínas se puso en contacto con el anticuerpo anti-Jak3. Este anticuerpo se precipitó con proteína G acoplada a agarosa. Una vez separado del lisado total, el complejo anticuerpo-Jak3 fue sometido a electroforesis en gel de acrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membrana de PVDF, que se puso en contacto con una solución del anticuerpo antifosfotirosina. Dicho anticuerpo se detectó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa empleando una reacción de quimioluminiscencia en la cual la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario oxida una diacilhidrazida cíclica, generando productos excitados que emiten luz detectada con una placa fotográfica. La membrana se lavó y se repitió el proceso para detectar la cantidad de Jak3 y así normalizar la cantidad de proteína fosforilada.

4.6 RT-PCR PARA RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

La cantidad de RNA mensajero de los receptores de quimiocinas se examinó de manera semicuantitativa por medio de una RT-PCR. A partir de timocitos se extrajo RNA por el método del isotiocianato de guanidinio. Dicho RNA se empleó para sintetizar la primera hebra de cDNA empleando como cebadores oligonucleótidos de poliT para iniciar la retrotranscripción únicamente de mRNA. Esta primera hebra se utilizó para realizar una reacción de PCR duplex, empleando dos pares de oligonucleótidos: un par era específico para HPRT, empleado como control interno; el otro par era específico para cada receptor de quimiocinas analizado. El cDNA resultante de la PCR se examinó por electroforesis en gel

de agarosa teñido con bromuro de etidio. La intensidad de cada banda se determinó empleando el equipo MultiImager FX (BioRad). Se puede comparar de manera semicuantitativa si hay diferencias de expresión de los receptores en timocitos obtenidos de ratones Jak3 $-/-$ y $+/-$ calculando la relación de intensidad de la banda debida al receptor entre intensidad de la banda de HPRT (control interno) para normalizar las intensidades de las bandas con respecto al control interno.

5 RESULTADOS

5.1 TIPAJE DE RATONES JAK3 -/-

En los experimentos realizados en el presente trabajo se emplearon como controles ratones Jak3 +/- y Jak3 +/+ de la misma camada que los ratones Jak3 -/-. Los ratones heterocigotos también se emplearon para realizar nuevas cruizas. En la figura 5.1 se muestra el resultado de una reacción de tipificación del genotipo de los ratones empleados. En la tabla 5.1 se resumen los posibles resultados de una reacción de tipificación de genotipo.

Tabla 5.1: Resultados de reacciones de PCR para detectar fragmentos de genes para Neomicina (NEO) y Jak3 (JAK). En todas las reacciones de PCR realizadas se añadió un control positivo consistente en DNA previamente tipado como positivo para la banda que se busca, y un control negativo consistente en la mezcla de reacción de PCR sin DNA.

Genotipo	PCR NEO	PCR JAK
Jak3 +/+	Negativo	Positivo
Jak3 +/-	Positivo	Positivo
Jak3 -/-	Positivo	Negativo

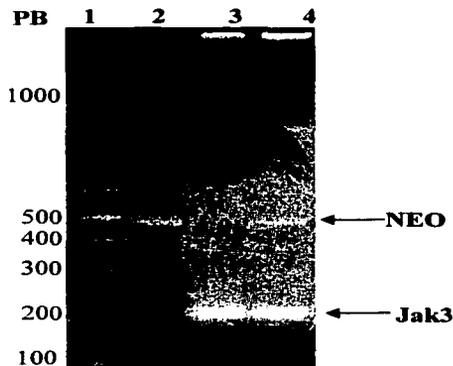


Figura 5.1: Tipificación del genotipo de los ratones empleando PCR con oligonucleótidos específicos para detectar el gen de neomicina (NEO) y el gen de Jak3. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de pesos moleculares (100+ pb, BioRad). Carril 2: DNA de ratón Jak3 -/-. Carril 3: DNA de ratón Jak3 +/+. Carril 4: DNA de ratón Jak3 +/- . Los pesos esperados de las bandas son: NEO 480 pb y Jak3 188 pb.

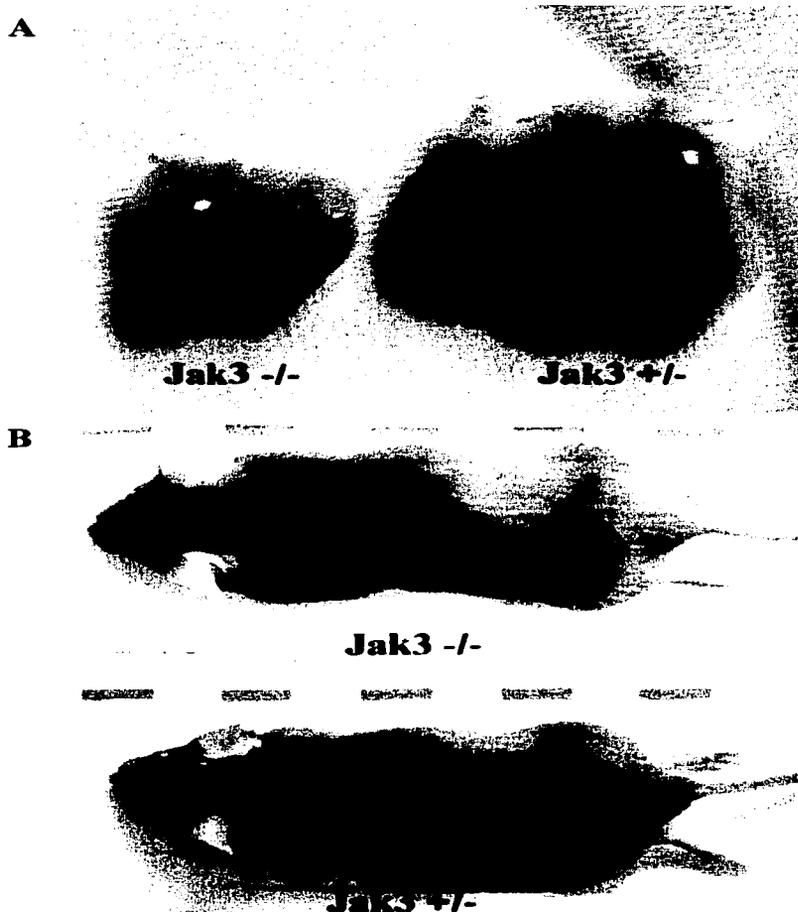


Figura 5.2 A) Comparación del tamaño de timos de ratones *Jak3* $-/-$ y *Jak3* $+/-$. B) Ratones de la misma camada, con 5 semanas al momento del sacrificio, con el mismo fenotipo macroscópico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES TÍMICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La distribución de las subpoblaciones de timocitos extraídos de ratones de 4 a 6 semanas Jak3 +/- y Jak3 -/- se muestra en la figura 5.3. Los resultados obtenidos de 4 experimentos independientes se resumen en la tabla 5.2 El tamaño de los timos es apreciablemente distinto (fig 5.2). En promedio, de un timo de ratón Jak3 +/+ se obtuvieron $1.08 \times 10^8 \pm 3.7 \times 10^7$ células, mientras que de un ratón Jak3 -/- el promedio de timocitos extraídos fue de $8.4 \times 10^6 \pm 6.2 \times 10^6$.

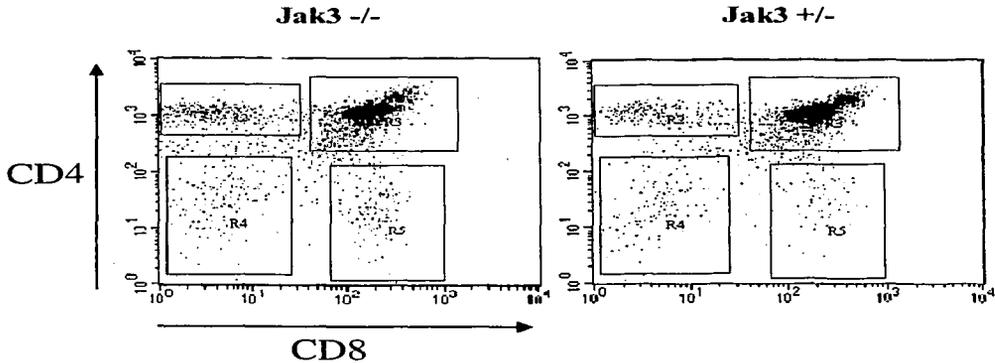


Figura 5.3 Distribución de timocitos con receptores CD4 y CD8 de ratones Jak3 -/- y Jak3 +/- . Resultado representativo de 4 experimentos

Tabla 5.2: Porcentaje de las distintas subpoblaciones de timocitos. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes.

Subpoblación	Jak3 -/-		Jak3 +/-		P
	% Eventos	Coficiente de Var. (%)	% Eventos	Coficiente de Var. (%)	
CD4 ⁻ CD8 ⁻	7.6	109.2	9.5	107.1	0.781
CD4 ⁺ CD8 ⁺	70.0	11.0	79.7	16.3	0.246
CD4 ⁺ CD8 ⁻	18.1	32.8	7.9	45.8	0.026
CD4 ⁻ CD8 ⁺	2.9	37.0	2.0	43.0	0.227

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5.3 QUIMIOTAXIS

Ya que se postula que SDF-1 α y TECK pueden jugar un papel importante en la migración de timocitos en el timo (ver introducción), se realizaron los experimentos con estas quimiocinas. En todos los experimentos realizados (n=2 a 4), los ratones Jak3 +/- y Jak3 -/- eran del mismo sexo y de la misma camada.

La respuesta migratoria de los timocitos Jak3 +/- frente a SDF-1 α siguió un patrón dependiente de la concentración de la quimiocina con un pico máximo alrededor de los 10 ng/ml (fig 5.4). Por otra parte, los timocitos del ratón Jak3 -/- no mostraron una respuesta quimiotáctica hacia SDF-1 α a ninguna de las concentraciones probadas.

De manera parecida a lo ocurrido con SDF-1 α , no se encontró migración de timocitos Jak3 -/- con TECK, mientras que con los timocitos Jak3 +/- se observó respuesta quimiotáctica máxima en 100 ng/ml (fig 5.4). Este experimento, y los realizados en adelante, se llevó a cabo utilizando una técnica descrita por De Gendt et al [26] y optimizada en el laboratorio para la cuantificación automatizada de las células marcadas con un reactivo fluorescente (ver metodología).

Los resultados descritos demuestran una deficiencia en la respuesta quimiotáctica de timocitos Jak3 -/-. En resultados preliminares (no mostrados) se encontró una disminución en la respuesta, aunque los timocitos Jak3 -/- migraron de manera significativa frente a concentraciones altas de quimiocina, efecto que no se observó en los presentes experimentos.

Puesto que tanto TECK como SDF-1 α han sido postulados como quimiocinas importantes en el reclutamiento de progenitores linfoides [76], se decidió examinar la respuesta quimiotáctica en progenitores obtenidos de la médula ósea. La respuesta migratoria de las células totales de médula ósea en respuesta a las quimiocinas TECK y SDF-1 α fue en general muy baja. En el experimento mostrado en que las células de médula ósea migraron en respuesta a TECK, se observa una migración disminuida por parte de las células Jak3 -/- en comparación con las células obtenidas de un ratón silvestre; la migración fue significativamente diferente a concentraciones de 1 y 100 ng/ml (fig 5.5).

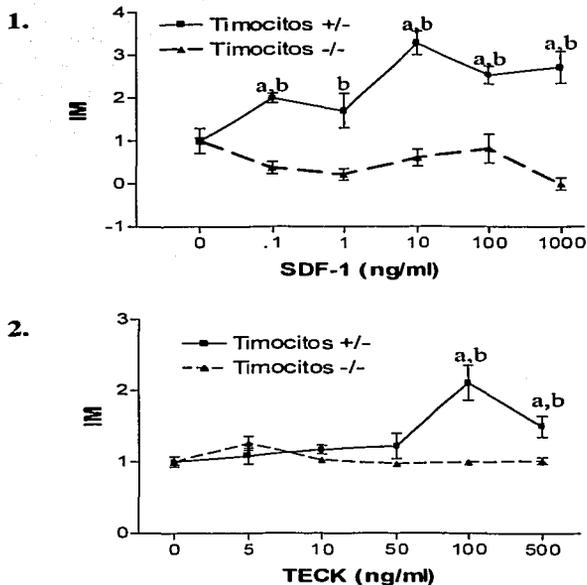


Figura 5.4: Migración de timocitos en respuesta a SDF-1 α (1) y TECK (2) por 2 horas. Se utilizaron tres pozos por cada concentración; en la gráfica se muestra el promedio \pm EMS del triplicado. Las células teñidas con una tinción diferencial se contaron al microscopio. Los símbolos sobre las líneas representan a: Migración estadísticamente significativa con respecto al medio sin quimiocinas ($P > 0.05$) b: Migración de timocitos Jak3 +/- significativamente diferente con respecto a la migración de timocitos Jak3 -/- ($p < 0.05$). IM representa el número de células que migraron frente a la quimiocina entre el número de células que migraron frente al blanco.

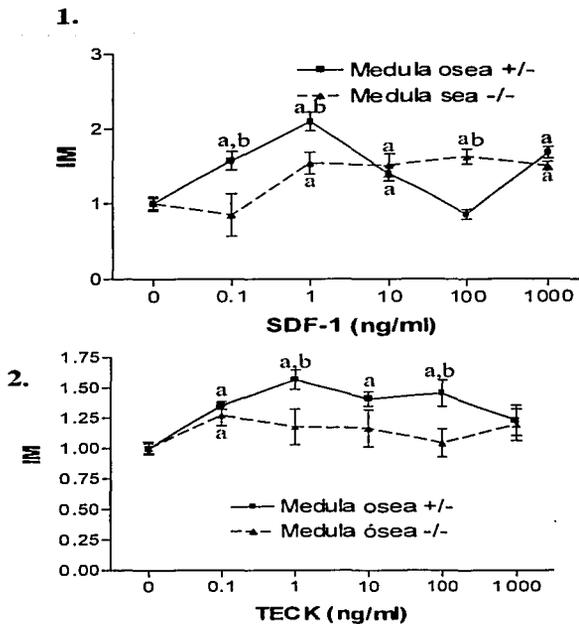


Figura 5.5: Quimiotaxis de células de médula ósea Jak3 +/- y Jak3 -/- en respuesta a SDF-1 α (1) y a TECK(2). El experimento se realizó con las mismas condiciones empleadas en las quimiotaxis ya mostradas. **a:** Migración fue estadísticamente significativa con respecto al medio sin quimiocinas ($P < 0.05$). **b:** Migración de timocitos Jak3 +/- significativamente diferente a la migración de timocitos Jak3 -/- ($p < 0.05$)

5.4 MOVILIZACIÓN DEL $[Ca^{2+}]_i$ COMO CONSECUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN POR QUIMIOCINAS.

Se determinó la movilización en $[Ca^{2+}]_i$ como un análisis funcional de la respuesta a quimiocinas, paralelo al análisis de la respuesta quimiotáctica.

En primer lugar se determinó la eficiencia del proceso de carga estimulando los timocitos con ionomicina $1\mu M$ (Sigma); este ionóforo se empleó como un control positivo (figura 5.6).

Con el fin de tener un control positivo fisiológico se examinó la respuesta de los timocitos al entrecruzamiento de CD3 y CD4. El resultado se muestra en la figura 5.7.

Una vez comprobada la capacidad de medir los flujos intracelulares de $[Ca^{2+}]_i$ con el sistema empleado, se probaron diversas quimiocinas para investigar en primer lugar la respuesta de timocitos Jak3 +/+, para después comparar dicha respuesta con la obtenida al estimular timocitos Jak3 -/-. Solo en algunos experimentos se detectaron cambios pequeños en la concentración del Ca^{2+}_i en respuesta a las quimiocinas a concentraciones de 25nM, 50nM (figura 5.8 y 5.9) y otras más elevadas (hasta 500nM, datos no mostrados). Dado que en general los cambios detectados de $[Ca^{2+}]_i$ resultaron pequeños y poco reproducibles, no se realizaron experimentos con timocitos Jak3 -/-.

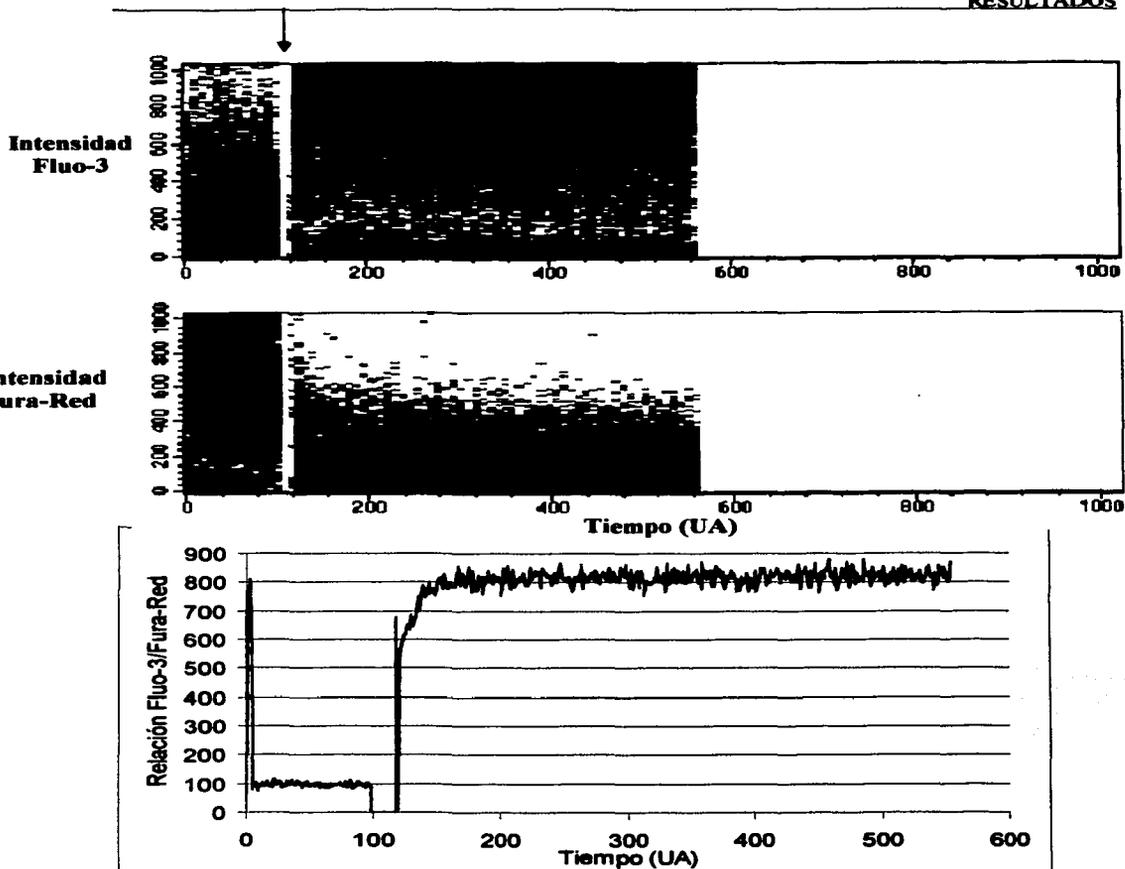


Figura 5.6: Movilización de Calcio tras la adición de Ionomicina. A los timocitos se les añadió ionomicina ($1\mu\text{M}$) en el punto indicado por la flecha. Se observa el cambio en la fluorescencia que indica un flujo de calcio al citoplasma: la intensidad de emisión (máximo en 525 nm) del Fluo-3 aumenta y la intensidad de emisión de Fura-Red (máximo en 657 nm) disminuye. El efecto de la ionomicina no disminuye a lo largo del tiempo, como puede observarse en la gráfica de la relación de intensidades de Fluo-3 entre Fura-Red

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

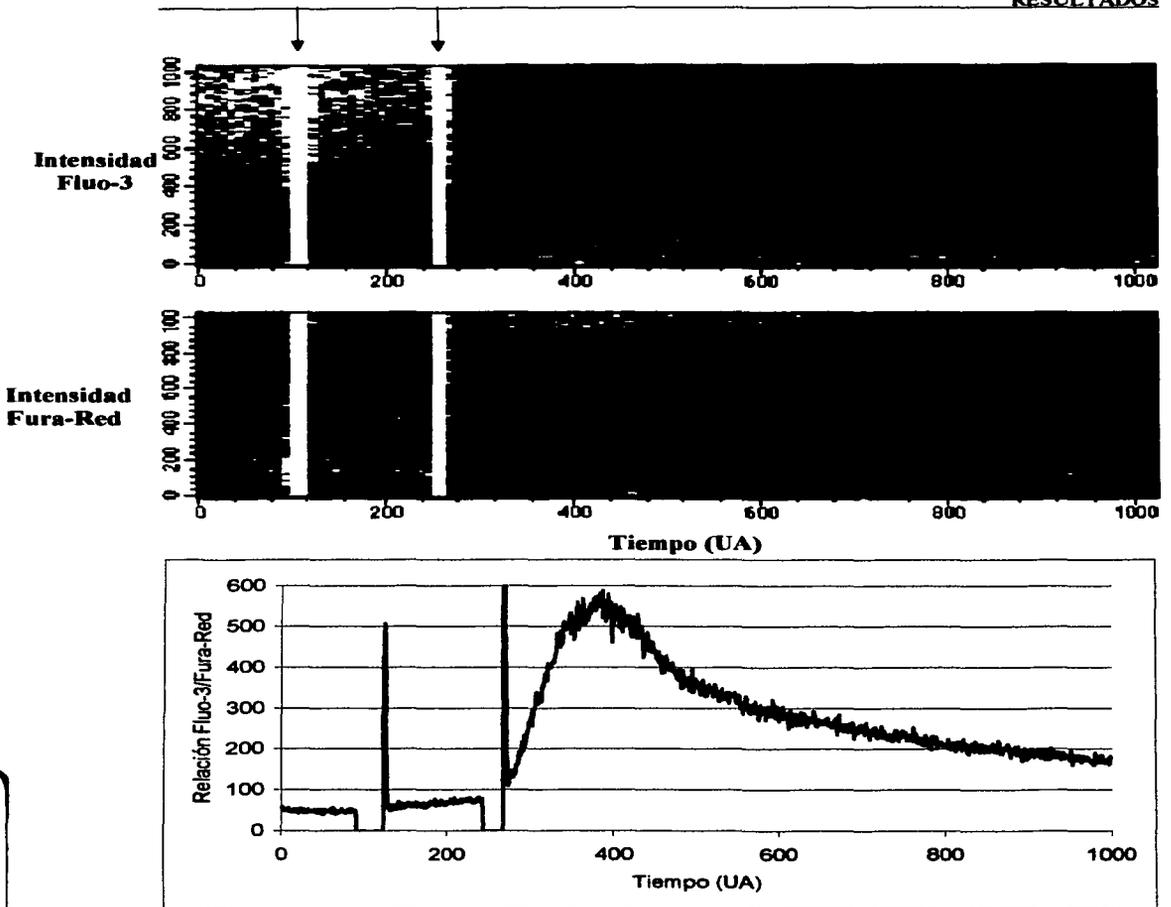
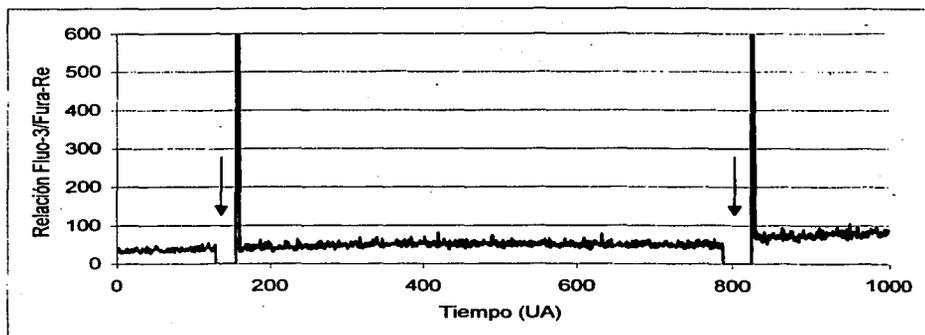


Figura 5.7: Movilización de Calcio en respuesta al entrecruzamiento CD3-CD4. Los anticuerpos biotinilados Anti-CD3 y Anti-CD4 se añadieron en el punto indicado por la primera flecha. En el punto marcado por la segunda flecha se añadió la estreptavidina, que provocó el entrecruzamiento de los anticuerpos. La respuesta en la movilización de calcio es rápida y después de alcanzar un máximo, la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye lentamente.

1



2

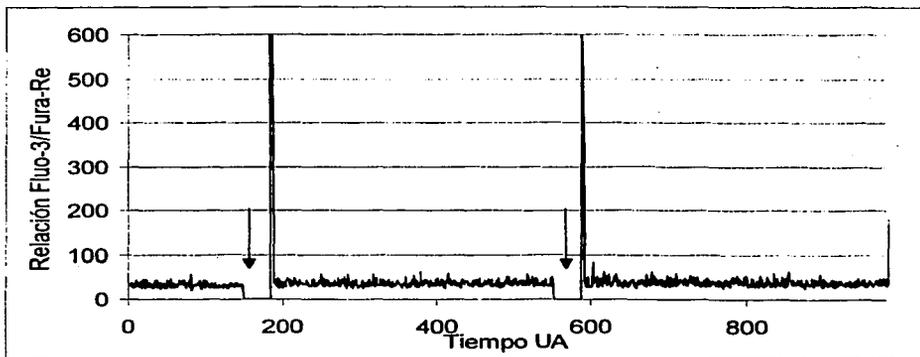


Figura 5.8: Movilización de calcio en respuesta a SDF-1 α (1) y TECK (2) en timocitos Jak3 +/+. En el momento señalado por la primera flecha se añadió la quimiocina probada para tener una concentración final de 25nM, y en el momento señalado por la segunda flecha se añadió una segunda dosis para tener una concentración final de 50nm. No se observan movilizaciones de calcio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5 FOSFORILACIÓN DE JAK3 EN RESPUESTA A QUIMIOCINAS

Para examinar el nivel de activación de Jak3 por las quimiocinas se realizaron experimentos con el fin de detectar la fosforilación de Jak3, dato que correlaciona con el nivel de activación de esta cinasa.

Inicialmente se realizaron experimentos para observar el patrón de fosforilación de proteínas en respuesta a estimulación con quimiocinas. Como se muestra en la figura 5.9, ciertas proteínas alcanzan un mayor nivel de fosforilación en respuesta a la estimulación de timocitos con TECK con respecto a las proteínas de timocitos sin estimular. Algunas de estas proteínas también aparecen fosforiladas en respuesta a la estimulación por entrecruzamiento de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 (figura 5.9).

Para examinar el estado de fosforilación de Jak3, se decidió purificar por inmunoprecipitación. Se comprobó en primer lugar que el anticuerpo policlonal obtenido comercialmente (Anti-Jak3, N-15, Santa Cruz) inmunoprecipitara específicamente a Jak3 (fig 5.10). La banda detectada con ese anticuerpo no fue detectada cuando se utilizó únicamente proteína G ni cuando se utilizó suero normal de ratón en conjunto con la proteína G para inmunoprecipitar. Por medio de una regresión logarítmica se calculó el peso aproximado de la banda detectada, el cual se encontraba siempre en el rango de 110 a 120 kDa (un resultado representativo se muestra en la gráfica 5.1), acorde al peso esperado de Jak3 (116 kDa).

Se realizaron experimentos preliminares para tratar de detectar la fosforilación de Jak3 en respuesta a quimiocinas, mostrados en la figura 5.11. Estos experimentos preliminares muestran a la cinasa Jak3 fosforilada en tirosina, aunque no fue posible discernir si el nivel de fosforilación resultaba mayor a la fosforilación basal de esta cinasa.

Con el fin de estandarizar la técnica de inmunoprecipitación de Jak3, se realizaron experimentos utilizando distintos números de células a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo inmunoprecipitante (determinada experimentalmente, datos no mostrados). Se observó que la cantidad de proteína precipitada era dependiente de la cantidad de células utilizadas por experimento (hasta 6×10^7 células por lisado), por lo que se decidió utilizar 30×10^6 células por lisado, número además compatible con el número de timocitos extraídos por timo de ratón ($< 10 \times 10^7$ células).

Una vez definidas las condiciones de inmunoprecipitación, se buscó un estímulo que indujera la fosforilación de Jak3. Ya que se ha reportado que Jak3 se fosforila en respuesta a la estimulación con IL-7 [47] se decidió utilizar dicha citocina (IL-7 recombinante, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). En la figura 5.12 se muestra el resultado de un experimento representativo de fosforilación de Jak3 en respuesta a IL-7. Para comprobar que la intensidad de la banda se debe a un aumento en la fosforilación de la proteína y no a una mayor cantidad de proteína inmunoprecipitada, se detectó la intensidad de la banda debida a Jak3 total limpiando la membrana y repitiendo la inmunodetección pero empleando esta vez un anticuerpo anti-Jak3. Como se muestra en la gráfica incluida en la figura 5.12, la fosforilación de Jak3 debida a IL-7 es notablemente mayor a la fosforilación basal de Jak3

Una vez definido el control positivo se realizaron los experimentos para detectar la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con SDF-1 α y TECK. Se probaron diversas concentraciones de quimiocinas a diversos tiempos de estimulación. Las concentraciones escogidas se basaron en los resultados obtenidos en los ensayos de quimiotaxis. Resultados representativos de estos experimentos se muestran en la figura 5.13 y 5.14. Tanto la figura 5.13A y 5.14A son ejemplos donde puede observarse un incremento en la fosforilación de Jak3 con respecto al nivel basal al estimular los timocitos con SDF-1 α y TECK. En otros experimentos (ejemplificados por las figuras 5.13B y 5.14B) no se detectaron diferencias en el nivel de fosforilación con respecto al nivel basal. Cabe mencionar que resultados recientes en el grupo de trabajo han reproducido el incremento en la fosforilación de Jak3 en respuesta a quimiocinas. En estos experimentos se observa Jak3 fosforilado a niveles bajos, aunque mayores que la fosforilación basal de Jak3

Las bandas debidas a Jak3 se observaban débiles de manera consistente, por lo que se intentó determinar la eficiencia de la inmunoprecipitación para verificar la cantidad de proteína precipitada. Para lograr esto se corrieron en un gel de acrilamida alícuotas de lisados celulares totales, de los sobrenadantes obtenidos después de inmunoprecipitar, y en algunos casos, de los inmunoprecipitados. En la figura 5.15 se muestra el resultado de uno de los experimentos realizados. La intensidad de las bandas se corrigió de acuerdo al factor de dilución para tratar de normalizar la intensidad respecto a la intensidad hallada en el lisado total. El resultado se resume en la gráfica 5.2.

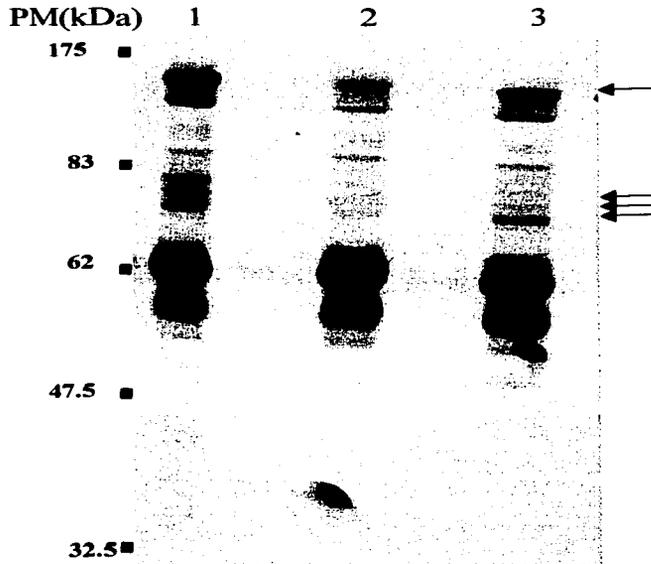


Figura 5.9: Patrón de fosforilación de proteínas totales extraídas de 2×10^7 timocitos en respuesta a la estimulación con TECK. Carril 1: timocitos estimulados por medio del entrecruzamiento por estreptavidina (Pierce) de anticuerpos anti-CD3 (2C11, Pharmingen) y anti-CD4 (L3T4, Pharmingen) acoplados a biotina; este experimento se realizó como control positivo de fosforilación. Carril 2: timocitos tratados con medio; experimento realizado para conocer el nivel basal de fosforilación de las proteínas. Carril 3: timocitos estimulados con 1000 ng/ml TECK por 5 minutos. Las flechas indican proteínas con incremento en la fosforilación con respecto al control negativo al estimular los timocitos con TECK.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FIGURA 5.10: Especificidad del anticuerpo anti-Jak3 (N-15, Santa Cruz). Carril 1: Inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo anti-Jak3 N-15. Carril 2: Inmunoprecipitación adicionando únicamente la proteína G-agarosa sin utilizar anticuerpo. Carril 3: Inmunoprecipitación con suero normal de ratón y proteína G-agarosa.

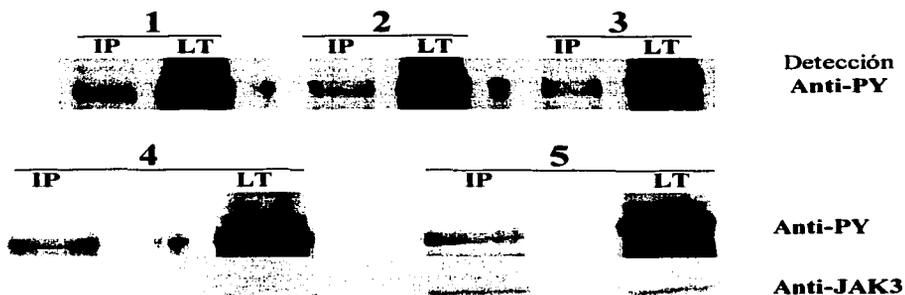
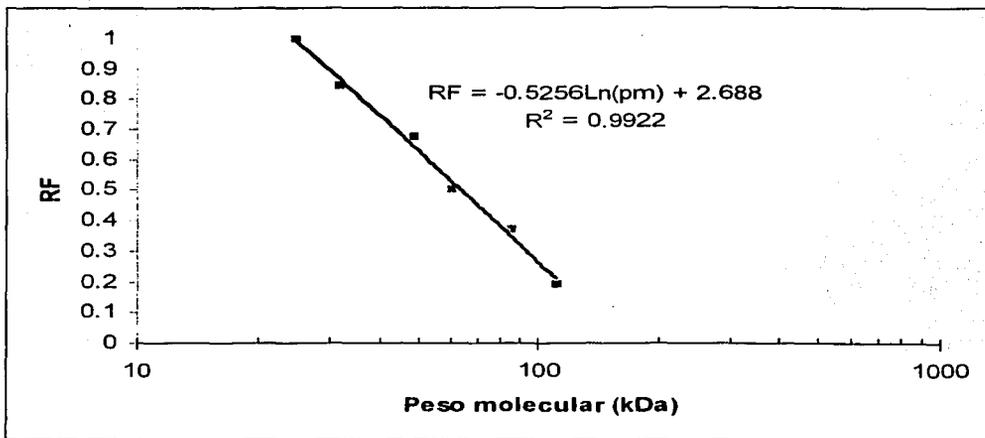


Figura 5.11: Fosforilación de Jak3 después de estimular timocitos con quimiocinas. Se corrieron en el mismo gel tanto lisados totales (LT) como inmunoprecipitados (IP) con anti-Jak3 (N-15). Carril 1: Estimulación por entrecruzamiento de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 biotinilados. Carril 2: Estimulación con SDF-1 100 nM por 30 segundos. Carril 3: Estimulación con SDF-1 100 nM por 5 minutos. Carril 4: Estimulación con TECK 100 nM por 30 segundos. Carril 5: Estimulación con TECK 100 por 5 minutos. Por razones técnicas no se observa la banda debida a Jak3 en el carril 4 después de lavar la membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5.1: Determinación del peso molecular de la banda observada en los carriles donde el lisado celular se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-Jak3 (N-15, Santa Cruz). Esta banda se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-Jak3 (888, Berg). El RF corresponde a la razón: Distancia recorrida por la banda examinada/ Distancia recorrida por la banda de menor peso molecular. El estándar de pesos moleculares utilizado es "*Prestained Protein Marker, Broad Range*" (6-175 kDa) (New England Biolabs) con un rango útil de pesos a las condiciones empleadas para la electroforesis (SDS-PAGE con concentración de acrilamida:bisacrilamida 8%) de 32.5 a 175 kDa.

RECIBIDO EN
LABORATORIO DE
INMUNOPRECIPITACIÓN

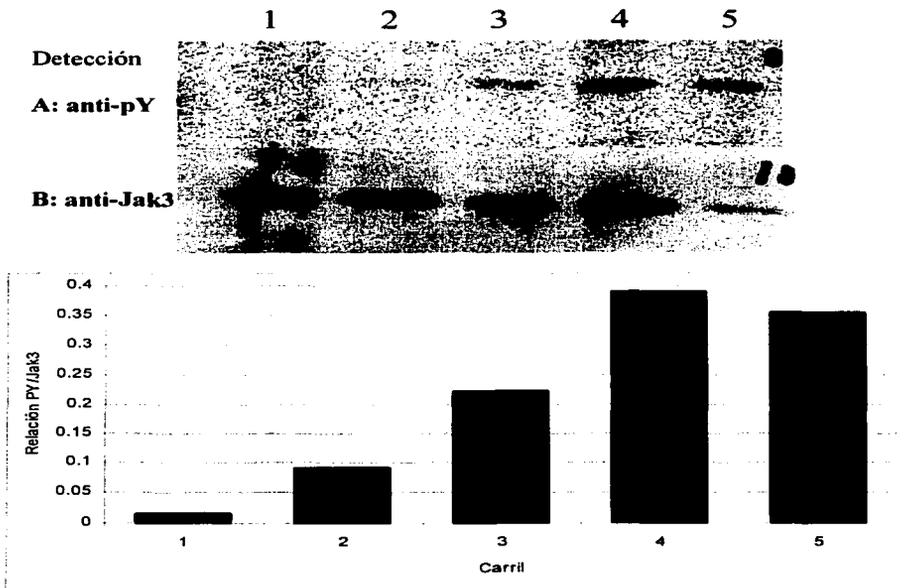


Figura 5.12: Cinética de fosforilación de Jak3 en respuesta a la estimulación por IL-7 (50 ng/ml) a 37°C. Se grafica la razón de la intensidad de la banda debida a Jak3 fosforilado en tirosina entre la debida a Jak3 total. Carril 1: Control negativo; los timocitos se trataron con medio por 1 minuto a 37°C. Carril 2: Estimulación con IL-7 por 1 minuto. Carril 3: Estimulación con IL-7 por 3 minutos. Carril 4: Estimulación con IL-7 por 8 minutos. Carril 5: Estimulación con IL-7 por 15 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

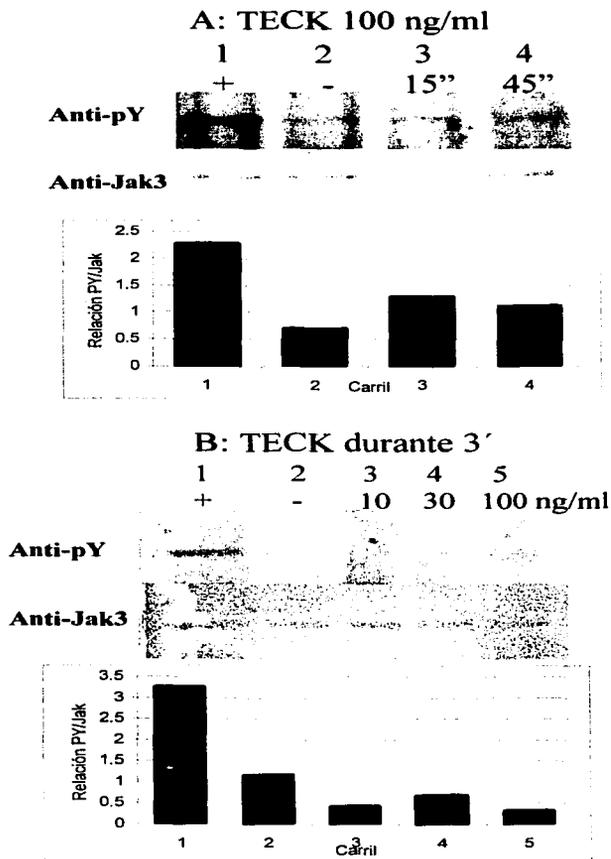


Figura 5.13: Medición de la fosforilación de Jak3 en respuesta a quimiocinas. **A:** Estimulación con TECK a concentración constante de 100 ng/ml. Carril 1: Control positivo (IL-7, 5' a 37°C). Carril 2: Control negativo (medio, 5' a 37°C). Carril 3: Estimulación con TECK por 15 segundos (a 37°C). Carril 4: Estimulación con TECK por 45 segundos. **B:** Estimulación con TECK por 3 minutos. Carril 1: Control positivo. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Estimulación con TECK a 10 ng/ml. Carril 4: Estimulación con TECK a 30 ng/ml. Carril 5: Estimulación con TECK a 100 ng/ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

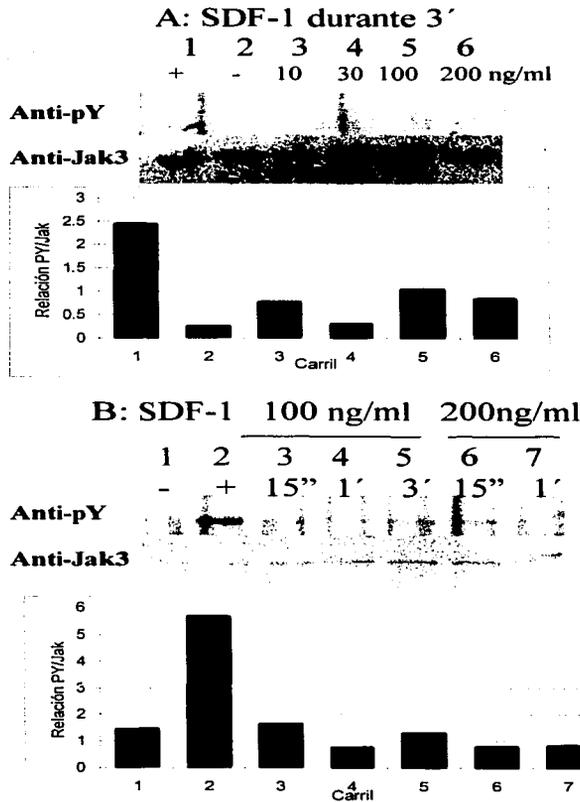
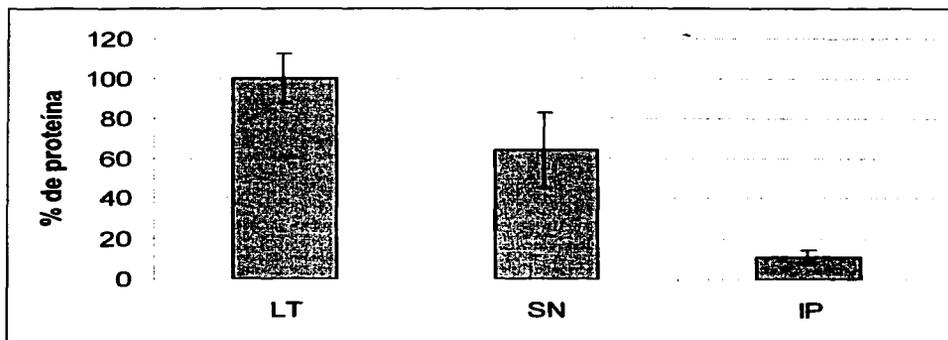


Figura 5.14: Medición de la fosforilación de Jak3 en respuesta a quimiocinas. **A:** Estimulación con SDF-1 por 3 minutos. Carril 1: Control positivo. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Estimulación con SDF-1 a 10 ng/ml. Carril 4: Estimulación con SDF-1 a 30 ng/ml. Carril 5: Estimulación con SDF-1 a 100 ng/ml. Carril 6: Estimulación con SDF-1 a 300 ng/ml. **B:** Estimulación con SDF-1. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Control positivo. Carril 3: Estimulación con SDF-1 a 100 ng/ml por 15 segundos. Carril 4: Estimulación con SDF-1 a 100 ng/ml por 1 minuto. Carril 5: Estimulación con SDF-1 a 100 ng/ml por 3 minutos. Carril 6: Estimulación con SDF-1 a 200 ng/ml por 15 segundos. Carril 7: Estimulación con SDF-1 a 200 ng/ml por 1 minuto.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Figura 5.15: Determinación de Jak3 no inmunoprecipitado. Los carriles marcados como LT representan una alícuota del lisado total celular y los carriles marcados como SN representan una alícuota del lisado después de inmunoprecipitar Jak3



Gráfica 5.2: Eficiencia de la inmunoprecipitación. La intensidad de las bandas se normalizó de acuerdo al total encontrado en los lisados celulares totales. LT: Lisados totales. SN: Sobrenadantes después de inmunoprecipitar Jak3. IP: Inmunoprecipitados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.6 EXPRESIÓN DE mRNA DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS EN RATONES Jak3 -/-.

Una de las explicaciones posibles a la deficiente respuesta quimiotáctica detectada en los timocitos de ratones Jak3, es que los receptores de quimiocinas no se expresan o se expresan de manera anormal por la ausencia de señales debidas a la IL-7.

En el grupo de trabajo con anterioridad se había detectado la presencia de RNA mensajero para los receptores de quimiocinas tanto en ratones Jak3 +/- como en ratones Jak3 -/- (figura 5.17). La detección se realizó por RT-PCR utilizando cDNA obtenido a partir de timocitos totales como se describe en la sección de métodos. Por PCR se amplificó el cDNA utilizando oligonucleótidos específicos para los receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9 y CXCR4; como se muestra en la figura 5.17, todos los mensajeros para receptores de quimiocinas detectados en el cDNA obtenido de timocitos Jak3 +/- también fueron detectados en cDNA extraído de timocitos Jak3 -/-. Esto demuestra que la falta de señales mediadas por citocinas con receptores que contienen γ c no induce la total inhibición de la transcripción de los genes de estos receptores.

Dado que no se encontraron diferencias cualitativas en la expresión de receptores de quimiocinas, se intentó una aproximación cuantitativa para investigar si existen diferencias a nivel de cantidad de mensajero de cada receptor. La metodología escogida fue RT-PCR semicuantitativa, en la cual se coamplifica junto al mensajero de interés un fragmento de mensajero de un gen expresado de manera constitutiva y cuyo nivel de expresión se supone que es constante en un mismo tipo celular independientemente de su genotipo. La cantidad del mensajero de interés amplificado se normaliza de acuerdo a la cantidad de mensajero constitutivo amplificado, que actúa como un control interno. El gen escogido para los ensayos realizados fue el gen de la hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT), expresado de manera moderada en células de mamíferos en comparación con otros genes constitutivos [36]. En cuanto a los receptores, nos enfocamos a investigar el nivel de expresión del mRNA de tres de ellos: CCR7 (receptor específico de SLC y ELC), CCR9 (TECK) y CXCR4 (SDF-1). Estos receptores están implicados en el desarrollo y reclutamiento de timocitos y progenitores de médula ósea, así como en el *homing* de linfocitos T recién emigrados del timo hacia órganos linfoides secundarios.

Los oligonucleótidos “HPRT 1” (que amplifican un fragmento de 351 pb) se utilizaron en conjunto con los oligonucleótidos para CXCR4 y CCR9 (que amplifican fragmentos de 267 y 414 pb, respectivamente) Para la reacción de amplificación de CCR7, que genera fragmentos de 344 pb se utilizaron oligonucleótidos “HPRT 2” que generan un fragmento de aproximadamente 200 pb.

Se emplearon condiciones que permitieran que ambos mensajeros pudieran ser amplificados en una misma reacción. Éstas se determinaron empíricamente, tomando como base las condiciones iniciales de las reacciones de amplificación de cada fragmento de mensajero de receptor. Las condiciones modificadas fueron la concentración de Mg^{2+} , la relación entre los oligonucleótidos para receptores y los oligonucleótidos para HPRT, y la temperatura y tiempo de los pasos de cada ciclo en la reacción de PCR. En el anexo III se resumen las condiciones determinadas como las más adecuadas para lograr la coamplificación de ambos fragmentos. Es importante mencionar que en esta primera aproximación se mantuvo constante el número de ciclos de la reacción de PCR en 35 ciclos, y los experimentos se realizaron con cDNA extraído de timocitos de un ratón Jak3 +/-.

Una vez que se definieron condiciones adecuadas para realizar la coamplificación, se empleó cDNA obtenido a partir de mRNAs de timocitos Jak3 -/-. Dada la baja celularidad de los timos de ratones Jak3 -/-, para obtener la cantidad mínima necesaria de RNA se mezclaron los timos de 5 ratones de edades de 12 a 17 semanas. El RNA control se obtuvo de un solo ratón Jak3 +/- de 16 semanas. Con este cDNA se llevaron a cabo los estudios de cinética de síntesis de los productos de la PCR. Estos estudios se realizan por que la relación calculada como cantidad de receptor/cantidad de HPRT solo es constante en la fase de síntesis exponencial de la PCR. Como se puede ver en la gráfica 5.3, el crecimiento es exponencial por unos ciclos antes de alcanzar un máximo que se mantiene constante, debido probablemente a que se consume en su totalidad alguno de los reactivos empleados. Es importante conseguir en la electroforesis bandas con una intensidad suficiente como para realizar mediciones reproducibles, por lo que de acuerdo a las cinéticas obtenidas se escogió el mayor ciclo aun dentro de la fase de síntesis exponencial. Finalmente se realizaron amplificaciones por triplicado en el ciclo escogido a las condiciones definidas con el cDNA obtenido de timocitos Jak3 +/- y con el cDNA de timocitos Jak3 -/-. (Figura 5.18). Se muestra una gráfica representativa de los resultados

obtenidos empleando los tres pares de oligonucleótidos (gráfica 5.4). Como se muestra en esta gráfica, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de CCR7 entre los timocitos Jak3 +/- y los timocitos Jak3 -/-. Siendo estos últimos los que expresan mayores niveles de CCR7 al normalizar con HPRT. En la gráfica también se muestra que hay una diferencia significativa en los niveles de CCR9, pero esta diferencia no resultó reproducible, incluso en ciertos experimentos la relación fue inversa, con una mayor expresión de CCR9 por parte de los timocitos Jak3 -/-. En general, las diferencias en la expresión de CXCR4 no resultaron significativas.

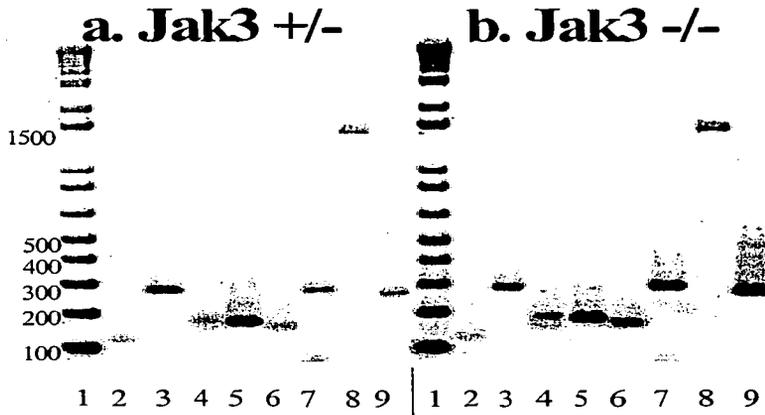
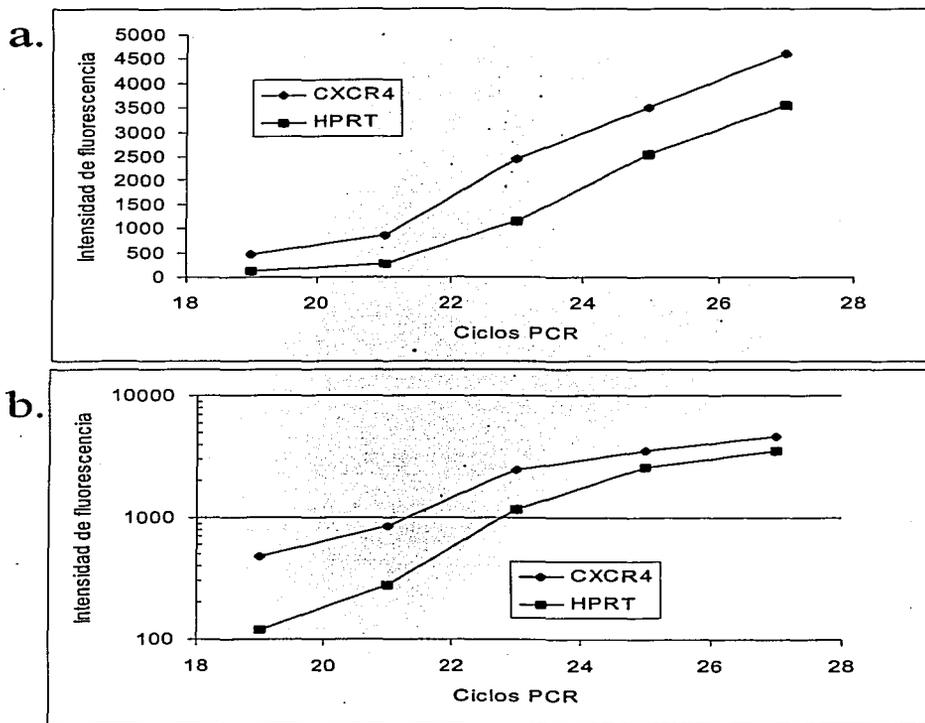


Figura 5.17: Comparación de la expresión de receptores de quimiocinas en timocitos Jak3 +/- y Jak3 -/-. El cDNA extraído de ambas poblaciones de timocitos fue sujeto a amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para CCR1 (carril 2), CCR2 (3), CCR3 (4), CCR4 (5), CCR5 (6), CCR7 (7), CCR9 (8) y CXCR4 (9). Carril 1: marcador de pesos 100 bp (Gibco). Se muestran resultados obtenidos previamente en el mismo grupo de trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Gráfica 5.3: Cinética de síntesis de fragmentos amplificados por PCR. A: Gráfica en escala lineal del aumento en la intensidad de la banda debido al fragmento amplificado teñido con bromuro de etidio con respecto al ciclo de PCR en que se detuvo la reacción. B: Gráfica del mismo experimento en escala logarítmica, empleada para detectar la zona de síntesis exponencial. En el experimento mostrado, el crecimiento exponencial se da hasta el ciclo 23, tras el cual la velocidad de síntesis disminuye, probablemente debido a una disminución en la cantidad de reactivos.

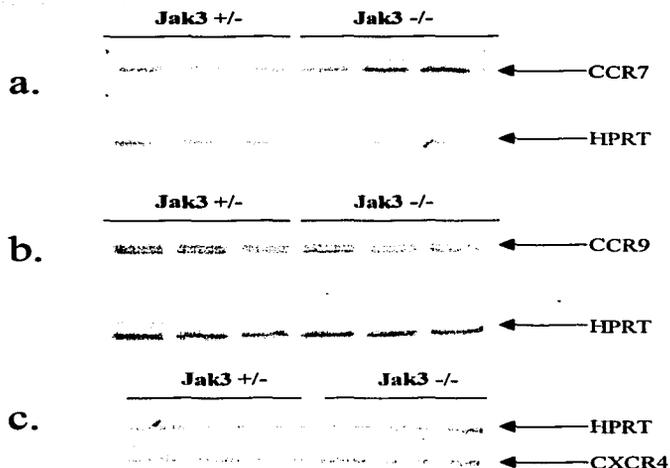
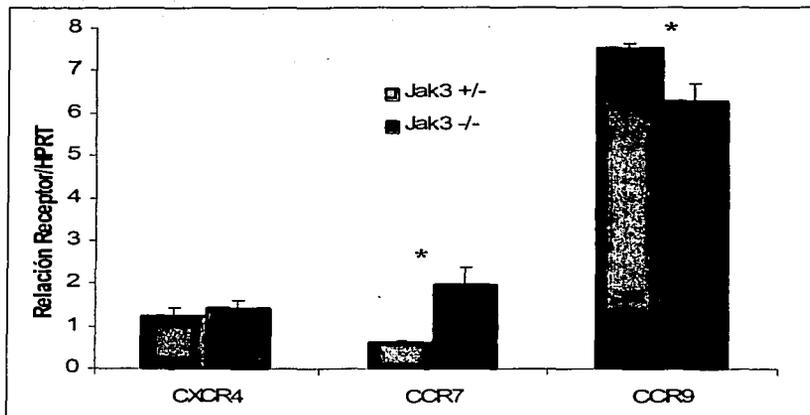


Figura 5.18: Comparación de la cantidad de fragmentos del mensajero de receptores de quimiocinas entre timocitos Jak3 +/- y timocitos Jak3 -/-. Los fragmentos para HPRT y los receptores se amplificaron en el mismo tubo de reacción de PCR, y las muestras obtenidas de timocitos Jak3 +/- se amplificaron al mismo tiempo que las de timocitos Jak3 -/-, empleando la misma mezcla de reactivos. A: Comparación de fragmentos generados empleando oligonucleótidos específicos para CCR7 y HPRT. B: Comparación de fragmentos generados empleando oligonucleótidos específicos para CCR9 y HPRT. C: Comparación de fragmentos generados empleando oligonucleótidos específicos para CXCR4 y HPRT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5.4 Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de los receptores CXCR4, CCR7 y CCR9. Se grafica el promedio \pm D.E. de la relación de intensidad de la banda del receptor entre la intensidad de la banda de HPRT de triplicados obtenidos en un solo experimento. *: Se detectaron diferencias significativas en la relación receptor/HPRT entre los timocitos Jak3 +/- y Jak3 -/-, $p < 0.01$. Las diferencias detectadas en el experimento mostrado empleando oligonucleótidos específicos para CCR7 se reprodujeron en todos los experimentos realizados ($n=4$), no así las detectadas para CCR9 en el experimento que se muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6 DISCUSIÓN

De manera paralela a su maduración, los timocitos se mueven a través de diversos micro ambientes dentro del timo, donde reciben las señales necesarias para sobrevivir, proliferar y diferenciarse, sufriendo distintos cambios fenotípicos durante el proceso. El movimiento de los timocitos es regulado por sus interacciones con las células del estroma tímico por medio de moléculas de adhesión y factores solubles, entre los cuales sobresalen las quimiocinas, pues se ha implicado experimentalmente a diversos miembros de esta familia como responsables, al menos en parte, de los movimientos ordenados de los timocitos en distintos estados de maduración dentro del timo [116]. Por otra parte, Jak3 es una cinasa expresada casi exclusivamente en células del sistema inmune, y su ausencia provoca serias deficiencias en el desarrollo de células del linaje linfoide. En particular, el desarrollo de los timocitos parece estar afectado por que la celularidad en el timo disminuye considerablemente, aunque existe evidencia que indica que el defecto no se da en procesos de maduración.

Puesto que se demostró el papel de las quimiocinas en el timo, nuestro grupo postuló que la vía Jak/STAT podría estar implicada en la respuesta a quimiocinas en el timo. La alteración de esta vía puede participar en el fenotipo observado en los ratones deficientes en Jak3. Corroborando esta hipótesis, se ha reportado recientemente el papel de Jak3 en la transducción de señales mediadas por receptores de quimiocinas (revisado en [71]) en diversas líneas celulares. Para probar nuestra hipótesis se realizaron estudios de quimiotaxis para investigar la capacidad de respuesta migratoria de timocitos obtenidos de ratones Jak3 -/-.

En primer lugar se examinó el fenotipo de los ratones Jak3 -/-. Se observó que los timos extraídos de ratones Jak3 -/- eran de un tamaño notablemente menor que los timos extraídos de ratones heterocigotos o normales (Fig. 5.2). Consecuentemente, el número de timocitos extraídos de timos Jak3 -/- era apreciablemente menor que cuando se trataba de timos Jak3 +/- o +/+. Los porcentajes de timocitos en las cuatro principales subpoblaciones (DN, DP, SP CD4⁺ y SP CD8⁺) resultaron muy parecidos a los obtenidos en ratones heterocigotos. Este resultado es consecuente con lo reportado previamente ([7] y [8]). Se observaron diferencias que no resultaron significativas ($P \leq 0.01$) en el porcentaje de

timocitos SP CD4⁺ Jak3^{-/-} (Tabla 5.1), aunque el aparente aumento en timocitos SP CD4⁺ probablemente sea un artefacto; se requiere realizar más experimentos para definir si se trata de un artefacto, aunque se ha reportado que la diferenciación de los timocitos aparentemente se lleva a cabo de manera normal en ausencia de Jak3, de acuerdo al análisis de las subpoblaciones según la expresión de los correceptores CD4 y CD8. Dado que el fenotipo de los ratones Jak3^{-/-} se observa en timos de ratones γc ^{-/-}, IL-7^{-/-} o IL-7R α ^{-/-}, es probable que el fenotipo se deba al menos en parte a la incapacidad de los timocitos de responder a IL-7, citocina envuelta en procesos de expansión, diferenciación y/o sobrevivencia [8]. Sin embargo, la caracterización detallada de los timocitos durante la etapa fetal demostró que existía un claro retraso en la generación de las subpoblaciones T1, T2, T3 y T4 de DN. En el día 14 de gestación el número total de timocitos Jak3^{-/-} se encontraba disminuido 1/100 respecto a los timocitos fetales del ratón silvestre. Puesto que el estadio más inmaduro (T1) no se encuentra en activa replicación, se argumentó que la reducción del número de timocitos no podría explicarse solamente por una ausencia de respuesta a IL-7, sino que podrían haber defectos en el reclutamiento de progenitores del hígado fetal hasta el timo [7]. Así mismo se observó un retraso de un día en la generación de los estadios T2 y T3 en los días 15 y 16 de gestación [8].

Los resultados descritos en el presente trabajo aportan nueva evidencia de que, además de los efectos debidos a la ausencia de señalización por IL-7, los timocitos Jak3^{-/-} podrían tener defectos adicionales, entre los cuales destaca la respuesta migratoria en respuesta a quimiocinas tímicas. En el presente trabajo se encontró que los timocitos de ratones Jak3^{-/-} presentaron deficiencias en la respuesta quimiotáctica frente a SDF-1 α y TECK, quimiocinas expresadas de manera importante en el timo. Algunos grupos de trabajo consideran que estas quimiocinas pueden tener un papel importante en la llegada de progenitores al timo [120;98], aunque experimentos con ratones deficientes en las quimiocinas mencionadas sugieren que existen otros factores implicados [122;130] porque a pesar de la ausencia de las quimiocinas, la llegada y el desarrollo de los timocitos no presenta defectos severos.

Es posible que estas quimiocinas cumplan papeles redundantes con otras quimiocinas, por lo que la ausencia de una no provocaría un efecto fácilmente detectable. Sin embargo, si diversos receptores de quimiocinas comparten vías de señalización, la

inhibición de una de estas vías afectaría la señalización mediada por varias quimiocinas, produciendo defectos importantes en el reclutamiento de los progenitores o la subsiguiente migración de los timocitos en desarrollo. La ausencia de Jak3 podría afectar la señalización mediada por varias quimiocinas, entre ellas las estudiadas en el presente trabajo, SDF-1 α y TECK; y según resultados preliminares, de MCP-1 (Soldevila et al, en preparación). La deficiencia en Jak3 podría en conjunto modificar de manera importante la migración de los timocitos y afectar su capacidad para encontrar los microambientes adecuados para el estadio de maduración en que se encuentren. Si los timocitos no se encuentran en el microambiente adecuado, es de suponer que habrá una disminución en su supervivencia, lo cual junto a la ausencia de señales de supervivencia de IL-7 explicaría la baja celularidad del timo. Es posible, sin embargo, que un miembro de la familia Jak pueda ser sustituido por otro miembro de la misma familia, por lo que resultaría importante realizar los experimentos con un ratón deficiente en más de un miembro de la familia Jak. De manera interesante los ratones Jak 1 -/- presenta una disminución en el número total de timocitos (M. Meraz, comunicación personal), aunque en este ratón no se estudió en detalle otras posibles deficiencias funcionales de los timocitos.

En experimentos preliminares se encontró que los timocitos Jak3 -/- sí eran capaces de migrar en respuesta a SDF-1 y TECK, pero a concentraciones más altas que las requeridas por timocitos Jak3 +/-; además, el número máximo de células Jak3-/- que migraban resultaba significativamente menor al número máximo de células Jak3+/- que migraban en la concentración de máxima respuesta. Sin embargo en el presente trabajo la respuesta de los timocitos Jak3-/- frente al gradiente de quimiocinas fue nula. Esta diferencia puede deberse al manejo experimental: quizá los timocitos Jak3 -/- empleados en el presente trabajo resultaron menos sensibles a las quimiocinas, o menos aptos para llevar a cabo la quimiotaxis que los empleados en los experimentos preliminares. También es posible que la concentración máxima de quimiocina empleada en los experimentos presentados no fuera suficiente para evocar la respuesta quimiotáctica. Es importante aclarar que los timocitos Jak3 +/-, tanto en los experimentos preliminares como en el presente trabajo tuvieron un máximo de migración a concentraciones parecidas.

Como se ha descrito anteriormente, una de las posibles causas de la hipoplasia tímica observada en los ratones Jak3 -/- es una deficiencia en el reclutamiento de células

progenitoras al el timo. Para investigar el papel de Jak3 en este proceso, se realizó el análisis de la respuesta quimiotáctica de células totales de la médula ósea contra quimiocinas que han sido implicadas en el reclutamiento al timo (Teck y SDF-1). En algunos experimentos se observa una diferencia significativa entre la migración de los timocitos Jak3 +/- y los timocitos Jak3 -/-. Dado que hay una gran diversidad de células en la médula ósea (progenitores mieloides, eritroides y linfoides en distintos estadios de maduración, así como células nana o "nurse", linfocitos B en desarrollo, macrófagos, etc.) resulta difícil concluir si existe una diferencia en la respuesta migratoria por parte de los progenitores linfoides, cuyo porcentaje es menor al 1% de la población total de células de la médula ósea [96]. Por lo tanto resulta necesaria la purificación de las subpoblaciones de progenitores linfoides mediante la utilización de marcadores específicos (Lin -, Sca, cKit, etc), para analizar posteriormente su respuesta hacia quimiocinas.

Como ya se ha mencionado, en ratones deficientes para IL-7 o para miembros del receptor de esta citocina se observan fenotipos similares al del ratón Jak3-/- [82;117]. En estos casos se postuló que la hipoplasia tímica se debía a la ausencia de señales de proliferación y supervivencia necesarias para los timocitos DN mas inmaduros. Para diferenciar los efectos debidos a la ausencia de estas señales de los efectos en la migración, resultaría importante realizar experimentos de quimiotaxis con timocitos γ c -/- en los que Jak3 no se ve afectado pero si existe la ausencia de señales mediadas por IL-7. A este respecto cabe mencionar que como alternativa se han realizado experimentos preliminares en nuestro grupo de trabajo, en los que se emplean timocitos Jak3 +/+ incubados con un inhibidor específico de Jak3, y la migración parece estar disminuida con respecto a los controles sin inhibidor, lo cual corrobora el papel de Jak3 en la respuesta quimiotáctica de los timocitos (García et al, en preparación).

Se supone que un evento "río abajo" de Jak3 en las vías de señalización activadas por las quimiocinas es la movilización de calcio intracelular. Como otra aproximación experimental para detectar la participación de Jak3 en la transducción de señales mediadas por quimiocinas se intentó determinar si existían diferencias en la movilización de calcio inducida por quimiocinas en timocitos Jak3 -/- con respecto a un control de timocitos Jak3 +/- . Se comprobó que el sistema empleado era capaz de detectar movilización de calcio intracelular al estimular a los timocitos por medio de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4

entrecruzados, y al emplear como control positivo el ionóforo ionomicina. Sin embargo, a pesar de que existen reportes de movilización de calcio en respuesta a quimiocinas en timocitos (como Eotaxina [38], y MIP-1 β [24]), no fue posible detectar ninguna respuesta en los experimentos, realizados todos con timocitos Jak3 +/+. En los reportes mencionados la respuesta de movilización de calcio es muy débil y es detectada empleando un fluorímetro, por lo que es posible que el método de detección empleado en el presente trabajo (citometría) no haya sido lo suficientemente sensible como para detectar la respuesta, por lo que sería conveniente repetir los experimentos empleando una metodología más sensible. Por otro lado, se ha demostrado que la respuesta a las quimiocinas varía según el estadio de maduración de los timocitos ya que existe una expresión diferencial de receptores de quimiocinas en los distintos estadios. Teniendo eso en consideración, convendría separar subpoblaciones de timocitos, para realizar los experimentos de movilización de calcio en poblaciones relativamente puras pues es posible que se haya dado un apantallamiento de la movilización de calcio en una subpoblación si la mayoría de los timocitos no respondieron. Por otra parte existe un reporte en el que tampoco fue posible detectar movilización de calcio en timocitos en respuesta a SDF-1 α ni ELC [57]; los autores ponen en duda que la movilización de calcio se dé como requisito necesario para la respuesta quimiotáctica, por lo que también es posible que en realidad las quimiocinas empleadas no provoquen movilización de calcio. En cualquier caso, dada la imposibilidad para detectar el resultado esperado en el control positivo (timocitos Jak3 +/-), no se realizaron estos experimentos empleando timocitos Jak3 -/-.

Una vez que se comprobó que la respuesta quimiotáctica de los timocitos estaba disminuida en ratones Jak3 -/-, se investigó si Jak3 se encontraba dentro de las vías de señalización activadas por las quimiocinas. Se ha demostrado que los estímulos capaces de activar a Jak3 inducen una fosforilación en tirosina de esta proteína, evento necesario para que Jak3 adquiera su actividad máxima de cinasa y sea capaz a su vez de fosforilar otras proteínas "río abajo" [50;63]; por lo tanto es de esperarse que si Jak3 es activado por las quimiocinas, se detecte su fosforilación en tirosina.

Al estimular timocitos con TECK, se observó un aumento en el nivel de fosforilación de proteínas totales con respecto a timocitos tratados con medio. Dado que puede haber proteínas que migren muy cerca de Jak3 al someter un lisado de timocitos a

SDS-PAGE, se decidió aislar esta proteína por medio de una inmunoprecipitación. Una vez que se logró aislar, se investigó la capacidad de detectar su estado de fosforilación, empleando un control positivo capaz de fosforilar Jak3. Se escogió la IL-7, cuyo receptor está constituido por la cadena γ_c que se asocia constitutivamente a Jak3, pues existen múltiples observaciones en que se detecta la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con esta citocina [47]. De acuerdo con los reportes previos, se detectó la fosforilación de Jak3 en respuesta a IL-7. Se probó entonces la capacidad de las quimiocinas para fosforilar Jak3. Esta fosforilación se vio claramente al estimular con TECK (100 ng/ml por 15 y 45 segundos, figura 5.14) y al estimular con SDF-1 α (3 minutos, concentraciones crecientes, figura 5.15).

En un reporte reciente [115] se detectó la fosforilación de Jak3 en células MOLT4 estimuladas durante un minuto con SDF-1 α 10nM. La fosforilación fue transitoria pues se dejó de detectar a los 5 minutos post-estimulación. No hay reportes de fosforilación de miembros de la familia de cinasas Jak por parte de TECK, aunque sí existen reportes que describen que otros miembros de la familia de quimiocinas CC (de la cual forma parte TECK) activan a cinasas Jak: MCP-1 es capaz de activar Jak2 [86] y RANTES es capaz de activar Jak1 [87], en ambos casos se empleó la línea celular HEK-293. Es posible que la fosforilación de Jak3 en respuesta a quimiocinas en timocitos recién aislados se lleve a cabo de manera muy débil y transitoria, de ahí la dificultad de detectarla. Nuestros experimentos mostraron además una fosforilación basal de Jak3 en timocitos pero fue difícil detectar incrementos en esta fosforilación en respuesta a quimiocinas.

Uno de los problemas técnicos que dificultaron la detección de la fosforilación de Jak 3 fue la baja eficiencia de inmunoprecipitación de la cinasa Jak 3 con el anticuerpo utilizado. Es posible que este hecho dificulte la detección de una fosforilación débil por parte de Jak3 en respuesta a quimiocinas. Para aumentar la sensibilidad del ensayo se busca probar un anticuerpo distinto para lograr la inmunoprecipitación.

También resultaría útil separar subpoblaciones de timocitos, pues dado que el patrón de expresión de los receptores de quimiocinas cambia con el estado de maduración, es probable que también cambie su respuesta a quimiocinas. Sin embargo, los receptores de SDF-1 α y TECK (CXCR4 y CCR9, respectivamente) tienen altos niveles de expresión en

timocitos durante el estadio de dobles positivos, que conforman la mayor parte de los timocitos, por lo que sería de esperarse que la respuesta de timocitos DP fuera detectable.

Se intentó también detectar la fosforilación de sustratos de las cinasas Jak (datos no mostrados). En particular, se investigó la fosforilación de las proteínas STAT, los sustratos más estudiados de las cinasas Jak. En ninguno de los experimentos se observó la fosforilación de estas proteínas en respuesta a los estímulos, incluido el control positivo de IL-7, por lo tanto los resultados preliminares no son concluyentes. Se ha reportado la activación de STAT1 y STAT3 en respuesta a la estimulación con las quimiocinas RANTES y MIP-1 α , que comparten el receptor CCR5 expresado en timocitos en los estadios DP y SP [121]. Estos experimentos se realizaron en células Jurkat y la activación se midió por la capacidad de las STAT de unir DNA; no se investigó su estado de fosforilación, aunque para translocarse al núcleo, las STAT deben estar fosforiladas y dimerizadas. En ese reporte se emplearon tiempos de estimulación de 15 minutos a 2 horas, aunque en otros reportes en que se investiga la fosforilación de las STAT, se observa su fosforilación en pocos minutos después de la estimulación (Revisado en [63]). Por lo tanto, es poco probable que la imposibilidad de detectar la fosforilación de STAT3 y STAT5 en respuesta a IL-7 se deba a una elección inadecuada del tiempo de estimulación. Se demostró además que la IL-7 empleada es capaz de inducir la fosforilación de Jak3, por lo que se esperaría observar la fosforilación de sus sustratos. Por lo tanto, es posible que la imposibilidad de detectar la fosforilación de STATs se deba a un artefacto en el método de detección. Existen anticuerpos que se unen específicamente a STATs fosforilados, permitiendo su detección en western blots a partir de lisados totales, sin tener que inmunoprecipitar la STAT investigada. Su uso permitirá examinar más directamente la fosforilación de STATs en respuesta a la estimulación con quimiocinas.

Una hipótesis alterna que puede explicar la deficiencia en la migración observada en los timocitos Jak3 $-/-$ es que la ausencia de esta cinasa afecte de alguna manera la regulación de la expresión de los receptores de quimiocinas. Este efecto podría deberse a la regulación de estos receptores por citocinas que empleen la vía Jak/STAT para transducir sus señales. Se ha reportado que IL-2, capaz de activar Jak3 porque su receptor emplea la cadena γ c, provoca un aumento en la expresión de CXCR4 en linfocitos T humanos [12]. También se investigó la capacidad de IL-15, cuyo receptor emplea la cadena γ c, para

inducir expresión de quimiocinas y sus receptores en linfocitos T; en ese reporte el grupo de Perera et al encontró que IL-15 induce la expresión de quimiocinas tipo CC, CXC y C, y de mRNA para receptores de quimiocinas CC pero no de mensajeros para receptores de quimiocinas CXC [81]. En un reporte más reciente [51] se emplea la citometría de flujo para investigar la expresión a nivel de superficie celular de CXCR4 en linfocitos T de memoria, y se encontró que IL-2, IL-4, IL-7 e IL-5, pero no IL-9 (interleucinas cuyo receptor emplea la cadena γ c) son capaces de aumentar la expresión en superficie de CXCR4. Se investigó también la transcripción de CXCR4 y se observó que la expresión en superficie de este receptor se correlaciona con un aumento en el mRNA del receptor, en aparente contradicción con los resultados de Perera. Estos reportes indican que IL-7 puede contarse entre las señales capaces de regular la expresión de receptores de quimiocinas, por lo que una deficiencia en las vías de señalización activadas por esta citocina pueden modificar la expresión de los receptores de quimiocinas.

Dado que al momento de realizar los experimentos no se contaba con anticuerpos específicos para receptores de quimiocinas (para medir la expresión de los receptores en la membrana celular por citometría de flujo), se decidió examinar la presencia del mensajero por medio de RT-PCR. En una primera aproximación se demostró que tanto en los timocitos Jak3 +/- como en los timocitos Jak3 -/- habían transcritos para todos los receptores probados. Resultó importante entonces intentar cuantificar el mensajero, para observar si había diferencias en el nivel de expresión de los genes de los receptores. Para esto se empleó una metodología de RT-PCR semicuantitativa en la que se comparó la eficacia de la síntesis de un fragmento del mRNA de interés (dependiente de la cantidad inicial de moléculas de mRNA por reacción) entre ratones Jak3 +/- y Jak3 -/-, empleando como control interno el mRNA de un gen de expresión constitutiva, el gen de la enzima hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT). Se escogió este gen dado que diversos estudios han demostrado que tiene una expresión moderada y relativamente constante, independiente de estímulos extracelulares [36]. Para lograr una coamplificación reproducible en la reacción de PCR se tienen que controlar muchos parámetros (revisados en Henegariu et al. [44]), entre los que cabe destacar la relación entre los pares de oligonucleótidos específicos para ambos fragmentos (receptor y HPRT), pues el exceso de un par con respecto al otro par provoca un aumento en la eficiencia de amplificación del

primero, y una disminución en la eficiencia de amplificación del segundo; la relación se debe estandarizar de forma que ambos fragmentos sean amplificados de manera equivalente en el cDNA control (Jak3 +/-). Igualmente importante es definir la cinética de amplificación de los fragmentos, pues se ha observado que el máximo de amplificación no se da al mismo tiempo en ambos fragmentos; cuando el primero de los fragmentos deja de amplificarse (probablemente porque ya es muy baja la concentración de oligonucleótidos específicos para ese fragmento), es probable que el otro continúe amplificándose por unos ciclos más, cambiando la relación entre ellos. Por lo tanto la reacción debe interrumpirse en un ciclo en el que la amplificación todavía se lleva a cabo de manera exponencial, pues durante estos ciclos la relación entre el gen de interés y el de HPRT se mantendrá constante. Así mismo se deben definir las condiciones de PCR (tiempo y temperatura de cada paso, y concentración de reactivos) para cada par de fragmentos amplificados.

De esta manera se compararon los niveles de expresión de CXCR4, CCR7 y CCR9 en timocitos. Los receptores para CXCR4 y CCR9, como se mencionó, se expresan en la mayor parte de los timocitos [76], por lo que es muy probable que tengan un papel relevante en los procesos de migración necesarios para la maduración de estas células. Los resultados preliminares obtenidos en el presente trabajo indican que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de estos receptores entre los timocitos Jak3 +/- y los timocitos Jak3 -/-. Estos resultados contrastan con los reportes recientes que demuestran que IL-7 induce la expresión de CXCR4 en linfocitos T de memoria [51] aunque es muy probable que las diferencias intrínsecas entre linfocitos T de memoria y timocitos expliquen esta discrepancia. Además se ha demostrado que la expresión del receptor CXCR4 durante la diferenciación de timocitos es relativamente estable, por lo que resultaría innecesaria la modulación de este receptor a través de IL-7 [57]. Por otro lado CCR9 se ve regulado por distintas señales, entre las que se encuentran las mediadas por el pre-TCR o el TCR, [123] y [109], por lo que también es posible que estas señales tengan un papel preponderante en la regulación de este receptor y no sea posible detectar diferencias al omitir la señal de IL-7.

El receptor CCR7 es expresado por timocitos SP, y sus ligandos, ELC y SLC, se expresan en órganos linfoides secundarios, por lo que es probable que la expresión de este receptor correlacione con la habilidad de los timocitos de salir del timo y llegar a los órganos linfoides secundarios. Se investigó su nivel de expresión en conjunto con un

proyecto en proceso que tiene el objetivo de definir las deficiencias de linfocitos T periféricos Jak3 $-/-$, pues los nódulos linfáticos de los ratones Jak3 $-/-$ tienen una celularidad muy disminuida y se piensa que es posible que esto se deba a una deficiencia en el tráfico de linfocitos T recientemente emigrados del timo. De manera interesante, se observó repetidamente una mayor cantidad de mRNA de CCR7 en timocitos Jak3 $-/-$ con respecto a timocitos Jak3 $+/-$, contrario a lo que podría esperarse si IL-7 aumentara la expresión de CCR7. Si Jak3 se encuentra en las vías de señalización activadas por CCR7, es posible que, por un mecanismo de regulación, la ausencia de señales mediadas por CCR7 indujera una mayor expresión de este receptor, aunque no se han encontrado reportes en que se mencione algo al respecto. En cualquier caso, es importante mencionar que estos resultados se obtuvieron todos de una mezcla de RNA de timocitos de 4 ratones Jak3 $-/-$, pues la eficiencia de recuperación de RNA resultó ser muy baja al emplear timocitos obtenidos a partir de un único timo Jak3 $-/-$ dada la baja celularidad del mismo. Por lo tanto es necesario repetir los experimentos en las condiciones de amplificación definidas empleando nuevo RNA de otras muestras para investigar la reproducibilidad de los resultados encontrados. Dada la gran cantidad de parámetros controlados en la realización de estos experimentos, también resultaría importante probar otros ensayos en los que se manipule menos la muestra, como el ensayo de protección de RNAsa. Está en proceso el análisis de expresión de receptores empleando PCR en tiempo real. También se ha considerado separar las subpoblaciones de timocitos, pero la cantidad limitada de timocitos Jak3 $-/-$ dificultaría la obtención de RNA en cantidades suficientes para llevar a cabo la retro-transcripción. Además, algunos autores consideran que la cantidad de mRNA de receptores de quimiocinas encontrada no necesariamente correlaciona con la expresión y actividad del receptor en la superficie, pues la célula podría tener un “pool” interno de mRNA que no se traduce a proteínas sino hasta recibir alguna señal (revisado en [71]). A este respecto, está en proceso el análisis por citometría de flujo de la cantidad de proteína expresada en superficie empleando anticuerpos disponibles comercialmente.

7 CONCLUSIONES

- Se probó que los timocitos Jak3 $-/-$ presentan una migración deficiente frente a SDF-1 α y TECK con respecto a los timocitos Jak3 $+/-$.
- Los ensayos de movilización de calcio para detectar la respuesta de timocitos hacia quimiocinas como SDF-1 α y TECK no resultaron lo suficientemente sensibles como para observar una respuesta. Alternativamente, los timocitos no responden con movilización de calcio ante las quimiocinas probadas.
- Se demostró un aumento en la fosforilación de diversas proteínas en respuesta a la estimulación con quimiocinas. Se detectó la fosforilación de Jak3 en respuesta a SDF-1 α y TECK a niveles bajos, resultados confirmados recientemente por el mismo grupo de trabajo.
- El análisis cualitativo de la expresión de mRNA de receptores de quimiocinas demostró que no hay diferencias en los patrones de expresión de estos receptores en timocitos Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$.
- Por medio de un método semicuantitativo optimizado en el laboratorio para comparar la cantidad de mRNA de los receptores CXCR4, CCR7 y CCR9 por PCR, se detectó de manera preliminar que no existen diferencias significativas en la expresión de los receptores CXCR4 y CCR9 en timocitos Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$, mientras que la expresión de CCR7 resultó estar aumentada en los timocitos Jak3 $-/-$.

8 APÉNDICE I: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

8.1 TINCIÓN DE CORRECEPTORES CD4 Y CD8 EN TIMOCITOS.

Por medio de cirugía se extrajo el timo de ratones C57B/6 Jak3 +/+, Jak3 +/- o Jak3 -/-. El timo se disgregó mecánicamente manteniéndose entre dos membranas de nylon de 50 μm sumergidas en medio RPMI (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco). La suspensión celular resultante está compuesta en su mayor parte por timocitos (pureza >95%). Los timocitos se lavaron un par de veces con amortiguador para citometría (ver apéndice II), centrifugando entre cada lavado a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 200 μl de suero normal de ratón diluido 1:20 con el amortiguador para citometría, y se incubó a 4°C durante 20 min. Al terminar la incubación, la suspensión se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 200 μl de una dilución previamente estandarizada del anticuerpo acoplado al fluoróforo (Anti-CD4-CyChrome y Anti-CD8-FITC, Pharmingen, San Diego CA, EUA), y se incubó por 30 min a 4°C. Se centrifugó y se lavó 3 veces con amortiguador para citometría. Por último, las células se fijaron en 200 μl de amortiguador de fijación. La fluorescencia de las células se evaluó empleando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ EUA) con el software CELLQuest versión 3.3 (Becton Dickinson).

8.2 GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES

Los ratones Jak3 -/- se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Se generaron ratones heterocigotos del mismo fondo genético (C57BL/6J), cuya descendencia fue tipificada por PCR para determinar su genotipo. Como resultado de la cruce de ratones heterocigotos se obtuvieron ratones con tres genotipos distintos: Jak3 +/+, Jak3 +/- y Jak3 -/-. Para conocer el genotipo de un ratón, se extrajo el DNA a partir de colas de ratón digeridas enzimáticamente; con este DNA se realizaron dos reacciones de PCR, una para determinar la presencia del gen de Jak3 y otra para determinar la presencia de un gen exógeno de resistencia a neomicina (NEO), pues el ratón Jak3 -/- se obtuvo por inserción del gen de resistencia a neomicina para reemplazar las secuencias que codifican los subdominios I a IV del dominio de cinasa de Jak3, por lo que la enzima perdió toda

actividad catalítica [105]. A los ratones de 1 a 2 semanas de edad se les cortó el extremo de la cola para determinar su genotipo. Las colas cortadas se incubaron por separado en 500 μ l de solución de digestión (apéndice II) con Proteinasa K (0.1 mg/ml) a 55°C por el tiempo necesario para digerirlas (de 4 a 8 h). A la suspensión resultante se le añadieron 500 μ l de una mezcla de fenol saturado: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 min para separar las fases, y se recuperó la fase acuosa. Se añadió entonces 400 μ l de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y una vez más se agitaron los tubos durante 15 min, tras los cuales se repitió la centrifugación a 13 000 rpm por 15 min. La fase acuosa se recuperó y se le añadió 1 ml de etanol al 100% enfriado a -20°C, mezclando los líquidos por inversión. La solución se mantuvo a -20°C durante al menos 20 minutos para precipitar el DNA, y posteriormente se centrifugo a 13 000 rpm durante 30 min a 4°C. El botón de DNA resultante se lavó con etanol al 70%, centrifugando a 13 000 durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante, y el botón se dejó secar al aire durante unos 5 min, tras los cuales se resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada y desionizada. Se sometió 1 μ l del DNA así obtenido a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para definir la ausencia o presencia del gen de Jak3 y del de neomicina siguiendo las condiciones de reacción definidas en el apéndice III, empleando los reactivos a la concentración listada a continuación:

Tabla 8.1: Concentración de los reactivos empleados en la PCR realizada para amplificar fragmentos tanto del gen de Jak3 como del gen de neomicina.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0.2 mM
Oligonucleótidos	0.25 μ M c/u
Taq Polimerasa	0.02 u/reacción

8.3 ENSAYO DE QUIMIOTÁXIS

Previo al experimento, se sumergió una membrana de policarbonato con poro de 5 μ m (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA) en una solución de fibronectina (20 μ g/ml), y con el fin de lograr una cubierta homogénea de fibronectina sobre la membrana, cada lado

de la membrana se incubó a 37°C por 30 min. Se extrajeron timocitos según el método descrito, y células de médula ósea. Las células de médula ósea se obtuvieron inyectando medio RPMI dentro del fémur recién extraído de ratones C57B/6 Jak3 +/+, Jak3 +/- o Jak3 -/-. Las células se lavaron un par de veces con medio RPMI adicionado con 2% SFB, centrifugando entre cada lavado a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. En algunos experimentos los timocitos se tiñeron de acuerdo al siguiente protocolo: se resuspendieron a 5×10^6 células/ml con RPMI y se adicionó a la suspensión celular el fluoróforo Acetoximetil-ester de Calceína (Calceína-AM, Molecular Probes, Eugene, Or. EUA) a una concentración final de 0.5 μ M. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ durante 30 min para lograr una buena inclusión del fluoróforo, tras lo cual las células se lavaron tres veces con medio HBSS (Gibco) para ser finalmente resuspendidas a 5×10^6 células/ml en medio HBSS adicionado de BSA al 0.05%, calcio y magnesio (medio de quimiotaxis). Las diluciones de los agentes quimiotácticos se prepararon en medio de quimiotaxis y se incubaron por 15 min a 37°C justo antes de comenzar el ensayo de quimiotaxis, para desgasificar la solución y evitar la aparición de burbujas durante el ensayo. Una vez que se tenían listas las células y las soluciones de los agentes quimiotácticos, se procedió a llenar la cámara de Boyden modificada (Neuroprobe) como a continuación se describe. En primer lugar, los pocillos inferiores se llenaron con 30 μ l de la solución del agente quimiotáctico, cuidando el tamaño del menisco sobre el pocillo para evitar problemas de contaminación cruzada o de falta de contacto entre la solución y la membrana. Una vez que todos los pocillos estuvieron llenos, se colocó con cuidado la membrana recubierta de fibronectina sobre estos, cuidando que no se mezclaran las soluciones y que no quedaran burbujas entre la solución y la membrana, sobre la cual se colocó un empaque de hule. Se colocó la parte superior de la cámara y se aseguró firmemente en su lugar con los tornillos provistos para este efecto. Finalmente, se cargaron 50 μ l de la suspensión de células en los pocillos superiores. Una vez que la cámara quedó cargada, se colocó en una incubadora a 37°C con 5% CO₂ y se incubó por 2 h durante las cuales las células capaces de responder a los agentes quimiotácticos migraron a través de la membrana. Pasado ese tiempo, la cámara se desarmó y la membrana fue procesada para detectar las células que migraron: primero se raspó el lado superior de la membrana (sobre el que se colocó la suspensión celular) con una espátula de hule provista por el fabricante; se repitió el raspado 3 veces, humedeciendo

el lado superior con PBS entre cada raspado. Se dejó secar la membrana y se sumergió en solución fijadora *DiffQuik* (Dade, Unterschleissheim, Alemania) por un minuto, pasado el cual se dejó secar la membrana. Una vez que estuvo seca y fijada, si en el experimento se emplearon timocitos marcados con Calceina, se examinó la emisión del fluoróforo incluido en las células, respuesta que se correlacionó con el número de células presentes. Esto se hizo con ayuda del analizador de imágenes FX (BioRad, Hercules, CA, USA), que cuantificó la fluorescencia en la membrana. Alternativamente, la membrana se tiñó con *DiffQuik*, un sistema de tinción diferencial consistente en dos soluciones: la membrana se sumergió durante un minuto en la solución I, y sin enjuagar se pasó a la solución II donde también se dejó sumergida durante un minuto, para por último sumergirse en agua bidestilada y desionizada para enjuagar el exceso de colorante. La membrana se dejó secar y se montó en un portaobjetos para su posterior análisis al microscopio, donde se contaron las células que migraron, examinando cuatro campos a 400X por cada pocillo.

8.4 MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

8.4.1 Tinción de las células.

Los fluoróforos Fluo3 y FuraRed (Molecular Probes) se disolvieron en DMSO estéril, y se adicionaron a una solución de 0.5% de ácido Plurónico (Molecular Probes) en medio RPMI suplementado con 2% de SFB. La concentración final de Fluo3 fue de 6 $\mu\text{g/ml}$ y la de FuraRed de 10 $\mu\text{g/ml}$. Esta solución de fluoróforos se guardó a temperatura ambiente, protegida de la luz. Se preparó una suspensión de timocitos a 10×10^6 células/ml en medio RPMI con 2% SFB. Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular y la solución de fluoróforos, para tener una suspensión de 5×10^6 células/ml en la solución de fluoróforos. Esta suspensión celular se incubó a 37°C por 45 min en la oscuridad, agitándola suavemente cada 10 min para evitar que las células se sedimenten. Después de la incubación, la suspensión de timocitos se lavó dos veces con medio RPMI + 2% SFB, centrifugando en cada lavado a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Los timocitos se resuspendieron en medio RPMI con 2% SFB para tener una suspensión de 5×10^6 células/ml, y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 45 min, agitando la suspensión cada 10 min. Después de la incubación, los timocitos se lavaron dos veces con medio RPMI sin SFB, tras lo cual se resuspendieron a 5×10^6 en medio RPMI.

8.4.2 Ensayo de movilización de calcio intracelular

Se tomaron 300 μ l de la suspensión de timocitos teñidos y se mezclaron con 1 ml de medio RPMI. El tubo con la suspensión celular se calentó a 37°C y se introdujo al citómetro sumergido en un baño de agua a 37°C para mantener esa temperatura durante todo el ensayo. Se midió la intensidad de fluorescencia en los canales FL1 (530 nm) y FL3 (680 nm) durante aproximadamente 40 segundos, tras lo cual se añadió la solución con la sustancia estimulante. Cuando la solución estimulante era una mezcla de anticuerpos biotinilados anti-CD3 y anti-CD4, después de añadir los anticuerpos se midió la fluorescencia de la suspensión durante 30 segundos, tras lo cual se adicionó a la suspensión una solución del agente entrecruzante estreptavidina (Pierce, Rockford, Ill, USA) La razón de las fluorescencias (FL1/FL3) se calculó empleando el programa FACSassistant.

8.5 ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN DE JAK3

8.5.1 Estimulación de las células

Los timocitos recién extraídos se lavaron dos veces con medio RPMI + 2% SFB, centrifugando en cada lavado a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Los timocitos se resuspendieron en medio de quimiotaxis, se separaron en distintos tubos para realizar las estimulaciones, y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min a 4°C una vez más. El botón de células (aproximadamente 3×10^7 de células por tubo) se resuspendió con la solución estimulante adecuada (300 μ l), colocando inmediatamente el tubo en un baño de agua a 37°C por el tiempo necesario. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se añadieron dos volúmenes de una solución inhibidora de fosfatasas (600 μ l, ver Apéndice II) a 4°C para detener la reacción de fosforilación y evitar que las fosfatasas defosforilaran los residuos de tirosina fosforilados en diversas proteínas. Las células, siempre manteniéndose a 4°C, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, y el botón celular se lisó con solución de lisis (ver Apéndice II), usando aproximadamente 100 μ l del buffer de lisis por cada 10^7 células. Esta solución se dejó 10 min a 4°C, para después centrifugarse a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contenía las proteínas citosólicas en solución, separando un volumen del 10% del volumen de lisado para usarse como control en el western blot, el cual se guardó a -70°C. El resto del sobrenadante se utilizó para llevar a cabo las correspondientes inmunoprecipitaciones.

8.5.2 Inmunoprecipitación

Se añadieron 2 μg del anticuerpo para inmunoprecipitar (AntiJak3 policlonal de cabra, N15, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EUA) sobre el lisado celular, incubándose en rotación a 4°C durante una hora. Durante este tiempo se lavó la proteína G acoplada a agarosa tres veces con solución de lisis. Una vez concluida la primera incubación, a los lisados se les añadieron 15 μl (volumen seco) de proteína G-agarosa (Invitrogen) por muestra, y se dejó incubar toda la noche con agitación a 4°C. Al día siguiente se centrifugó la suspensión de proteína G-agarosa en el lisado durante 30 segundos a 8000 rpm a 4°C; el sobrenadante se guardó para determinar la eficiencia de la inmunoprecipitación. El complejo Jak3-anticuerpo-proteína G-agarosa se lavó tres veces con 800 μl de solución de lisis fresca, siempre a 4°C. Finalmente, se resuspendió el complejo en 30 μl de solución de lisis, al cual se le añadieron 10 μl de solución de carga para proteínas (Ver apéndice II). La mezcla obtenida se guardó a -70°C para un análisis posterior, o se mantuvo a temperatura de ebullición por 5 minutos para luego realizar la electroforesis.

8.5.3 Electroforesis de proteínas.

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes (con la presencia de un 0.1% de SDS), según el método de Laemmli [61]. El gel concentrador tenía 4% de acrilamida, y el separador 8% (Apéndice II). La electroforesis se realizó a un voltaje de 8 a 10 V/cm.

8.5.4 Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF

Una vez que la electroforesis se llevó a cabo, el gel se separó de las placas de vidrio y se sumergió en solución de transferencia por al menos 5 min para equilibrarse. La transferencia se realizó siguiendo una modificación del método de Towbin [108]. El aparato de transferencia semiseca usado fue "The Panther", modelo HEP-1, de Owl Separation Systems (Portsmouth, NH, EUA). Antes de la transferencia, la membrana de PVDF con poro de 0.45 μm (Immobilon-P, Millipore, Bedford, Mass, EUA) se sumergió en metanol absoluto por 15 segundos para que adquiriera un carácter hidrofílico. Pasado ese tiempo, la membrana se sumergió en agua bidestilada y desionizada por 2 min y se transfirió a un envase con solución de transferencia donde se dejó equilibrar por al menos 5 min. Se humedecieron cuatro piezas de papel filtro 3 MM (Whatmann, Maidstone, Kent,

UK) recortadas al tamaño del gel y la membrana, con la solución de transferencia y se procedió a armar el aparato de transferencia de la siguiente manera: sobre el cátodo se colocaron dos piezas del papel filtro húmedo, luego se colocó el gel y sobre este la membrana de PVDF. Se pasó un rodillo sobre la membrana para expulsar el aire que pudiera estar atrapado entre esta y el gel, y finalmente se colocaron las otras dos piezas de papel filtro húmedo sobre la membrana. Una vez completo el montaje, se pasó el rodillo sobre este para eliminar el exceso de solución de transferencia. Se colocó el ánodo sobre el papel filtro para cerrar el circuito. La transferencia se realizó a voltaje constante de 10 V (aprox. $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$) por una hora. Transcurrido este tiempo, se desmontó el aparato de transferencia y se hizo un corte en una de las esquinas del gel y la membrana para identificar el lado con las proteínas. El gel se tiñó con azul de Coomassie (apéndice II) para verificar la eficiencia de la transferencia. La membrana se enjuagó brevemente con TBS, y luego se sumergió en la solución de bloqueo para anticuerpo antifosfotirosina, donde se dejó toda la noche a 4°C en agitación (o al menos 1 hora a temperatura ambiente).

8.5.5 Tinción del gel de acrilamida con Azul de Coomassie

El gel se dejó en agitación por al menos una noche en la solución de azul de Coomassie. Al día siguiente se sustituyó la solución de azul de Coomassie por la solución desteñidora. El gel se dejó en agitación por aproximadamente 30 minutos en la solución desteñidora antes de sustituir por solución desteñidora limpia. Se repitieron los lavados un número de veces suficiente para lograr un fondo transparente donde se distinguieran bien las bandas azules correspondientes a proteínas. Por último el gel se dejó una hora en agitación a temperatura ambiente dentro de la solución de glicerol al 5% en agua bidestilada desionizada para aumentar su resistencia frente al proceso de secado. Se humedecieron dos hojas de papel celofán en agua bidestilada desionizada; una vez que el tiempo de incubación del gel en la solución de glicerol pasó, se colocó entre las dos hojas de papel celofán, las cuales a su vez se montaron en un marco que las mantuvo tensas durante todo el proceso de secado. Este se realizó con un ventilador Easy Breeze (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco CA, EUA) con calentamiento ligero por un par de horas. Una vez seco, el gel dentro del papel celofán se recortó y analizó.

8.5.6 Inmunodetección del nivel de fosforilación de Jak3

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con la solución bloqueadora y se puso en contacto con la solución reutilizable del anticuerpo antifosfotirosina (monoclonal 4G10) durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido este tiempo, la membrana se enjuagó dos veces con TBS-T y se dejó en agitación con suficiente TBS-T por 15 min. Se repitió este lavado dos veces más pero incubando solo 5 min; después de los lavados la membrana se puso en contacto con la solución de anticuerpo secundario (Policlonal de oveja anti Ig de ratón acoplado a peroxidasa de rábano, Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA) diluido 1:5000, incubándose a temperatura ambiente y con agitación durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la solución del anticuerpo secundario se desechó y se dieron dos enjuagues rápidos a la membrana con TBS-T, seguidos de un lavado de 15 min y 3 lavados más de 5 min, con TBS-T. La membrana se mantuvo en TBS hasta comenzar la reacción de quimioluminiscencia. Para hacer esto, se añadió una mezcla-uno a uno de los dos reactivos de ECL (Amersham Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) hasta cubrir completamente la membrana, y se dejaron incubar con agitación por un minuto. Al cabo de este tiempo, la membrana se escurrió y se colocó dentro de una mica de plástico transparente, para después colocarse dentro del caset de exposición con el lado de las proteínas hacia arriba. La peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario es capaz de oxidar el reactivo "Luminol" (una diacilhidrazida cíclica) contenido en el kit ECL, generando dos productos, uno de los cuales se encuentra en un estado excitado y emite luz visible (máximo a 430 nm) para alcanzar a su estado basal. En completa oscuridad se colocó entonces una placa fotográfica Kodak Biomax MR y se realizó una primera exposición de 5 min, tras las cuales la placa se reveló sumergiéndola con agitación por un minuto en la solución reveladora (Kodak Dektol). Se enjuagó con agua la placa y se sumergió después en la solución fijadora (Kodak Rapid Fixer with Hardener) por un minuto, tras el cual se volvió a enjuagar la membrana y se dejó secar al aire. En los casos en que las bandas no eran detectables a los 5 min de exposición, se procedió a realizar exposiciones de más tiempo (hasta 2 h). Una vez seca, la placa fotográfica se examinó con un analizador de imágenes MultiImager FluorS BioRad (Hercules, CA, EUA), para cuantificar la densidad de las bandas en la placa. La membrana,

una vez que se realizaron las exposiciones requeridas, se enjuagó con TBS y se limpió de anticuerpos para volver a realizar una inmunodetección.

8.5.7 Limpieza de la membrana e inmunodetección con antiJak3.

Para desprender los anticuerpos adsorbidos a la membrana, esta se sumergió en suficiente solución de *stripping*, y se dejó agitándose a 55°C durante 30 min. A continuación se le dio un par de enjuagues rápidos con TBS-T, y se lavó en 5 ocasiones con TBS-T, si se usó la solución de *stripping* ácida (ver apéndice II), o un número de veces suficiente para no detectarse el olor a β -mercaptoetanol, en caso de usar la solución de *stripping* con β -mercaptoetanol. A continuación se bloqueó la membrana con la solución bloqueadora para antiJak3 durante toda la noche a 4°C o por al menos dos h a 37°C, para a continuación sumergir la membrana en la solución reutilizable del anticuerpo antiJak3 888 (policlonal de conejo) a una dilución 1:2000. La membrana se incubó durante al menos 6 h a 4°C en agitación en esta solución, y después se lavó de manera similar a la descrita para el anticuerpo antifosfotirosina. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario (policlonal de burro anti Ig de conejo-HRP, Amersham Life Science) a una dilución 1:5000, por 30 min a temperatura ambiente y se lavó como se ha descrito. Las bandas se detectaron empleando el kit de quimioluminiscencia.

8.6 RT-PCR SEMICUANTITATIVA.

8.6.1 Obtención de RNA total de timocitos.

Se extrajeron timocitos según el método ya explicado a partir de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$. Dada la pobre celularidad de los timos en ratones Jak3 $-/-$, se hicieron pools a partir de 4 ratones Jak3 $-/-$ para obtener suficientes células para el ensayo reportado en el presente trabajo. Manipulando lo mínimo las células, se dividieron en tubos libres de RNAsas con 10 millones de timocitos cada uno. Se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min a 4°C, y al botón de timocitos se le añadió 1 ml de la solución para extraer RNA STAT-60 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tel-Test, Friendswood, TX, USA). Se agitó la mezcla con ayuda de una micropipeta hasta obtener una suspensión homogénea que se dejó a temperatura ambiente y en reposo por 5 min. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo a cada tubo, para luego agitarlos vigorosamente por 15 segundos seguido de una incubación a temperatura ambiente por 2 min, al cabo de los cuales los tubos se centrifugaron por 15

min a 12 000 g a 4°C. La mezcla se separó en dos fases; la superior (acuosa) se transfirió a un tubo nuevo libre de RNAsas, al que se le añadieron 0.5 ml de isopropanol. Los tubos se agitaron por inversión un par de veces, para después dejarse en reposo por unos 5 a 10 min. Los tubos entonces se centrifugaron a 12 000g por 30 min a 4°C, obteniéndose un botón de RNA que fue lavado con 1 ml de etanol al 75% para después centrifugarse a 7500 g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar levemente el botón de RNA. Finalmente se resuspendió en 25 µl de agua bidestilada y desionizada tratada con DEPC (libre de RNAsas); una alícuota se usó para determinar la concentración por medios espectrofotométricos y otra se corrió en un gel de agarosa 1% con TAE (todo preparado con agua tratada con DEPC) para determinar la calidad del RNA obtenido. El resto se utilizó para sintetizar cDNA.

8.6.2 Síntesis de cDNA de una hebra.

La síntesis de cDNA se realizó empleando un kit comercial (SuperScript, Gibco) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, en un tubo libre de RNAsas se añadieron 5 µg de RNA total y 0.5 µg de oligo dT. Esta mezcla se incubó a 70°C por 10 min, seguida de una incubación de 1 minuto en hielo, después de la cual se añadió el amortiguador de la transcriptasa en la concentración recomendada por el fabricante, 2.5 mM de MgCl₂, 0.5 mM dNTP's, y 10 mM DTT. Se mezcló por agitación y se centrifugaron brevemente los tubos. Se incubaron los tubos a 42°C por 5 minutos, después de los cuales se añadieron 200 unidades de la enzima transcriptasa inversa SUPERSRIPT II (Gibco BRL) a cada tubo. Estos se mantuvieron a 42°C por 50 minutos, para incubarlos inmediatamente a 70°C por 15 minutos para detener la reacción. Los tubos se enfriaron en hielo, para después añadirles 2 unidades de RNAsa a cada uno. Los tubos se incubaron 20 minutos a 37°C para lograr la degradación total del RNA. El cDNA así obtenido se usó como templado en reacciones de PCR destinadas a detectar semicuantitativamente el nivel de expresión de ciertos receptores.

8.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se determinaron experimentalmente las condiciones óptimas de reacción para amplificar una banda debida a un transcrito de la hipoxantin-ribosil transferasa (HPRT) junto con una banda debida al transcrito de uno de los receptores de quimiocinas examinado. La preparación de la mezcla de reacción de la PCR siempre se llevó a cabo en

un solo tubo, poniendo el $MgCl_2$ siempre al final para evitar la activación de DNAsas contaminantes. La mezcla se agitó en un vortex y se recolectó por centrifugación. La solución se dividió en dos alícuotas del mismo volumen, a las que se les añadió el cDNA de los timocitos Jak3 +/- y Jak3 -/-. Los tubos se agitaron y después de colectar por centrifugación, la solución se dividió en tres tubos con el mismo volumen, los cuales se metieron al termociclador. La concentración de los reactivos empleados en cada reacción puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 8.2 Concentración de los reactivos empleados en las reacciones de PCR semicuantitativa empleando distintos oligonucleótidos.

	CCR7	CCR9	CXCR4
Amortiguador	1X	1X	1X
MgCl ₂	1.625 mM	.2 mM	2 mM
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Oligonucleótidos receptor (cada uno)	0.25 μM	0.25 μM	0.25 μM
Oligonucleótidos HPRT (cada uno)	0.25 μM	0.25 μM	0.25 μM
Taq polimerasa	0.02 u/reacción	0.02 u/reacción	0.02 u/reacción
c DNA	0.5 μg/μl	0.5 μg/μl	0.5 μg/μl

APENDICE II: REACTIVOS Y SOLUCIONES.

A. REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA ESTIMULACIÓN DE TIMOCITOS.

PBS

KCl	200 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l
NaCl	8000 mg/l
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l

Solución inhibidora de fosfatasas

PBS	1X
NaF	0.02 M
Na ₃ VO ₄	0.001M

Solución de lisis con inhibidores de proteasas

Tritón X-100	1%
Tris pH 8.0	0.02 M
NaCl	0.1 M
EDTA	0.001 M
NaF	0.02 M
Na ₃ VO ₄	0.002 M
Na ₄ P ₂ O ₇	0.02 M
PMSF	0.3 mM
DTT	0.001 M
Aprotinina	1 µg/ml
Leupeptina	1 µg/ml
Pepstatina	1 µg/ml

B. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Mezcla Acrilamida-bisacrilamida 30%

Acrilamida	30% (p/v)
Bisacrilamida	0.8% (p/v)

Gel concentrador

Mezcla Acrilamida-bisacrilamida	4% (v/v)
Tris pH 6.8	0.125 M
SDS	0.1% (p/v)
Persulfato de amonio (PSA)	0.1% (p/v)
TEMED	0.1% (v/v)

Gel separador

Mezcla Acrilamida-bisacrilamida	8% (v/v)
Tris pH 8.8	0.375 M
SDS	0.1% (p/v)
Persulfato de amonio (PSA)	0.1% (p/v)
TEMED	0.1% (v/v)

Amortiguador de electroforesis

Tris base	0.025M
Glicina	0.2 M
SDS	0.1% (p/v)

Amortiguador para cargar proteínas 4X

Tris pH 6.8	0.15M
Glicerol	30% (v/v)
SDS	6% (p/v)
β -mercaptoetanol	25% (v/v)

Solución de tinción de geles de acrilamida

Metanol	45% (v/v)
Ácido acético glacial	10% (v/v)
Azul de Coomasie	0.1% (p/v)

Solución desteñidora

Metanol	10% (v/v)
Ácido acético glacial	10% (v/v)

Solución de glicerol

Glicerol	5% (v/v)
----------	----------

C. REACTIVOS UTILIZADOS EN EL WESTERN BLOT**TBS**

Tris pH 7.6	0.05M
NaCl	0.15M

TBS-T

TBS	1X
Monolaurato de sorbitan	0.1% (v/v)
Polioxi-etileno (Tween 20)	

Solución bloqueadora para anticuerpo antifosfotirosina

TBS-T	1X
Albúmina sérica bovina (BSA)	5%

Solución reutilizable de anticuerpo antifosfotirosina

TBS-T	1X
Azida de sodio	0.02% (p/v)
BSA	1% (p/v)
Anticuerpo 4G10 antifosfotirosina	0.5 µg/ml.

Monoclonal de ratón IgG_{2bκ} (Upstate Biotechnologies)

Esta solución puede utilizarse no más de 5 veces en un lapso no mayor a dos meses.

Solución de anticuerpo secundario antiratón

TBS-T	1X
BSA	1% (p/v)
Anticuerpo de oveja anti Ig de ratón	Diluido 1:5000
Acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)	

(Amersham Life Science).

Solución de limpieza de membranas con β-mercaptoetanol

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	2%
β-mercaptoetanol	0.1 M
Tris pH 6.8	0.062 M

Solución ácida de limpieza de membranas.

Glicina•HCl	0.2M
Tween 20	0.05%

Llevar a pH de 2.5

Solución de Bloqueo para anticuerpo antiJak3

TBS-T	1X
BSA	5% (p/v)
Leche	2% (p/v)

Solución reutilizable de anticuerpo antiJak3

TBS	1X
Azida de Sodio	0.02% (p/v)
Tween 20	0.25% (v/v)
BSA	1% (p/v)
Leche	0.4% (p/v)
Suero de conejo 888 (anticuerpos específicos antiJak3)	Diluido 1:2000

Solución de anticuerpo secundario anticonejo

TBS-T	1X
BSA	1% (p/v)
Leche	0.4% (p/v)
Anticuerpo de burro anti Ig de conejo	Diluido 1:5000
Acoplado a HRP (Amersham Life Science)	

D. REACTIVOS USADOS EN LA ELECTROFORESIS DE DNA Y RNA

Nota: las soluciones utilizadas para electroforesis de RNA se prepararon a las mismas concentraciones que las soluciones empleadas para DNA, pero empleando agua bidestilada y desionizada tratada con DEPC, libre de RNAsas

TAE 1X

Tris-Acetato	0.04 M
EDTA	0.001 M
El pH debe ser de 8.3	

TBE 1X

Tris base	0.1 M
Ácido Bórico	0.09 M
EDTA	0.001 M
El pH debe ser de 8.3	

Amortiguador de carga para DNA y RNA (10X)

Glicerol	50% (v/v)
EDTA a pH de 8.3	0.2 M
Azul de bromofenol	0.05% (p/v)

E. OTROS REACTIVOS**Amortiguador para citometría**

PBS	1X
SFB	0.5% (v/v)
Azida de Sodio	0.02% (p/v)

Amortiguador para fijar células teñidas

PBS	1X
Paraformaldehído	4% (p/v)

Nota: Para disolver el paraformaldehído la solución debe tener pH básico. Antes de emplearla el pH debe fijarse en 7.4

Amortiguador para la digestión de colas de ratón

Tris pH 8.5	0.1 M
NaCl	0.2 M
SDS	0.2% (p/v)
EDTA	5 mM

APÉNDICE III: OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN

CXCR4

Forward 5'-AGAAGCTAAGGAGCATGACGGA

Reverse 5'-ACTGCCTTTTCAGCCAGCAGTT

El fragmento amplificado es de 267 bases de longitud.

RT-PCR semicuantitativa (coamplificado con HPRT):

Un ciclo 94°C 5 min.

27 ciclos 94°C 45 seg, 60°C 45 seg, 72°C 45 seg.

Por último, mantener a 4°C

CCR7

Forward 5'-ACAGCGGCCTCCAGAAGAACAGCGG

Reverse 5'-TGACGTCATAGGCAATGTTGAGCTG

Secuencias reportadas por Yanagihara et al. [124]

El fragmento amplificado es de 344 bases de longitud

RT-PCR semicuantitativa (coamplificado con HPRT):

Un ciclo: 94°C 5 min.

29 ciclos: 94°C 45 seg, 57°C 45 seg, 72°C 55 seg.

Por último, mantener a 4°C

CCR9

Forward 5'- CACCATGATGCCACAGAAC

Reverse 5'- GATGAGAAGCACACAGCTGTAG

El fragmento amplificado es de 414 bases de longitud

RT-PCR semicuantitativa (coamplificado con HPRT):

Un ciclo: 94°C 5 min.

29 ciclos: 94°C 45 seg, 65°C 45 seg, 72°C 1 min.

Por último, mantener a 4°C

HPRT (1)

Forward 5'- CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG

Reverse 5'- GTCAAGGGCATATCCAACAACAAC

El fragmento amplificado es de 351 bases de longitud

Las condiciones de reacción se mencionan arriba.

HPRT (2)

Forward 5'- GACACAAACATGATTCAAATCCCTGA

Reverse 5'- TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC

El fragmento amplificado es de aprox. 200 bases de longitud

Las condiciones de reacción se mencionan arriba.

JAK3

Forward 5'-GGCAACTTTGGCAGCGTGGAGCTGTGCCGC

Reverse 5'-CTGGCCCATAGCTGACTCCCCGGTACTGA

El fragmento amplificado es de 188 bases de longitud

PCR:

Un ciclo: 94°C 5 min.

35 ciclos: 94°C 45 seg, 62°C 45 seg, 72°C 1 min.

Un ciclo: 72°C 10 min.

Por último, mantener a 4°C

NEOMICINA

Forward 5'- ATTGAACAAGATGGATTGCAC

Reverse 5'- CGTCCAGATCATCCTGATC

El fragmento amplificado es de 480 bases de longitud

PCR :

Un ciclo: 95°C 5 min.

35 ciclos: 95°C 30 seg, 57°C 30 seg, 72°C 1 min.

Un ciclo 72°C 10 min.

Por último, mantener a 4°C

9 BIBLIOGRAFÍA.

1. Adachi, S., Yoshida, H., *et al.* (1998). "Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage." *Int Immunol* **10**(1): 1-6.
2. Adema, G. J., Hartgers, F., *et al.* (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." *Nature* **387**(6634): 713-7.
3. Aiuti, A., Taviani, M., *et al.* (1999). "Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors." *Eur J Immunol* **29**(6): 1823-31.
4. Akashi, K., Kondo, M. y Weissman, I. L. (1998). "Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells." *Immunol Rev* **165**: 13-28.
5. Anderson, G., Harman, B. C., Hare, K. J. y Jenkinson, E. J. (2000). "Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus." *Semin Immunol* **12**(5): 457-64.
6. Baggiolini, M., Dewald, B. y Moser, B. (1997). "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* **15**: 675-705.
7. Baird, A. M., Lucas, J. A. y Berg, L. J. (2000). "A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3." *J Immunol* **165**(7): 3680-8.
8. Baird, A. M., Thomas, D. C. y Berg, L. J. (1998). "T cell development and activation in Jak3-deficient mice." *J Leukoc Biol* **63**(6): 669-77.
9. Berger, E. A., Murphy, P. M. y Farber, J. M. (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
10. Bermejo, M., Martin-Serrano, J., *et al.* (1998). "Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains." *Eur J Immunol* **28**(10): 3192-204.
11. Binari, R. y Perrimon, N. (1994). "Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*." *Genes Dev* **8**(3): 300-12.
12. Bleul, C. C., Wu, L., *et al.* (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925-30.
13. Bromley, S. K., Peterson, D. A., Gunn, M. D. y Dustin, M. L. (2000). "Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation." *J Immunol* **165**(1): 15-9.
14. Buggy, J. J. (1998). "Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway." *Biochem J* **331**(Pt 1): 211-6.
15. Campbell, J. J., Pan, J. y Butcher, E. C. (1999). "Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation." *J Immunol* **163**(5): 2353-7.
16. Candotti, F., Oakes, S. A., *et al.* (1997). "Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency." *Blood* **90**(10): 3996-4003.
17. Cao, X., Shores, E. W., *et al.* (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain." *Immunity* **2**(3): 223-38.
18. Clore, G. M. y Gronenborn, A. M. (1995). "Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines." *FASEB J* **9**(1): 57-62.
19. Corcoran, A. E., Smart, F. M., *et al.* (1996). "The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis." *Embo J* **15**(8): 1924-32.
20. Crompton, T., Outram, S. V., Buckland, J. y Owen, M. J. (1997). "A transgenic T cell receptor restores thymocyte differentiation in interleukin-7 receptor alpha chain-deficient mice." *Eur J Immunol* **27**(1): 100-4.
21. Cunningham, C. P., Kimpton, W. G., Holder, J. E. y Cahill, R. N. (2001). "Thymic export in aged sheep: a continuous role for the thymus throughout pre- and postnatal life." *Eur J Immunol* **31**(3): 802-11.

22. Chaffin, K. E. y Perlmutter, R. M. (1991). "A pertussis toxin-sensitive process controls thymocyte emigration." *Eur J Immunol* **21**(10): 2565-73.
23. Chantry, D., Romagnani, P., *et al.* (1999). "Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes." *Blood* **94**(6): 1890-8.
24. Dairaghi, D. J., Franz-Bacon, K., *et al.* (1998). "Macrophage inflammatory protein-1beta induces migration and activation of human thymocytes." *Blood* **91**(8): 2905-13.
25. Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. y Stark, G. R. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* **264**(5164): 1415-21.
26. De Gendt, C. M., De Clerck, L. S., Bridts, C. H. y Stevens, W. J. (1996). "The use of calcein acetomethylester (AM)-labelled polymorphonuclear cells in a polycarbonate filter chemotaxis assay." *Clin Chim Acta* **249**(1-2): 189-95.
27. Dekker, L. V. y Segal, A. W. (2000). "Perspectives: signal transduction. Signals to move cells." *Science* **287**(5455): 982-3, 985.
28. DiSanto, J. P., Muller, W., *et al.* (1995). "Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2): 377-81.
29. Donskoy, E. y Goldschneider, I. (1992). "Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice." *J Immunol* **148**(6): 1604-12.
30. Duhe, R. J. y Farrar, W. L. (1995). "Characterization of active and inactive forms of the JAK2 protein-tyrosine kinase produced via the baculovirus expression vector system." *J Biol Chem* **270**(39): 23084-9.
31. Endo, T. A., Masuhara, M., *et al.* (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." *Nature* **387**(6636): 921-4.
32. Eynon, E. E., Livak, F., *et al.* (1999). "Distinct effects of Jak3 signaling on alphabeta and gammadelta thymocyte development." *J Immunol* **162**(3): 1448-59.
33. Fernandez, L., Flores-Morales, A., *et al.* (1998). "Desensitization of the growth hormone-induced Janus kinase 2 (Jak 2)/signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5)-signaling pathway requires protein synthesis and phospholipase C." *Endocrinology* **139**(4): 1815-24.
34. Fish, E. N., Uddin, S., *et al.* (1999). "Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons." *J Biol Chem* **274**(2): 571-3.
35. Forster, R., Schubel, A., *et al.* (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* **99**(1): 23-33.
36. Foss, D. L., Baarsch, M. J. y Murtaugh, M. P. (1998). "Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues." *Anim Biotechnol* **9**(1): 67-78.
37. Foxman, E. F., Campbell, J. J. y Butcher, E. C. (1997). "Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis." *J Cell Biol* **139**(5): 1349-60.
38. Franz-Bacon, K., Dairaghi, D. J., *et al.* (1999). "Human thymocytes express CCR-3 and are activated by eotaxin." *Blood* **93**(10): 3233-40.
39. Ganju, R. K., Dutt, P., *et al.* (1998). "Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK." *Blood* **91**(3): 791-7.
40. Germain, R. N. (2002). "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision." *Nature Rev Immunol* **2**(5): 309-22.
41. Gosling, J., Dairaghi, D. J., *et al.* (2000). "Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK." *J Immunol* **164**(6): 2851-6.
42. Guillet-Deniau, I., Burnol, A. F. y Girard, J. (1997). "Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT2A receptor coupled to the Jak/STAT pathway." *J Biol Chem* **272**(23): 14825-9.

43. He, Y. W., Nakajima, H., *et al.* (1997). "The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages." *J Immunol* **158**(6): 2592-9.
44. Henegariu, O., Heerema, N. A., *et al.* (1997). "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." *Biotechniques* **23**(3): 504-11.
45. Hershko, A. y Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* **67**: 425-79.
46. Hill, C. S. y Treisman, R. (1995). "Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity." *Cell* **80**(2): 199-211.
47. Hofmeister, R., Khaled, A. R., *et al.* (1999). "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." *Cytokine Growth Factor Rev* **10**(1): 41-60.
48. Hubbard, S. R., Mohammadi, M. y Schlessinger, J. (1998). "Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases." *J Biol Chem* **273**(20): 11987-90.
49. Jiang, H., Kuang, Y., *et al.* (1996). "Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors." *J Biol Chem* **271**(23): 13430-4.
50. Johnston, J. A., Kawamura, M., *et al.* (1994). "Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2." *Nature* **370**(6485): 151-3.
51. Jourdan, P., Vendrell, J. P., *et al.* (2000). "Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells." *J Immunol* **165**(2): 716-24.
52. Kaibuchi, K., Kuroda, S. y Amano, M. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* **68**: 459-86.
53. Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M. y Nakagawa, M. (1999). "Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases." *Curr Opin Cell Biol* **11**(5): 591-6.
54. Kawata, T., Shevchenko, A., *et al.* (1997). "SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium." *Cell* **89**(6): 909-16.
55. Kennedy, J., Kelner, G. S., *et al.* (1995). "Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin." *J Immunol* **155**(1): 203-9.
56. Kim, C. H. y Broxmeyer, H. E. (1999). "Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function." *J Leukoc Biol* **65**(1): 6-15.
57. Kim, C. H., Pelus, L. M., White, J. R. y Broxmeyer, H. E. (1998). "Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines." *Blood* **91**(12): 4434-43.
58. Kim, K., Lee, C. K., *et al.* (1998). "The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways." *J Immunol* **160**(12): 5735-41.
59. Kondo, M., Akashi, K., *et al.* (1997). "Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice." *Immunity* **7**(1): 155-62.
60. Kotenko, S. V., Iztotova, L. S., *et al.* (1996). "Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma." *J Biol Chem* **271**(29): 17174-82.
61. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
62. LaRosa, G. J., Thomas, K. M., *et al.* (1992). "Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity." *J Biol Chem* **267**(35): 25402-6.
63. Leonard, W. J. y O'Shea, J. J. (1998). "Jaks and STATs: biological implications." *Annu Rev Immunol* **16**: 293-322.
64. Liu, K. D., Gaffen, S. L., Goldsmith, M. A. y Greene, W. C. (1997). "Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation." *Curr Biol* **7**(11): 817-26.
65. Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M. y Moser, B. (1996). "Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes." *J Exp Med* **184**(2): 569-77.
66. Maki, K., Sunaga, S. y Ikuta, K. (1996). "The V-J recombination of T cell receptor-gamma genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice." *J Exp Med* **184**(6): 2423-7.

67. Malissen, M., Pereira, P., *et al.* (1997). "The common cytokine receptor gamma chain controls survival of gamma/delta T cells." *J Exp Med* **186**(8): 1277-85.
68. Marrero, M. B., Schieffer, B., *et al.* (1995). "Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor." *Nature* **375**(6528): 247-50.
69. Matzinger, P., Zamojska, R. y Waldmann, H. (1984). "Self tolerance is H-2-restricted." *Nature* **308**(5961): 738-41.
70. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., *et al.* (1998). "The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor." *J Immunol* **161**(2): 805-13.
71. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S. y Martinez, A. C. (2001). "Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation." *Annu Rev Immunol* **19**: 397-421.
72. Miyazaki, T., Takaoka, A., *et al.* (1998). "Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway." *Genes Dev* **12**(6): 770-5.
73. Muegge, K., Vila, M. P. y Durum, S. K. (1993). "Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene." *Science* **261**(5117): 93-5.
74. Murdoch, C. y Finn, A. (2000). "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases." *Blood* **95**(10): 3032-43.
75. Namen, A. E., Lupton, S., *et al.* (1988). "Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7." *Nature* **333**(6173): 571-3.
76. Norment, A. M. y Bevan, M. J. (2000). "Role of chemokines in thymocyte development." *Semin Immunol* **12**(5): 445-55.
77. Norment, A. M., Bogatzki, L. Y., Gantner, B. N. y Bevan, M. J. (2000). "Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling." *J Immunol* **164**(2): 639-48.
78. Oosterwegel, M. A., Haks, M. C., *et al.* (1997). "Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells." *Immunity* **6**(3): 351-60.
79. Park, S. Y., Saijo, K., *et al.* (1995). "Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice." *Immunity* **3**(6): 771-82.
80. Peault, B., Khazaal, I. y Weissman, I. L. (1994). "In vitro development of B cells and macrophages from early mouse fetal thymocytes." *Eur J Immunol* **24**(3): 781-4.
81. Perera, L. P., Goldman, C. K. y Waldmann, T. A. (1999). "IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes." *J Immunol* **162**(5): 2606-12.
82. Peschon, J. J., Morrissey, P. J., *et al.* (1994). "Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice." *J Exp Med* **180**(5): 1955-60.
83. Rajarathnam, K., Sykes, B. D., *et al.* (1994). "Neutrophil activation by monomeric interleukin-8." *Science* **264**(5155): 90-2.
84. Remy, I., Wilson, I. A. y Michnick, S. W. (1999). "Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change." *Science* **283**(5404): 990-3.
85. Robey, E., Chang, D., *et al.* (1996). "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." *Cell* **87**(3): 483-92.
86. Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., *et al.* (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3628-33.
87. Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., *et al.* (1999). "Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis." *J Cell Biol* **144**(4): 755-65.
88. Rosenthal, L. A., Winestock, K. D. y Finbloom, D. S. (1997). "IL-2 and IL-7 induce heterodimerization of STAT5 isoforms in human peripheral blood T lymphoblasts." *Cell Immunol* **181**(2): 172-81.

89. Sadlack, B., Lohler, J., *et al.* (1995). "Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells." Eur J Immunol **25**(11): 3053-9.
90. Sallusto, F., Mackay, C. R. y Lanzavecchia, A. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
91. Sanchez-Madrid, F. y del Pozo, M. A. (1999). "Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions." Embo J **18**(3): 501-11.
92. Sharp, L. L., Schwarz, D. A., *et al.* (1997). "The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment." Immunity **7**(5): 609-18.
93. Shortman, K. y Wu, L. (1996). "Early T lymphocyte progenitors." Annu Rev Immunol **14**: 29-47.
94. Smithgall, M. D., Wong, J. G., Critchett, K. E. y Haffar, O. K. (1996). "IL-7 up-regulates HIV-1 replication in naturally infected peripheral blood mononuclear cells." J Immunol **156**(6): 2324-30.
95. Sohn, S. J., Forbush, K. A., *et al.* (1998). "Requirement for Jak3 in mature T cells: its role in regulation of T cell homeostasis." J Immunol **160**(5): 2130-8.
96. Spits, H., Blom, B., *et al.* (1998). "Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells." Immunol Rev **165**: 75-86.
97. Sudo, T., Nishikawa, S., *et al.* (1993). "Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9125-9.
98. Suzuki, G., Sawa, H., *et al.* (1999). "Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus." J Immunol **162**(10): 5981-5.
99. Tanabe, S., Lu, Z., *et al.* (1997). "Identification of a new mouse beta-chemokine, thymus-derived chemotactic agent 4, with activity on T lymphocytes and mesangial cells." J Immunol **159**(11): 5671-9.
100. Taylor, J. R., Jr., Kimbrell, K. C., *et al.* (2001). "Expression and function of chemokine receptors on human thymocytes: implications for infection by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **75**(18): 8752-60.
101. Teglund, S., McKay, C., *et al.* (1998). "Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses." Cell **93**(5): 841-50.
102. Thiel, S., Behrmann, I., *et al.* (1998). "Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway." Biochem J **330**(Pt 1): 47-54.
103. Thomis, D. C. y Berg, L. J. (1997). "Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function." J Exp Med **185**(2): 197-206.
104. Thomis, D. C. y Berg, L. J. (1997). "The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling." Curr Opin Immunol **9**(4): 541-7.
105. Thomis, D. C., Gurniak, C. B., *et al.* (1995). "Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3." Science **270**(5237): 794-7.
106. Thomis, D. C., Lee, W. y Berg, L. J. (1997). "T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis." J Immunol **159**(10): 4708-19.
107. Tomita, K., Saijo, K., *et al.* (2001). "Cytokine-independent Jak3 activation upon T cell receptor (TCR) stimulation through direct association of Jak3 and the TCR complex." J Biol Chem **276**(27): 25378-85.
108. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
109. Uehara, S., Song, K., Farber, J. M. y Love, P. E. (2002). "Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25." J Immunol **168**(1): 134-42.
110. Ushiki, T. y Takeda, M. (1997). "Three-dimensional ultrastructure of the perivascular space in the rat thymus." Arch Histol Cytol **60**(1): 89-99.

111. van Ewijk, W., Wang, B., *et al.* (1999). "Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D?" *Semin Immunol* **11**(1): 57-64.
112. Van Snick, J., Houssiau, F., *et al.* (1996). "I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis." *J Immunol* **157**(6): 2570-6.
113. Veillette, A., Zuniga-Pflucker, J. C., Bolen, J. B. y Kruisbeek, A. M. (1989). "Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways." *J Exp Med* **170**(5): 1671-80.
114. Vicente-Manzanares, M., Rey, M., *et al.* (1999). "Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis." *J Immunol* **163**(7): 4001-12.
115. Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., *et al.* (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." *FASEB J* **13**(13): 1699-710.
116. Villa-Verde, D. M., Calado, T. C., *et al.* (1999). "The conveyor belt hypothesis for thymocyte migration: participation of adhesion and de-adhesion molecules." *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 569-72.
117. von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., *et al.* (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." *J Exp Med* **181**(4): 1519-26.
118. Wang, J. M., Ueda, H., *et al.* (1998). "HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation." *J Immunol* **161**(8): 4309-17.
119. Weissman, D., Dybul, M., *et al.* (2000). "Interleukin-2 up-regulates expression of the human immunodeficiency virus fusion coreceptor CCR5 by CD4+ lymphocytes in vivo." *J Infect Dis* **181**(3): 933-8.
120. Wilkinson, B., Owen, J. J. y Jenkinson, E. J. (1999). "Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus." *J Immunol* **162**(7): 3873-81.
121. Wong, M. y Fish, E. N. (1998). "RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells." *J Biol Chem* **273**(1): 309-14.
122. Wurbel, M. A., Malissen, M., *et al.* (2001). "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* **98**(9): 2626-32.
123. Wurbel, M. A., Philippe, J. M., *et al.* (2000). "The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9." *Eur J Immunol* **30**(1): 262-71.
124. Yanagihara, S., Komura, E., *et al.* (1998). "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation." *J Immunol* **161**(6): 3096-102.
125. Yin, T., Shen, R., Feng, G. S. y Yang, Y. C. (1997). "Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases." *J Biol Chem* **272**(2): 1032-7.
126. Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S. y Kopito, R. R. (1997). "Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome." *J Biol Chem* **272**(33): 20800-4.
127. Zhou, Y. J., Hanson, E. P., *et al.* (1997). "Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13850-5.
128. Zingoni, A., Soto, H., *et al.* (1998). "The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells." *J Immunol* **161**(2): 547-51.
129. Zinkernagel, R. M., Callahan, G. N., *et al.* (1978). "On the thymus in the differentiation of 'H-2 self-recognition' by T cells: evidence for dual recognition?" *J Exp Med* **147**(3): 882-96.
130. Zou, Y. R., Kottmann, A. H., *et al.* (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* **393**(6685): 595-9.
131. Zuniga-Pflucker, J. C., Di, J. y Lenardo, M. J. (1995). "Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation." *Science* **268**(5219): 1906-9.