



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“PAPEL DE LA CINASA JAK3 EN LA
SEÑALIZACIÓN DE CCR7 EN LA MIGRACIÓN DE
LINFOCITOS A ÓRGANOS LIFOIDES
SECUNDARIOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A
IRMA ILEANA LICONA LIMÓN**

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Eduardo García Zepeda**

México, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

Agradecimientos:

A mis padres

A Raúl

A mi familia

A mis amigos

A mis tutores de la licenciatura y en especial al Doctor Eduardo García Zepeda por su guía y paciencia infinitas.

Al técnico académico del laboratorio Ramsés Chávez Ríos por su apoyo en el tipaje de los ratones para la realización de esta tesis

A la Doctora Gloria Soldevila y al comité tutorial por la revisión de este trabajo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|---|---------|
| 1.1 El sistema inmune..... | 5 - 7 |
| 1.2 Los ganglios linfáticos..... | 8 - 12 |
| 1.3 Las quimiocinas y sus receptores..... | 13 - 19 |
| 1.4 La familia de las cinasas de Janus..... | 20 - 27 |
| 1.5 Las quimocinas en el tráfico de linfocitos..... | 28 - 34 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 35 |
|------------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------|-----------|
| 3. HIPÓTESIS..... | 36 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------|-----------|
| 4. OBJETIVOS..... | 37 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 38 - 44 |
|-------------------------------------|----------------|

| | |
|---------------------------|----------------|
| 6. RESULTADOS..... | 45 - 59 |
|---------------------------|----------------|

| | |
|--------------------------|----------------|
| 7. DISCUSIÓN..... | 60 - 64 |
|--------------------------|----------------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 8. CONCLUSIONES..... | 65 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|---|---------|
| Apéndice de reactivos y soluciones..... | 66 - 69 |
|---|---------|

| | |
|-------------------|---------|
| Bibliografía..... | 70 - 79 |
|-------------------|---------|

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune en los mamíferos está diseñado para combatir las infecciones causadas por los microorganismos a los que están constantemente expuestos mientras mantiene tolerancia a lo propio. Para poder cumplir estas tareas, las células y tejidos del sistema inmune están rigurosamente organizados, asegurando así el correcto desarrollo, activación y función de las diversas poblaciones de leucocitos. La migración selectiva de los leucocitos hacia los diferentes tejidos (homing) es la base de esta organización, la respuesta de los leucocitos a las citocinas quimioatrayentes (quimiocinas) juega un papel esencial en las vías de homing [1].

El sistema inmune actúa mediante los mecanismos de la inmunidad innata y por medio de la respuesta inmune adaptativa.

La inmunidad innata sirve como una primera línea de defensa y depende del reconocimiento de características comunes de los patógenos es decir, no es antígeno-específica, por lo que es incapaz de reconocer algunos patógenos y no provee protección inmunológica. Este sistema está completamente desarrollado desde el nacimiento y no existe variabilidad en la respuesta. Se compone de barreras fisicoquímicas, moléculas secretadas y células fagocíticas.

Cuando el patógeno ha sobrepasado o evadido a las defensas innatas se induce una respuesta inmune adaptativa que es una respuesta antígeno-específica. La respuesta inmune toma varios días para desarrollarse ya que los linfocitos T y B deben encontrar primero a su antígeno específico, proliferar y diferenciarse hacia células efectoras. Una vez que se ha montado una respuesta adaptativa, la infección es generalmente controlada y el patógeno eliminado. A la respuesta inmune adaptativa le sucede un estado de inmunidad protectora que consiste en la presencia de células efectoras y moléculas producidas en la respuesta inicial y memoria inmunológica. La memoria inmunológica se manifiesta como la habilidad de responder más eficientemente a un segundo encuentro con el patógeno (respuesta secundaria).

Los órganos linfoides son tejidos donde los linfocitos tienen interacciones con células no linfoides que son importantes para su desarrollo o en el inicio de las respuestas inmunes adaptativas. Estos se pueden dividir en órganos linfoides primarios o centrales, donde los linfocitos son generados y en órganos linfoides secundarios o periféricos, donde las respuestas adaptativas son iniciadas.

Los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo. Tanto los linfocitos T como los B se originan en la médula ósea pero solo los linfocitos B maduran allí, los linfocitos T migran de la médula ósea hacia el timo, donde maduran. Cuando han completado su maduración, ambos tipos celulares migran hacia los órganos linfoides secundarios [2].

El número de determinantes antigénicos de los patógenos es casi infinito. El sistema adaptativo ha evolucionado para cubrir este enorme espectro de antígenos equipando a los linfocitos con receptores únicos que en conjunto, son capaces de reconocer a millones de antígenos. Dado que la capacidad de un organismo para generar y mantener una población muy grande de linfocitos es inevitablemente limitada, el número de linfocitos con una especificidad antigénica debe ser restringido para garantizar la máxima diversidad de receptores [3], lo cual presenta un reto importante para el sistema inmune, debiendo asegurar que ningún patógeno escape a la detección mientras mantiene un número sostenible de precursores. Dos principios básicos facilitan estos requerimientos, el primero: los antígenos de la periferia son adquiridos por las células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés), y luego mostrados en los órganos linfoides secundarios (SLO por sus siglas en inglés) y segundo, los linfocitos que nunca han sido estimulados por su antígeno (vírgenes) re-circulan a través de los órganos linfoides secundarios para interaccionar con las APC en busca de la presencia de su antígeno presentado en el contexto de estimulación adecuado. Así, la respuesta inmune adaptativa no es iniciada en el sitio donde el patógeno establece el foco de infección, ésta ocurre en los órganos linfoides secundarios: los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a la mucosa como las placas de Peyer, las amígdalas, los adenoides y el apéndice. Los patógenos que entran a la sangre son atrapados en el bazo, los patógenos que infectan las mucosas se acumulan en las placas de Peyer o las amígdalas, y los patógenos que infectan los tejidos son transportados en la linfa hacia el ganglio linfático más cercano (ganglio periférico) a través de los conductos linfáticos. Aunque todos estos tejidos son diferentes en apariencia, el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos asociados a la mucosa operan con el mismo principio: atrapan antígeno y se lo presentan a los linfocitos, induciendo la respuesta inmune adaptativa [2].

La compartimentación del sistema inmune en órganos linfoides primarios, secundarios permite la generación eficiente de respuestas inmunes a pesar de la baja

frecuencia de linfocitos antígeno-específicos ya que proveen puntos de intersección para éstas células y las células presentadoras de antígeno [4].

1.2 LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

1.2.1 Desarrollo de los ganglios linfáticos

El desarrollo del tejido linfoide está asociado con la colonización del primordio del ganglio linfático de una población de células hematopoyéticas provenientes del hígado fetal, identificadas como $CD4^+CD3^-IL-7R\alpha^{hi}$ y llamadas inductoras, que interactúan con las células estromales residentes, llamadas organizadoras. Las células inductoras proveen de linfotoxina(LT) $\alpha1\beta2$ a las células organizadoras [5-7], esencial para el desarrollo de los ganglios linfáticos y las placas de Peyer. La cadena α del receptor de IL-7 (IL-7R α) es necesaria para el desarrollo de los ganglios linfáticos y las placas de Peyer, y se cree que es debido, al menos en parte, a su papel en la inducción de la expresión de LT $\alpha1\beta2$, en las células inductoras en el rudimento de las placas de Peyer [8-10].

Las células $CD4^+CD3^-IL-7R\alpha^{hi}$, además de expresar LT $\alpha1\beta2$, expresan CD45, la integrina $\alpha4\beta7$ y receptores de quimiocinas como CCR7 y CXCL13, necesarios para mediar el reclutamiento de las células circulantes a los sitios de génesis del tejido linfoide para inducir el desarrollo de los ganglios linfáticos y las placas de Peyer [9, 11].

1.2.2 Arquitectura de los ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos están distribuidos a lo largo de todo el cuerpo, son estructuras altamente organizadas, cubiertas por una cápsula fibrosa, y embebidos en tejido conectivo. Estos presentan dos regiones histológicamente reconocibles: la corteza y la médula. La corteza se divide por límites físicos no demarcados, sino más bien por la segregación de las células T y B en micro-ambientes distintos, en una corteza externa, formada por linfocitos B y células dendríticas foliculares, organizados en folículos primarios (zona B), y por una zona más interna formada por linfocitos T y células dendríticas (derivadas de la piel) llamada paracorteza (zona T). Algunos de los folículos primarios, después del reto antigénico, presentan áreas de proliferación intensa de células B llamadas centros germinales, localizados en la frontera entre las zonas T y B. Los folículos primarios que contienen un centro germinal se conocen como folículos secundarios [2].

El estroma del ganglio está formado por varios tipos celulares derivados del mesénquima, principalmente por células fibroblásticas reticulares (FRCs por sus siglas en inglés) y sus fibras reticulares [12].

La zona central, la médula, es un laberinto de conductos de drenaje de la linfa que están separados por los llamados cordones medulares constituidos por células reticulares, macrófagos, células plasmáticas y células T de memoria. Los cordones medulares son el sitio donde las células plasmáticas se agregan para liberar inmunoglobulinas hacia los canales eferentes de la linfa [2, 13].

Debajo de la cápsula hay un espacio llamado cavidad subcapsular que manda extensiones de tejido conectivo hacia la médula formando conductos llamados trabécula, que subdividen al ganglio en lóbulos. La paracorteza está organizada en cordones paracorticales que miden de 100 a 1000 μ m, y se extienden desde los cordones medulares hasta la base de los folículos B [14]. Los cordones paracorticales están delimitados por los conductos que transportan a la linfa hacia la médula. En un corte transversal, se puede ver que en el centro de cada cordón paracortical hay una vénula de endotelio alto (HEV), las cuales son pequeñas venas que unen capilares a grandes venas y que presentan un fenotipo cuboidal característico). Las HEVs se encuentran normalmente solo en los órganos linfoides secundarios (con excepción del bazo), aunque su formación también se induce en sitios de inflamación crónica [15].

Además del sistema de circulación sanguíneo, los vertebrados superiores han desarrollado otro sistema de circulación que regresa el fluido extracelular y las proteínas a la sangre. Este fluido extracelular es producido continuamente por filtración y es llamado linfa, a la red de conductos que la transportan se le conoce como conductos linfáticos. Esta red de conductos es necesaria para mantener la homeostasis natural, y el sistema inmune ha evolucionado de tal manera que hace uso de ellos. Intercalados entre los conductos linfáticos están los ganglios linfáticos, que funcionan como sitios de convergencia del sistema de conductos linfáticos y sirven para limpiar la linfa de antígenos extraños [16]. Los conductos linfáticos tienen válvulas que solo permiten el flujo unidireccional desde los tejidos hacia los ganglios, los conductos aferentes de la linfa que drenan el fluido de los tejidos también transportan células cargadas con antígeno o partículas desde los sitios de infección hacia los ganglios linfáticos en donde son atrapados.

Los leucocitos también usan el sistema de circulación de la linfa, aunque todos los tipos de leucocitos pueden ser encontrados en las vías aferentes de la linfa, solo los linfocitos pueden ser recuperados de las vías eferentes de la linfa y es esta propiedad única la que les permite regresar a la circulación sanguínea [16].

Cada ganglio tiene de 6 a 12 conductos aferentes y solo uno eferente. Cualquier célula o partícula contenida en la linfa entra al ganglio por los canales aferentes hacia la cavidad subcapsular. A partir de aquí, la linfa es canalizada por la trabécula a través del ganglio hacia el arreglo de cavidades medulares y de allí a los canales eferentes de la linfa que dejan el ganglio. En la cavidad subcapsular, hay macrófagos y células dendríticas CD11b (implicadas en la presentación de antígenos subcutáneos a los linfocitos T CD4), que remueven microorganismos y desechos contenidos en la linfa, estas células también transportan y/o procesan material antigénico para presentación [17]. La linfa recorre varios ganglios antes de regresar a circulación sanguínea, así la materia contenida en la linfa que no fue filtrada en un ganglio pasa al siguiente ganglio, y de allí a otro ganglio y así consecutivamente; la linfa puede pasar hasta por 8 ganglios, por lo que para cuando la linfa llega a la sangre regularmente está libre de materia extraña y desechos.

1.2.3 Tráfico celular en los ganglios linfáticos

Los linfocitos T y B maduros vírgenes, después de dejar los órganos linfoides centrales, entran a la circulación sanguínea y migran hacia los ganglios para buscar en las APC a su antígeno. Si no encuentran a su antígeno, regresan a la circulación y migran hacia otro ganglio en busca de su antígeno.

Esta re-circulación continua solo se interrumpe cuando la célula T virgen encuentra a su antígeno, entonces son retenidas en el ganglio y deben decidir si montan una respuesta efectora dirigida a eliminar la fuente del antígeno o si se vuelven tolerantes y/o mueren para evitar una respuesta auto-inmune. Las células dendríticas de los órganos linfoides tienen un papel crucial en la recopilación de la información que permite al linfocito tomar esta decisión [18].

Para desencadenar una respuesta inmune, las células T y B específicas deben interactuar primero con las células dendríticas (DCs) y células dendríticas foliculares (FDCs) respectivamente, y luego entre ellas. Aunque el número de T y B específicos para un antígeno dado es muy bajo estas células deben encontrarse para que ocurra una respuesta [19].

Hay dos puntos de entrada a un ganglio: las HEVs y los conductos aferentes de la linfa. Los linfocitos T y B vírgenes entran por las HEVs en la zona T, mientras que algunas células de memoria y las células dendríticas entran a los ganglios a través de los conductos aferentes de la linfa [20]. La migración de los linfocitos hacia los ganglios

está regulada por las HEVs que, a través de la expresión de diversas moléculas de homing (selectinas, integrinas, moléculas de la familia de las inmunoglobulinas y quimiocinas) marcan sitios definidos de salida de la sangre para los linfocitos. La composición y distribución de moléculas de homing en las HEVs varía entre los diferentes órganos linfoides secundarios y es regulada a lo largo de la vida del individuo [21].

Las DCs inmaduras también circulan en la sangre, pero son más abundantes en los tejidos epitelial y conectivo, en donde están colocadas para adquirir antígenos que inicialmente establecen infección en la periferia. Las DC inmaduras generalmente entran a los ganglios a través de los canales aferentes de la linfa y se establecen en los alrededores de las HEVs, en la paracorteza (zona T) [14, 22].

La co-localización de células T-células dendríticas se lleva a cabo en las zonas T de los órganos linfoides secundarios. El encuentro del antígeno en el contexto de co-estimulación adecuado lleva a la división de los linfocitos, lo que resulta en una expansión, y después de varios días, a la adquisición de funciones efectoras, las cuales eliminan al patógeno del organismo [23]. A diferencia de las células T vírgenes, las células T efectoras son capaces de producir citocinas, matar a las células que expresan antígeno (en caso de que sean linfocitos T citotóxicos, CTLs), modificar el comportamiento de otros leucocitos (en caso de ser linfocitos ayudadores, T helper) y expresar moléculas de homing que les permiten migrar a la fuente de su antígeno en los tejidos periféricos. Así, las células efectoras que migran a la piel son preferentemente generadas en los ganglios linfáticos de la piel, mientras que los órganos linfoides secundarios intestinales producen poblaciones que migran a la lámina propia del intestino instruidas probablemente por las células dendríticas que las activaron [24, 25]. Una vez activadas, las células T migran hacia la médula para abandonar el ganglio por los canales eferentes de la linfa, algunas células T activadas, adquieren el fenotipo T helper y migran hacia la frontera entre la zona T y B donde activan a los linfocitos B.

La mayoría de las células efectoras mueren cuando el antígeno ha sido eliminado, pero una pequeña fracción permanece como células de memoria, estas células de memoria se dividen en células efectoras de memoria que migran hacia los tejidos periféricos, y en células de memoria central que continúan re-circulando a través de los órganos linfoides secundarios en donde montan una respuesta secundaria si vuelven a encontrar a su antígeno [26].

Los linfocitos B entran al ganglio también a través de las HEVs en la zona T pero continúan migrando hacia la región externa de la corteza, la zona B, donde buscan a su antígeno y son estimuladas por las FDCs, una vez estimuladas se localizan en los folículos en la frontera entre las zonas T y B para su activación por las células T helper. Las células B plasmáticas migran hacia la médula donde liberan anticuerpos hacia los canales eferentes de la linfa.

En resumen, los ganglios linfáticos tienen importantes funciones en el mantenimiento del sistema inmune: reclutar un gran número de linfocitos de la sangre, colectar antígeno y células dendríticas de tejidos periféricos, proveer el ambiente adecuado para provocar una respuesta efectora primaria o secundaria específica o promover tolerancia antígeno-específica y mantener a las células de memoria central para que sean capaces de montar una respuesta específica cuando sea necesario. Para llevar a cabo estas diversas funciones, los participantes de la respuesta adaptativa deben migrar hacia los ganglios linfáticos y encontrar su lugar específico dentro de ellos.

La estructura altamente organizada de los órganos linfoides secundarios aumenta la sensibilidad del reconocimiento de antígeno y soporta la regulación apropiada de la activación y maduración de los linfocitos que responden al antígeno [27].

1.3 LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES

1.3.1 Las quimiocinas

Las quimiocinas constituyen una gran familia de proteínas de bajo peso molecular (de 8 a 12 kDa), estructuralmente relacionados, cuya función principal, junto con los receptores de adhesión, es dirigir la migración leucocitaria. Las quimiocinas pueden ser consideradas como los factores de organización del sistema inmune ya que coordinan la arquitectura micro ambiental de los órganos linfoides primarios y secundarios en condiciones homeostáticas y patológicas. Además de regular el tráfico leucocitario, las quimiocinas también participan en angiogénesis y/o angiostasis, organogénesis de los órganos linfoides primarios [28] y secundarios [9], curación de las heridas, metástasis, en la activación de leucocitos, desgranulación de eosinófilos, basófilos y neutrófilos [29-31], en la activación de integrinas [32, 33], y presentan actividad antimicrobiana [34] y antiviral [35].

La familia de las quimiocinas consta de aproximadamente 50 miembros con secuencias altamente conservadas. Las quimiocinas se clasifican en 4 subfamilias principales dependiendo de la posición de dos de las cuatro cisteínas altamente conservadas en su extremo aminoterminal. En las quimiocinas del tipo CXC, las dos cisteínas están separadas por un aminoácido, mientras que en las quimiocinas del tipo CC, estas dos cisteínas no están separadas. Las excepciones para esta clasificación son las quimiocinas XC que carecen de dos de las cuatro cisteínas conservadas y CX₃CL1 en la cual tres aminoácidos separan las cisteínas.

Alternativamente, las quimiocinas pueden ser divididas en subfamilias de acuerdo a su función [36-38] en quimiocinas inflamatorias y quimiocinas homeostáticas, aunque no es una clasificación muy aceptada, sirve para entender la biología de las quimiocinas. Por ejemplo, la expresión de quimiocinas como CXCL9 y CXCL10, es regulada positivamente en condiciones de inflamación y son producidas por los leucocitos activados, por células de tejido así como por tumores. Controlan el reclutamiento de leucocitos efectores, con lo que determinan la composición de los infiltrados inflamatorios. La mayoría de las quimiocinas inflamatorias muestran un amplio rango de atracción y actúan tanto en células del sistema inmune innato como en células del sistema inmune adaptativo. En contraste, las quimiocinas homeostáticas, como CCL19, CCL21 y CXCL13, se expresan constitutivamente en sitios no inflamados. Este tipo de quimiocinas son las responsables de la regulación del tráfico de precursores linfoides durante la hematopoyesis en la médula ósea y el timo, controlan el tráfico celular hacia

y en bazo y ganglios linfáticos, y contribuyen al mantenimiento de tejidos periféricos sanos. Aunque esta clasificación no es muy aceptada, es útil para entender la biología de las quimiocinas, aunque hay varias quimiocinas que están pobremente definidas y que no pueden ser atribuidas a ninguna de las dos categorías funcionales [37, 39].

Las quimiocinas presentan una estructura terciaria conservada, con un asa en el extremo amino-terminal, seguido de tres hojas β plegadas antiparalelas interconectadas por asas, y una hélice α en el extremo carboxilo-terminal [40-42]. Las quimiocinas forman dímeros y tetrámeros a concentraciones fisiológicas [40]. Esta multimerización les permite interactuar con glicosaminoglicanos (GAGs) altamente sulfatados, como el heparán sulfato [43, 44], aunque se ha demostrado que algunas quimiocinas como CXCL18, pueden tener actividad como monómeros [45].

1.3.2 Los receptores de quimiocina

Las quimiocinas ejercen sus efectos mediante la interacción con receptores celulares de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G presentes en la célula blanco. Estos receptores se conforman de aproximadamente 350 aminoácidos con un peso molecular de cerca de 40 kDa. El dominio extracelular consiste del extremo amino-terminal y tres asas extracelulares que actúan en conjunto para unir al ligando. La región intracelular se compone de tres asas y el extremo carboxilo-terminal. De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, los receptores de quimiocina pertenecen a la familia de receptores tipo rodopsina de clase A [46]. Aunque estos receptores son similares a otros receptores de siete dominios transmembranales, los receptores de quimiocinas comparten ciertas características estructurales, como la secuencia de aminoácidos altamente conservada DRYLAIV en la segunda asa intracelular y una cisteína conservada en el extremo amino-terminal y otra en la tercer asa extracelular que posiblemente formen puentes bisulfuro que les permita tener la estructura necesaria para la unión al ligando. Mediante el uso de receptores quiméricos se ha determinado que el dominio amino-terminal es el responsable de la selectividad por el ligando [47].

Se han reportado 18 receptores de quimiocinas, muchos de los cuales unen a más de un ligando, aunque esta unión se da generalmente entre miembros de la misma familia estructural. La expresión de los receptores de quimiocinas es heterogénea entre los distintos tipos de leucocitos y se regula a nivel transcripcional [48]. Se ha demostrado que el estado de activación de las células puede regular la expresión de receptores de quimiocinas [49-51], así como los factores solubles presentes en el ambiente como citocinas [52, 53].

1.3.3 La señalización mediada por receptores de quimiocinas

El movimiento de los leucocitos involucra varios fenómenos, como cambios en la forma de la célula, cambios en la adhesividad de las integrinas y el reciclaje de integrinas en el borde líder de las células (leading edge). Estos eventos están mediados por las señales de fosforilación mediadas a través de los receptores de quimiocina.

El modelo clásico de señalización de un receptor de quimiocina requiere la activación de la vía de proteínas G heterotriméricas (compuestas por las subunidades α , β y γ) después de la unión de la quimiocina. La mayoría de estas respuestas son inhibidas por la toxina Pertussis, indicando que son miembros de la subfamilia de proteínas G inhibitorias (G_i) las que están principalmente asociadas a los receptores de quimiocinas. Se ha demostrado la asociación física de la subunidad $G\alpha_i$ a varios receptores de quimiocina como resultado de la unión de la quimiocina como CCR2, CCR5 y CXCR4 [54-57].

La activación del receptor de quimiocina por su ligando, provoca un intercambio de GDP, unido a la subunidad $G\alpha$ de la proteína heterotrimérica ($G\alpha\beta\gamma$), por GTP. Esto trae como consecuencia la activación de la subunidad $G\alpha_i$ y su disociación del complejo $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha_i$ unida a GTP se une al receptor, mediante su interacción con una o varias asas intracelulares [58]. Las subunidades $G\beta\gamma$ inducen la activación de algunos tipos de fosfolipasa C (PLC) [59], que hidrolizan al fosfolípido fosfatidilinositol bifosfato ($PI(4,5)P_2$), para producir inositol trifosfato ($I(4,5,6)P_3$) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico provocando movilización de Ca^{2+} , que en conjunto con el DAG activa varias isoformas de la proteína cinasa C (PKC), misma que después activa una cascada de señalización intracitoplásmica y en el núcleo. El complejo $G\beta\gamma$ también actúa como una proteína de anclaje que facilita la interacción del receptor con otras vías, como la de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK), que están involucrados en la desensibilización del receptor [60-62] (Fig 1).

La subunidad $G\alpha$ es una GTPasa, así cuando el GTP unido a esta subunidad es hidrolizado se induce la disociación de $G\alpha$ de sus efectores y la reasociación de esta con las subunidades $G\beta\gamma$, apagando así las vías de señalización inducidas por las proteínas G. La baja tasa de hidrólisis de GTP por las proteínas $G\alpha$ es regulada por interacciones con proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) que regulan negativamente la señalización por proteínas G [63, 64].

La actividad de PI3K es rápidamente estimulada por activación con quimiocinas como CCL5 y CXCL12, lo que resulta en la producción de segundos mensajeros (lípidos fosforilados en posición 3) que activan a las cinasas PKC, AKT y la vía de Ras [65]. Esta activación está relacionada con la adhesividad de integrinas, migración celular y polarización. La proteína cinasa de adhesión focal (FAK), se fosforila en respuesta a la estimulación del receptor con quimiocina por su ligando, lo que le permite asociarse con la subunidad p85 de PI3K. La activación de FAK, induce la fosforilación de la proteína de citoesqueleto paxilina y la asociación con su receptor. La inhibición de la activación de PI3K impide la polarización de moléculas de adhesión y de varias proteínas de citoesqueleto como el complejo ezrina/radixina/moesina (ERM) [66]. Otros efectores de PI3K incluyen GTPasas de bajo peso molecular como Rho, Rac y Cdc42, que participan en la regulación del citoesqueleto de actina y en la adhesión celular [67, 68].

Los receptores de quimiocinas son capaces de activar la transcripción de genes por medio de la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), además, esta vía fosforila y activa a la fosfolipasa A 2 citoplásmica (cPLA2) que lleva a la producción de ácido araquidónico [69] y leucotrienos [70] implicados en la polimerización de actina, necesaria para la migración celular (Fig 1).

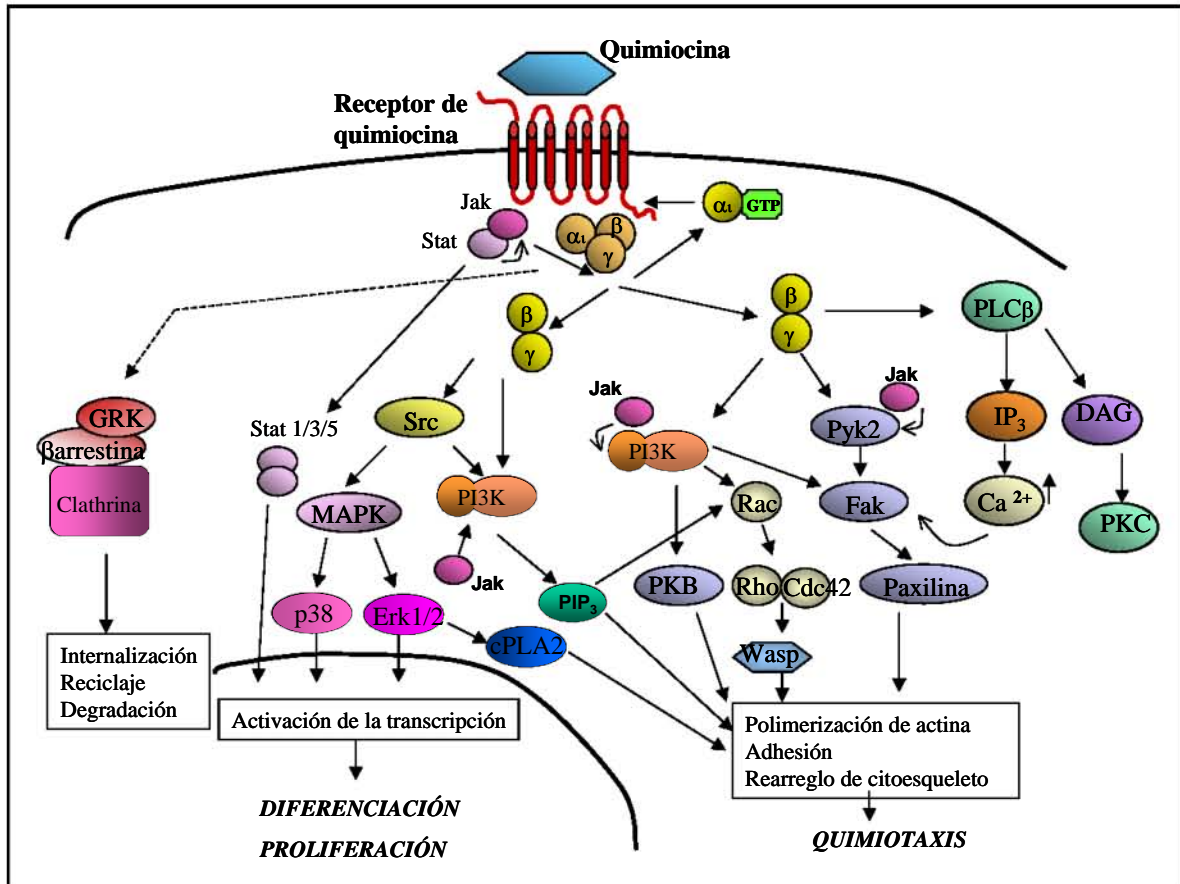


Fig 1. Representación de las vías de señalización activadas por los receptores de quimiocinas.

La mayoría de las respuestas inducidas por los receptores de quimiocinas son inhibidas por la toxina pertussis, sin embargo, en algunos casos, esta toxina no bloquea la respuesta, indicando que otras proteínas distintas a las del tipo G_i pueden estar involucradas en la señalización de quimiocinas [58].

De manera similar a lo observado con otros receptores acoplados a proteínas G, algunos receptores de quimiocinas como CCR2[71], CCR5 [56] y CXCR4 [57] se dimerizan con la unión de su ligando, lo que lleva a la iniciación de las cascadas de señalización inducidas por los receptores de quimiocinas. Esta dimerización induce la activación de varios miembros de la vía de las cinasas de Janus y de los factores de transcripción STATs (Signal Transducers and Activator Transcription Factors), conocida como la vía Jak-STAT.

En líneas celulares transfectadas con CCR5, la estimulación del receptor con su ligando CCL5, induce la fosforilación del receptor en la tirosina del motivo DRYLAIV, la asociación de Jak1, pero no de Jak2 o Jak3, al receptor y la activación de STAT 5b [56], y en linfocitos T, STAT1 y STAT3 se fosforilan en respuesta a la estimulación de

CCR5 con CCL5 y CCL3 [72]. En una línea de células T, la estimulación CCL5, induce la fosforilación de Jak2 y Jak3 [73].

En líneas celulares transfectadas con CCR2, Jak2 se fosforila en respuesta a la estimulación con CCL2 [55]. En líneas celulares de células T, Jak2 y Jak3 son fosforilados y se asocian al receptor en respuesta a la estimulación por su ligando, CXCL12, lo que promueve la activación de STAT1, 2, 3 y 5b [57]. En una línea de células progenitoras hematopoyéticas, con la estimulación de CXCR4, Jak1, Jak2 y Tyk2 se fosforilan, lo que activa a STAT2 y STAT4 [74]. En timocitos de ratón, la estimulación de CXCR4 y CCR9 por sus ligandos induce la fosforilación de Jak3 [75].

En un modelo de artritis reumatoide en rata, se demostró la fosforilación y asociación con el receptor de quimiocina de varios miembros de la familia Jak y la subsiguiente activación de miembros de la familia STAT in vivo, Jak1, STAT1 y 3 con CCR1 y CCR5 y de Jak2, STAT 1 y 3 con CCR2 [76]. En células de ganglios linfáticos de ratón, la estimulación de CCR7 por sus ligandos CCL19 o CCL21, induce la fosforilación de Jak2 [77]. Todo lo anterior indica que el tipo de Jak/STAT reclutada depende del tipo celular (Tabla 1).

Además, mediante el uso de ratones deficientes en Jaks o de inhibidores de esta vía, se ha demostrado que la fosforilación de las Jaks es requerida para la migración inducida por diversos receptores de quimiocinas como CXCR4 [57, 74, 75], CCR9 [75] y CCR7 [77]. No está bien definida la vía por la que las Jaks regulan la migración inducida por quimiocinas pero existen reportes que indican su participación en la fosforilación de cinasas de adhesión focal como FAK, RAFTK (Pyk2), p130Cas, Crk y paxilina vía su asociación con la subunidad p85 de p13K [74] y la activación de proteínas que regulan la morfología y movilidad celular como Vav/Rho [78] (Fig 1).

Las vías de señalización propuestas, son la suma de la información para varios receptores de quimiocinas, sin embargo es necesario estudiar la señalización inducida por cada receptor de quimiocinas, ya que éste parece ser distinto dependiendo del tipo de receptor y del tipo celular [77].

| Tabla 1 | | | |
|-------------------------------|--|--|---|
| Receptor de Quimiocina | Tipo Celular | Tipo de Jak fosforilada | Tipo de STAT fosforilada |
| CCR1 | Células de rata | Jak1 | STAT1, 3 |
| CCR2 | HEK 293 Células de rata | Jak2 Jak2 | N. D STAT 1, 3 |
| CCR5 | HEK 293 Línea celular de linfocitos T (PM1T) Células de rata Línea celular de ovario de hamster (CHO) | Jak1 Jak2, Jak3 Jak1 Jak2 | STAT 5b STAT 1, 3 STAT 1, 3 N. D |
| CXCR4 | Línea celular de linfocitos T (MOLT4) Línea celular de progenitores (CTS) Timocitos de ratón | Jak2, Jak3 Jak1, Jak2, Tyk2 Jak3 | STAT 1, 2, 3, 5b STAT 2, 4 N. D |
| CCR7 | Células de ganglio de ratón | Jak2 | N. D |
| CCR9 | Timocitos de ratón | Jak3 | N. D |

Abreviaturas:

N.D,

No

Determinado

1.4 LA FAMILIA DE LAS CINASAS DE JANUS

La familia de cinasas de Janus (Jaks) son cinasas de tirosina, en mamíferos, la familia tiene cuatro miembros Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. En ratones, Jak1 se localiza en el cromosoma 4, Jak2 en el cromosoma 19 y Jak3 y Tyk2 en el cromosoma 8. La proximidad de los genes de *Jak3* y *Tyk2* sugiere que uno podría haberse generado a partir del otro por duplicación, sin embargo es difícil concluir cuál es más ancestral. Las Jaks tienen aproximadamente 20 exones, se han descrito formas de arreglo de exones alternativas pero su significado funcional no se conoce. En otros vertebrados como aves y peces, también se han encontrado cuatro miembros de Jaks. En cordados primitivos y en *Drosophila* se ha encontrado una Jak cinasa, Hopscotch, lo que sugiere que la cinasa Jak ancestral surgió antes de la divergencia de vertebrados e invertebrados [79]. Los gusanos nemátodos y algunos protistas no tienen Jaks, sin embargo, expresan miembros de la familia de factores de transcripción STATs [80] -que en vertebrados interactúan con Jaks entre otras proteínas-, sugiriendo que las Stats surgieron en la evolución antes que las Jaks. A la fecha, se han identificado siete STATs en células de mamíferos, estas se localizan como clusters en los cromosomas: Stat1 y Stat4 en el cromosoma 1, Stat2 y Stat6 en el cromosoma 10 y Stat3, Stat5a y Stat5b en el cromosoma 11 en el modelo murino [81].

1.4.1 Características Estructurales

La estructura tridimensional de las Jaks no se conoce, esto en parte porque son proteínas relativamente grandes, de más de 1,100 aminoácidos, con masas moleculares de 120 a 140 kDa. A partir de su estructura primaria, se han identificado siete dominios putativos estructurales que están conservados entre las Jaks de mamíferos, aves, peces e insectos. Estos dominios Jak de homología (JH) se numeran del extremo carboxilterminal al aminoterminal (Fig 2). El dominio JH1 tiene todas las características típicas de un dominio de tirosina cinasa eucarionte. Este dominio está muy relacionado con los dominios de cinasa de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico, sugiriendo que la familia de las Jaks pudo originarse a partir de esta gran familia de cinasas [82]. Adyacente al dominio JH1 se encuentra el dominio tipo cinasa JH2, que es una pseudocinasa catalíticamente inactiva. Esta arquitectura en tándem de los dominios de cinasa es la característica distintiva de las cinasas de Janus, y de donde toman su nombre. Aunque el dominio de pseudocinasa carece de actividad catalítica, tiene una función reguladora esencial [83, 84].

El extremo aminoterminal de las Jaks contiene un dominio tipo SH₂ (JH3 y JH4) y un dominio de homología (JH6-JH7) de Banda 4.1, tipo ezrin, radixin, moesin (FERM). El dominio FERM tiene 300 aminoácidos, y media interacciones con proteínas transmembranales como receptores de citocinas, y en algunos casos regula la expresión de superficie de estos receptores [85, 86]. El dominio FERM está implicado también en la asociación de Jaks con cinasas de citoesqueleto, como la asociación de Jak2 con Fak [74], y de Jak3 con Pyk2 [87]. Además, el dominio FERM se une al dominio de cinasa de Jak y regula positivamente su actividad catalítica [88].

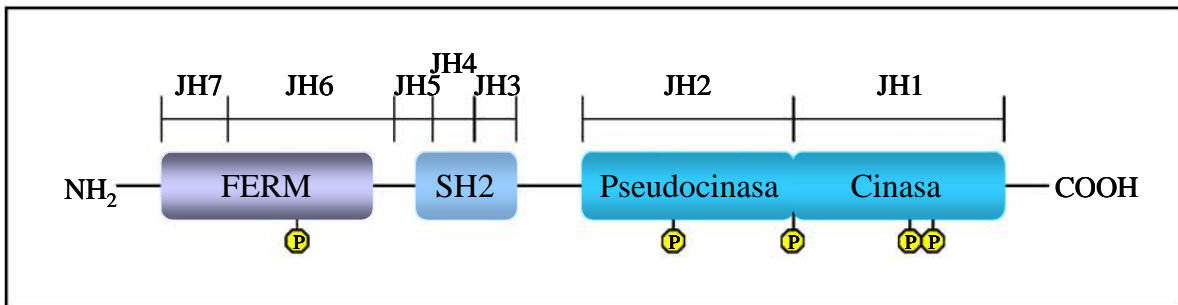


Figura 2. Representación esquemática de la estructura primaria de las cinasas de Janus (Jaks). Contiene los dominios FERM, tipo SH₂, pseudocinasa y cinasa. Los dominios de homología Jak (JH) son una nomenclatura alternativa. El dominio FERM media la unión de Jaks a los receptores de citocina y a otras proteínas. Tanto el dominio FERM como el de pseudocinasa regulan la actividad catalítica del dominio de cinasa. Las Jaks se autofosforilan en varios sitios (P), incluyendo dos en el loop de activación del dominio de cinasa.

1.4.2 Localización y función

En mamíferos, Jak1, Jak2 y Tyk2 se expresan de manera ubicua, en contraste, la expresión de Jak3 es más restringida, se encuentra expresada predominantemente en células hematopoyéticas y está regulada con el desarrollo y la activación [89-91]. A nivel celular, las Jaks se encuentran en el citosol cuando se expresan en ausencia de receptores de citocinas, pero, debido a su asociación con los receptores de citocinas, se localizan normalmente en la membrana y en endosomas junto con los receptores [92, 93].

Un gran número de receptores de citocinas son dependientes de Jak3, ya que esta cinasa se asocia a la cadena gamma común (γ c). Esta familia incluye a la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Jak1 también es necesario para la señalización de estos receptores. La familia de receptores de citocinas que usa la subunidad gp130 es dependiente de Jak1; esta familia incluye a la IL-6, oncostatina M, el factor inhibitorio

de la leucemia (LIF), el factor ciliar neurotrófico (CNF) así como el factor estimulador de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) e interferones (IFNs) [94]. Jak2 es esencial para la señalización de citocinas tipo hormona como la hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO) y la familia de citocinas que señalizan a través del receptor de IL-3 (IL-3, IL-5 y GM-SCF). Jak2 también es importante para citocinas que usan el receptor gp130 y para algunos interferones [95]. Tyk2 es esencial para la señalización de IL-12 y se le ha implicado con la señalización de los receptores Toll [96].

Los ratones deficientes en Jak1 tienen mortalidad perinatal, estos ratones también presentan defectos en el desarrollo y función linfoide [94] (Tabla 2). Los ratones deficientes en Jak2 presentan letalidad al día 12.5 embrionario debida a defectos en eritropoiesis [95]. Los ratones deficientes en Tyk2 son viables y fértiles pero presentan susceptibilidad a infecciones parasitarias y presentan una respuesta defectuosa a LPS. La deficiencia en Jak3 se identificó por primera vez en humanos con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID, por sus siglas en inglés) [97, 98]. Dado que la cadena gamma común (γ_c) señala a través de Jak3, la deficiencia en Jak3 impide la señalización de todas las citocinas que utilizan γ_c , lo que trae como consecuencia un desarrollo y función inmune defectuosos. Las mutaciones en el receptor para IL-7, γ_c y Jak3 en conjunto son las responsables del 70% de los casos SCID [99]. Posteriormente se generaron ratones *Jak3*^{-/-} que exhiben el fenotipo SCID, sin embargo, no presentan defectos no inmunes [100-102].

| Tabla 2 | | |
|--|--|--|
| Funciones de las cinasas de Janus | | |
| Gen | Fenotipo de los ratones knockout | Citocinas |
| <i>Jak1</i> | Viables pero mueren posnatalmente debido a defectos neurológicos, SCID | Familia de receptores γ_c o gp130; IFNs |
| <i>Jak2</i> | Letalidad a nivel embrionario debida a defectos en eritropoiesis | Familia de receptores gp130, IFN γ , citocinas tipo hormona (EPO, GH, PRL, TPO), IL-3 |
| <i>Jak3</i> | Viables y fértiles, SCID | Familia de receptores γ_c |
| <i>Tyk2</i> | Viables y fértiles, susceptibles a infecciones parasitarias, resistentes a LPS | IL-12, LPS |

1.4.3 Fenotipo de los ratones *Jak3* *-/-*

Los ratones deficientes en *Jak3* o γc presentan severos defectos en el desarrollo de linfocitos T, B y células NK, indicando que las citocinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) que señalizan a través de esta cinasa, son importantes para el desarrollo normal de estos tipos celulares [103]. Los ratones deficientes en *Jak3* o γc presentan una celularidad similar a los ratones normales aunque con un bloqueo en el desarrollo de las células B en la médula ósea, en el estadio pro-B a pre-B, debido a la ausencia de señalización por IL-7R, ya que esta promueve tanto el rearreglo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas como la proliferación por distintas vías de señalización [104]. La señalización inducida por IL-7 también es necesaria para el rearreglo de la cadena γ del TCR por lo que los ratones deficientes en *Jak3* o γc no tienen linfocitos T $\gamma\delta$ [101, 105, 106]. El desarrollo de las células NK es dependiente de IL-15 por lo que estos ratones no tienen células NK [107, 108]. El timo de los ratones deficientes en *Jak3* contiene entre el 0.1% y el 10% del número normal de células. A pesar de este número tan reducido en timocitos, el patrón de tinción con CD4/CD8 en el timo adulto es relativamente normal [102]. El análisis de subpoblaciones DN reveló una disminución en los timocitos más inmaduros (estadio DN1) al día 14 de gestación debido probablemente a un defecto en la llegada de progenitores de la médula ósea hacia el timo [75, 109]. Además, este ratón presenta un bloqueo en el paso de DN a DP al día 16 de gestación. El fenotipo del ratón *Jak3**-/-* es muy similar a los ratones deficientes en IL-7, IL-7R y γc por lo que parte del fenotipo observado se debe a la falta de señalización mediada por IL-7 [103, 110] que actúa como un factor de supervivencia y proliferación en la etapa de DN [111] y en parte a la falta de señalización de receptores de quimiocinas importantes en estos estadios y que señalizan a través de *Jak3* [75].

A pesar del reducido número de timocitos, los ratones *Jak3**-/-* presentan números normales de linfocitos T CD4, pero no CD8, en periferia, y poseen ganglios linfáticos periféricos muy pequeños [112], fenotipo similar al observado en los ratones *IL-7R α* *-/-* y γc *-/-* [9, 105], que son las cadenas que forman el receptor heterodimérico para la transducción de señales de IL-7. El examen microscópico de los sitios donde no hay ganglios detectables macroscópicamente en los ratones *IL-7R α* *-/-*, reveló la presencia de rudimentos de ganglios linfáticos [9]. Este defecto en los ganglios linfáticos no se debe a la ausencia de la señalización de IL-7 durante el desarrollo de los linfocitos, ya que el

ratón *RAG*^{-/-} (deficiente en linfocitos) no presenta ausencia de ganglios, sino a defectos en la señalización del receptor de IL-7 en el desarrollo del ganglio [9].

Sin embargo, estas células son fenotípica y funcionalmente anormales. Expresan altos niveles de CD44 y CD69, y bajos niveles de CD62L [112-114], fenotipo característico de linfocitos activados o de memoria. Esta activación parece depender de activación por antígeno ya que ratones deficientes en *Jak3* que expresan un TCR transgénico, presentan un fenotipo vírgen [115]. Entonces, parece que la activación policlonal de estos linfocitos depende de interacciones con lo propio o con antígenos del ambiente. Los linfocitos de los ratones *Jak3*^{-/-} son anérgicos y no responden estímulos mitogénicos [116], además son más susceptibles a apoptosis y tienen una deficiencia severa en la producción de IL-2 debido principalmente a la supervivencia limitada en cultivos a largo plazo de los linfocitos de los ratones *Jak3*^{-/-} [113].

El bazo de los ratones deficientes en *Jak3* jóvenes es más pequeño que en los ratones normales aunque el número de células aumenta con la edad hasta desarrollar esplenomegalia severa. Estos ratones además presentan defectos en mielopoiesis conforme los ratones envejecen, como un aumento significativo de células mieloides/premonocíticas en sangre periférica, médula ósea y bazo [117].

Los defectos encontrados en la periferia de los ratones deficientes en *Jak3* no son el resultado de una maduración defectuosa en el timo. Cuando se restauró el desarrollo normal de linfocitos T reconstituyendo el timo de los ratones *Jak3*^{-/-} con *Jak3* utilizando el promotor proximal de *Lck*, el defecto en los linfocitos T de periferia no se corrigió. Al salir las células del timo pierden la expresión de *Jak3* y estos ratones acumulan grandes números de células T con fenotipo activado/memoria y que presenta los mismos defectos funcionales que el ratón deficiente en *Jak3*, lo que demostró que *Jak3* tiene un papel crucial en la periferia en las células T [112].

1.4.4 Activación de la vía Jak-Stat

Las Jaks están asociadas constitutivamente a regiones ricas en prolina en la región proximal a la membrana de los receptores de citocinas, aunque en algunos casos la interacción entre las Jaks y el receptor se incrementa con la unión del ligando al receptor. El modelo de activación clásico de la vía de las Jaks propone que con la unión de la citocina, se promueve un cambio conformacional en el receptor que promueve la activación de *Jak* a través de la interacción recíproca de dos Jaks yuxtapuestas y la auto- y/o-transfosforilación de residuos de tirosina en el loop de activación del dominio de cinasa. La autofosforilación en el loop de activación regula positivamente la actividad

de cinasa, sin embargo, en Jak3 la fosforilación en esta región puede aumentar (tirosina 980) o inhibir (tirosina 981) la actividad catalítica (Fig 2) [118]. Otros sitios de autofosforilación se han identificado, como el residuo conservado entre los dominios JH1 y JH2 en Jak2 (tirosina 813) y Jak3 (tirosina 785) [119], que sirve para reclutar la proteína adaptadora SH2-B β , que regula positivamente la actividad de Jak2. En Jak3 la autofosforilación de las tirosinas 221 y 570 están involucrados en la regulación negativa de la cinasa (Fig 2) [120]. El mecanismo exacto de la autofosforilación de las Jaks, así como su relevancia funcional y mecanismo de activación, se desconocen.

Una vez activadas, las Jak fosforilan residuos de tirosinas en los receptores generando así, sitios de anclaje para los STATs que se unen a los receptores por medio de un dominio SH2. Los STATs reclutados a la membrana son fosforilados por las Jaks activadas. Los STATs fosforilados forman homo y/o heterodímeros, lo que les permite translocarse al núcleo donde regulan la expresión de varios genes [121] (Fig 3) entre los que se encuentran algunas quimiocinas y receptores de quimiocinas [52, 53]. Esta vía es importante porque garantiza una señalización rápida de la superficie celular hacia el núcleo.

Además de las STATs, las Jaks interaccionan con otras proteínas como PI3K en respuesta a estimulación con quimiocinas, y de esta interacción depende en parte, la fosforilación de algunas proteínas de adhesión focal como FAK, RAFTK (Pyk2), p130, Crk y paxilina, importantes para la adhesión celular y la migración [74].

Se ha demostrado la asociación de Jak3 a la cadena ζ del TCR y su activación al estimularlo [122]. Además se ha reportado que las Jaks son activadas por una variedad de receptores estructuralmente diversos además de los receptores de citocinas, como receptores de muerte (CD40), receptores de cinasa de tirosina y receptores acoplados a proteínas G como el receptor de serotonina [123], angiotensina [124] y varios receptores de quimiocinas como CXCR4 [57, 74, 75], CCR9 [75], CCR7 [125]. También se ha descrito la fosforilación de miembros de la familia STAT en respuesta a estimulación con quimiocinas como CCL2 [55] y CCL5 [72].

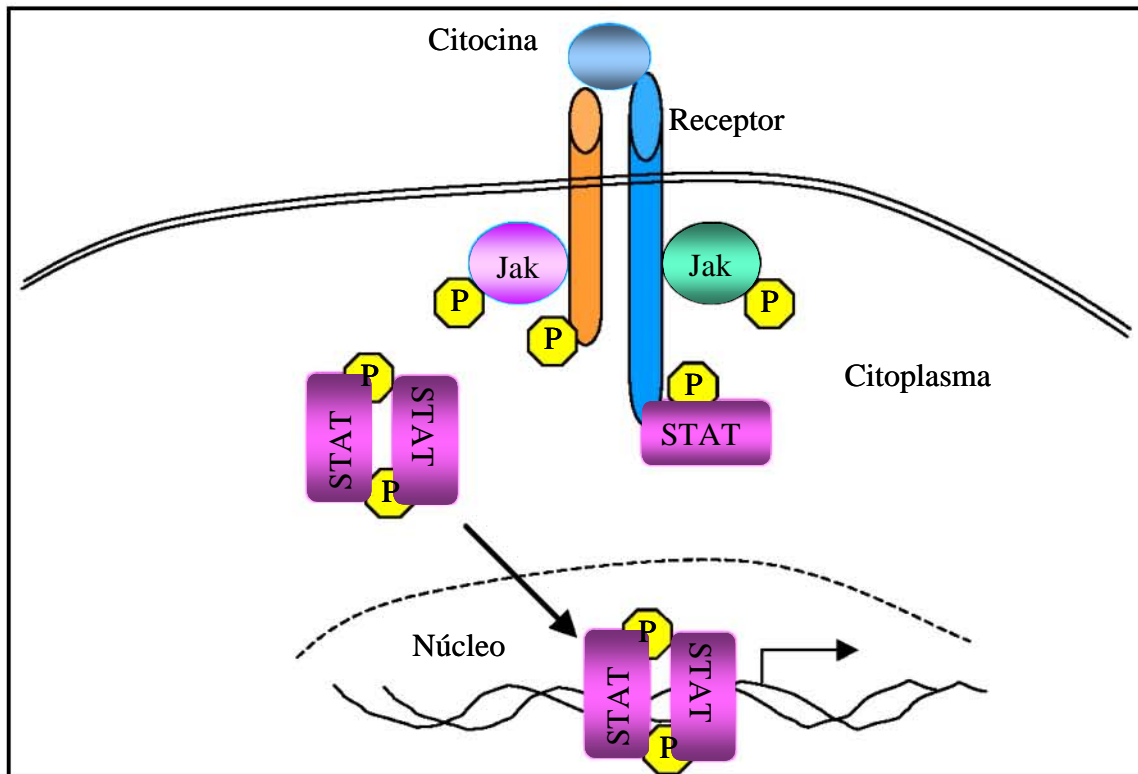


Figura 3. Las citocinas se unen a receptores homo o heterodiméricos, los cuales están asociados constitutivamente con las Jaks. Se cree que las Jaks se activan por un cambio conformacional en el receptor que les permite a las Jaks asociadas auto y/o transfosforilarse, una vez fosforiladas las Jaks fosforilan en residuos de tirosina al receptor de citocinas. Los STATs se unen a las cadenas fosforiladas del receptor, permitiendo a las Jaks fosforilar a los STATs. Los STATs fosforilados forman homo o heterodímeros y se translocan al núcleo donde regulan la expresión de varios genes.

1.4.5 Regulación negativa de la vía Jak/STAT

La degradación de las STATs es uno de los mecanismos por los cuales la vía Jak-STAT puede ser regulada negativamente. Se ha demostrado que Stat1 es un blanco de degradación por ubiquitina/proteasoma [126]. Algunos STATs presentan varias formas por splicing alternativo y degradación. Stat 1 y Stat3 tienen formas trucadas que carecen de la región C-terminal que se cree que actúan como dominantes negativas [127, 128]. La fosfatasa de tirosina, Shp1 regula negativamente la señalización de varias citocinas y se asocia a Jak2 y Tyk2 lo que cataliza la desactivación de las Jaks, así como la desfosforilación de los residuos de tirosina, que fosforilados permiten la asociación de las STATs [129]. También se ha demostrado asociación de Shp2 con Jak1 y Jak2. Existen además, varias familias de proteínas que regulan negativamente esta vía, ya sea

actuando sobre el receptor o uniéndose directamente a las Jaks mediante sus dominios SH2 como: CIS [130], JAB, SSI e importantemente SOCS [131-133].

1.5 LAS QUIMIOCINAS EN EL TRÁFICO DE LINFOCITOS

Los órganos linfoides son estructuras especializadas que permiten el desarrollo y la activación de los linfocitos T y B. El contacto entre las células linfoides y del estroma en médula ósea y timo es un prerrequisito para el correcto desarrollo de las células B y T. Las quimiocinas producidas constitutivamente en estos órganos, son requeridas para el posicionamiento correcto y la interacción de células linfoides y no linfoides, creando micro ambientes eficientes para el desarrollo. Mientras que los órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos son los lugares donde las células B y T entran en contacto con células presentadoras de antígeno para iniciar una respuesta inmune. Las quimiocinas inducen la separación de los linfocitos T y B en microambientes físicamente distintos como las áreas T y B donde las quimiocinas atrayentes de un subtipo específico son expresadas.

1.5.1 Órganos linfoides primarios

El desarrollo de células B se da en la médula ósea, donde las células pre-pro B se desarrollan hacia pro, pre y células inmaduras que salen a flujo sanguíneo. CXCR4 juega un papel central durante el desarrollo de las células B ya que la ausencia de este receptor o de su ligando, bloquea la linfopoyesis de células B [134-136]. Este receptor también está implicado en el desarrollo de células B en el hígado, durante la embriogénesis [137]. Los ratones deficientes en CXCR4 presentan un número incrementado de precursores en sangre [138], sugiriendo que las señales inducidas por CXCR4 funcionan como un factor de retención de los precursores, pero no en las células B inmaduras, ya que a pesar de tener una expresión similar de CXCR4 estas células no son retenidas en la médula ósea. Se ha demostrado que los precursores transducen las señales de CXCR4 de manera diferente que las células B inmaduras y las células B vírgenes [139]. Los precursores de células B se caracterizan por patrones definidos de expresión de receptores de quimiocinas. Las células pre-pro B migran únicamente en respuesta a estimulación de CCR9. La respuesta a la estimulación de CCR7 y CXCR5 se incrementa durante la maduración de pro a pre a células inmaduras [140]. Las células B inmaduras migran hacia el bazo, acumulándose en la frontera de la zona T – B, donde las células que reciben las señales adecuadas requeridas para la entrada a los folículos [141], incrementan la expresión de CXCR5, lo que les permite migrar hacia los folículos de células B que expresan CXCL13 [140].

La colonización del timo ocurre al día 11.5 del desarrollo embrionario en ratón, previo a la vascularización del timo, los pre-timocitos llegan al primordio tímico vía

vesículas sanguíneas adyacentes a éste. Se ha demostrado el papel parcial pero significativo de las quimiocinas CCL21 y CCL25 en este estadio temprano de colonización. Las quimiocinas CCL21 y CCL25 son expresadas por el primordio tímico, junto con otras quimiocinas [142]. En los ratones, mutantes naturales para CCL21 y CCL19 (*plt/plt*: paucity of lymph-node T cells), y en los ratones deficientes en CCR7, el número total de timocitos está reducido comparado con el normal hasta el día E14.5 [143]. Los ratones deficientes en CCR9, muestran una disminución de una tercera parte en la celularidad total del timo comparado con los ratones normales hasta el día E17.5 [144]. Tanto en ausencia de CCR7 como de CCR9, la celularidad del timo en estadios más tardíos, del día E18.5 en adelante, se restaura, debido probablemente a una proliferación incrementada.

En ratones adultos, los pre-timocitos entran al timo adulto vascularizado por la región cortico-medular. Se ha demostrado que esta colonización está regulado por la interacción adhesiva entre la P-selectina expresada en el estroma tímico y la glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (PSGL1) en los progenitores linfoides [145]. Los receptores de quimiocinas implicados en el reclutamiento de estos precursores, no están claramente establecidos, pero se sugiere que CCR9 podría estar implicado [146].

Después de la entrada al timo, los progenitores comienzan su desarrollo hacia células T. De la región cortico-medular los timocitos migran hacia la zona sub-cortical, CCR7 es requerido para la acumulación de estos progenitores en la zona sub-cortical. Los timocitos en el estadio DN 1-2 expresan altos niveles de CCR7, en los ratones deficientes para CCR7 o para sus ligandos (*plt/plt*), las células DN1-DN2 se acumulan en la región cortico-medular, mientras que la celularidad de los timocitos en los estadios DN3 y DN4 se reduce [147]. Los timocitos DP, reinducen la expresión de CCR7, que se requiere para la migración hacia la médula. La sobreexpresión de CCR7 induce la migración prematura de timocitos DP hacia la médula [148] y los ratones deficientes en CCR7 presentan timocitos SP en la corteza en lugar de en la médula [149].

En los ratones deficientes para CCR9, los timocitos inmaduros, no se acumulan en la zona sub-cortical sino que se distribuyen a través de la corteza [150], no obstante su localización errónea, la maduración de estos timocitos hacia SP no parece tener defectos, sugiriendo que la señalización de CCR9 funciona como una señal de atracción/retención a esta zona y que esta migración no es un prerrequisito para el desarrollo tímico.

Los timocitos SP seleccionados positivamente aumentan la expresión de CCR7 y salen del timo hacia la sangre para unirse al reservorio de células T vírgenes periféricas. Los receptores involucrados en la salida de los timocitos hacia la periferia reportados son CCR7 [149] y el receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P₁), un receptor acoplado también a proteínas G_i [151].

Aunque las quimiocinas claramente regulan la localización de los timocitos y la arquitectura del timo, los efectos en los timocitos de la ausencia de señalización de un solo receptor de quimiocina son moderados, ya que la timopoyesis, podría depender del uso de quimiocinas y receptores de quimiocinas que pudieran reemplazarse funcionalmente unos a otros, por lo que solo el estudio de ratones deficientes en varios receptores de quimiocinas en conjunto podría aclarar el papel de las quimiocinas en este proceso.

1.5.2 Órganos linfoides secundarios.

El principal punto de entrada de los linfocitos de sangre periférica hacia los ganglios linfáticos periféricos, mesentéricos y placas de Peyer, pero no al bazo, son las HEVs. Para que un linfocito entre al ganglio vía HEVs debe ocurrir una cascada de cuando menos cuatro eventos. Estas cascadas de adhesión son iniciadas por un paso de tethering (besamiento) que les permite a los linfocitos pegarse débilmente al endotelio vascular, las células que se han unido son empujadas hacia la pared por el torrente sanguíneo lo que resulta en un rodamiento lento por la pared vascular (etapa 1). Después, las células que van rodando encuentran estímulo en el endotelio que involucra receptores específicos (etapa 2). La activación de estas integrinas les permite a los linfocitos pegarse firmemente (etapa 3) y transmigrar por el endotelio (etapa 4) [23] (Fig 4).

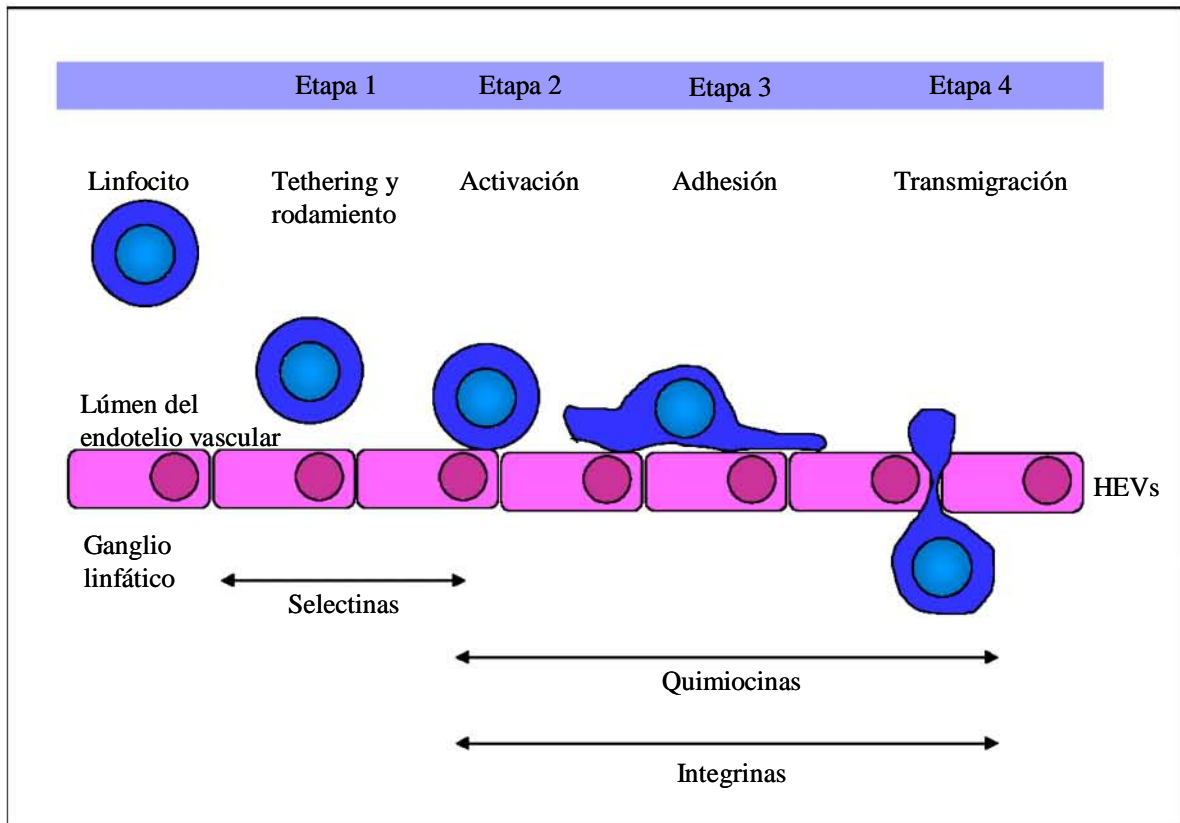


Fig 4. Los linfocitos ruedan a través del endotelio vascular a través de interacciones de selectinas. El lumen del endotelio vascular presenta CCL21 y en menor grado CCL19 y CXCL12. La interacción de las quimiocinas con su receptor induce la activación de integrinas que le permiten a la célula adherirse firmemente al endotelio y finalmente transmigrar.

En general, el tethering y el rodamiento están mediados por la unión de L-selectina en linfocitos (CD62L) con PNAd (CD34 y GlyCAM-1) en el endotelio vascular de ganglios periféricos y con MadCAM-1 en mucosa [152]. Sin embargo algunos ganglios expresan otros ligandos para L-selectina que también son eficientes para este primer paso de adhesión [153]. El pegado firme de los linfocitos T rodantes en las HEVs es mediado principalmente por la unión de la integrina LFA-1 (CD11a/CD18) a ICAM-1 (una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas) en el endotelio vascular, y en algunas cepas, también mediado por la interacción de la integrina $\alpha_4\beta_7$ con VCAM1 pero en mucho menor grado, ya que las HEVs de los ganglios periféricos expresan muy poco VCAM1 [154]. Los linfocitos del ratón deficiente en LFA-1 son incapaces de migrar a los ganglios en una cepa mientras que en otra cepa se reporta una migración residual de linfocitos mediada por $\alpha_4\beta_7$ -VCAM1 [155]. Independientemente del tipo de integrinas involucradas, estas necesitan ser activadas para mediar el arresto firme, la

activación implica un cambio conformacional en el dominio extracelular de la integrina, que le permite pasar de un estado de baja afinidad por ligando a uno de alta afinidad.

Aunque la mayoría de los leucocitos expresan estas integrinas, no entran a los órganos linfoides, el tropismo de los linfocitos depende de las quimiocinas específicas presentadas por el endotelio vascular, que son las causantes de la activación de integrinas [156] en los linfocitos pero no de otros leucocitos en las HEVs. El hecho de que se deba suceder una vía molecular de varios pasos en las HEVs para que exista una trans migración exitosa, explica por qué algunos leucocitos migran a los ganglios y otros no. Por ejemplo, las células polimorfonucleares expresan la L-selectina y LFA-1 pero no CCR7 o CXCR4, por lo que los PMNs efectúan el paso de tethering y rodamiento pero no pueden adherir firmemente al endotelio; o los linfocitos de memoria que sí expresan el receptor de quimiocinas y LFA-1 pero bajan la expresión de L-selectina por lo que son incapaces de efectuar el rodamiento [154, 157].

Los ligandos de CCR7, CCL21 expresado en las HEVs [158], y CCL19 producido por células del estroma y exportado hacia las HEVs [159], son las principales fuentes de activación de integrinas en los linfocitos T [160]. El ratón *plt/plt* muestra una adhesión deficiente de células T a las HEVs y por lo consiguiente migración deficiente hacia los ganglios linfáticos [140]. El ratón deficiente en CCR7 muestra una reducción de la población de células T del 60 al 70% en ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos y del 25% en las placas de Peyer, mientras que la población de células T está enriquecida en sangre, la pulpa roja del bazo y la médula ósea [161]. CXCL12 también participa, aunque en menor grado, durante la adhesión de los linfocitos T a las HEVs [162]. La activación de integrinas en los linfocitos B para la entrada a los ganglios linfáticos periféricos, mesentéricos y placas de Peyer está mediada por CXCR5, CXCR4 y en menor grado por CCR7 [158, 162, 163].

Los linfocitos pegados firmemente al endotelio vascular, transmigran hacia el tejido linfoide. Una vez adentro, los linfocitos T vírgenes migran en respuesta a las quimiocinas CCL21 y CCL19 expresadas en la zona T, mientras que los linfocitos B migran en respuesta a la quimiocina CXCL13 expresada en las áreas foliculares [19]. En los ratones *plt/plt* y los deficientes para CCR7 la migración de las células T no está afectada solamente al nivel de la entrada de las células vírgenes a través de las HEVs sino que también al nivel de localización de las células que han logrado entrar a los órganos linfoides, ya que no presentan zonas T definidas [161, 164]. Lo que indica que CCR7 y sus ligandos son requeridos no solamente para guiar a los linfocitos T vírgenes

a través de las HEVs sino también para dirigirlas a su microambiente correspondiente. El posicionamiento de las células T y B está determinado por una respuesta balanceada hacia CCL21 y CXCL13 [165].

Cuando los linfocitos encuentran a su antígeno en el contexto adecuado, las células T se activan, expresan citocinas inflamatorias y se dividen, estas células también cambian la expresión de sus moléculas de superficie, por ejemplo, un subtipo de linfocitos T CD4 incrementan transitoriamente su expresión de CXCR5 mientras que disminuyen el nivel de expresión de CCR7 [166], lo que les permite migrar hacia la frontera de las zonas foliculares [167, 168], las células B activadas, a su vez incrementan transitoriamente el nivel de expresión de CCR7 así como el nivel de respuesta a este receptor. Esta regulación coordinada de los niveles de receptores de quimiocinas permite un encuentro eficiente de las células T y B en el borde de los folículos donde las células B reciben co-estimulación de las CD4 [169]. La respuesta balanceada por la modulación de la expresión de receptores de quimiocinas es un mecanismo importante para la migración intersticial, aunque la modulación de la respuesta es importante también, ya que aunque en algunos casos los niveles de expresión del receptor de quimiocinas correlaciona con la capacidad migratoria [165] en otros casos no lo hace [170].

Mientras que algunos linfocitos T CD4 proveen ayuda a las células B, otros linfocitos T CD4 y CD8 activados salen de los ganglios a través de las vías eferentes de la linfa y llegan a los sitios de inflamación a través de la sangre. La expresión de altos niveles de ligandos de selectinas y de receptores de quimiocinas como CXCR3 caracterizan a estas células efectoras [167]. En caso de no encontrar a su antígeno en el contexto adecuado, los linfocitos abandonan el ganglio a través de las vías eferentes hacia el flujo sanguíneo por vías dependientes de S1P [151].

A diferencia de la entrada hacia los ganglios linfáticos por las HEVs, en la entrada al bazo, los linfocitos T y B son liberados pasivamente en las cavidades de la zona marginal y la pulpa roja. De allí, los linfocitos son atraídos por los ligandos de CCR7 y CXCR5 probablemente, hacia la pulpa blanca, usualmente, a la frontera entre las zonas B y T [168]. En experimentos de transferencia adoptiva, ambos subtipos se acumulan primero en la zona T (1 hora después de la inyección intravenosa) de donde los linfocitos B migran hacia los folículos (después de 2 a 4 horas) [161]. En ratones deficientes para CXCR5, las células B no forman folículos, sino que se acumulan alrededor de la zona T, probablemente atraídos con baja eficiencia por los ligandos de

CCR7 [171]. Y en ratones deficientes para CCR7, los linfocitos T se acumulan en la cavidad de la zona marginal y la pulpa roja, los bazo de estos ratones son de 2 a 3 veces más grandes comparados con los de los ratones normales [161].

Las quimiocinas, y como consecuencia, los micro-ambientes linfoides ordenados son importantes para la iniciación de la respuesta inmune. Sin embargo, análogo a lo observado con el desarrollo de los timocitos, los receptores de quimiocinas no son siempre indispensables para la generación de las respuestas inmunes. Aunque la deficiencia de CCR7 reduce importantemente la reacción inmune, los animales a los que se les administra antígeno de manera sistémica montan reacciones inmunes comparables, aunque retardadas comparadas con los ratones normales [161], además de que presentan defectos en la regulación negativa de estas respuestas [172]. Así mismo, los ratones deficientes en CXCR5 muestran una producción de anticuerpos similar a la de los ratones normales cuando se les administra antígeno sistémicamente [171]. Las células participantes en estos procesos, al ser excluidas del sitio donde originalmente interaccionan, podrían establecer contacto en otros sitios, guiadas por quimiocinas a las que normalmente responden con menor eficiencia. Para evaluar la relevancia de las quimiocinas en este proceso, es necesario estudiar ratones deficientes en diferentes combinaciones de receptores de quimiocinas para descartar la posible redundancia en el uso de receptores de quimiocinas.

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los recientes avances, el conocimiento de las señales intracelulares en el homing de linfocitos está incompleto, especialmente los eventos moleculares inducidos por CCR7, que llevan a la migración y a la activación de integrinas. El paradigma actual involucra la activación de las proteínas G α i, seguida de la activación de PI3K y PLC β , lo que lleva a la liberación de calcio intracelular y a la activación de varias moléculas como las cinasas de adhesión focal. Además, varias publicaciones han implicado demostrado la rápida fosforilación de los miembros de la familia de las cinasas de Janus en líneas celulares, progenitores hematopoyéticos y timocitos [55, 57, 71, 75].

Las señales inducidas por el receptor de quimiocinas CCR7, es una de las principales guías de los linfocitos T vírgenes para dejar el timo y salir hacia los ganglios linfáticos [140, 149, 158-160]. Los ratones deficientes en Jak3 presentan ganglios linfáticos periféricos muy pequeños. Los ratones deficientes en CCR7 o en sus ligandos (*plt/plt*) presentan ganglios linfáticos muy pequeños, y prácticamente sin linfocitos T vírgenes [161, 164].

Nosotros postulamos que la cinasa Jak3 podría participar en la señalización de CCR7, en la migración de linfocitos T vírgenes hacia los ganglios linfáticos periféricos, lo que explicaría en parte el fenotipo observado en la periferia del ratón deficiente en Jak3.

3. HIPÓTESIS

La ausencia de ganglios linfáticos en el ratón deficiente de Jak3 podría deberse a que la cinasa Jak3 participa en la señalización del receptor de quimiocinas CCR7, que media la migración hacia órganos linfoides secundarios

4. OBJETIVOS

- Comparar la respuesta quimiotáctica de los timocitos del raton Jak3^{-/-} con las del ratón de cepa silvestre en respuesta a la estimulación de CCL19 y CCL21.
- Estudiar el nivel de expresión de los receptores de quimiocinas CCR7, CCR9 y CXCR4 en timocitos de ratones Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+}.
- Determinar si la estimulación de CCR7 por sus ligandos CCL19 y CCL21 induce la activación de Jak3.
- Comparar la respuesta quimiotáctica de células de ganglios linfáticos tratadas con el inhibidor específico de Jak3, WHI-P131 con la respuesta de las células no tratadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Citocinas

La IL-7 recombinante murina y las quimiocinas CCL21, CCL19, CCL11 y CXCL12 murinas fueron obtenidas de Peprotech (New Jersey, NJ, EUA). La quimiocina CCL25 fue obtenida de R & D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

5.1.2 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina (4G10). El suero de conejo anti-Jak3 888 fue donado por la Dra. Leslie J. Berg (University of Massachusetts Medical Center, Worcester, MA, EUA). El anticuerpo policlonal de cabra anti-Jak3 fue obtenido de Santa Cruz Biotechnologies (N15 Santa Cruz, CA, EUA). El anticuerpo de conejo anti-Jak3 fue obtenido de Upstate Biotechnologies (Lake Placid, NY, EUA). El anticuerpo de oveja anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) y el anticuerpo de burro anti-conejo-HRP fueron obtenidos de Amersham Pharmacia Biothechnologies (Piscataway, NJ, EUA).

5.1.3 Reactivos

La toxina pertussis (PTX) fue obtenida de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El inhibidor específico de Jak3, WHI-P131, fue obtenido de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). El fluoróforo calceína-AM fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, Or, EUA). La fibronectina fue obtenida de Molecular Probes (Eugene, Or, EUA). Las membranas de policarbonato de 5 micras (PFD5) y las cámaras de Boyden utilizadas fueron obtenidas en Neuroprobe (Gaithersburg, MD, EUA). El kit RNA-STAT60 fue obtenido de Tel-Test (Friendswood, TX, EUA). La DNAsaI y la transcriptasa reversa SUPERSSCRIPT II fueron obtenidas de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). El SYBRGreen Master Mix para el PCR tiempo real fue obtenido de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). La proteína G-agarosa fue obtenida de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Las membranas de PVDF (polyvinylidene fluoride) con poro de 0.45 μm Immobilon-P fueron obtenidas de Millipore (Bedford, Mass, EUA). El kit de quimioluminiscencia ECL fue obtenido de Amersham Pharmacia Biothechnologies (Piscataway, NJ, EUA).

5.1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron:

CCR7 sentido 5'-ACAGCGGCCTCCAGAAGAAGAACAGCGG-3'

CCR7 anti-sentido 5'-TGACGTCATAGGCAATGTTGAGCTG-3'

CCR9 sentido 5'-CACCATGATGCCACAGAAC-3'

CCR9 anti-sentido 5'-GATGAGAAGCACACAGCTGTAG-3'

CXCR4 sentido 5'-AGAAGCTAAGGAGCATGACGGA-3'

CXCR4 anti-sentido 5'-ACTGCCTTTTCAGCCAGCAGTT-3'

HPRT sentido 5'-GACACAAACATGATTCAAATCCCTGA-3'

HPRT anti-sentido 5'-TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC-3'

5.1.5 Ratones

Los ratones JAK3 $-/-$ (C57/BL6-JAK3^{tm1Ljb}) fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA). Se usaron ratones Jak3 $-/-$ de 4 a 8 semanas de edad y como controles se utilizaron ratones de la misma edad C57/BL6 (de cepa silvestre) o ratones heterocigotos Jak3 $+/-$ indistintamente, referidos como Jak3 $+$.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS

Se extrajo quirúrgicamente el timo o los ganglios de los ratones C57BL/6 JAK3 $-/-$, o de los ratones C57BL/6 JAK3 $+$ de 4 a 8 semanas. El tejido se disgregó mecánicamente utilizando dos membranas de nylon de 50 micrómetros sumergidas en RPMI (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) con los suplementos estándar y adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Las células obtenidas de la disgregación (timocitos) se lavaron 2 veces centrifugando a 1800 rpm por 7 minutos a 4°C. Se resuspendieron en el medio requerido para el ensayo a realizarse. Para ensayos de fosforilación y extracción de RNA en HBSS (Hanks Balanced Salt Solution buffer, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para la incubación con calceína previa a la quimotaxis en RPMI-10% de SFB. Para todos los experimentos utilizando timocitos Jak3 $-/-$, se hicieron pools de las células de 3-4 ratones. Los ganglios linfáticos axilares, maxilares e inguinales extraídos

de los ratones C57/BL6 (Jak3^{+/+}) se mezclaron y se obtuvieron las células de la misma manera que las células del timo.

5.2.2 TRATAMIENTO CON INHIBIDORES

Las células obtenidas de los ganglios, o los timocitos, a una concentración de 8×10^6 /ml en RPMI-10% SFB se mantuvieron por 1.5 horas en una incubadora a 37°C, 5% CO₂, con 200 ng/ml de PTX, con 30 µg/ml de WHI-P131 o con 3 µl/ml de DMSO como control. Se lavaron con tres veces el volumen de células con HBSS-BSA 0.05% dos veces, y se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 /ml en HBSS-BSA 0.05% con calcio y con magnesio, para ensayos de quimiotáxis, y a una concentración de 45×10^6 /ml para ensayos de fosforilación. La viabilidad no fue afectada bajo ninguna de estas condiciones como lo demostró el análisis de exclusión con el colorante azul de tripano.

5.2.3 ENSAYOS DE QUIMIOTÁXIS

A las células a una concentración de 8×10^6 /ml, se les adicionó el fluoróforo acetoximetil-ester de calceína a una concentración 0.5 µM por 15 minutos en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. En caso de ser células tratadas con inhibidores o DMSO, en los últimos 15 minutos de la incubación con las drogas se añadió la calceína-AM. Las células se lavaron y resuspendieron de la manera previamente descrita para ensayos de quimiotáxis. Previo al experimento, membranas de policarbonato con poro de tamaño de 5 µm (PFD5 Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA) se cubrieron con una solución de fibronectina a 20 µg/ml en PBS, se incubaron 30 minutos de cada lado a 37°C y se dejaron secar al aire. Las quimiocinas se prepararon a concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/ml en una solución de HBSS-BSA 0.05% y se incubaron 15 minutos a 37°C como medida para desgasificarlas y evitar la formación de burbujas en la cámara. Los pozos de la parte inferior de la cámara de Boyden modificada (AP48 Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA) se cargaron con 29 µl de las diluciones de quimiocina. Posteriormente se colocó encima la membrana cubierta de fibronectina, después de esto se superpuso la parte de arriba de la cámara y se llenaron los pozos superiores con 50 µl de las células marcadas con calceína a una concentración de 5×10^6 /ml. Una vez cargada la cámara, se mantuvo en una incubadora por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al final del tiempo de incubación, la cámara se desarmó y se raspó el lado

superior de la membrana (sobre el cual se colocó la suspensión celular) con una espátula de hule (P48AP, Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA) 3 veces, lavando este mismo lado de la membrana entre cada raspado con solución de PBS. La membrana se dejó secar al aire. Posteriormente se cuantificó la fluorescencia de la membrana con el analizador de imágenes MultiImager FX (BioRad, Hércules, CA, EUA). Los niveles de fluorescencia de cada pozo correlacionan con el número de células presentes, corroborado en experimentos previos de tinción celular en el laboratorio.

5.2.4 RT-PCR

Extracción de RNA (ácido ribonucleíco)

Las células de timo de ratón Jak3 ^{-/-} y Jak3 ⁺ se obtuvieron como se describió anteriormente. Se colocaron de 5 a 10 millones de células por tubo y se centrifugaron, al botón de timocitos se les agregó 1 ml de RNA-STAT-60 y se agitó la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea que se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo a cada tubo para luego agitarlos vigorosamente por 15 seg, posteriormente se dejaron 2 min a temperatura ambiente y se centrifugaron por 15 min a 13000 rpm a 4°C. La mezcla se separó en dos fases, la fase acuosa se transfirió a tubos a los que se le añadieron 0.5 ml de isopropanol y se agitaron por inversión y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente. Después, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 30 min a 4°C, y se desecha el sobrenadante, el botón de RNA que se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire el botón para evaporar el etanol, posteriormente el botón se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Posteriormente, el RNA fue tratado con DNAsaI. Una alícuota se utilizó para determinar la concentración por espectrofotometría y otra para correr en un gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) para determinar la integridad del RNA obtenido.

Síntesis de cDNA

Se añadieron de 1 a 3 µg de RNA total y 500ng de oligo dT en un tubo que se incubó a 70°C por 10 min, enseguida esta mezcla se puso en hielo por un minuto y se le añadió el amortiguador de la transcriptasa reversa, 2.5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de dNTPs y 10 mM de DTT. Los tubos se incubaron por 5 min a 42°C y se les añadieron 200 unidades de la enzima Superscript II a cada tubo. Estos se mantuvieron a 42°C por 50 minutos y posteriormente a 70°C por 15 min para detener la reacción. El cDNA (DNA

complementario) obtenido se usó como templado para las reacciones de PCR cualitativa y cuantitativa

PCR no cuatitativa

Para la PCR cualitativa se usó el 10% del volumen total de la reacción de síntesis de cDNA. Se utilizó una concentración final de oligonucleotidos específicos para cada gen de 200 nM, 2 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTPs y 0.02 unidades de Taq Polimerasa por reacción. El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 2 minutos a 72°C. Después de la reacción de PCR, 10 µl de cada muestra se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% (p/v) en una solución de TBE (Tris Base 100 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para su posterior captura.

PCR Cuantitativa de Tiempo Real

Para la PCR cuantitativa se utilizó el 2% del volumen total de la reacción de síntesis de cDNA. Se usó una concentración final de oligonucleotidos específicos para cada gen de 200 nM y la mezcla de reacción SYBR Green Master Mix 1X. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de: 45 seg a 94°C, 45 seg a 60°C y 45 seg a 72°C. Seguidos de una curva de desnaturalización que va de los 60 a los 95°C para probar la especificidad de la reacción (alineamiento de los primers, primer dimer, productos inespecíficos).

La PCR se analizó en un equipo para PCR en Tiempo Real 7000 SDS se utilizó HPRT como control endógeno y se normalizó con respecto al ratón Jak3 +.

5.2.5 ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN DE Jak3

Estimulación y lisis de las células

Las células de timo y ganglios linfáticos obtenidas como se describe previamente, fueron resuspendidas a una concentración de 4.5×10^7 /ml en HBSS-BSA 0.05% BSA con calcio y magnesio. Se colocó 1 ml de esta suspensión celular por tubo y fueron centrifugadas a 1800 rpm por 5 min. El botón de células se resuspendió en 300 µl de la solución estimulante: IL-7 a una concentración de 50 ng/ml o de las quimiocinas a una concentración de 100 ó 200 ng/ml en HBSS-BSA 0.05% BSA con calcio y magnesio. Para la estimulación con IL-7 o con HBSS-BSA 0.05% BSA con calcio y magnesio (como control), las células se incubaron 5 minutos a 37°C, para la estimulación con quimiocinas las células se incubaron 30 segundos a 37°C. Después del tiempo de

estimulación se añadieron 600 μ l de solución inhibidora de fosfatasas. Las células se centrifugaron a 1800 rpm 5 min a 4°C y se le añadió 100 μ l de solución de lisis al botón celular. Esta solución se dejó 10 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se separaron 10 μ l del lisado para usarse como control y se guardó a -70°C. El resto del sobrenadante se utilizó para las inmunoprecipitaciones.

Inmunoprecipitación de Jak3

Se añadieron 2 μ g de anti-Jak3 (N-15) sobre el lisado celular y se incubó en rotación por 1 hora a 4°C. Posteriormente se les añadió a los lisados 15 μ l (volumen seco) de proteína G-agarosa por muestra en 200 μ l de buffer de lisis y se dejó incubar toda la noche en agitación a 4°C. Después de esta incubación, las muestras se centrifugaron por 1 min a 8000 rpm a 4°C y se guardó el sobrenadante para determinar la eficiencia de la inmunoprecipitación. El complejo Jak3-anticuerpo-proteína G-agarosa se lavó tres veces con 800 μ l de buffer de lisis a 4°C y las muestras se resuspendieron en 30 μ l de buffer de lisis a las cuales se añadió un volumen de buffer de carga para proteínas. Finalmente, las muestras se incubaron 5 minutos a 100°C.

Electroforesis de proteínas

Se preparó un gel separador al 8% de acrilamida y un gel concentrador al 4% de acrilamida. Las muestras después de la inmunoprecipitación o los lisados totales, se cargaron en el gel con un marcador de proteínas de alto peso molecular preteñido (p-77085 New England Biolabs, Boston MA, USA), los geles se corrieron en cámaras Hoeffer (SE600 Amersham Biosciences, NJ, USA) a 150 V hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Las electroforesis se realizaron en condiciones desnaturalizantes.

Electrotransferencia de proteínas del gel a membranas de PVDF

Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de PVDF previamente hidratadas (15 segundos en metanol, 2 min en agua y 5 min en buffer de transferencia) usando cámaras de transferencia semiseca (HEP-1 Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA) por 1 hora a 10 V. El gel se tiñó con azul de Coomasie para verificar la eficiencia de la transferencia.

Inmunodetección de fosforilación en tirosina

Después de la transferencia, las membranas se lavaron con una solución de TBS y se sumergieron en la solución de bloqueo para el anticuerpo anti-fosfotirosina toda la

noche a 4°C en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo 4G10 (monoclonal anti-fosfotirosina) 1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después, las membranas se enjuagaron una vez y se lavaron dos veces 10 min y 4 veces 5 min en agitación con TBS-Tween. Posteriormente se trató a las membranas con el anticuerpo secundario (policlonal de oveja anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano) diluido 1:3000 por 30 min a temperatura ambiente en agitación. Terminada la incubación, la membrana se lavó de la misma manera que después de la incubación con el anticuerpo primario con un lavado adicional de 5 min con TBS. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron por 1 min con ECL y se pusieron en contacto con placas fotográficas (Kodak Biomax MR). Se realizó una exposición de 5 min, posteriormente las placas fueron sumergidas en solución reveladora (Kodak Dektol) por el tiempo necesario, se enjuagaron con agua y se sumergieron en la solución fijadora (Kodak Rapid Fixer with Hardener) por el tiempo necesario. Finalmente, las placas se enjuagaron con agua y se dejaron secar al aire. En algunos casos las membranas se expusieron 1 hora. La placa fotográfica se examinó con un analizador de imágenes MultiImager FluorS BioRad (Hercules, CA, USA) para cuantificar la intensidad de las bandas. Después del revelado, las membranas se enjuagaron con TBS.

Lavado de la membrana e inmunodetección de Jak3

Para despegar los anticuerpos pegados a las proteínas de las membranas después de la primera inmunodetección, estas se sumergieron en la solución de lavado de la membrana y se dejó en agitación a 65°C durante 30 min. Las membranas se enjuagaron dos veces con TBS-Tween y se lavaron dos veces 10 min y 4 veces 5 min en agitación. Después de los lavados se bloquearon las membranas con la solución bloqueadora para anti-Jak3 888 durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se incubaron las membranas con el anti-Jak3 a una dilución 1:2000 por 8 horas a 4°C después de lo cual se lavaron como se describió anteriormente. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario (policlonal de burro anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:4000 por 30 min a temperatura ambiente y se lavó. Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia como se describió anteriormente.

*Para reactivos y soluciones utilizados durante los ensayos de fosforilación, consultar el Apéndice I.

6. RESULTADOS

6.1 MIGRACIÓN EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN DE CCR7

El receptor de quimiocinas CCR7 juega un papel crucial en la migración intersticial en el timo y en la salida de los linfocitos T hacia ganglios linfáticos periféricos. Se realizaron experimentos de quimiotaxis con CCL21 y CCL19, los ligandos naturales de CCR7, en timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$ como control para analizar si existían defectos en la migración hacia esta quimiocina en ratones deficientes en Jak3.

La respuesta migratoria de los timocitos frente a CCL21 siguió un patrón dependiente de la concentración de la quimiocina, con un pico de migración entre los 50 y 100 ng/ml (fig 6.1). Aunque ambos tipos celulares muestran una respuesta quimiotáctica, los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ presentan una migración significativamente disminuida comparada con la migración que se observa en los timocitos del ratón Jak3 $+/-$ a las concentraciones de 50, 100 y 500 ng/ml de CCL21.

La respuesta migratoria obtenida de los timocitos Jak3 $-/-$ frente a la quimiocina CCL19 se encuentra afectada comparada con la respuesta de los timocitos Jak3 $+/-$. Mientras que los timocitos del ratón Jak3 $+/-$ presentan actividad quimiotáctica con un pico de migración a la concentración de 50 ng/ml de CCL19, los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ tienen una respuesta muy baja o casi nula hacia las diferentes concentraciones de CCL19 analizadas en el experimento (fig 6.2).

Además se demostró en experimentos previos del laboratorio que existen defectos en la migración de timocitos de Jak3 $-/-$ hacia CCL25 y CXCL12. Este defecto en la migración no es un efecto inespecífico, ya que en respuesta a otras quimiocinas como CCL4, CCL5 y CCL11, los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no muestran diferencias en la migración comparados con los ratones Jak3 $+/-$ [1].

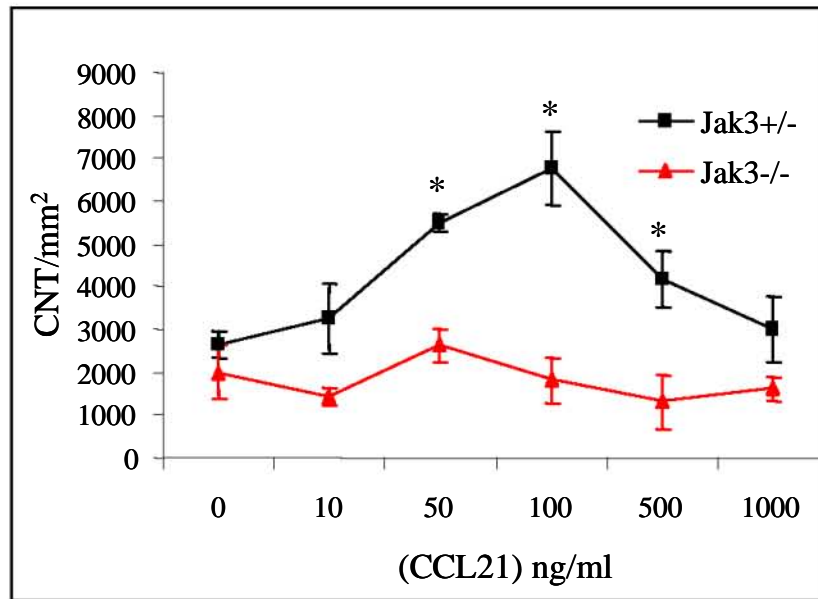


Figura 6.1 Migración de timocitos en respuesta a CCL21 por 2 horas. Se utilizaron 3 pozos por cada concentración. La gráfica muestra el promedio del triplicado con error estándar. * Diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los datos se analizaron mediante una prueba de t de student no apareada.

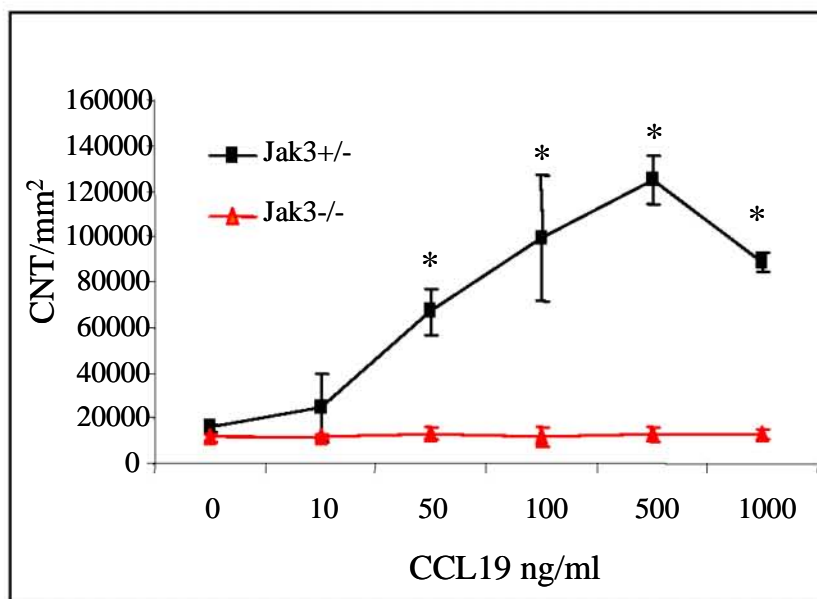


Figura 6.2 Migración de timocitos en respuesta a CCL19 por 2 horas. Se utilizaron 3 pozos por cada concentración. La gráfica muestra el promedio del triplicado con error estándar. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los datos se analizaron mediante una prueba de t de student no apareada.

6.2 ANALISIS CUALITATIVO DE LA EXPRESIÓN mRNA DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Las diferencias en respuesta migratoria de los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ podrían deberse ya sea a defectos en la señalización de los receptores de quimiocina o a una disminución de los niveles de expresión de los receptores de quimiocina en el ratón deficiente de Jak3.

Para definir si había defectos de expresión de receptores de quimiocinas en los ratones Jak3 $-/-$, se caracterizó la expresión de varios receptores de quimiocinas: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9 y CXCR4 en timocitos totales de ratones Jak3 $-/-$, Jak3 $+/-$ y Jak3 $+/+$ con la técnica de RT-PCR cualitativa.

Se extrajo RNA total de timocitos adultos de ratones Jak3 $+/+$, Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$ y se sintetizó cDNA. El cDNA se probó en PCR para detectar los RNA mensajeros de los diferentes receptores. Se detectó RNA mensajero de todos los receptores de quimiocinas probados para el ratón (figura 6.3) demostrando que la falta de señales mediadas por citocinas que utilizan la γc no induce la inhibición de la transcripción de los genes de los receptores de quimiocinas ensayados y que las deficiencias en la quimiotaxis de timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no se deben a la ausencia del mensajero del receptor de quimiocinas CCR7.

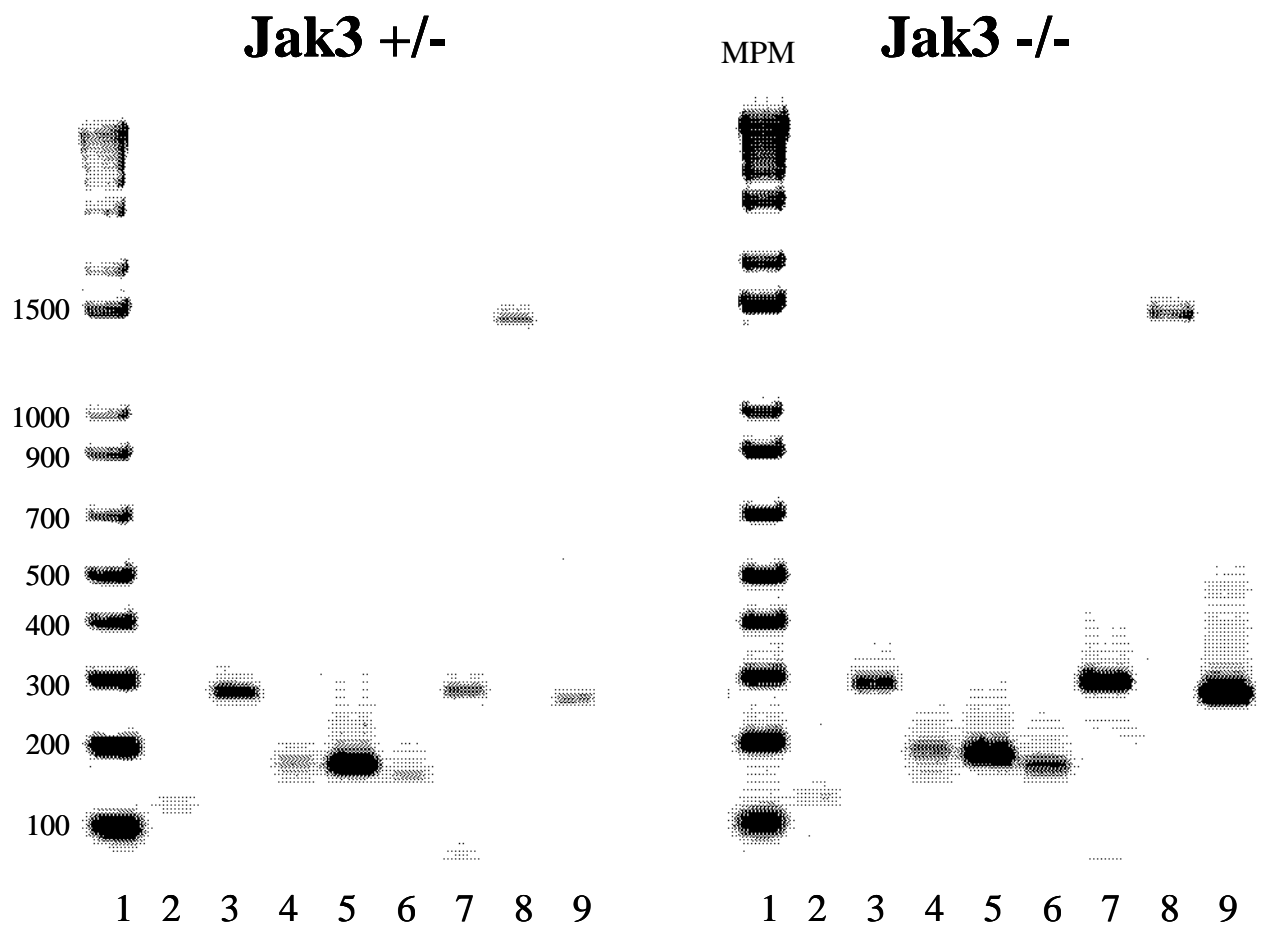


Figura 6.3 Comparación de la expresión RNA mensajero de receptores de quimiocinas en timocitos Jak3 +/- y Jak3 -/-. Carril (1) MPM, (2) CCR1, (3) CCR2, (4) CCR3, (5) CCR4, (6) CCR5, (7) CCR7, (8) CCR9 y (9) CXCR4.

6.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE mRNA DE RECEPTORES DE QUIMIOCINA

Dado que no existen diferencias cualitativas en la expresión de mRNA para receptores de quimiocinas entre los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y los timocitos de los ratones Jak3 $+/-$. Se investigó si existían diferencias cuantitativas en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$.

Utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real se cuantifico el mensajero de los receptores de quimiocina CCR7, CCR9, CXCR4. En este tipo de ensayos, la cantidad de mensajero del gen de interés se normaliza con respecto a la cantidad de mensajero de un gen de expresión constitutiva, para corregir diferencias en calidad y cantidad de RNA en las diferentes muestras que inevitablemente existen como resultado de diferencias en la cantidad de muestra y en extracción. El control endógeno utilizado fue la hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT). Se extrajo RNA total de timos adultos de ratones Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$ y se hizo un pool. El RNA total extraído se trató con DNAsaI, se sintetizó cDNA (DNA complementario) y se sometió a PCR en tiempo real.

Los resultados muestran que la expresión de los mensajeros para CCR9 y CXCR4 no muestra diferencias significativas entre los timocitos de ratones Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$. La expresión del mensajero de CCR7 muestra diferencias significativas entre los timocitos Jak3 $+/+$ y Jak3 $-/-$, ya que el análisis muestra que los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ presentan una expresión superior de CCR7 comparada con la de los timocitos Jak3 $+/+$. Demostrando así que las deficiencias en migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ no se deben a niveles disminuidos en expresión de RNA mensajero de estos receptores de quimiocinas lo que apoyaría que el defecto se encuentra a nivel de señalización. Estos experimentos se repitieron usando 6 extracciones distintas de RNA con datos muy reproducibles (figura 6.4).

Para comparar la expresión de mensajero entre las diferentes muestras se obtuvo el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia del SYBR Green (se intercala en la doble cadena y fluoresce marcando así la aparición de doble cadena) alcanzara un cambio en el nivel de fluorescencia significativo sobre el umbral (Ct = Ciclo umbral). Los datos de PCR en tiempo real se presentan como la expresión relativa con respecto a los timocitos del ratón Jak3 $+/+$ (normalizador) utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$ en el cual la expresión relativa es igual a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde:

$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del gen endógeno HPRT de la muestra}) - \Delta\Delta Ct \text{ de la muestra normalizadora.}$

Cada muestra se corrió por triplicado y los valores de Ct fueron promediados en cada tipo de reacción. Estos resultados se usaron para calcular la expresión relativa del mensajero de cada receptor de quimiocina en los timocitos del ratón Jak3 -/- comparado con la cantidad de mensajero de cada receptor en los timocitos del ratón Jak3 +/+. El análisis de significancia fue realizado usando el programa qgene con la ecuación 3 de acuerdo a la referencia. El cálculo de la expresión normalizada se soporta en los valores de eficiencia de amplificación calculados a partir de las curvas de eficiencia de amplificación de cada gen. Se utilizó una prueba de t de Student no apareada de dos colas. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

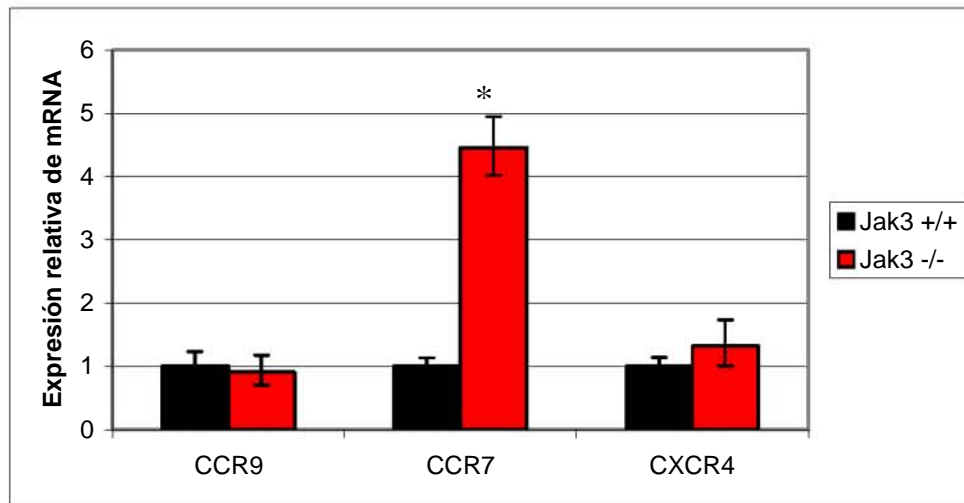
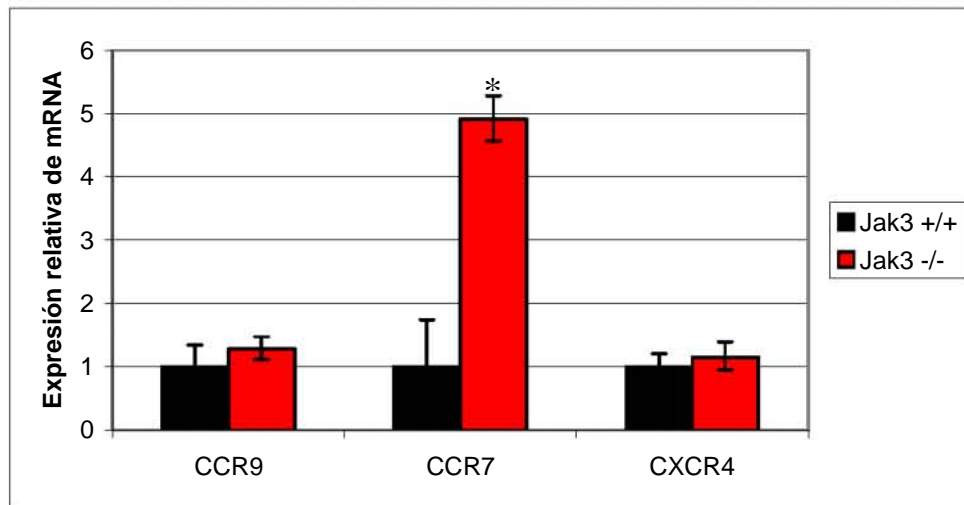


Figura 6.4 Expresión de CCR9, CCR7 y CXCR4 en timocitos de ratones Jak3 -/- y Jak3 +/+. Se graficó el promedio de los triplicados con desviación estándar de la expresión, corregidos con el mensajero de HPRT y normalizados con respecto a la expresión de cada receptor en el ratón Jak3 +/+. Se muestran 2 experimentos representativos.

6.4 QUIMIOTAXIS EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE Jak3 (WHI-P131)

Se demostró que en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no presentan deficiencias de expresión de RNA mensajero para los receptores de quimiocinas estudiados, lo que sugiere que los defectos de migración observados en los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ no se deben a defectos en la expresión de receptores de quimiocinas. Para descartar la posibilidad de que los defectos en migración en el ratón Jak3 $-/-$ se deban a deficiencias en el desarrollo de los timocitos en ausencia de Jak3 se midió la respuesta quimiotáctica de timocitos y linfocitos de ganglio de ratones silvestres, en presencia de un inhibidor específico de Jak3: WHI-P131.

Los timocitos de ratón tratados fueron probados con las quimiocinas CCL25, CXCL12 y CCL11 para probar la relevancia de Jak3 en la señalización de quimiocinas durante la migración intersticial en timo. Como control de inhibición se utilizó la toxina pertussis (PTX), que bloquea la función de las proteínas $G_{\alpha i}$ asociadas a los receptores de quimiocina.

Como se esperaba, la PTX bloqueó completamente la respuesta quimiotáctica hacia CCL25, CXCL12, y CCL11 (figuras 6.5, 6.6 y 6.7 respectivamente) a todas las concentraciones de quimiocina. La inhibición farmacológica de Jak3 mostró que la migración en respuesta a CCL25 y CXCL12 se afecta seriamente en ausencia de Jak3 pero la respuesta de los timocitos a CCL11 no se afecta (figuras 6.5, 6.6 y 6.7, respectivamente), sugiriendo que en timocitos Jak3 está involucrado en la señalización de los receptores de quimiocina CCR9 y CXCR4 pero no es necesario para la señalización del receptor CCR3. Estos resultados reproducen el fenotipo de migración observado en el ratón Jak3 $-/-$, los cuales presentan una migración deficiente hacia las quimiocinas CCL25 y CXCL12 pero no hacia la quimiocina CCL11.

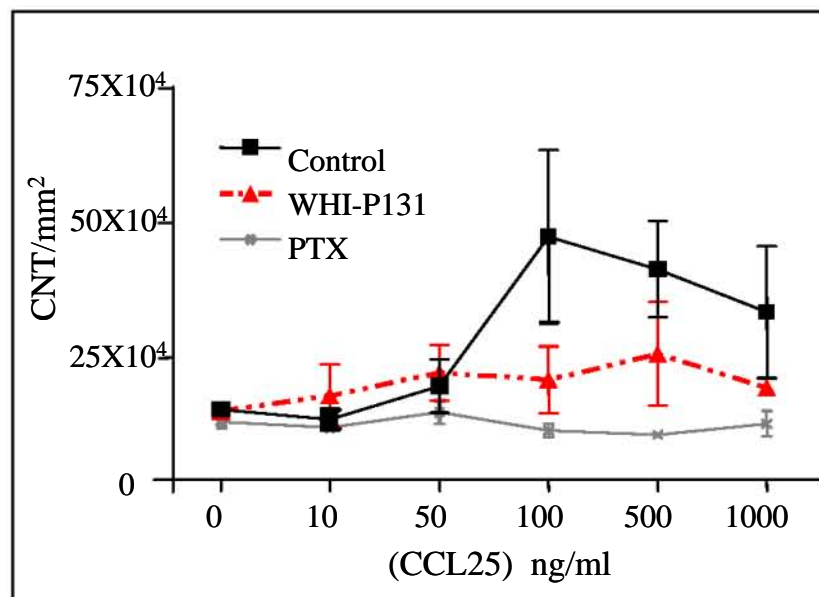


Figura 6.5 Quimiotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL25 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CCR9. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

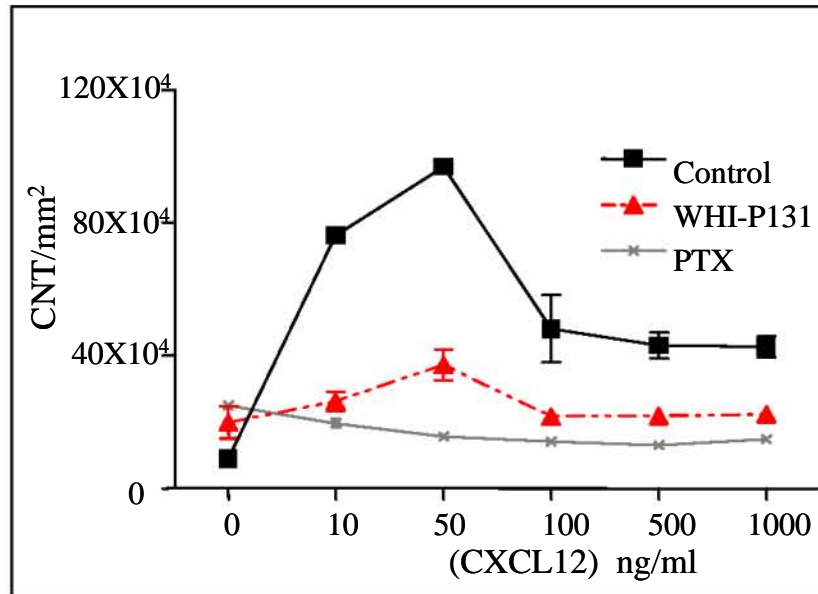


Figura 6.6 Quimiotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CXCL12 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CXCR4. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

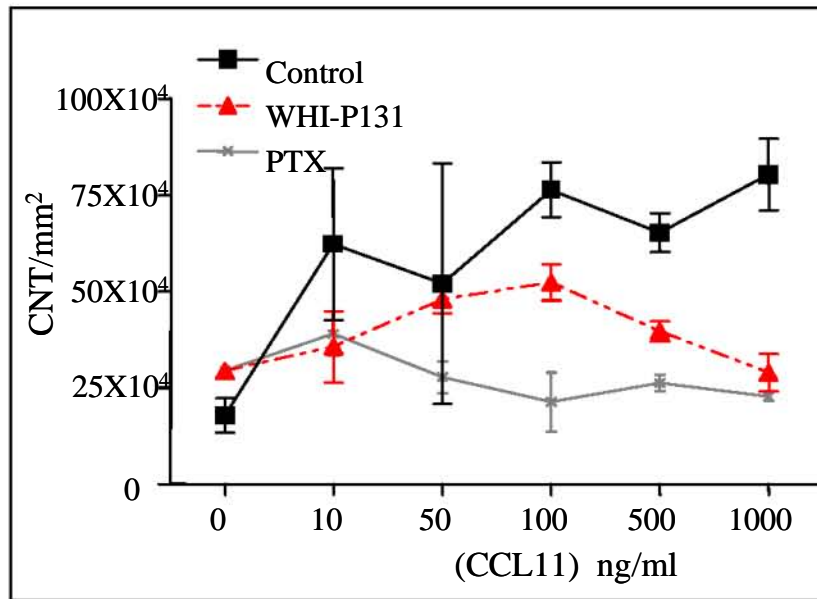


Figura 6.7 Quimotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL11 que es el ligando para el receptor de quimiocinas CCR3. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

Además se probó el efecto de tratar con la droga linfocitos de ganglios periféricos para evaluar la participación de Jak3 en la señalización de CCR7 en periferia. Se midió la respuesta quimiotáctica hacia CCL21 de las células inhibidas farmacológicamente para Jak3 comparada con las células no inhibidas. Como control de inhibición se utilizó PTX.

El bloqueo de las $G_{\alpha i}$ por PTX inhibió casi completamente la migración de los linfocitos de ganglio en respuesta a CCL21, además la inhibición de Jak3 también muestra deficiencias en la respuesta quimiotáctica en respuesta a CCL21 en todas las concentraciones ensayadas con las células sin tratamientos con (figura 6.8).

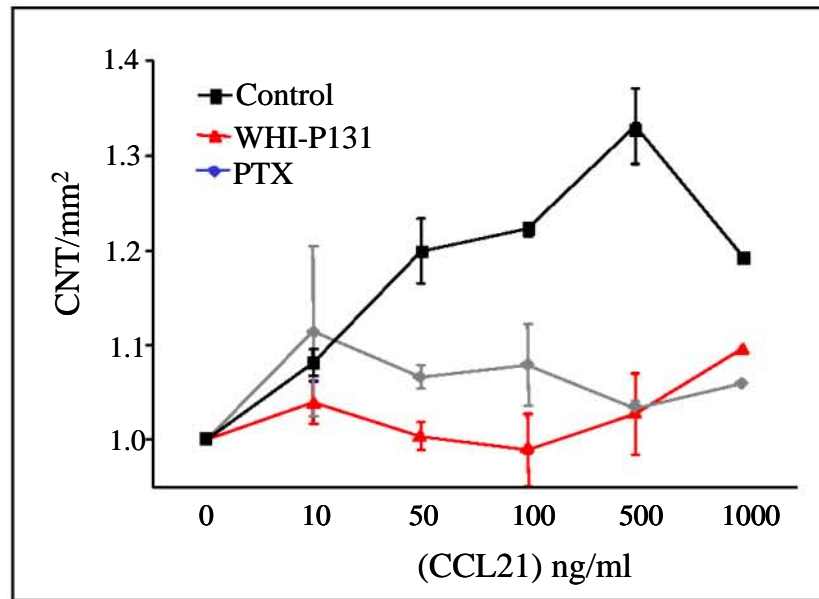


Figura 6.8 Quimioaxis de células de ganglios periféricos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL21 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CCR7. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación.

5.4 FOSFORILACIÓN DE JAK3 EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CCR7

Dado que se demostró que no existe una disminución en la expresión del RNA mensajero para el receptor de quimocinas CCR7 en los timocitos de ratones Jak3 $-/-$; se sugirió que los defectos en la migración de los timocitos del ratón deficiente en Jak3 en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21 podían deberse a una deficiencia en la señalización de este receptor en las células deficientes en Jak3, ya que la cinasa Jak3 podría encontrarse en la vía de señalización de CCR7. Esta hipótesis apoyada en los experimentos de migración de células del ratón de cepa silvestre tratados con el inhibidor específico de Jak3, WHI-P131 en donde se observó una migración disminuida con respecto a las células no tratadas en respuesta a la estimulación de las células con CCL21.

Se hicieron experimentos de fosforilación para medir la activación de la cinasa Jak3 en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos.

Para estos experimentos se inmunoprecipitó Jak3 con el anticuerpo policlonal anti-Jak3, se reveló con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10) y posteriormente la misma membrana se reveló con un anticuerpo contra Jak3 total en la membrana para normalizar la fosforilación de Jak3 y descartar la posibilidad de que el aumento se deba a mayor cantidad de proteína total. En un trabajo previo del grupo de trabajo [73] se había demostrado que esta inmunoprecipitación es específica al encontrarse una banda entre el rango de los 110 y los 120 kDa de acuerdo al peso esperado para Jak3 de 116 kDa, sin embargo, la eficiencia de inmunoprecipitación es baja, solo se reportó un índice de inmunoprecipitación de entre el 10 y 15% del total de Jak3 en la muestra, por lo que para los experimentos de fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación de CCR7 se decidió usar células de ganglios periféricos que se sabe tienen una expresión de CCR7 mayor que los timocitos.

Como control positivo se utilizó IL-7 murina recombinante (rmIL-7), ya que está reportada la fosforilación de la cinasa Jak3 en respuesta a la estimulación con IL-7. En experimentos previos del laboratorio se determinó que la concentración óptima para la estimulación de las células con IL-7 es de 50 ng/ml. El tiempo que se utilizó fue el reportado en la literatura como el pico de fosforilación para Jak3 con el estímulo de IL-7, 5 minutos a 37°C. Como control negativo se utilizó medio de estimulación sin quimiocina ni rIL-7 por 5 min o 15 seg a 37°C.

Para medir la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con quimiocinas se utilizaron dos concentraciones que estuvieran cerca del pico de quimiotaxis 100 y 200 ng/ml. Se probaron las quimiocinas CCL19 y CCL21 por 15 segundos a 37°C debido a que con otras quimiocinas probadas en el laboratorio y las reportadas en la literatura se observa el pico de fosforilación de las cinasas de Janus de los 10 a los 60 segundos.

Se demostró una fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con CCL21 y CCL19 (figura 6.9) a los 15 segundos con 100 y 200 ng/ml de quimiocina aunque la concentración más eficiente para estímulo parece ser la de 100 ng/ml lo cual corresponde al pico de quimiotaxis. Esta fosforilación rápida muestra que la cinasas Jak3 está involucrada en la señalización de CCR7 y sugiere que los defectos en la migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ se deben a deficiencias en la señalización del receptor.

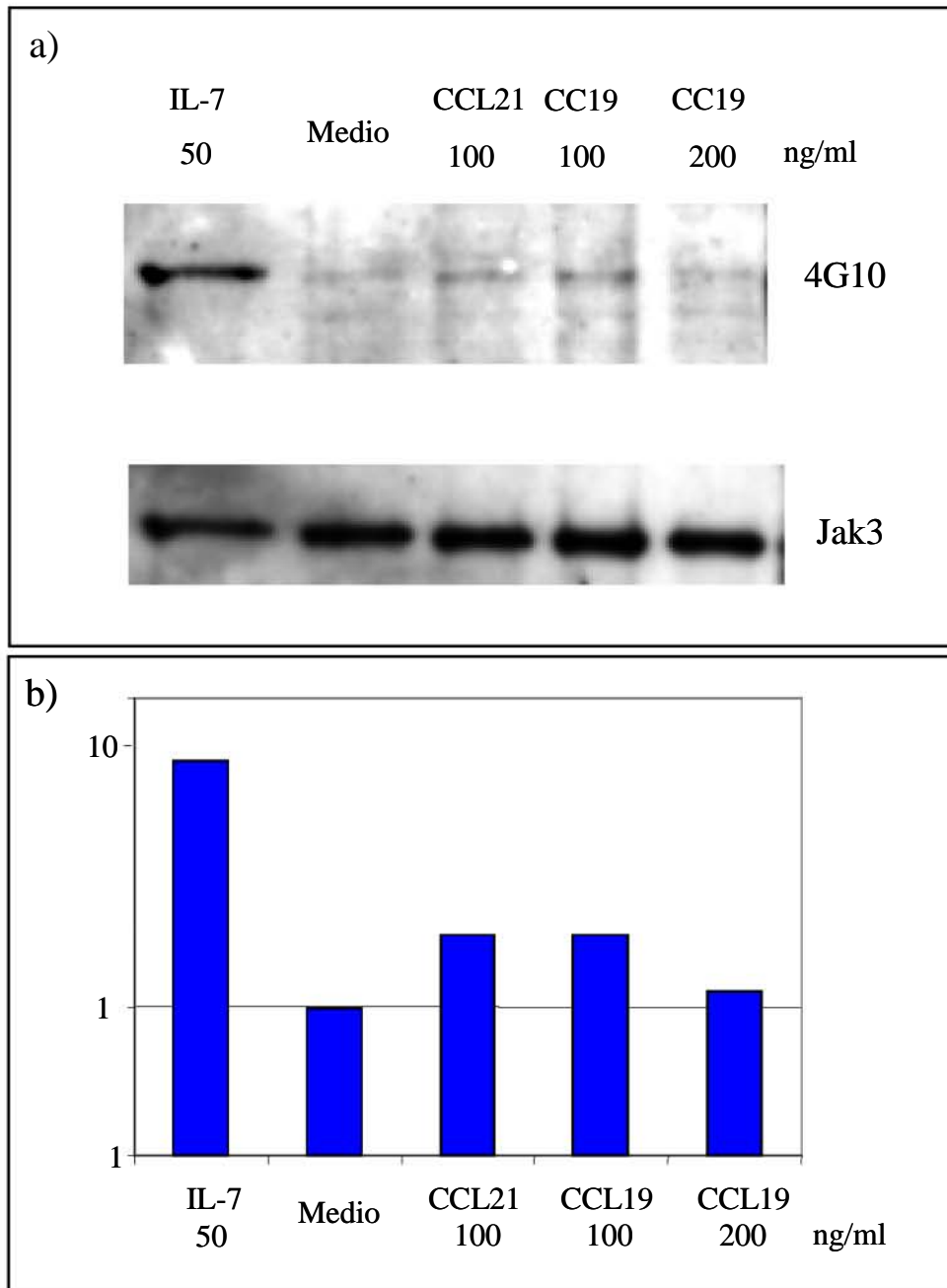


Figura 6.9 Análisis de la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con CCL21 y CCL19 por 15 segundos. Carril (1) IL-7, (2) Medio, (3) SLC100 ng/ml, (4) CCL19 100 ng/ml, (5) CCL21 200 ng/ml.

7. DISCUSIÓN

Una vez que los linfocitos T han terminado su maduración, estos salen del timo hacia la periferia para migrar a los órganos linfoides secundarios en busca de su antígeno. Los ratones deficientes en Jak3 presentan ganglios linfáticos periféricos muy pequeños, fenotipo muy parecido al de los ratones deficientes en IL-7R α y en γc [1-3]. Estos ratones son capaces de formar el rudimento de los ganglios linfáticos [3], sin embargo presentan serias deficiencias para poblarlos. Las señales inducidas por el receptor de quimiocinas CCR7, es una de las principales guías de los linfocitos T vírgenes para dejar el timo y salir hacia los ganglios linfáticos [4-8]. Los ratones deficientes en CCR7 o en sus ligandos (*plt/plt*) presentan ganglios linfáticos muy pequeños, y prácticamente sin linfocitos T vírgenes [9, 10]. Existe evidencia creciente de la participación de las cinasas Jak en la señalización de receptores de quimiocinas en diferentes tipos celulares [11-19]. Por lo que se propone que la cinasa Jak3 podría participar en la señalización de CCR7, en la migración de linfocitos T vírgenes hacia los ganglios linfáticos periféricos, lo que explicaría en parte el fenotipo observado en la periferia del ratón deficiente en Jak3.

Los timocitos SP (positivos sencillos) seleccionados positivamente aumentan la expresión de CCR7 y salen del timo hacia el torrente sanguíneo para unirse al reservorio de células T vírgenes periféricas. Para analizar la respuesta migratoria de los linfocitos T vírgenes a la estimulación de CCR7 en ausencia de la cinasa Jak3, se hicieron experimentos de quimiotaxis con timocitos de los ratones Jak3 *-/-*. Se demostró que los timocitos del ratón deficiente en Jak3, no responden a la estimulación con CCL19 y CCL21 a ninguna de las concentraciones ensayadas, en contraste, los timocitos de ratones heterocigotos (Jak3 *+/-*) sí presentaron respuestas quimiotácticas a estas concentraciones. Estos experimentos sugieren que la migración mediada por CCR7 en linfocitos T vírgenes, requiere de la participación de Jak3.

Sin embargo, esta migración deficiente de los timocitos Jak3 *-/-* podría deberse a niveles de expresión de CCR7 menores en los timocitos de los ratones deficientes en Jak3, ya que se ha demostrado que algunos de los receptores de citocinas que señalizan a través de la cadena gamma común, y que por lo tanto utilizan Jak3, pueden regular la expresión de receptores de quimiocinas. Se ha demostrado que IL-2 aumenta la expresión de CXCR4 en linfocitos T humanos [20]. En progenitores tímicos, IL-7 aumenta la expresión de CXCR4 [21]. En linfocitos T, IL-15 induce la expresión de

mensajero para receptores de quimiocinas tipo CC pero no CXC [22]. Las IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 aumentan la expresión de CXCR4 en células de memoria [23]. Entonces, la ausencia de la señalización de estas citocinas, podría modificar la expresión de los receptores de quimiocinas en los ratones Jak3 $-/-$.

Por lo tanto, mediante la técnica de RT-PCR cualitativa, se examinó la presencia del mensajero de varios receptores de quimiocinas en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$. Estos experimentos demostraron que estos ratones sí expresan todos los receptores de quimiocinas estudiados, entre los cuales se encuentra CCR7.

Para descartar la posibilidad de que, los defectos en la migración de estos en respuesta a la estimulación con CCL19 y CCL21, se debieran a diferencias en el nivel de expresión de CCR7 en los ratones Jak3 $-/-$, comparado con la expresión en los ratones Jak3 $+$. Se hicieron experimentos de RT-PCR cuantitativa utilizando la técnica de tiempo real. Como control endógeno se utilizó el gen de la hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT), ya que se ha demostrado que posee una expresión constante que es independiente de estímulos extracelulares [24].

Se estudió el nivel de expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+$. Además se estudió la expresión de CCR9 y CXCR4, ya que en experimentos previos del laboratorio se demostró que los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ presentan defectos en la migración en respuesta a la estimulación con CCL25 y CXCL12, los ligandos respectivos de estos receptores [14]. Estos experimentos mostraron que el nivel de expresión de CCR9 y CXCR4 no es significativamente distinto en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+$, lo que indicó que los defectos en la migración de los timocitos Jak3 $-/-$ en respuesta a la estimulación de CCR9 y CXCR4 no se deben a niveles disminuidos de expresión en estas células sino a defectos de señalización.

Inesperadamente, el nivel de expresión del receptor de quimiocinas CCR7 se encuentra aumentado más de cuatro veces en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$, estos resultados se reprodujeron en 6 extracciones independientes de pools de 3 a 4 ratones, confirmando el resultado. Se pueden considerar varias hipótesis para este resultado, la primera, que los niveles de CCR7 sean regulados negativamente por la activación de Jak3, así, en la ausencia de Jak3, los niveles de CCR7 aumentan; la segunda, CCR7 transduce señales independientemente de Jak3, entonces, las células que expresan altos niveles de CCR7 tienen una ventaja, incluso en la ausencia de Jak3; tercero, que la

ausencia de señalización mediada por CCR7 indujera una sobre-expresión del receptor como un intento de mecanismo compensatorio.

La abundancia del RNA mensajero no necesariamente correlaciona con la expresión de la proteína, sin embargo existen reportes de receptores de quimiocinas donde sí lo hace [23]. Sin embargo, esta cuestión solo puede ser aclarada por la cuantificación del receptor en superficie. La expresión aumentada de CCR7 en los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ fue confirmada en experimentos posteriores del grupo de trabajo, utilizando una proteína quimérica CCL19-Ig, que ha demostrado ser un marcador confiable de los niveles de expresión de CCR7 en células linfoides [15].

Estos resultados demuestran que las deficiencias en la migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ no se deben a una menor expresión del receptor de quimiocinas CCR7. Entonces se procedió a investigar si Jak3 se activa en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21. La activación de Jak3 puede ser medida por la fosforilación en tirosinas de esta cinasa [25, 26].

Este análisis reveló la fosforilación de Jak3 en tirosinas en respuesta a la estimulación con sus ligandos CCL19 y CCL21. Esta fosforilación es rápida, alcanzando un pico de fosforilación entre los 30-60 segundos, y decayendo a los niveles basales al cabo de 3 minutos (datos no mostrados). Estos resultados son consistentes con los resultados previos que demuestran la fosforilación de cinasas Jak en respuesta a la estimulación con quimiocinas [11, 14, 16, 19]. Recientemente, un reporte demostró que en células de ganglios de ratón Balb/c, la cinasa Jak2 se fosforila en respuesta a la estimulación con CCL21, con un pico de fosforilación a los 60 segundos [15]. En este reporte se utiliza un inhibidor de Jak2 y Jak3, Tyr AG490. El tratamiento de las células con esta droga abate la fosforilación de Jak2, y la migración y activación de integrinas en respuesta a la estimulación con CCL21. En este reporte no se midió la fosforilación de Jak3 [15]. Estos resultados no son contradictorios con los nuestros, ya que en la señalización de citocinas, estas se unen a receptores heterodiméricos cuyas cadenas están asociadas constitutivamente a distintos tipos de jaks, que en respuesta a la unión del ligando, se transfosforilan para la transducción de señales. Por ejemplo, en la transducción de señales de IL-2 e IL-7, Jak1 y Jak3 están involucradas, ya que cada cinasa se asocia constitutivamente a un tipo de cadena del receptor. Así, en la señalización de CCR7, Jak2 y Jak3 podrían estar involucradas. El mecanismo por el cual las Jaks transmiten las señales de los receptores de quimiocinas no está establecido. Se ha propuesto un modelo de dimerización, basado en resultados que demuestran la

coprecipitación de los receptores en dímeros u oligómeros en respuesta a la estimulación con quimiocina [12, 16, 27], de acuerdo al cual, en respuesta a la estimulación con quimiocina, los receptores de quimiocina se dimerizan y unen Jaks, los cuales fosforilan al receptor de quimiocinas [28]. La actividad de las cinasas Jak, en estos trabajos, parece no solo ser independiente de proteínas G α i, sino necesaria para su asociación con el receptor [11]. Apoyando esta hipótesis, se ha demostrado que la dimerización de receptores acoplados a proteínas G, como los opioides [29-31], muscarínicos [31] y adrenérgicos [30], y la dimerización de otros receptores de siete dominios transmembranales, como el receptor de GABA [32, 33], tiene un papel importante en la señalización. Actualmente no hay evidencia directa de que CCR7 se dimerice en respuesta a la estimulación con sus ligandos, son necesarios experimentos en el futuro que determinen el mecanismo de acción de la Jak3 y Jak2 en la transducción de señales de CCR7.

Aunque se había demostrado que Jak3 se activa en respuesta a la estimulación con CCL19 y CCL21, y que esto podía explicar los defectos en la migración de los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$, existía la posibilidad de que los defectos en la migración de estos ratones fueran una consecuencia de defectos en la maduración de estas células, debido al importante papel en la señalización de IL-7 en el desarrollo de los linfocitos T [34, 35]. Para resolver esta cuestión, se hicieron experimentos de quimiotaxis frente a la quimiocina CCL21, usando células de ganglio linfático de ratones de cepa silvestre tratadas con un inhibidor específico de Jak3, WHI-P31. Este inhibidor funciona uniéndose al sitio activo de la cinasa Jak3, impidiéndole así la interacción con sus sustratos.

Anteriormente se había demostrado que los timocitos del ratón deficiente en Jak3 también presenta deficiencias en la respuesta migratoria frente a las quimiocinas CCL25 y CXCL12 pero no frente a la quimiocina CCL11 [14]. Aquí demostramos que la inhibición farmacológica de Jak3 con WHI-P131 reproduce los resultados observados con el ratón Jak3 $-/-$.

El tratamiento de las células de ganglios linfáticos con WHI-P131 bloquea su respuesta a la estimulación de CCR7 con su ligando CCL21. Lo cual confirma el papel de la cinasa Jak3 en la señalización de CCR7.

La demostración definitiva de que Jak3 es necesario para transducir las señales del receptor de quimiocinas, explica, en parte, la ausencia de ganglios linfáticos en el ratón Jak3 $-/-$, ya que la señalización por CCR7 es indispensable para que los linfocitos T

vírgenes migren hacia estos órganos. Aunque cabe la posibilidad de que este defecto tenga un origen más temprano, en defectos en la organogénesis de los ganglios por una ausencia de señalización del receptor de IL-7, que está involucrado en el desarrollo, es decir, que no existiera el lugar hacia donde migrar. Esta cuestión se resuelve parcialmente con la observación de los ratones deficientes en IL-7R α y γ c si poseen rudimentos de ganglios en los sitios donde el ganglio debió desarrollarse. Sin embargo, para la demostración clara de que parte de los defectos en la periferia del ratón Jak3^{-/-} se deben a deficiencias de señalización de CCR7 por la ausencia de Jak3, son necesarios experimentos de transferencia de células del ratón Jak3^{-/-} a ratones de cepa silvestre. Estos experimentos fueron desarrollados por el grupo de trabajo y demostraron que las células del ratón deficiente de Jak3, presenta defectos en la migración hacia los ganglios. Estos resultados confirman que Jak3 es necesario para la transducción de señales de CCR7, y que el fenotipo del ratón Jak3 con respecto a los ganglios se explica en parte, a los defectos en la señalización de CCR7 por la ausencia de la cinasa Jak3.

6. RESULTADOS

6.1 MIGRACIÓN EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN DE CCR7

El receptor de quimiocinas CCR7 juega un papel crucial en la migración intersticial en el timo y en la salida de los linfocitos T hacia ganglios linfáticos periféricos. Se realizaron experimentos de quimiotaxis con CCL21 y CCL19, los ligandos naturales de CCR7, en timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$ como control para analizar si existían defectos en la migración hacia esta quimiocina en ratones deficientes en Jak3.

La respuesta migratoria de los timocitos frente a CCL21 siguió un patrón dependiente de la concentración de la quimiocina, con un pico de migración entre los 50 y 100 ng/ml (fig 6.1). Aunque ambos tipos celulares muestran una respuesta quimiotáctica, los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ presentan una migración significativamente disminuida comparada con la migración que se observa en los timocitos del ratón Jak3 $+/-$ a las concentraciones de 50, 100 y 500 ng/ml de CCL21.

La respuesta migratoria obtenida de los timocitos Jak3 $-/-$ frente a la quimiocina CCL19 se encuentra afectada comparada con la respuesta de los timocitos Jak3 $+/-$. Mientras que los timocitos del ratón Jak3 $+/-$ presentan actividad quimiotáctica con un pico de migración a la concentración de 50 ng/ml de CCL19, los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ tienen una respuesta muy baja o casi nula hacia las diferentes concentraciones de CCL19 analizadas en el experimento (fig 6.2).

Además se demostró en experimentos previos del laboratorio que existen defectos en la migración de timocitos de Jak3 $-/-$ hacia CCL25 y CXCL12. Este defecto en la migración no es un efecto inespecífico, ya que en respuesta a otras quimiocinas como CCL4, CCL5 y CCL11, los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no muestran diferencias en la migración comparados con los ratones Jak3 $+/-$ [1].

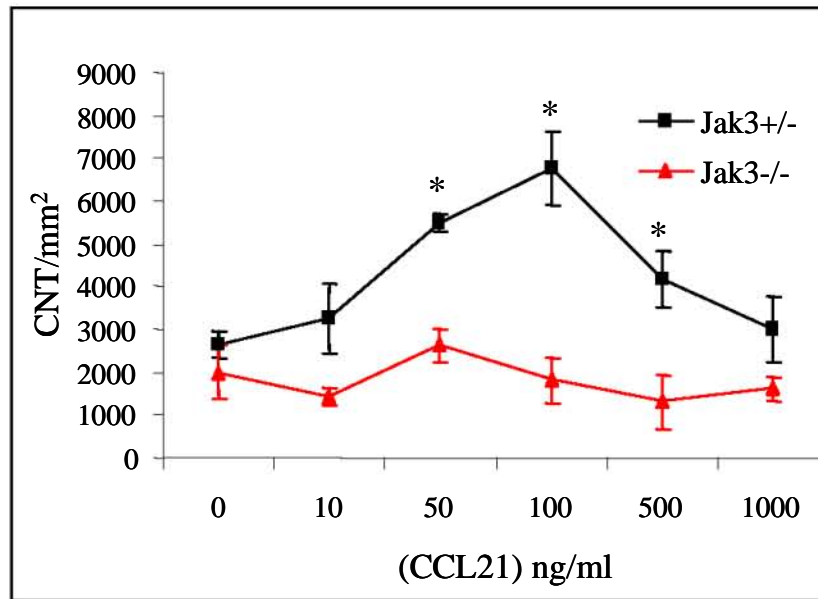


Figura 6.1 Migración de timocitos en respuesta a CCL21 por 2 horas. Se utilizaron 3 pozos por cada concentración. La gráfica muestra el promedio del triplicado con error estándar. * Diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los datos se analizaron mediante una prueba de t de student no apareada.

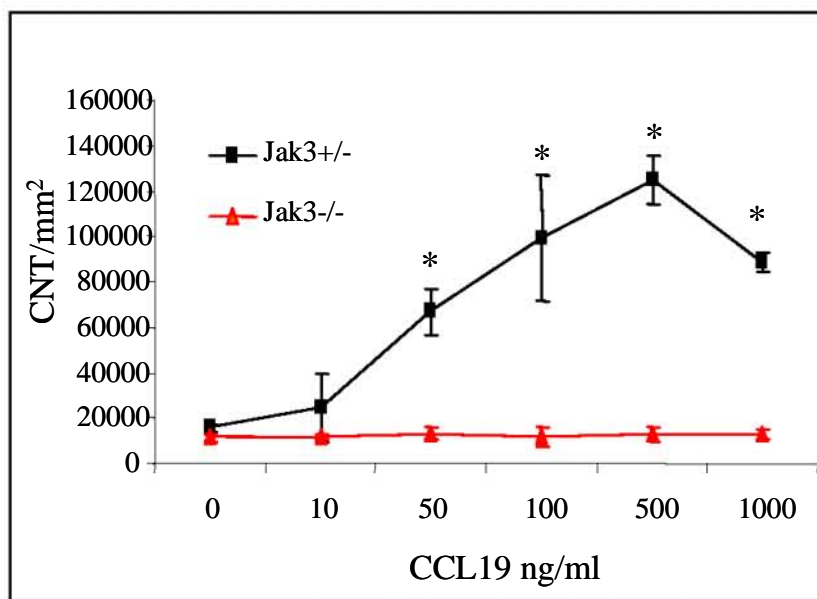


Figura 6.2 Migración de timocitos en respuesta a CCL19 por 2 horas. Se utilizaron 3 pozos por cada concentración. La gráfica muestra el promedio del triplicado con error estándar. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los datos se analizaron mediante una prueba de t de student no apareada.

6.2 ANALISIS CUALITATIVO DE LA EXPRESIÓN mRNA DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Las diferencias en respuesta migratoria de los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ podrían deberse ya sea a defectos en la señalización de los receptores de quimiocina o a una disminución de los niveles de expresión de los receptores de quimiocina en el ratón deficiente de Jak3.

Para definir si había defectos de expresión de receptores de quimiocinas en los ratones Jak3 $-/-$, se caracterizó la expresión de varios receptores de quimiocinas: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9 y CXCR4 en timocitos totales de ratones Jak3 $-/-$, Jak3 $+/-$ y Jak3 $+/+$ con la técnica de RT-PCR cualitativa.

Se extrajo RNA total de timocitos adultos de ratones Jak3 $+/+$, Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$ y se sintetizó cDNA. El cDNA se probó en PCR para detectar los RNA mensajeros de los diferentes receptores. Se detectó RNA mensajero de todos los receptores de quimiocinas probados para el ratón (figura 6.3) demostrando que la falta de señales mediadas por citocinas que utilizan la γc no induce la inhibición de la transcripción de los genes de los receptores de quimiocinas ensayados y que las deficiencias en la quimiotaxis de timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no se deben a la ausencia del mensajero del receptor de quimiocinas CCR7.

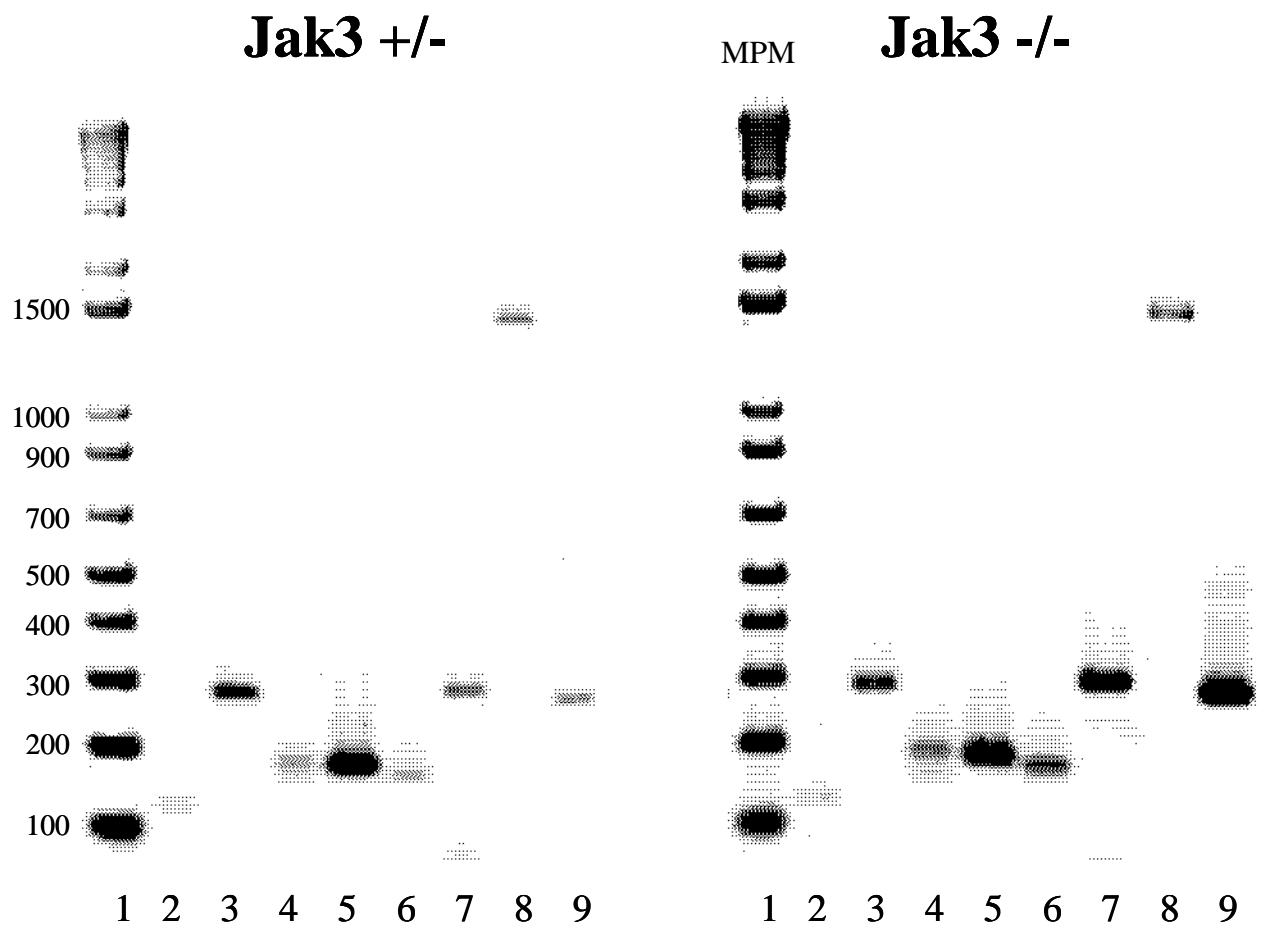


Figura 6.3 Comparación de la expresión RNA mensajero de receptores de quimiocinas en timocitos Jak3 +/- y Jak3 -/-. Carril (1) MPM, (2) CCR1, (3) CCR2, (4) CCR3, (5) CCR4, (6) CCR5, (7) CCR7, (8) CCR9 y (9) CXCR4.

6.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE mRNA DE RECEPTORES DE QUIMIOCINA

Dado que no existen diferencias cualitativas en la expresión de mRNA para receptores de quimiocinas entre los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y los timocitos de los ratones Jak3 $+/-$. Se investigó si existían diferencias cuantitativas en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en timocitos de ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+/-$.

Utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real se cuantifico el mensajero de los receptores de quimiocina CCR7, CCR9, CXCR4. En este tipo de ensayos, la cantidad de mensajero del gen de interés se normaliza con respecto a la cantidad de mensajero de un gen de expresión constitutiva, para corregir diferencias en calidad y cantidad de RNA en las diferentes muestras que inevitablemente existen como resultado de diferencias en la cantidad de muestra y en extracción. El control endógeno utilizado fue la hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT). Se extrajo RNA total de timos adultos de ratones Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$ y se hizo un pool. El RNA total extraído se trató con DNAsaI, se sintetizó cDNA (DNA complementario) y se sometió a PCR en tiempo real.

Los resultados muestran que la expresión de los mensajeros para CCR9 y CXCR4 no muestra diferencias significativas entre los timocitos de ratones Jak3 $+/-$ y Jak3 $-/-$. La expresión del mensajero de CCR7 muestra diferencias significativas entre los timocitos Jak3 $+/+$ y Jak3 $-/-$, ya que el análisis muestra que los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ presentan una expresión superior de CCR7 comparada con la de los timocitos Jak3 $+/+$. Demostrando así que las deficiencias en migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ no se deben a niveles disminuidos en expresión de RNA mensajero de estos receptores de quimiocinas lo que apoyaría que el defecto se encuentra a nivel de señalización. Estos experimentos se repitieron usando 6 extracciones distintas de RNA con datos muy reproducibles (figura 6.4).

Para comparar la expresión de mensajero entre las diferentes muestras se obtuvo el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia del SYBR Green (se intercala en la doble cadena y fluoresce marcando así la aparición de doble cadena) alcanzara un cambio en el nivel de fluorescencia significativo sobre el umbral (C_t = Ciclo umbral). Los datos de PCR en tiempo real se presentan como la expresión relativa con respecto a los timocitos del ratón Jak3 $+/+$ (normalizador) utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ en el cual la expresión relativa es igual a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ donde:

$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del gen endógeno HPRT de la muestra}) - \Delta\Delta Ct \text{ de la muestra normalizadora.}$

Cada muestra se corrió por triplicado y los valores de Ct fueron promediados en cada tipo de reacción. Estos resultados se usaron para calcular la expresión relativa del mensajero de cada receptor de quimiocina en los timocitos del ratón Jak3 -/- comparado con la cantidad de mensajero de cada receptor en los timocitos del ratón Jak3 +/+. El análisis de significancia fue realizado usando el programa qgene con la ecuación 3 de acuerdo a la referencia. El cálculo de la expresión normalizada se soporta en los valores de eficiencia de amplificación calculados a partir de las curvas de eficiencia de amplificación de cada gen. Se utilizó una prueba de t de Student no apareada de dos colas. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

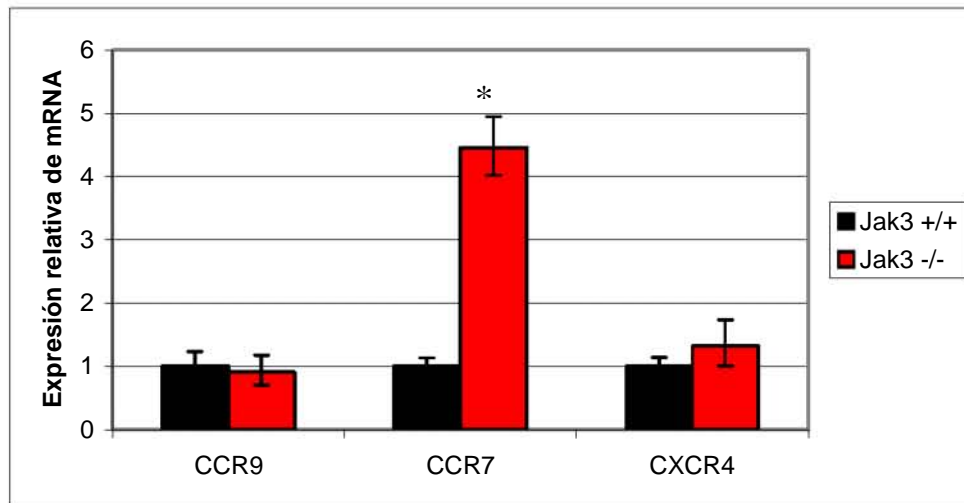
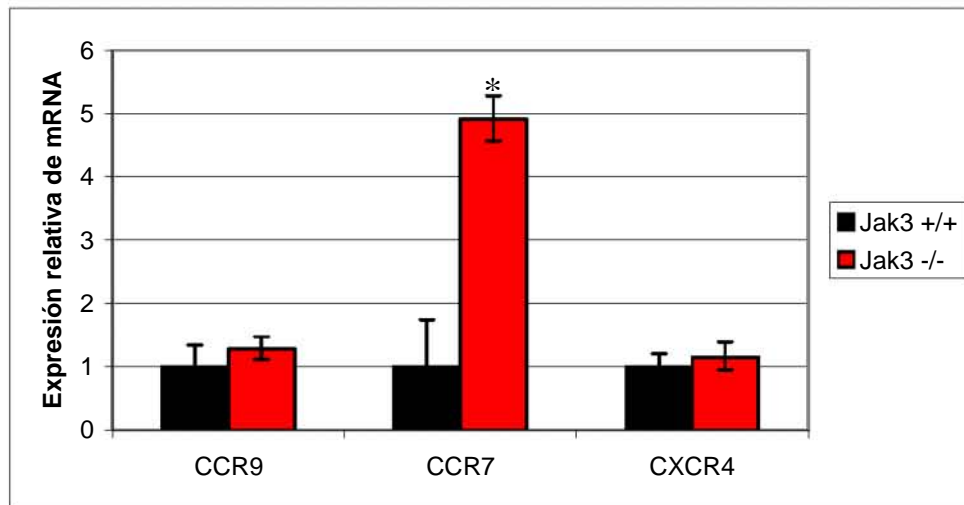


Figura 6.4 Expresión de CCR9, CCR7 y CXCR4 en timocitos de ratones Jak3 -/- y Jak3 +/+. Se graficó el promedio de los triplicados con desviación estándar de la expresión, corregidos con el mensajero de HPRT y normalizados con respecto a la expresión de cada receptor en el ratón Jak3 +/+. Se muestran 2 experimentos representativos.

6.4 QUIMIOTAXIS EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE Jak3 (WHI-P131)

Se demostró que en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no presentan deficiencias de expresión de RNA mensajero para los receptores de quimiocinas estudiados, lo que sugiere que los defectos de migración observados en los timocitos de ratones Jak3 $-/-$ no se deben a defectos en la expresión de receptores de quimiocinas. Para descartar la posibilidad de que los defectos en migración en el ratón Jak3 $-/-$ se deban a deficiencias en el desarrollo de los timocitos en ausencia de Jak3 se midió la respuesta quimiotáctica de timocitos y linfocitos de ganglio de ratones silvestres, en presencia de un inhibidor específico de Jak3: WHI-P131.

Los timocitos de ratón tratados fueron probados con las quimiocinas CCL25, CXCL12 y CCL11 para probar la relevancia de Jak3 en la señalización de quimiocinas durante la migración intersticial en timo. Como control de inhibición se utilizó la toxina pertussis (PTX), que bloquea la función de las proteínas $G_{\alpha i}$ asociadas a los receptores de quimiocina.

Como se esperaba, la PTX bloqueó completamente la respuesta quimiotáctica hacia CCL25, CXCL12, y CCL11 (figuras 6.5, 6.6 y 6.7 respectivamente) a todas las concentraciones de quimiocina. La inhibición farmacológica de Jak3 mostró que la migración en respuesta a CCL25 y CXCL12 se afecta seriamente en ausencia de Jak3 pero la respuesta de los timocitos a CCL11 no se afecta (figuras 6.5, 6.6 y 6.7, respectivamente), sugiriendo que en timocitos Jak3 está involucrado en la señalización de los receptores de quimiocina CCR9 y CXCR4 pero no es necesario para la señalización del receptor CCR3. Estos resultados reproducen el fenotipo de migración observado en el ratón Jak3 $-/-$, los cuales presentan una migración deficiente hacia las quimiocinas CCL25 y CXCL12 pero no hacia la quimiocina CCL11.

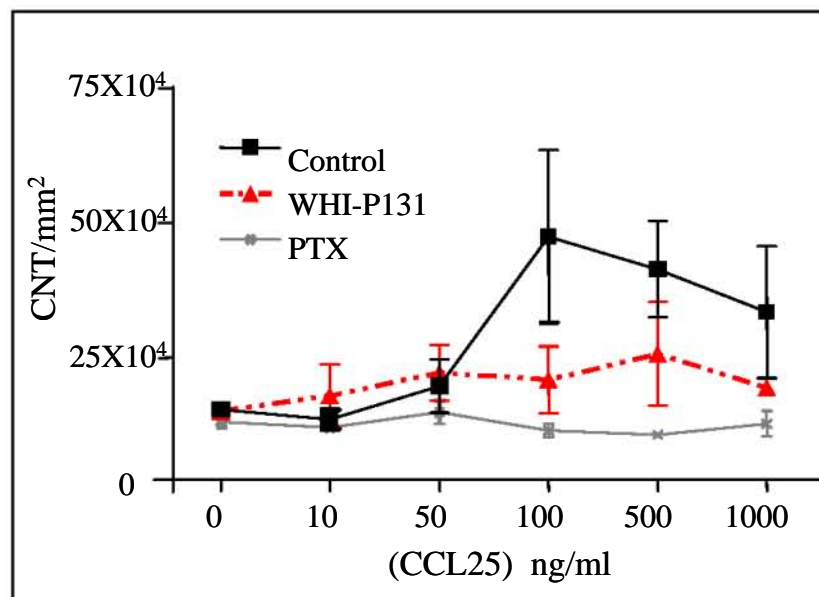


Figura 6.5 Quimiotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL25 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CCR9. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

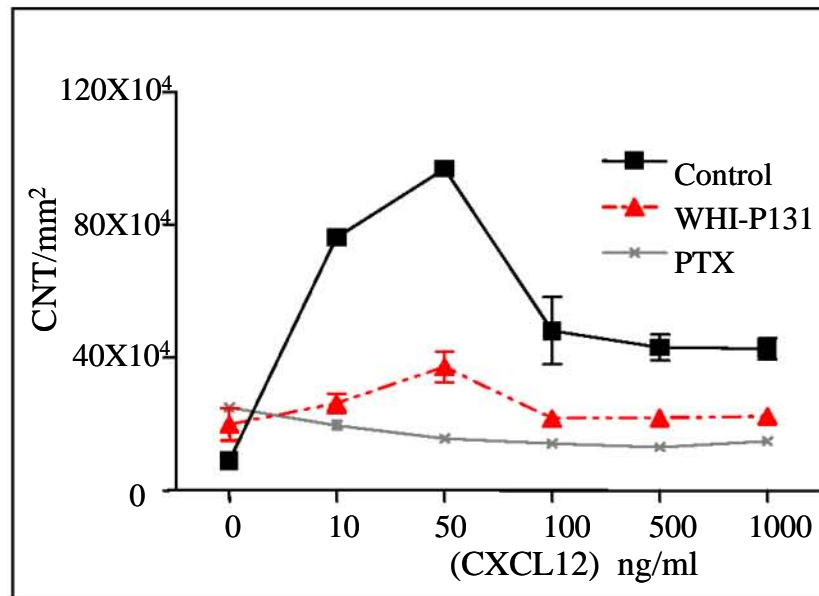


Figura 6.6 Quimiotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CXCL12 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CXCR4. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

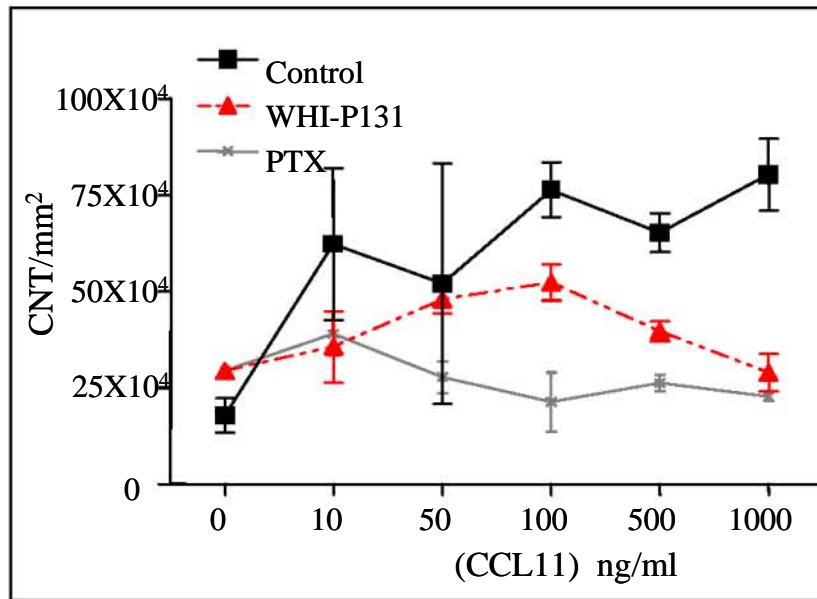


Figura 6.7 Quimotaxis de timocitos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL11 que es el ligando para el receptor de quimiocinas CCR3. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación, se muestra un experimento representativo de un total de tres.

Además se probó el efecto de tratar con la droga linfocitos de ganglios periféricos para evaluar la participación de Jak3 en la señalización de CCR7 en periferia. Se midió la respuesta quimiotáctica hacia CCL21 de las células inhibidas farmacológicamente para Jak3 comparada con las células no inhibidas. Como control de inhibición se utilizó PTX.

El bloqueo de las $G_{\alpha i}$ por PTX inhibió casi completamente la migración de los linfocitos de ganglio en respuesta a CCL21, además la inhibición de Jak3 también muestra deficiencias en la respuesta quimiotáctica en respuesta a CCL21 en todas las concentraciones ensayadas con las células sin tratamientos con (figura 6.8).

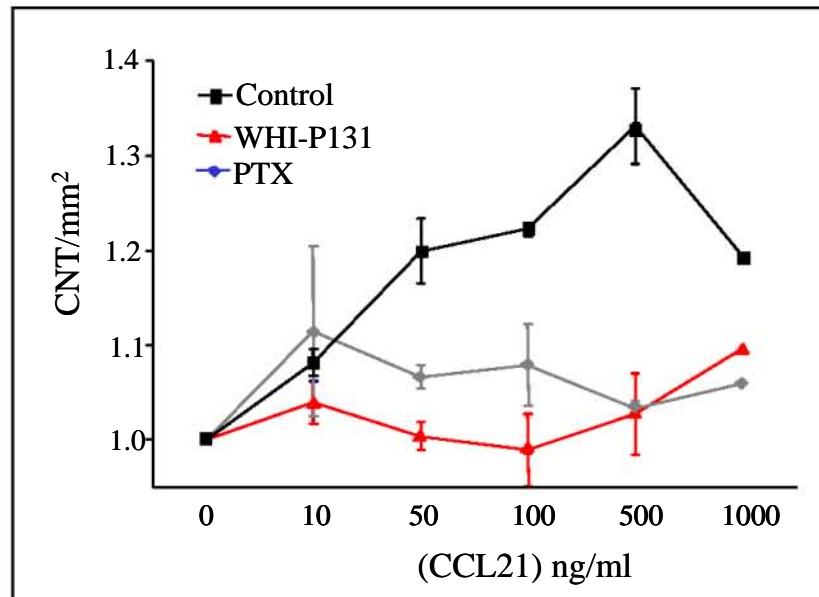


Figura 6.8 Quimioaxis de células de ganglios periféricos de ratón de cepa sillvestre sin tratamiento (control) y tratados con las drogas WHI-P131 (inhibidor de Jak3) y PTX (inhibidor de proteínas $G_{\alpha i}$). Las células tratadas se prueban contra diferentes concentraciones que van de 0 a 1000 ng/ml de la quimiocina CCL21 que es ligando natural para el receptor de quimiocinas CCR7. Se grafica el promedio de los duplicados con desviación.

5.4 FOSFORILACIÓN DE JAK3 EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CCR7

Dado que se demostró que no existe una disminución en la expresión del RNA mensajero para el receptor de quimocinas CCR7 en los timocitos de ratones Jak3 $-/-$; se sugirió que los defectos en la migración de los timocitos del ratón deficiente en Jak3 en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21 podían deberse a una deficiencia en la señalización de este receptor en las células deficientes en Jak3, ya que la cinasa Jak3 podría encontrarse en la vía de señalización de CCR7. Esta hipótesis apoyada en los experimentos de migración de células del ratón de cepa silvestre tratados con el inhibidor específico de Jak3, WHI-P131 en donde se observó una migración disminuida con respecto a las células no tratadas en respuesta a la estimulación de las células con CCL21.

Se hicieron experimentos de fosforilación para medir la activación de la cinasa Jak3 en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos.

Para estos experimentos se inmunoprecipitó Jak3 con el anticuerpo policlonal anti-Jak3, se reveló con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10) y posteriormente la misma membrana se reveló con un anticuerpo contra Jak3 total en la membrana para normalizar la fosforilación de Jak3 y descartar la posibilidad de que el aumento se deba a mayor cantidad de proteína total. En un trabajo previo del grupo de trabajo [73] se había demostrado que esta inmunoprecipitación es específica al encontrarse una banda entre el rango de los 110 y los 120 kDa de acuerdo al peso esperado para Jak3 de 116 kDa, sin embargo, la eficiencia de inmunoprecipitación es baja, solo se reportó un índice de inmunoprecipitación de entre el 10 y 15% del total de Jak3 en la muestra, por lo que para los experimentos de fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación de CCR7 se decidió usar células de ganglios periféricos que se sabe tienen una expresión de CCR7 mayor que los timocitos.

Como control positivo se utilizó IL-7 murina recombinante (rmIL-7), ya que está reportada la fosforilación de la cinasa Jak3 en respuesta a la estimulación con IL-7. En experimentos previos del laboratorio se determinó que la concentración óptima para la estimulación de las células con IL-7 es de 50 ng/ml. El tiempo que se utilizó fue el reportado en la literatura como el pico de fosforilación para Jak3 con el estímulo de IL-7, 5 minutos a 37°C. Como control negativo se utilizó medio de estimulación sin quimiocina ni rIL-7 por 5 min o 15 seg a 37°C.

Para medir la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con quimiocinas se utilizaron dos concentraciones que estuvieran cerca del pico de quimiotaxis 100 y 200 ng/ml. Se probaron las quimiocinas CCL19 y CCL21 por 15 segundos a 37°C debido a que con otras quimiocinas probadas en el laboratorio y las reportadas en la literatura se observa el pico de fosforilación de las cinasas de Janus de los 10 a los 60 segundos.

Se demostró una fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con CCL21 y CCL19 (figura 6.9) a los 15 segundos con 100 y 200 ng/ml de quimiocina aunque la concentración más eficiente para estímulo parece ser la de 100 ng/ml lo cual corresponde al pico de quimiotaxis. Esta fosforilación rápida muestra que la cinasas Jak3 está involucrada en la señalización de CCR7 y sugiere que los defectos en la migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ se deben a deficiencias en la señalización del receptor.

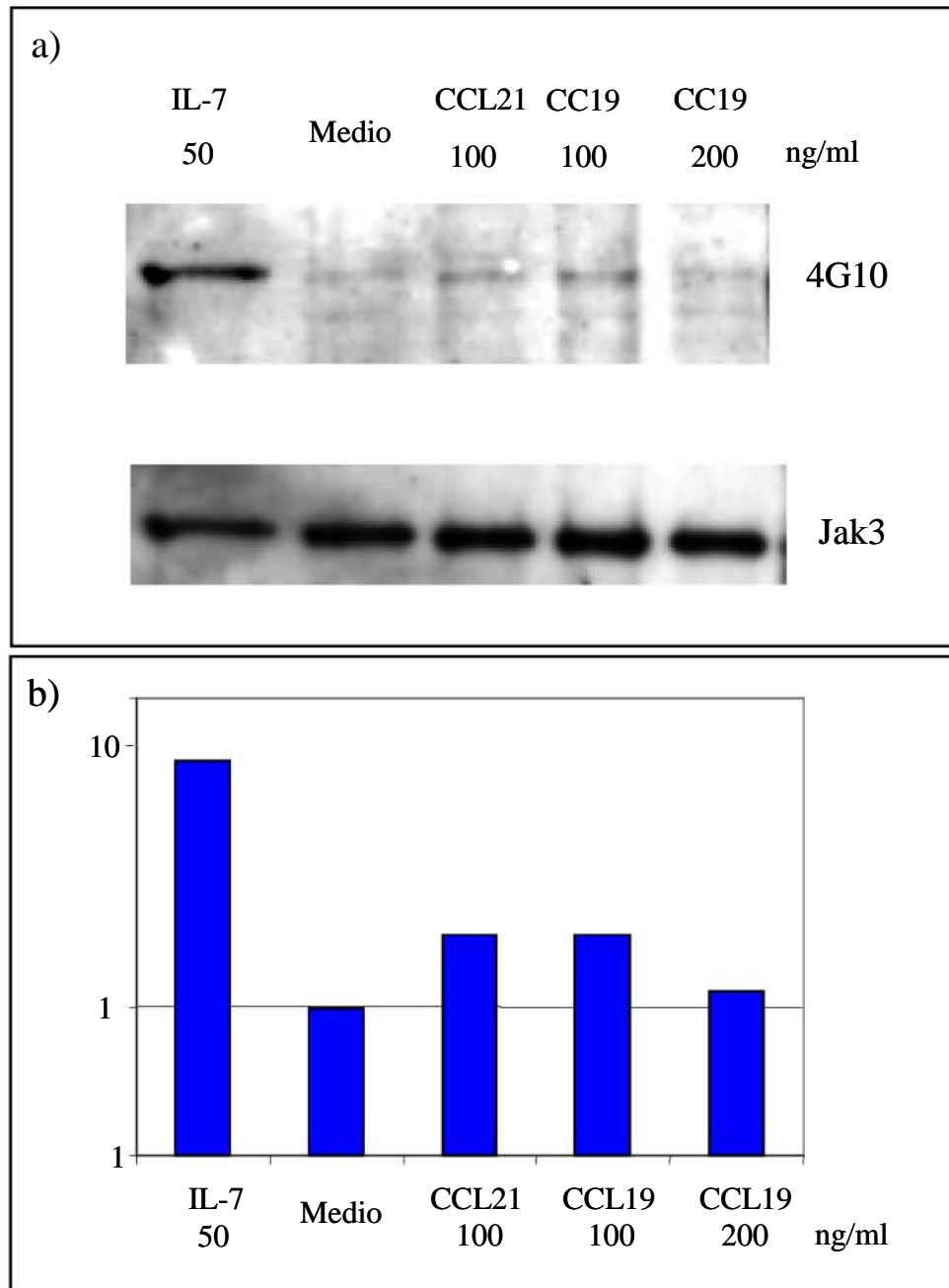


Figura 6.9 Análisis de la fosforilación de Jak3 en respuesta a estimulación con CCL21 y CCL19 por 15 segundos. Carril (1) IL-7, (2) Medio, (3) SLC100 ng/ml, (4) CCL19 100 ng/ml, (5) CCL21 200 ng/ml.

7. DISCUSIÓN

Una vez que los linfocitos T han terminado su maduración, estos salen del timo hacia la periferia para migrar a los órganos linfoides secundarios en busca de su antígeno. Los ratones deficientes en Jak3 presentan ganglios linfáticos periféricos muy pequeños, fenotipo muy parecido al de los ratones deficientes en IL-7R α y en γc [1-3]. Estos ratones son capaces de formar el rudimento de los ganglios linfáticos [3], sin embargo presentan serias deficiencias para poblarlos. Las señales inducidas por el receptor de quimiocinas CCR7, es una de las principales guías de los linfocitos T vírgenes para dejar el timo y salir hacia los ganglios linfáticos [4-8]. Los ratones deficientes en CCR7 o en sus ligandos (*plt/plt*) presentan ganglios linfáticos muy pequeños, y prácticamente sin linfocitos T vírgenes [9, 10]. Existe evidencia creciente de la participación de las cinasas Jak en la señalización de receptores de quimiocinas en diferentes tipos celulares [11-19]. Por lo que se propone que la cinasa Jak3 podría participar en la señalización de CCR7, en la migración de linfocitos T vírgenes hacia los ganglios linfáticos periféricos, lo que explicaría en parte el fenotipo observado en la periferia del ratón deficiente en Jak3.

Los timocitos SP (positivos sencillos) seleccionados positivamente aumentan la expresión de CCR7 y salen del timo hacia el torrente sanguíneo para unirse al reservorio de células T vírgenes periféricas. Para analizar la respuesta migratoria de los linfocitos T vírgenes a la estimulación de CCR7 en ausencia de la cinasa Jak3, se hicieron experimentos de quimiotaxis con timocitos de los ratones Jak3 *-/-*. Se demostró que los timocitos del ratón deficiente en Jak3, no responden a la estimulación con CCL19 y CCL21 a ninguna de las concentraciones ensayadas, en contraste, los timocitos de ratones heterocigotos (Jak3 *+/-*) sí presentaron respuestas quimiotácticas a estas concentraciones. Estos experimentos sugieren que la migración mediada por CCR7 en linfocitos T vírgenes, requiere de la participación de Jak3.

Sin embargo, esta migración deficiente de los timocitos Jak3 *-/-* podría deberse a niveles de expresión de CCR7 menores en los timocitos de los ratones deficientes en Jak3, ya que se ha demostrado que algunos de los receptores de citocinas que señalizan a través de la cadena gamma común, y que por lo tanto utilizan Jak3, pueden regular la expresión de receptores de quimiocinas. Se ha demostrado que IL-2 aumenta la expresión de CXCR4 en linfocitos T humanos [20]. En progenitores tímicos, IL-7 aumenta la expresión de CXCR4 [21]. En linfocitos T, IL-15 induce la expresión de

mensajero para receptores de quimiocinas tipo CC pero no CXC [22]. Las IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 aumentan la expresión de CXCR4 en células de memoria [23]. Entonces, la ausencia de la señalización de estas citocinas, podría modificar la expresión de los receptores de quimiocinas en los ratones Jak3 $-/-$.

Por lo tanto, mediante la técnica de RT-PCR cualitativa, se examinó la presencia del mensajero de varios receptores de quimiocinas en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$. Estos experimentos demostraron que estos ratones sí expresan todos los receptores de quimiocinas estudiados, entre los cuales se encuentra CCR7.

Para descartar la posibilidad de que, los defectos en la migración de estos en respuesta a la estimulación con CCL19 y CCL21, se debieran a diferencias en el nivel de expresión de CCR7 en los ratones Jak3 $-/-$, comparado con la expresión en los ratones Jak3 $+$. Se hicieron experimentos de RT-PCR cuantitativa utilizando la técnica de tiempo real. Como control endógeno se utilizó el gen de la hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT), ya que se ha demostrado que posee una expresión constante que es independiente de estímulos extracelulares [24].

Se estudió el nivel de expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+$. Además se estudió la expresión de CCR9 y CXCR4, ya que en experimentos previos del laboratorio se demostró que los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ presentan defectos en la migración en respuesta a la estimulación con CCL25 y CXCL12, los ligandos respectivos de estos receptores [14]. Estos experimentos mostraron que el nivel de expresión de CCR9 y CXCR4 no es significativamente distinto en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ y Jak3 $+$, lo que indicó que los defectos en la migración de los timocitos Jak3 $-/-$ en respuesta a la estimulación de CCR9 y CXCR4 no se deben a niveles disminuidos de expresión en estas células sino a defectos de señalización.

Inesperadamente, el nivel de expresión del receptor de quimiocinas CCR7 se encuentra aumentado más de cuatro veces en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$, estos resultados se reprodujeron en 6 extracciones independientes de pools de 3 a 4 ratones, confirmando el resultado. Se pueden considerar varias hipótesis para este resultado, la primera, que los niveles de CCR7 sean regulados negativamente por la activación de Jak3, así, en la ausencia de Jak3, los niveles de CCR7 aumentan; la segunda, CCR7 transduce señales independientemente de Jak3, entonces, las células que expresan altos niveles de CCR7 tienen una ventaja, incluso en la ausencia de Jak3; tercero, que la

ausencia de señalización mediada por CCR7 indujera una sobre-expresión del receptor como un intento de mecanismo compensatorio.

La abundancia del RNA mensajero no necesariamente correlaciona con la expresión de la proteína, sin embargo existen reportes de receptores de quimiocinas donde sí lo hace [23]. Sin embargo, esta cuestión solo puede ser aclarada por la cuantificación del receptor en superficie. La expresión aumentada de CCR7 en los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ fue confirmada en experimentos posteriores del grupo de trabajo, utilizando una proteína quimérica CCL19-Ig, que ha demostrado ser un marcador confiable de los niveles de expresión de CCR7 en células linfoides [15].

Estos resultados demuestran que las deficiencias en la migración de los timocitos del ratón Jak3 $-/-$ no se deben a una menor expresión del receptor de quimiocinas CCR7. Entonces se procedió a investigar si Jak3 se activa en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21. La activación de Jak3 puede ser medida por la fosforilación en tirosinas de esta cinasa [25, 26].

Este análisis reveló la fosforilación de Jak3 en tirosinas en respuesta a la estimulación con sus ligandos CCL19 y CCL21. Esta fosforilación es rápida, alcanzando un pico de fosforilación entre los 30-60 segundos, y decayendo a los niveles basales al cabo de 3 minutos (datos no mostrados). Estos resultados son consistentes con los resultados previos que demuestran la fosforilación de cinasas Jak en respuesta a la estimulación con quimiocinas [11, 14, 16, 19]. Recientemente, un reporte demostró que en células de ganglios de ratón Balb/c, la cinasa Jak2 se fosforila en respuesta a la estimulación con CCL21, con un pico de fosforilación a los 60 segundos [15]. En este reporte se utiliza un inhibidor de Jak2 y Jak3, Tyr AG490. El tratamiento de las células con esta droga abate la fosforilación de Jak2, y la migración y activación de integrinas en respuesta a la estimulación con CCL21. En este reporte no se midió la fosforilación de Jak3 [15]. Estos resultados no son contradictorios con los nuestros, ya que en la señalización de citocinas, estas se unen a receptores heterodiméricos cuyas cadenas están asociadas constitutivamente a distintos tipos de jaks, que en respuesta a la unión del ligando, se transfosforilan para la transducción de señales. Por ejemplo, en la transducción de señales de IL-2 e IL-7, Jak1 y Jak3 están involucradas, ya que cada cinasa se asocia constitutivamente a un tipo de cadena del receptor. Así, en la señalización de CCR7, Jak2 y Jak3 podrían estar involucradas. El mecanismo por el cual las Jaks transmiten las señales de los receptores de quimiocinas no está establecido. Se ha propuesto un modelo de dimerización, basado en resultados que demuestran la

coprecipitación de los receptores en dímeros u oligómeros en respuesta a la estimulación con quimiocina [12, 16, 27], de acuerdo al cual, en respuesta a la estimulación con quimiocina, los receptores de quimiocina se dimerizan y unen Jaks, los cuales fosforilan al receptor de quimiocinas [28]. La actividad de las cinasas Jak, en estos trabajos, parece no solo ser independiente de proteínas G α i, sino necesaria para su asociación con el receptor [11]. Apoyando esta hipótesis, se ha demostrado que la dimerización de receptores acoplados a proteínas G, como los opioides [29-31], muscarínicos [31] y adrenérgicos [30], y la dimerización de otros receptores de siete dominios transmembranales, como el receptor de GABA [32, 33], tiene un papel importante en la señalización. Actualmente no hay evidencia directa de que CCR7 se dimerice en respuesta a la estimulación con sus ligandos, son necesarios experimentos en el futuro que determinen el mecanismo de acción de la Jak3 y Jak2 en la transducción de señales de CCR7.

Aunque se había demostrado que Jak3 se activa en respuesta a la estimulación con CCL19 y CCL21, y que esto podía explicar los defectos en la migración de los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$, existía la posibilidad de que los defectos en la migración de estos ratones fueran una consecuencia de defectos en la maduración de estas células, debido al importante papel en la señalización de IL-7 en el desarrollo de los linfocitos T [34, 35]. Para resolver esta cuestión, se hicieron experimentos de quimiotaxis frente a la quimiocina CCL21, usando células de ganglio linfático de ratones de cepa silvestre tratadas con un inhibidor específico de Jak3, WHI-P31. Este inhibidor funciona uniéndose al sitio activo de la cinasa Jak3, impidiéndole así la interacción con sus sustratos.

Anteriormente se había demostrado que los timocitos del ratón deficiente en Jak3 también presenta deficiencias en la respuesta migratoria frente a las quimiocinas CCL25 y CXCL12 pero no frente a la quimiocina CCL11 [14]. Aquí demostramos que la inhibición farmacológica de Jak3 con WHI-P131 reproduce los resultados observados con el ratón Jak3 $-/-$.

El tratamiento de las células de ganglios linfáticos con WHI-P131 bloquea su respuesta a la estimulación de CCR7 con su ligando CCL21. Lo cual confirma el papel de la cinasa Jak3 en la señalización de CCR7.

La demostración definitiva de que Jak3 es necesario para transducir las señales del receptor de quimiocinas, explica, en parte, la ausencia de ganglios linfáticos en el ratón Jak3 $-/-$, ya que la señalización por CCR7 es indispensable para que los linfocitos T

vírgenes migren hacia estos órganos. Aunque cabe la posibilidad de que este defecto tenga un origen más temprano, en defectos en la organogénesis de los ganglios por una ausencia de señalización del receptor de IL-7, que está involucrado en el desarrollo, es decir, que no existiera el lugar hacia donde migrar. Esta cuestión se resuelve parcialmente con la observación de los ratones deficientes en IL-7R α y γ c si poseen rudimentos de ganglios en los sitios donde el ganglio debió desarrollarse. Sin embargo, para la demostración clara de que parte de los defectos en la periferia del ratón Jak3^{-/-} se deben a deficiencias de señalización de CCR7 por la ausencia de Jak3, son necesarios experimentos de transferencia de células del ratón Jak3^{-/-} a ratones de cepa silvestre. Estos experimentos fueron desarrollados por el grupo de trabajo y demostraron que las células del ratón deficiente de Jak3, presenta defectos en la migración hacia los ganglios. Estos resultados confirman que Jak3 es necesario para la transducción de señales de CCR7, y que el fenotipo del ratón Jak3 con respecto a los ganglios se explica en parte, a los defectos en la señalización de CCR7 por la ausencia de la cinasa Jak3.

8. CONCLUSIONES

1. Los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ presentan una migración deficiente en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21.
2. Los receptores de quimiocinas CCR9, CCR7 y CXCR4 se encuentran presentes en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$.
3. Los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ no presentan diferencias cuantitativas en la expresión de los receptores de quimiocinas CCR9 y CXCR4 con respecto a la expresión en los timocitos de los ratones Jak3 $+/-$ o Jak3 $+/+$.
4. La expresión del receptor de quimiocinas CCR7 se encuentra aumentada cuatro veces en los timocitos de los ratones Jak3 $-/-$ con respecto a la expresión en los timocitos de los ratones Jak3 $+/-$ o Jak3 $+/+$.
5. La cinasa Jak3 se fosforila rápidamente en respuesta a la estimulación de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21 en células de ganglios linfáticos.
6. Las células de ganglios de ratones Jak3 $+/+$ tratadas con el inhibidor específico de Jak3 WHI-P131, presentan deficiencias en la migración en respuesta a la estimulación de CCR7 con CCL21 comparadas con células sin tratamiento WHI-P131.

APÉNDICE I

REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS

Solución inhibidora de fosfatasas

| | |
|---------------------------------|-------|
| PBS | 1X |
| NaF | 20 mM |
| Na ₃ VO ₄ | 1 mM |

Solución de lisis con inhibidores de proteasas

| | |
|---|---------|
| Tritón X-100 | 1% |
| Tris pH 8.0 | 20 mM |
| NaCl | 100 mM |
| EDTA | 1 mM |
| NaF | 20 mM |
| Na ₃ VO ₄ | 2 mM |
| Na ₄ P ₂ O ₇ | 20 mM |
| PMSF | 0.3 mM |
| DTT | 1 mM |
| Aprotinina | 1 µg/ml |
| Leupeptina | 1 µg/ml |
| Pepstatina | 1 µg/ml |

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Gel concentrador

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Mezcla acrilamida-bisacrilamida 30% | 4% (v/v) |
| Tris pH 6.8 | 125 mM |
| SDS | 0.1% (p/v) |
| Persulfato de amonio | 0.1% (p/v) |
| TEMED | 0.1% (v/v) |

Gel separador

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Mezcla acrilamida-bisacrilamida 30% | 10% (v/v) |
| Tris pH 8.8 | 375 mM |
| SDS | 0.1% (p/v) |
| Persulfato de amonio | 0.1% (p/v) |
| TEMED | 0.1% (v/v) |

Amortiguador de electroforesis

| | |
|-----------|------------|
| Tris base | 25 mM |
| Glicina | 200 mM |
| SDS | 0.1% (p/v) |

Amortiguador para cargar proteínas 4X

| | |
|-------------------------|-----------|
| Tris pH 6.8 | 150 mM |
| 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 de geles de acrilamida

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

REACTIVOS UTILIZADOS EN EL WESTERN BLOT

TBS

| | |
|-------------|-------|
| Tris pH 7.6 | 50 mM |
| NaCl | 15 mM |

TBS-Tween

| | |
|----------|------------|
| TBS | 1X |
| Tween 20 | 0.1% (v/v) |

Solución bloqueadora para el anticuerpo anti-fosfotirosina

| | |
|-----------|----------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 5% (p/v) |

Solución de anticuerpo anti-fosfotirosina

| | |
|-----------------|-------------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 1% (p/v) |
| Anticuerpo 4G10 | 0.5 µg/ml |
| Azida de Sodio | 0.02% (p/v) |

Solución de anticuerpo secundario anti-ratón

| | |
|---|----------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 1% (p/v) |
| Anticuerpo de oveja anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) | 1:3000 |

Solución de limpieza de membranas

| | |
|--------------------------|-------------|
| Glicina | 200 mM |
| Ajustar a pH 2.5 con HCl | |
| Tween 20 | 0.05% (v/v) |

Solución de bloqueo para el anticuerpo anti-Jak3

| | |
|----------------|----------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 5% (p/v) |
| Leche en polvo | 2% (p/v) |

Solución de anticuerpo anti-Jak3

| | |
|---------------------|-------------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 1% (p/v) |
| Leche en polvo | 0.4% (p/v) |
| Suero de conejo 888 | 1:2000 |
| Azida de Sodio | 0.02% (p/v) |

Solución de anticuerpo secundario anti-conejo

| | |
|--|------------|
| TBS-Tween | 1X |
| BSA | 1% (p/v) |
| Leche en polvo | 0.4% (p/v) |
| Anticuerpo de burro anti-conejo acoplado a HRP. | 1:4000 |

1. Campbell, D.J., C.H. Kim, and E.C. Butcher, *Chemokines in the systemic organization of immunity*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 58-71.
2. Janeway, C.A.e.a., *IMMUNOBIOLOGY The Immune System in Health and Disease*, ed. t. Ed. 1999: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing.
3. Blattman, J.N., et al., *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 657-64.
4. Muller, G. and M. Lipp, *Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 217-24.
5. Finke, D., et al., *CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 363-73.
6. Fukuyama, S., et al., *Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTbetaR, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3(-)CD4(+)CD45(+) cells*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 31-40.
7. Mebius, R.E., P. Rennert, and I.L. Weissman, *Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 493-504.
8. Honda, K., et al., *Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis*. J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 621-30.
9. Luther, S.A., K.M. Ansel, and J.G. Cyster, *Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1191-8.
10. Yoshida, H., et al., *IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 643-55.
11. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
12. Thomazy, V.A., et al., *Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types*. Am J Pathol, 2003. **163**(1): p. 165-74.
13. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 867-78.
14. Gretz, J.E., A.O. Anderson, and S. Shaw, *Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex*. Immunol Rev, 1997. **156**: p. 11-24.
15. Girard, J.P. and T.A. Springer, *High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration*. Immunol Today, 1995. **16**(9): p. 449-57.
16. Young, A.J., *The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo*. Semin Immunol, 1999. **11**(2): p. 73-83.
17. Ingulli, E., et al., *In situ analysis reveals physical interactions between CD11b+ dendritic cells and antigen-specific CD4 T cells after subcutaneous injection of antigen*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2247-52.
18. Scheinecker, C., et al., *Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1079-90.
19. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2098-102.

20. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation*. J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 801-17.
21. Mebius, R.E., et al., *A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11019-24.
22. Bajenoff, M., S. Granjeaud, and S. Guerder, *The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 715-24.
23. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
24. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 135-41.
25. Mora, J.R., et al., *Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 88-93.
26. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
27. Fu, Y.X. and D.D. Chaplin, *Development and maturation of secondary lymphoid tissues*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 399-433.
28. Blackburn, C.C. and N.R. Manley, *Developing a new paradigm for thymus organogenesis*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 278-89.
29. Ansel, K.M. and J.G. Cyster, *Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 172-9.
30. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
31. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 217-42.
32. Dustin, M.L., T.G. Bivona, and M.R. Philips, *Membranes as messengers in T cell adhesion signaling*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 363-72.
33. Laudanna, C., et al., *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 37-46.
34. Stegelmann, F., et al., *Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7474-83.
35. Nakayama, T., et al., *Novel antiviral activity of chemokines*. Virology, 2006. **350**(2): p. 484-92.
36. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
37. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
38. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 593-620.
39. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
40. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines*. Faseb J, 1995. **9**(1): p. 57-62.

41. Dealwis, C., et al., *Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6941-6.
42. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.
43. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberly, *Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1229-34.
44. Patel, D.D., et al., *Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients.* Clin Immunol, 2001. **99**(1): p. 43-52.
45. Rajarathnam, K., et al., *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8.* Science, 1994. **264**(5155): p. 90-2.
46. Mellado, M., et al., *Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 397-421.
47. LaRosa, G.J., et al., *Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity.* J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25402-6.
48. Loetscher, P., et al., *Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 569-77.
49. Bermejo, M., et al., *Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains.* Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3192-204.
50. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.* J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
51. Langenkamp, A., et al., *Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells.* Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 474-82.
52. Jourdan, P., et al., *Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells.* J Immunol, 2000. **165**(2): p. 716-24.
53. Perera, L.P., C.K. Goldman, and T.A. Waldmann, *IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2606-12.
54. Damaj, B.B., et al., *Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops.* Faseb J, 1996. **10**(12): p. 1426-34.
55. Mellado, M., et al., *The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor.* J Immunol, 1998. **161**(2): p. 805-13.
56. Rodriguez-Frade, J.M., et al., *Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis.* J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 755-65.
57. Vila-Coro, A.J., et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway.* Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1699-710.
58. Arai, H. and I.F. Charo, *Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors.* J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21814-9.

59. Jiang, H., et al., *Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13430-4.
60. Mueller, S.G., et al., *Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8207-14.
61. Oppermann, M., et al., *Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8875-85.
62. Wu, G., et al., *Receptor docking sites for G-protein betagamma subunits. Implications for signal regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7197-200.
63. Berman, D.M. and A.G. Gilman, *Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1269-72.
64. De Vries, L., et al., *The regulator of G protein signaling family*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 235-71.
65. Shimizu, Y. and S.W. Hunt, 3rd, *Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase?* Immunol Today, 1996. **17**(12): p. 565-73.
66. Vicente-Manzanares, M., et al., *Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 4001-12.
67. Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano, *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 459-86.
68. Serrador, J.M., M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid, *Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(6): p. 228-33.
69. Durstin, M., et al., *Cytoplasmic phospholipase A2 translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 3142-6.
70. Peppelenbosch, M.P., et al., *Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products*. Cell, 1993. **74**(3): p. 565-75.
71. Rodriguez-Frade, J.M., et al., *The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3628-33.
72. Wong, M. and E.N. Fish, *RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 309-14.
73. Wong, M., et al., *Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11427-31.
74. Zhang, X.F., et al., *Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3342-8.
75. Soldevila, G., et al., *Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3*. Immunology, 2004. **112**(2): p. 191-200.
76. Shahrara, S., et al., *Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3568-83.
77. Stein, J.V., et al., *CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway*. Blood, 2003. **101**(1): p. 38-44.

78. Bartolome, R.A., et al., *Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion*. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 248-58.
79. Binari, R. and N. Perrimon, *Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in Drosophila*. *Genes Dev*, 1994. **8**(3): p. 300-12.
80. Kawata, T., et al., *SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium*. *Cell*, 1997. **89**(6): p. 909-16.
81. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 293-322.
82. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
83. Chen, M., et al., *Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(3): p. 947-56.
84. Saharinen, P. and O. Silvennoinen, *The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47954-63.
85. Huang, L.J., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish, *The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor*. *Mol Cell*, 2001. **8**(6): p. 1327-38.
86. Velazquez, L., et al., *A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway*. *Cell*, 1992. **70**(2): p. 313-22.
87. Miyazaki, T., et al., *Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway*. *Genes Dev*, 1998. **12**(6): p. 770-5.
88. Zhou, Y.J., et al., *Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases*. *Mol Cell*, 2001. **8**(5): p. 959-69.
89. Kawamura, M., et al., *Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(14): p. 6374-8.
90. Musso, T., et al., *Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1425-31.
91. Tortolani, P.J., et al., *Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies*. *J Immunol*, 1995. **155**(11): p. 5220-6.
92. Hofmann, S.R., et al., *Jak3-independent trafficking of the common gamma chain receptor subunit: chaperone function of Jaks revisited*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(11): p. 5039-49.
93. Ragimbeau, J., et al., *The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression*. *Embo J*, 2003. **22**(3): p. 537-47.
94. Rodig, S.J., et al., *Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 373-83.
95. Neubauer, H., et al., *Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 397-409.
96. Karaghiosoff, M., et al., *Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(5): p. 471-7.

97. Macchi, P., et al., *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID)*. Nature, 1995. **377**(6544): p. 65-8.
98. Russell, S.M., et al., *Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development*. Science, 1995. **270**(5237): p. 797-800.
99. O'Shea, J.J., et al., *A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(7): p. 555-64.
100. Nosaka, T., et al., *Defective lymphoid development in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 800-2.
101. Park, S.Y., et al., *Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 771-82.
102. Thomis, D.C. and L.J. Berg, *The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(4): p. 541-7.
103. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
104. Corcoran, A.E., et al., *The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis*. Embo J, 1996. **15**(8): p. 1924-32.
105. Cao, X., et al., *Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain*. Immunity, 1995. **2**(3): p. 223-38.
106. Maki, K., S. Sunaga, and K. Ikuta, *The V-J recombination of T cell receptor-gamma genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2423-7.
107. Suzuki, H., et al., *Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 499-505.
108. Tanaka, T., et al., *Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1103-7.
109. Baird, A.M., J.A. Lucas, and L.J. Berg, *A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3680-8.
110. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
111. Saint-Ruf, C., et al., *Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1208-12.
112. Thomis, D.C. and L.J. Berg, *Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function*. J Exp Med, 1997. **185**(2): p. 197-206.
113. Nakajima, H., et al., *The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis*. J Exp Med, 1997. **185**(2): p. 189-95.
114. Thomis, D.C., et al., *Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 794-7.
115. Saijo, K., et al., *Crucial role of Jak3 in negative selection of self-reactive T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(2): p. 351-6.
116. Sohn, S.J., et al., *Requirement for Jak3 in mature T cells: its role in regulation of T cell homeostasis*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2130-8.
117. Grossman, W.J., et al., *Dysregulated myelopoiesis in mice lacking Jak3*. Blood, 1999. **94**(3): p. 932-9.

118. Zhou, Y.J., et al., *Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13850-5.
119. Kurzer, J.H., et al., *Tyrosine 813 is a site of JAK2 autophosphorylation critical for activation of JAK2 by SH2-B beta*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4557-70.
120. Feener, E.P., et al., *Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4968-78.
121. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
122. Tomita, K., et al., *Cytokine-independent Jak3 activation upon T cell receptor (TCR) stimulation through direct association of Jak3 and the TCR complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25378-85.
123. Guillet-Deniau, I., A.F. Burnol, and J. Girard, *Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT2A receptor coupled to the Jak/STAT pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14825-9.
124. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 247-50.
125. Stein, J.V., et al., *The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 61-76.
126. Kim, T.K. and T. Maniatis, *Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway*. Science, 1996. **273**(5282): p. 1717-9.
127. Azam, M., et al., *Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing*. Immunity, 1997. **6**(6): p. 691-701.
128. Caldenhoven, E., et al., *STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13221-7.
129. Yin, T., et al., *Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1032-7.
130. Yoshimura, A., *The CIS family: negative regulators of JAK-STAT signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(3-4): p. 197-204.
131. Endo, T., et al., *CIS1 interacts with the Y532 of the prolactin receptor and suppresses prolactin-dependent STAT5 activation*. J Biochem (Tokyo), 2003. **133**(1): p. 109-13.
132. Naka, T., et al., *Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15577-82.
133. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
134. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
135. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 591-4.
136. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.

137. Egawa, T., et al., *The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor*. *Immunity*, 2001. **15**(2): p. 323-34.
138. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. *Immunity*, 1999. **10**(4): p. 463-71.
139. Glodek, A.M., et al., *Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis*. *J Exp Med*, 2003. **197**(4): p. 461-73.
140. Bowman, E.P., et al., *Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation*. *J Exp Med*, 2000. **191**(8): p. 1303-18.
141. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development*. *Immunol Rev*, 2004. **197**: p. 206-18.
142. Haynes, B.F. and C.S. Heinly, *Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1445-58.
143. Liu, C., et al., *The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 31-9.
144. Wurbel, M.A., et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2626-32.
145. Rossi, F.M., et al., *Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(6): p. 626-34.
146. Uehara, S., et al., *A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2811-9.
147. Misslitz, A., et al., *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. *J Exp Med*, 2004. **200**(4): p. 481-91.
148. Kwan, J. and N. Killeen, *CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla*. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 3999-4007.
149. Ueno, T., et al., *Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus*. *Immunity*, 2002. **16**(2): p. 205-18.
150. Benz, C., K. Heinzel, and C.C. Bleul, *Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(12): p. 3652-63.
151. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
152. Berg, E.L., et al., *The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor*. *J Cell Biol*, 1991. **114**(2): p. 343-9.
153. Clark, R.A., R.C. Fuhlbrigge, and T.A. Springer, *L-Selectin ligands that are O-glycoprotease resistant and distinct from MECA-79 antigen are sufficient for tethering and rolling of lymphocytes on human high endothelial venules*. *J Cell Biol*, 1998. **140**(3): p. 721-31.
154. Warnock, R.A., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes*. *J Exp Med*, 1998. **187**(2): p. 205-16.
155. Andrew, D.P., et al., *Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(6): p. 1959-69.

156. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
157. Weninger, W., et al., *Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 953-66.
158. Ebisuno, Y., et al., *Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1642-6.
159. Baekkevold, E.S., et al., *The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1105-12.
160. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
161. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
162. Okada, T., et al., *Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches*. J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 65-75.
163. Warnock, R.A., et al., *The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 77-88.
164. Nakano, H., et al., *A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2886-95.
165. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-9.
166. Ansel, K.M., et al., *In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1123-34.
167. Campbell, D.J., C.H. Kim, and E.C. Butcher, *Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 876-81.
168. Cyster, J.G., *Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 127-59.
169. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
170. Liao, F., et al., *Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4871-80.
171. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
172. Mori, S., et al., *Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 207-18.
173. Leonard, W.J., *TSLP: finally in the limelight*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 605-7.

174. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
175. Hernandez-Lopez, C., et al., *Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development*. Blood, 2002. **99**(2): p. 546-54.
176. Foss, D.L., M.J. Baarsch, and M.P. Murtaugh, *Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues*. Anim Biotechnol, 1998. **9**(1): p. 67-78.
177. Cvejic, S. and L.A. Devi, *Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 26959-64.
178. Hebert, T.E., et al., *Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 1): p. 287-93.
179. Maggio, R., Z. Vogel, and J. Wess, *Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 3103-7.
180. Kuner, R., et al., *Role of heteromer formation in GABAB receptor function*. Science, 1999. **283**(5398): p. 74-7.
181. White, J.H., et al., *Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 679-82.