



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVACIÓN DE LA CINASA ERK POR MIEMBROS  
DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA EN  
TIMOCITOS MURINOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

GERMAN RODRIGO ALEMAN MUENCH



DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ.**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:  
"Activación de la cinasa ERK por miembros de la superfamilia del  
TGF-Beta en timocitos murinos"

realizado por Aleman Muench Germán Rodrigo

con número de cuenta 40206918-8 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)  
Propietario Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Propietario Dr. Jesús Chimal Monroy

Propietario M en C. Felipe Alcántara Sánchez

Suplente Dr. Guillermo Laguna Hernández

Suplente M en C. Victor Antonio Mejía Rea

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 22 de enero  
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

del 2007

Dr. Zenón Cano Santana

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

*Dedico esta tesis con mucho amor*

*A mi madre*

*Cristina Muench*

## *Agradezco en especial*

*A mi querida Jessica*

*A mis abuelos Polidor y Gloria*

*A mis tíos Germán, Pablo, Augusto y Magda*

*A mis hermanas Paulina y Laura*

*A mi tía Terry*

*A mis hermanos Carlos y Alejandra*

*A mis amigos Bruno, Delfín, Martín y Berta*

*A mis amigos Luis Fernando y Mauricio*

*A Paula, Ramses, Karen, Diana, y a la Dra. Gloria*

# Contenido

<b>Contenido</b> .....	i
<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	iii
<b>Abreviaturas</b> .....	iv
<b>Resumen</b> .....	v
<b>Introducción</b> .....	1
Sistema Inmune.....	1
Ontogenia de Linfocitos T.....	3
Señalización inducida por el complejo del TCR.....	6
Vía de las MAP cinasas.....	7
Vía de movilización de calcio.....	10
Vía de rearreglo de citoesqueleto.....	11
Participación de las MAP cinasas en el desarrollo de linfocitos T.....	12
Importancia de microambientes especializados en el timo.....	15
Señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$ .....	17
Receptores.....	17
Activación de receptores.....	19
Activación de Smads.....	21
Ligandos.....	22
Papel de la Superfamilia del TGF- $\beta$ en el desarrollo de linfocitos T.....	26
TGF- $\beta$ .....	26

BMPs.....	29
Activinas/Inhibinas.....	30
Interacción de las vías de señalización de TGF- $\beta$ y MAP cinasas.....	32
Activación de MAP cinasas por TGF- $\beta$ .....	32
Modulación de la actividad de Smads por MAP cinasas.....	33
Interacciones nucleares entre complejos de Smads y factores de transcripción activados por MAP cinasas.....	34
Justificación.....	36
Hipótesis.....	36
Objetivo general.....	37
Objetivos particulares.....	37
Estrategia experimental.....	38
Resultados.....	42
ERK es fosforilado en todas las subpoblaciones de timocitos.....	43
La fosforilación de ERK depende de la actividad de MEK1/2.....	44
La fosforilación de ERK inducida por el TCR es disminuida en condiciones de estimulación con Inhibinas.....	45
Discusión.....	56
Conclusiones.....	59
Literatura consultada.....	60

## Índice de Figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Órganos Linfoides humanos.....	2
<b>Figura 2.</b> Desarrollo de linfocitos T en el timo.....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura molecular de los complejos del pre-TCR y TCR.....	5
<b>Figura 4.</b> Señalización del complejo TCR/CD3.....	7
<b>Figura 5.</b> Componentes principales involucrados en la activación de las tres principales MAP cinasas.....	9
<b>Figura 6.</b> Actividad de las MAP cinasas en desarrollo.....	14
<b>Figura 7.</b> Diversos tejidos son representados por expresión génica promiscua en células epiteliales medulares (mTECs).....	16
<b>Tabla I.</b> Componentes de la señalización inducida por la Superfamilia del TGF $\beta$ .....	18
<b>Figura 8.</b> Mecanismo general de activación de receptores y proteínas Smads de la Superfamilia del TGF- $\beta$ .....	20
<b>Figura 9.</b> Estructura y papel de los dominios de Smads, sitios candidatos como blancos de otras cinasas.....	21
<b>Figura 10.</b> Identificación de las subpoblaciones de timocitos.....	42
<b>Figura 11.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducida por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	46
<b>Figura 12.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducida por TGF- $\beta$ en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	47
<b>Figura 13.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducida por Activina A en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	48
<b>Figura 14.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducida por Inhibina A en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	49
<b>Figura 15.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducida por Inhibina B en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	50
<b>Figura 16.</b> Fosforilación de la cinasa ERK1/2 inducida por los ligandos en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	51
<b>Figura 17.</b> Inhibición de la fosforilación de ERK.....	52
<b>Figura 18.</b> Inhibición de la fosforilación de ERK inducido por PMA-Ionomicina en las distintas subpoblaciones de timocitos.....	53
<b>Figura 19.</b> Fosforilación de ERK1/2 inducido por el anticuerpo anti-CD3 en timocitos CD4+....	54
<b>Figura 20.</b> Fosforilación de ERK1/2 en condiciones de coestimulación con los ligandos y con el anticuerpo anti-CD3.....	55

## Abreviaturas

<b>ActRII</b>	Activin Receptor type II
<b>ALK</b>	Activin receptor Like Kinase
<b>ASK1</b>	Apoptosis Signal regulating Kinase
<b>ATF2</b>	Activating Transcription Factor 2
<b>Aire</b>	Autoimmune regulator
<b>APC</b>	Antigen Presenting Cell
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>CRAC</b>	Ca <sup>2+</sup> release-activated Ca <sup>2+</sup> channels
<b>CREB</b>	Cyclic-AMP Response Element-Binding protein
<b>ConA</b>	Concanavalin A
<b>Co-Smad</b>	Common-mediator Smad
<b>DAG</b>	Diacyl glycerol
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>FTOC</b>	Fetal Thymic Organ Cultures
<b>FLRG</b>	Follistatin-Related Gene
<b>GDF</b>	Growth Differentiation Factor
<b>InhBP</b>	Inhibin Binding Protein
<b>IMF</b>	Intensity Mean Fluorescence
<b>ITAMS</b>	Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B Kinase
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>LAT</b>	Linker for Activated T cells
<b>LTBP</b>	Latent TGF- $\beta$ -Binding Protein
<b>LAP</b>	Latent-Associated Peptide
<b>Mad</b>	Mothers against dpp
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>MBP</b>	Myelin Basic Protein
<b>MHC</b>	Mayor Histocompatibility Complex
<b>MKK</b>	MAP Kinase Kinase
<b>MEK</b>	MAP/ERK kinase
<b>MIS/AMS</b>	Mullerian Inhibiting Substance/anti-Mullerian hormone
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor- $\kappa$ B
<b>NFAT</b>	Nuclear Factor of Activated T cells
<b>PMA</b>	Phorbol Myristate Acetate
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositide 3-kinase
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	Phospholipase C $\gamma$
<b>RAG</b>	Recombination Activation Gene
<b>SARA</b>	Smad Anchor for Receptor Activation
<b>Smad</b>	SMA/MAD related
<b>Smurf</b>	Smad Ubiquitin regulatory factor
<b>Shn-2</b>	Schnurri-2
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TAK1</b>	Transforming growth Factor Activated Kinase 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumour Necrosis Factor- $\alpha$
<b>TEC</b>	Thymic Epithelial Cell
<b>Tsg</b>	Twisted gastrulation
<b>TAB1</b>	TGF- $\beta$ -Activated kinase-Binding protein-1
<b>TGIF</b>	TG3-Interacting Factor
<b>ZAP-70</b>	Zeta-Associated Protein of 70kDa

## Resumen

Se ha descrito que los componentes de la señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$  son expresados en el timo, formando parte del microambiente de receptores y ligandos que regulan de manera importante los diferentes procesos de diferenciación de los timocitos, los cuales incluyen la transición del estadio DN al DP, los procesos de selección positiva y negativa, y el compromiso a un linaje específico CD4 o CD8. Una de las vías que median estos procesos de diferenciación es la MAP cinasa ERK, la magnitud en la actividad de esta cinasa dicta en gran medida el destino de los timocitos en desarrollo. Aunado a lo anterior, se ha descrito que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 mediante la activación de la cinasa ERK, pueden regular el crecimiento de diferentes líneas celulares derivadas de epitelio pulmonar, intestinal, como también de líneas derivadas de cáncer de mama.

Este trabajo se basó en investigar si los ligandos de TGF- $\beta$ 1, Activina A, y las Inhibinas A y B pueden inducir la fosforilación de ERK y modular la fosforilación de esta cinasa desencadenada por la estimulación del TCR en las diferentes subpoblaciones de timocitos murinos. Para ello, se realizó la técnica de tinción superficial e intracelular para citometría de flujo, la cual permite distinguir las diferentes subpoblaciones de timocitos identificadas por los marcadores CD4 y CD8, y mediante la tinción intracelular para p-ERK se analizó por subpoblación la fosforilación en respuesta a los ligandos de TGF- $\beta$ 1, Activina A, Inhibina A y B, y en condiciones de co-estimulación con el anticuerpo anti-CD3. La cinasa ERK es fosforilada por TGF- $\beta$ 1 principalmente en la subpoblación DN, mientras que la fosforilación obtenida por la estimulación con Activina A es similar en todas las subpoblaciones de timocitos. Sorpresivamente, las inhibinas desencadenan la fosforilación de ERK en todas las subpoblaciones de los timocitos presentándose un mayor efecto por la inhibina B en las subpoblaciones DP, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Aunado a lo anterior, la fosforilación de ERK inducida por la estimulación del TCR es disminuida por inhibinas, principalmente Inhibina B.

Estas observaciones sugieren un estudio más detallado de la funcionalidad de la fosforilación de ERK por estos factores y su repercusión en los diferentes procesos de diferenciación que ocurren en el timo. Además, es necesario estudiar en detalle el mecanismo por el cual las inhibinas están induciendo señales intracelulares y su relevancia en el desarrollo de los linfocitos T.

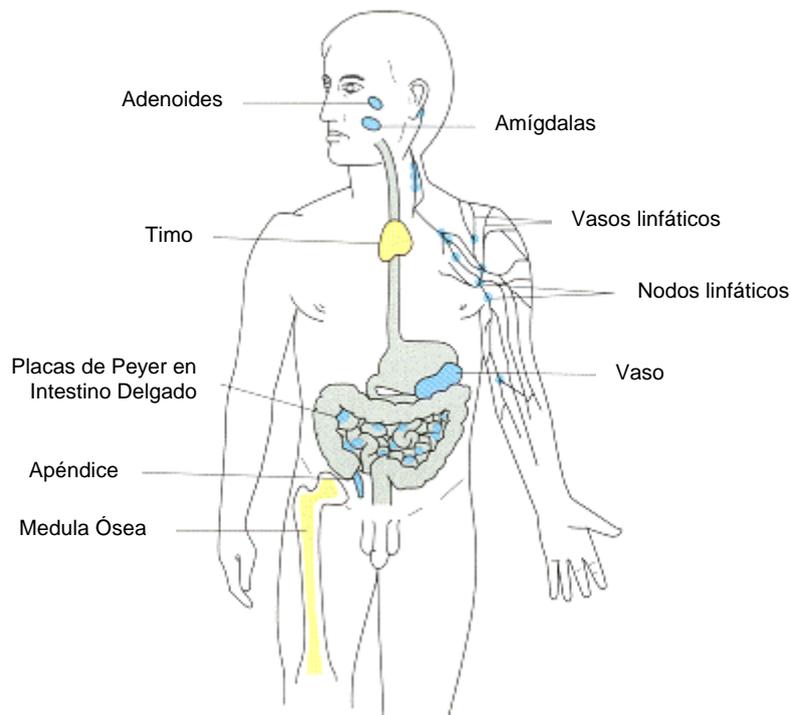
## Sistema Inmune

Una característica fundamental del Sistema Inmune es la capacidad de distinguir entre antígenos propios y no propios. Existen dos tipos diferentes de respuestas hacia infecciones: la inmunidad innata y la adaptativa.<sup>1,2</sup>

La inmunidad innata es llevada a cabo por células granulares como macrófagos, células cebadas, células NK (asesinas naturales ó Natural Killers), neutrófilos, basófilos, eosinófilos y células dendríticas. Este tipo de respuesta no varía conforme al número de exposiciones de un antígeno, presenta una reactividad similar y es rápida en montarse, su mecanismo de acción depende del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Los componentes moleculares de las respuestas innatas incluyen el sistema de complemento, proteínas de fase aguda, y diversas citocinas como interferones.<sup>2</sup>

A diferencia de la respuesta innata, la inmunidad adaptativa es antígeno específica y presenta la propiedad de generar una memoria inmunológica, lo que promueve que la respuesta montada sea más eficaz y rápida en presencia de un segundo reto antigénico.<sup>3</sup>

La inmunidad adaptativa se divide a su vez en la inmunidad humoral ó mediada por anticuerpos, y en la inmunidad mediada por células. Ambos tipos de respuesta se llevan a cabo por medio de un amplio repertorio de receptores altamente específicos, los cuales se originan por una serie de eventos de recombinación genética durante los estados tempranos de desarrollo de los linfocitos B y T. Los linfocitos T se desarrollan en el timo y los linfocitos B en la médula ósea. Estos órganos linfoides se denominan primarios ó centrales. Los linfocitos recién formados migran hacia órganos linfoides secundarios (ó periféricos), donde pueden interactuar con antígenos promoviendo su activación y la generación de una respuesta (Fig. 1).



**Fig. 1. Órganos linfoides humanos.** Los órganos linfoides primarios o centrales son el timo y la médula ósea (amarillo). Los linfocitos formados migran hacia los órganos linfoides secundarios (azul) ó periféricos donde pueden reaccionar con un antígeno. Únicamente son mostrados algunos órganos linfoides secundarios, los linfocitos también se pueden localizar en la piel y en mucosas. *Adaptado de Alberts, 1994.*

La inmunidad humoral está mediada por los linfocitos B, los cuales son células especializadas en la producción de anticuerpos. De manera general los anticuerpos están conformados por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas covalentemente, y presentan una región de reconocimiento específico hacia antígenos. En los vertebrados existen 5 clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM <sup>1</sup>. La unión de los anticuerpos al patógeno permite la fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos, a este fenómeno se le conoce como opsonización <sup>1</sup>. Los anticuerpos pueden ser reconocidos directamente o mediante el sistema de complemento. De manera paralela están involucrados en la regulación de diversos procesos inflamatorios que se presentan en reacciones alérgicas como el asma. <sup>3</sup>

La inmunidad mediada por células es llevada a cabo por los linfocitos T. Los linfocitos T se caracterizan por presentar en su superficie un complejo proteico denominado el receptor de célula T (“T Cell Receptor, TCR”). El TCR es un heterodímero compuesto por cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , la expresión de este receptor define a dos poblaciones de linfocitos T: los linfocitos T  $\alpha\beta$  y los T  $\gamma\delta$ . <sup>3</sup>

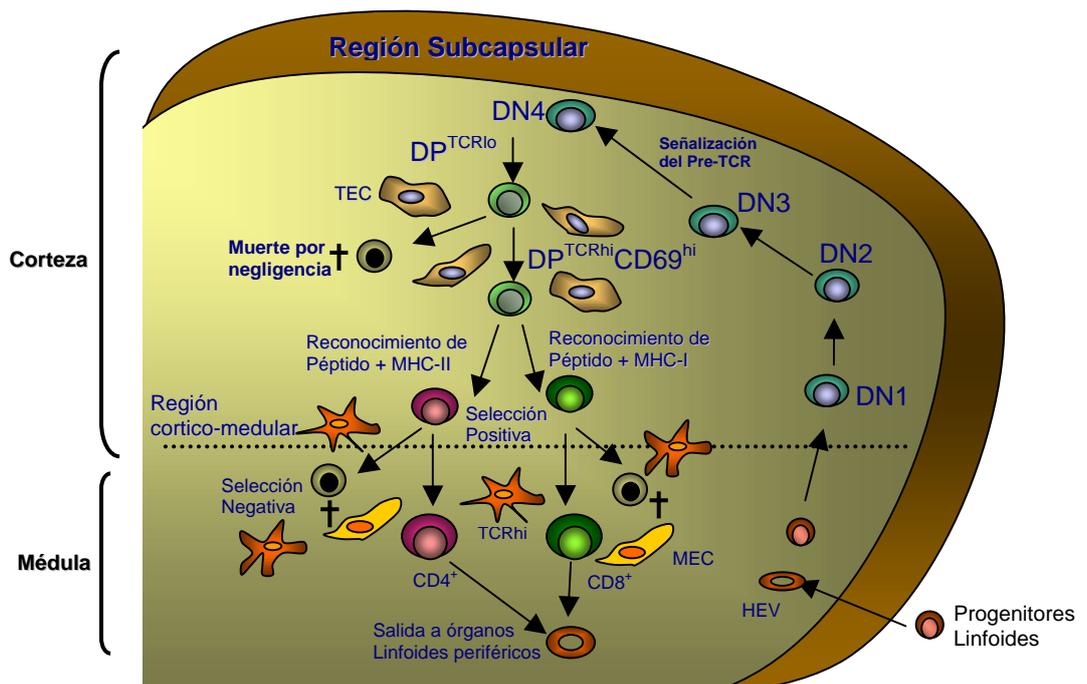
La población de linfocitos T  $\alpha\beta$  se subdivide a su vez en 2 tipos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o ayudadores (helper) y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o citotóxicos, identificados por la expresión de los receptores CD4 y CD8. <sup>3,4</sup>

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante su TCR reconocen los antígenos acoplados en las moléculas de MHC-II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II), por su parte los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen los antígenos acoplados en las moléculas de MHC-I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I). Ambos linfocitos T tienen la capacidad de generar respuestas altamente específicas hacia antígenos no propios, por lo tanto la ontogenia de estas células es altamente regulada. Los linfocitos T  $\gamma\delta$  tienen la particularidad de ser capaces de reconocer antígenos no protéicos, tales como glicolípidos presentados por moléculas de MHC no convencionales, como CD1. <sup>3,4</sup>

## Ontogenia de Linfocitos T

El timo es un órgano bilobulado localizado en la parte superior del tórax y de manera anterior al corazón, comprende principalmente dos tipos de tejidos: un tejido de naturaleza linfoide y un tejido estromal. Se ha demostrado que las interacciones ocurridas entre estos dos tipos de tejidos funcionan como un regulador importante del desarrollo de los timocitos. Dentro del timo se localizan ciertas regiones anatómicas bien diferenciadas; una zona central ó médula formada por timocitos, células epiteliales medulares, células dendríticas y macrófagos, y una región externa, denominada corteza, que contiene timocitos inmaduros que mantienen una estrecha interacción con células epiteliales corticales. <sup>5</sup>

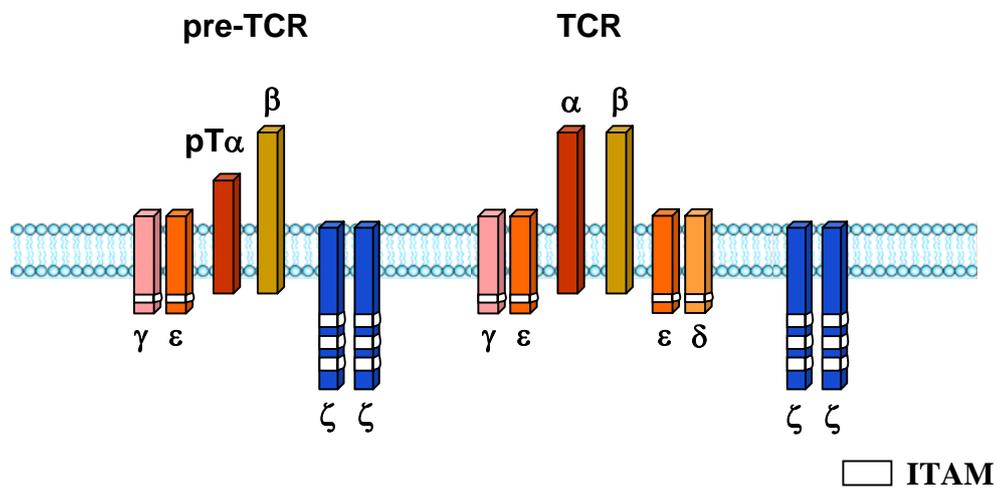
Dentro del timo los estadios de diferenciación de los timocitos se identifican con base en la expresión de los co-receptores CD4 y CD8: llamados dobles negativos ó DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), dobles positivos ó DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y simples positivos ó SP (CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>). Los timocitos dobles negativos a su vez se pueden dividir con base en la expresión de los marcadores CD44 y CD25 en las subpoblaciones DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2(CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3(CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) y DN4(CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) (Fig. 2). <sup>5,6</sup>



**Fig. 2. Desarrollo de linfocitos T en el Timo.** El desarrollo de células T inicia con la entrada de precursores al timo por la vénula del alto endotelio (HEV), posteriormente ocurren una serie de estadios celulares identificados por la expresión de los marcadores CD4 y CD8 (DN: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, DP: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, y SP: CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>). El timo presenta 2 regiones especializadas denominadas corteza y médula. En los timocitos DN3 ocurre la señalización del pre-TCR, el cual finaliza en la expresión de un TCR maduro en la subpoblación DP. En el estadio DP ocurren los procesos de la muerte por negligencia, la selección negativa, la selección positiva y compromiso a un linaje específico CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, todos ellos consecuencia del umbral de afinidad/avidez con el cual un TCR reconoce los péptidos endógenos acoplados a un tipo de MHC expresado por las células epiteliales tímicas. TEC: Célula Epitelial Tímica; MEC: Célula Epitelial Medular. Tomado de Soldevila & García-Zepeda, 2003.

Los progenitores linfoides formados en la médula ósea son liberados al torrente sanguíneo y entran al timo por medio de la vénula del alto endotelio localizado en la región cortico-medular de este órgano (Fig.2). El fenotipo de estos progenitores todavía se encuentra en discusión pero está relacionado a la expresión en superficie de Sca-1 y c-kit. Estos progenitores migran como timocitos dobles negativos a la región subcapsular y luego entran a la corteza externa donde se diferencian en timocitos dobles positivos (Fig. 2). En el estadio DN las células pierden la capacidad de diferenciarse en células B y NK ("Natural Killers"), pero mantienen la capacidad de generar células T  $\gamma\delta$  y principalmente células T  $\alpha\beta$ .<sup>5</sup>

En la subpoblación DN2 se inicia el rearreglo de la cadena  $\beta$  del TCR y en el siguiente estadio DN3 se expresa en superficie una cadena  $\alpha$  inmadura (pre-T $\alpha$ ) (Fig. 3) <sup>5</sup>. El complejo resultante se denomina pre-TCR, e induce una señalización autónoma (conocida como selección  $\beta$ ) que da pauta a la transición al estadio DN4. La selección  $\beta$  da como resultado el rearreglo del locus de la cadena  $\alpha$  llevada a cabo por las proteínas RAG1 (Recombination Activation Gene) y RAG2, el término del rearreglo de la cadena  $\beta$ , la disminución de la expresión de CD25 y la proliferación de timocitos. <sup>6</sup>



**Fig. 3. Estructura molecular de los complejos del pre-TCR y TCR.** El complejo del pre-TCR se conforma de la cadena no polimórfica pT $\alpha$  acoplada a una cadena  $\beta$ , dímeros de CD3 $\gamma\epsilon$  y de CD3 $\zeta\zeta$ . Por su parte el complejo del TCR maduro se conforma de una cadena  $\alpha$  acoplada a una cadena  $\beta$ , dímeros de CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\epsilon\delta$  y CD3 $\zeta\zeta$ . Los dominios ITAM (YXXL/IX<sub>6-8</sub>YXXL/I) son mostrados en los tallos citoplásmicos de moléculas de CD3.

La señalización inducida por el complejo del pre-TCR constituye un punto de control (“checkpoint”) en el desarrollo de las células T, ya que los timocitos que no sean capaces de inducir una señal por medio de este complejo son dirigidos a apoptosis. Durante el estadio doble positivo (DP) los timocitos coexpresan en su superficie los co-receptores CD4 y CD8 y presentan bajos niveles de expresión de TCR $\alpha\beta$  ensamblados con complejos de proteínas CD3. <sup>6</sup>

Los timocitos DP constituyen aproximadamente el 90% del total de los timocitos del compartimento tímico, y experimentan cuatro procesos importantes con base en la presentación de los péptidos endógenos por las células tímicas estromales: muerte por negligencia, selección negativa, selección positiva y el desarrollo al compromiso de un linaje específico ( $CD4^+$  ó  $CD8^+$ ) en contexto del tipo de MHC (Fig. 2).<sup>5,6</sup>

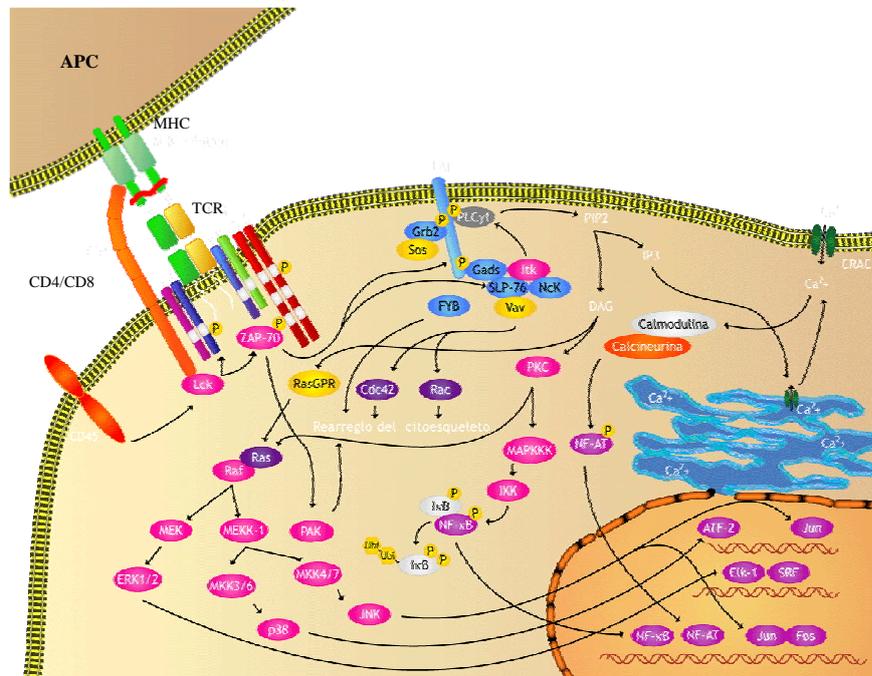
La mayoría de los timocitos DP ( $\approx 90\%$ ) no son capaces de reconocer complejos de MHC con péptidos propios y mueren por negligencia. Una pequeña fracción de timocitos ( $\approx 5\%$ ) son dirigidos a apoptosis ya que presentan TCRs con un alto umbral de afinidad/avidez al complejo MHC-péptido, este mecanismo denominado selección negativa constituye la base de la tolerancia central, asegurando la eliminación de la mayoría de células T autoreactivas involucradas en las patologías autoinmunes. Los timocitos DP que presentan TCRs que reconocen péptidos endógenos con una avidez baja/intermedia son rescatados de la muerte celular programada y seleccionados positivamente. Finalmente, los timocitos seleccionados positivamente culminan su diferenciación hacia  $CD4^+$  ayudadores ó  $CD8^+$  citotóxicos y salen del timo hacia los órganos linfoides periféricos a ejercer su función (Fig. 2).<sup>5,6</sup>

## **Señalización inducida por el complejo del TCR**

La señalización mediada por el complejo del TCR es de gran importancia en los procesos de la selección negativa, la selección positiva y el compromiso a un linaje específico, debido a que la magnitud en la activación de diferentes vías intracelulares que éstas desencadenan dictará el destino de los timocitos dobles positivos.

El umbral de afinidad/avidez con el cual un TCR reconoce a un péptido acoplado a un MHC desencadena la fosforilación de los dominios denominados ITAMS (Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif) localizados en los tallos citoplásmicos de los complejos TCR/CD3 (Fig. 3).<sup>7</sup>

Esta fosforilación está mediada por los miembros de la familia de cinasas Src como Lck y Fyn permitiendo el reclutamiento de ZAP-70 (Zeta-associated protein of 70kDa) por medio de su dominio SH2. ZAP-70 fosforila a la proteína adaptadora LAT (Linker for Activated T cells), la cual recluta a otras proteínas adaptadoras y efectoras dando como resultado el establecimiento de una plataforma de señalización donde se activan diferentes vías intracelulares, dentro de las cuales destacan la vía de las MAP cinasas (Proteínas cinasas activadas por mitógenos), la vía de movilización de calcio y las vías que llevan al rearrreglo del citoesqueleto (Fig. 4).<sup>7</sup>



**Fig. 4. Señalización del complejo TCR/CD3.** La interacción del complejo MHC-péptido/TCR desencadena una activación de diferentes vías intracelulares que promueven la transcripción y expresión de genes involucrados en supervivencia, apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Las vías intracelulares desencadenadas incluyen MAP cinasas (ERK1/2, p38 y JNK), rearrreglo del citoesqueleto y de movilización de Ca<sup>2+</sup>. Adaptado de Lin y Weiss, 2001.

### Vía de las MAP cinasas

La familia de las MAP cinasas incluyen a ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38, JNK, ERK3/4 y ERK5<sup>8-10</sup>. Las MAP cinasas son activadas por fosforilación en residuos de tirosina y treonina por MKKs (cinasas de las MAP cinasas). ERK1/2 es fosforilado por MEK, JNK es fosforilado por MKK4 y MKK7, por su parte MKK3, MKK4 y MKK6 fosforilan a p38 (Fig.5)<sup>11</sup>.

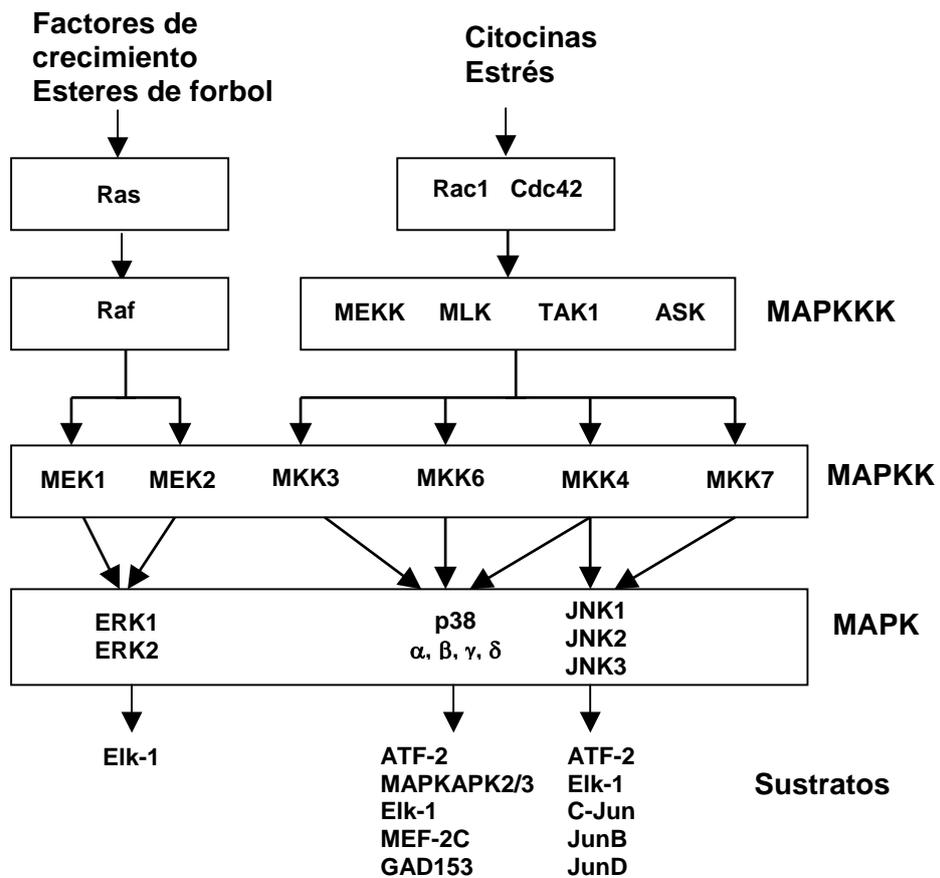
Las MAP cinasas menos estudiadas son las pertenecientes a las familias ERK3/4 y ERK5, pero se han visto involucradas en procesos de desarrollo cardiovascular y angiogénesis <sup>10</sup>. La señalización por ERK1/2 regula la proliferación, la diferenciación y la meiosis en diversos tipos celulares. Es activada por estímulos mitogénicos, factores de crecimiento, citocinas y ésteres de forbol, los cuales activan a una serie de receptores en la superficie celular con propiedades de cinasas de tirosina ó acoplados a proteínas G. <sup>10</sup>

La interacción receptor-ligando induce el reclutamiento de Sos (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) por medio de la proteína adaptadora Grb2, dando como resultado la activación de Ras. Ras es una GTPasa que al ser activada (Ras-GTP) puede unirse a diferentes moléculas efectoras reclutándolas a la membrana, como son las cinasas Raf, PI3K (Cinasa de Fosfatidil Inositol Trifosfato) y PKC (Proteína cinasa C). <sup>11</sup>

El mayor sustrato de Ras es la cinasa Raf que presenta varias isoformas (A-Raf, B-Raf y Raf1), todas pueden activar a MEK (cinasa de ERK) mediante fosforilación en dos serinas en su “loop” de activación (Fig. 5). MEK al igual que ERK presenta 2 isoformas MEK1 y MEK2. MEK activa a ERK mediante la fosforilación de residuos de tirosina y treonina en su “loop” de activación (Fig. 5). La cinasa ERK es considerada el principal efector de esta vía y presenta varios sustratos como factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto, proteínas involucradas en señalización y receptores. <sup>10,11</sup>

En la familia de la MAP cinasa p38 se han identificado cuatro miembros: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  (Fig. 5). Las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  se encuentran ampliamente expresados, mientras que la expresión de p38 $\gamma$  es restringido al músculo esquelético, y p38 $\delta$  al páncreas, intestino delgado y a células T CD4<sup>+</sup>. <sup>12</sup>

La activación de p38 se genera por estrés químico que incluyen: hormonas, radiación ultravioleta, citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , choque osmótico y calor. Estos estímulos inducen la activación de las GTPasas de Rho (Rac1 y Cdc42), las cuales activan a las cinasas MAPKKKS (MTK1, TAK1 y ASK1). <sup>12</sup>



**Fig. 5. Componentes principales involucrados en la activación de las tres principales**

**MAP cinasas.**

Abreviaciones: ASK, Apoptosis Signal regulating Kinase; ATF-2, Activating Transcription Factor 2; ERK, Extracellular signal Regulated Kinase; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; MEF-2C, Myocyte Enhancer Factor 2C; MAPKAP-K2/3, MAP kinase Activated Protein Kinase 2/3; MEK, MAP/ERK kinase; MKKK, MAP Kinase Kinase Kinase; MKK, MAP Kinase Kinase; TAK1, Transforming growth Factor Activated Kinase 1; MLK, Mixed Lineage Kinase; TLP2, Tumor Progression Locus 2.

Estas cinasas activan a MAPKKs (MKK3, MKK4 y MKK6) mediante la fosforilación en residuos de serina y treonina, permitiendo a su vez la activación de p38 mediante la fosforilación en su “loop” de activación. En procesos de inflamación p38 induce la activación de numerosos sustratos como factores de transcripción y cinasas dando como resultado la expresión de diversos genes.<sup>12</sup>

La familia JNK(c-Jun N-terminal Kinase) tiene un papel importante en el desarrollo embrionario, la sobrevivencia celular, la apoptosis y la proliferación. La familia incluye a JNK1, JNK2 y JNK3 (Fig. 5) .<sup>13</sup>

Aunque pueden originarse varias isoformas por “splicing alternativo”. JNK1 y JNK2 son ampliamente expresados en diversos tejidos, mientras que la expresión de JNK3 se restringe a cerebro, corazón y testículo. La cinasa JNK es activada mediante fosforilación por MKK7 y MKK4 que a su vez activa a p38. MKK4 es activado principalmente por estrés ambiental, mientras que MKK7 es activado por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1. <sup>14</sup>

Varias MAPKKs pueden activar a MKK4 y MKK7, las que se han reportado han sido el grupo de cinasas ASK, TAK1, y miembros de la familia de GTPasas Rho (Fig. 5). JNK fosforila a factores de transcripción como junB, JunD, ATF-2, AP-1, miembros de la familia NFAT, y sustratos involucrados en la apoptosis como Bcl-2 y Bcl-xl. <sup>13,14</sup>

### **Vía de movilización de calcio**

Inicia con la activación PLC $\gamma$  por parte de las cinasas de las familias de Src, Syk y TEC como Lck, ZAP-70 e Itk/Rlk, respectivamente. La interacción de PLC $\gamma$  con LAT permite su reclutamiento a la membrana y fosforilación por las cinasas antes mencionadas. La principal función de PLC $\gamma$  es hidrolizar a la molécula lipídica fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para convertirlo en inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y en diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> permite la liberación de calcio por parte del retículo endoplásmico mediante su interacción con receptores específicos (IP<sub>3</sub>R) localizados en estos organelos celulares. El aumento de la concentración de calcio intracelular permite la apertura de canales CRAC (Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels), que a su vez incrementan la concentración intracelular de este ión <sup>7,15</sup>. El Ca<sup>2+</sup> induce cambios en expresión génica mediante la activación de varias cinasas y fosfatasas, por ejemplo el Ca<sup>2+</sup> regula la actividad de los miembros de la familia de CaMK. Estas cinasas fosforilan a varios factores de transcripción como CREB (Cyclic-AMP Response Element-Binding protein). La fosfatasa calcineurina activada por Ca<sup>2+</sup> es responsable de defosforilar al factor de transcripción NFAT induciendo su translocación al núcleo. <sup>16</sup>

Otra vía que se activa mediante la estimulación del TCR es la iniciada por la cinasa PI3K, que es una cinasa de lípidos y de residuos de serina y treonina en blancos protéicos. <sup>17</sup>

PI3K cataliza la conversión de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub>, el lípido PIP<sub>3</sub> generado activa a efectores “río abajo” como AKT. La activación de IKK (I $\kappa$ B Kinase) es mediado también por PI3K; IKK activado fosforila al represor I $\kappa$ B- $\alpha$  permitiendo la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo <sup>17</sup>. La activación de la familia de PKC que presenta 9 isoformas (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\gamma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$ , PKC $\eta$  y PKC $\mu$ /PKD) es dependiente de la activación por Ca<sup>2+</sup> y ésteres de forbol. En linfocitos T, DAG recluta a PKC $\theta$  en membrana donde es fosforilado por Lck. PKC $\theta$  está involucrado en la activación de algunos miembros de las MAP cinasas como JNK y MKK4. PKC $\theta$  y PKC $\alpha$  han sido involucradas en la activación de la vía de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , marcándolo para la degradación por el proteosoma y permitiendo así la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. <sup>7,18</sup>

### **Vía de rearrreglo de citoesqueleto**

El rearrreglo del citoesqueleto de actina es mediado por la actividad de las GTPasas Rho. Esta actividad está modulada por un “switch” entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). La transición entre estos dos estados conformacionales es regulada por tres clases de proteínas: GAPs (GTPase Activating Proteins) que estimulan la actividad de GTPasa; GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), que mantienen a la GTPasa en su estado inactivo unido a GDP, y GEFs (Guanine Exchange Factors) que facilitan el intercambio de GDP por GTP activando a las GTPasas Rho. Las GTPasas de Rho son activadas por receptores de membrana y conectan las señales intracelulares al rearrreglo del citoesqueleto.

El rearrreglo del citoesqueleto es importante en la estabilización de una sinapsis inmunológica, la cual es caracterizada por la interacción del complejo MHC/péptido-TCR y diversos receptores de adhesión, así como proteínas en membrana que presentan la función de regular la señal generada por el reconocimiento del antígeno. <sup>19</sup>

Las cinasas de la familia Src (Lck y Fyn) activan a Vav mediante el reclutamiento de éste por las proteínas adaptadoras SLP-76 y LAT. La proteína Vav es un GEF que activa a las GTPasas Rho. Vav se asocia a vinculina y talina en membrana permitiendo el acoplamiento de F-actina a la membrana celular y mediante la actividad de GEF activa a la GTPasa Rac y Cdc42.<sup>19</sup> Esta última activa a su vez a la proteína WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), la cual forma un complejo con Arp2 (Actin Related Protein 2) y Arp3, permitiendo la polimerización de actina.<sup>7,19</sup>

## **Participación de las MAP cinasas en el desarrollo de linfocitos T**

En el desarrollo de los linfocitos T, la vía de las MAP cinasas participa en los procesos de selección negativa, selección positiva, muerte por negligencia y compromiso hacia un linaje específico. En la señalización inducida por el pre-TCR, la activación de ERK induce proliferación de timocitos inmaduros pero no media la exclusión alélica. Esta observación fue obtenida mediante el empleo de la técnica de FTOCs (Fetal Thymic Organ Cultures), la cual consiste en la extracción de los lóbulos tímicos de un embrión de 14 días de gestación y cultivo de éstos en un medio especial, permitiendo monitorear el desarrollo de los linfocitos T in vitro.<sup>5</sup>

En estudios realizados con FTOCs, y mediante la expresión constitutiva de una forma activa de MEK1 en timocitos, se observó que se induce la proliferación de los timocitos inmaduros DN3 y se pueden llegar a generar timocitos DP a partir de timos de ratones  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ , este hecho es importante ya que en estos ratones el desarrollo de células T se bloquea en el estadio DN. Sin embargo, en ratones  $\text{RAG1}^{-/-}$ , la expresión constitutiva de MEK1 no es capaz de inducir la diferenciación de los timocitos DP, a pesar de que la estimulación de timocitos inmaduros DN3 con un anticuerpo anti-CD3 activa la vía de ERK, promoviendo la diferenciación de timocitos DP.<sup>20</sup>

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de la expresión constitutiva de una forma activa de c-Raf en timocitos, donde se observa que la señalización de ERK induce proliferación y maduración de timocitos DN a DP en ausencia del complejo del pre-TCR (RAG2<sup>-/-</sup>), pero no media la exclusión alélica (Fig. 6)<sup>21</sup>.

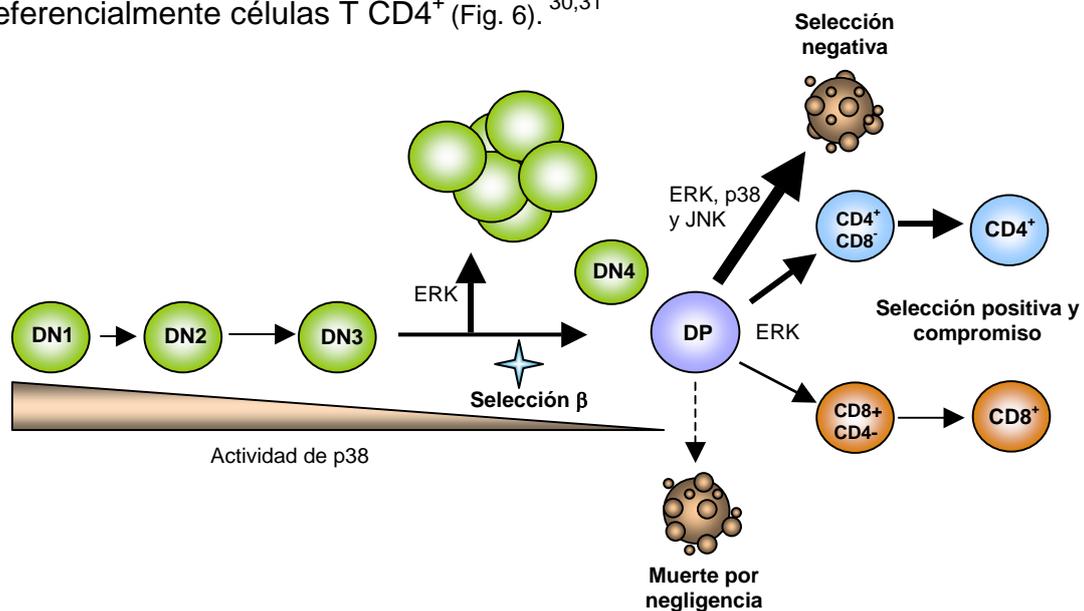
Por otro lado, una alta activación de p38 es crucial para la expansión de las subpoblaciones DN1, DN2, y DN3, a diferencia de los estadios DN4 y DP donde se observa una baja actividad (Fig. 6)<sup>22</sup>. Esta expansión ha sido también observada *in vivo* mediante la expresión de una forma activada de MKK6 (cinasa “río arriba” de p38) en un ratón transgénico. Además de esta expansión, los timocitos detienen su desarrollo en el estadio CD4<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>. Además, la entrada de precursores hematopoyéticos provenientes de la médula ósea en este ratón transgénico causa una acumulación progresiva de timocitos inmaduros debido a la actividad constitutiva de p38<sup>22</sup>.

En ratones deficientes de componentes de señalización del pre-TCR (e.g. RAG2, Lck, pre-T $\alpha$  y SLP-76), el desarrollo de los timocitos está arrestado en el estadio DN3, pero a diferencia del ratón transgénico con actividad constitutiva de p38, los timocitos inmaduros no se acumulan con la entrada de los precursores al timo. Este hecho indica que la actividad persistente de p38, además de inducir la diferenciación de los timocitos DN, inhibe la entrada a ciclo celular de los timocitos en el estadio DN3. Esto sugiere que la actividad de p38 está regulada negativamente por otras vías de señalización inducidas por el pre-TCR para la diferenciación de los timocitos al estadio DN4.<sup>22</sup>

Estudios con los timocitos de ratones transgénicos o mediante transfecciones con componentes de la vía de ERK indican su importancia en la selección positiva de los timocitos DP (Fig. 6)<sup>23-25</sup>. Esta afirmación es consistente con el arresto en el estadio de DP en el ratón deficiente de CD3 $\delta$ , debido a que en ausencia de esta molécula, el entrecruzamiento del TCR con un anticuerpo no induce específicamente la activación de la MAP cinasa ERK, indicando que la señalización de ERK está acoplada a la activación de CD3 $\delta$ <sup>26</sup>. Además de ello, los ratones deficientes de la cinasa ERK1 (p44) presentan porcentajes de células TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> reducidos sustancialmente<sup>27</sup>.

La señalización de ERK también se ha visto relacionada en la selección negativa, ya que se ha observado que cuando se inhibe farmacológicamente la actividad de MEK, la apoptosis de timocitos DP es disminuida <sup>28</sup>. Aunque al parecer la señalización de ERK está más relacionada a la selección positiva, la cinética de activación de esta cinasa parece ser crucial en la distinción de los procesos de selección positiva y negativa que ocurren en el timo. La estimulación del TCR con los ligandos específicos que promueven la selección positiva inducen una baja y sostenida señalización de ERK, mientras que ligandos que seleccionan negativamente inducen una señalización intensa e intermitente de esta cinasa (Fig.6). <sup>29</sup>

El papel de ERK en el compromiso a un linaje específico también ha sido descrito. En FTOCs de ratones transgénicos para las moléculas de MHC y TCRs que inducen un linaje T específico (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>), en condiciones de inhibición de MEK se desencadena un aumento de células T CD8<sup>+</sup> y una disminución considerable del fenotipo CD4<sup>+</sup>, indicando que en los timocitos DP seleccionados positivamente la señalización sostenida de ERK genera preferencialmente células T CD4<sup>+</sup> (Fig. 6). <sup>30,31</sup>



**Fig. 6. Actividad de las MAP cinasas en desarrollo.** En timocitos inmaduros (DN1, DN2, DN3) p38 presenta una alta actividad que permite la proliferación de estas células, y en el estadio DN4 y DP la actividad de p38 es baja. Por su parte JNK no se ha visto involucrado de manera importante en los timocitos inmaduros. ERK dirige proliferación de timocitos DN3 sin mediar la exclusión alélica. JNK, p38 y ERK presentan una alta actividad en los procesos de selección negativa. Una baja señalización y sostenida de ERK se ha relacionado a la selección positiva, mientras que en la selección negativa se presenta una actividad alta e intermitente. De manera paralela, ERK se relaciona al compromiso preferencial del fenotipo CD4<sup>+</sup>. El grosor de las líneas esquematiza la magnitud en actividad de las MAP cinasas.

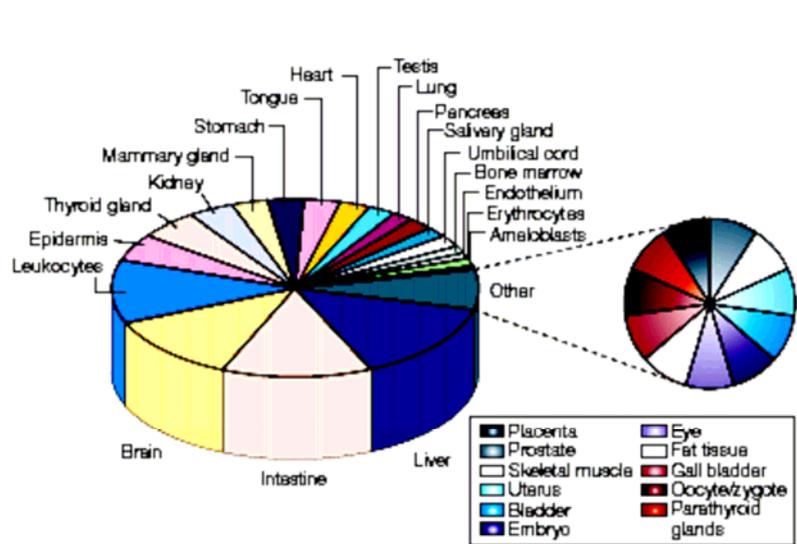
El papel de la MAP cinasa p38 también ha sido implicada como regulador de la selección negativa (Fig. 6). La sobreexpresión de MKK6 (activador “río arriba” de p38) en FTOCs no afecta la selección positiva de los timocitos DP, sin embargo acelera la eliminación de éstos. Es así que p38 promueve la selección negativa, debido a que se relaciona más a la muerte celular de los timocitos DP que a los eventos de sobrevivencia y proliferación celular inducidos por ERK, aunque todavía es necesario definir en detalle la relevancia de la actividad de p38 en los procesos de la selección del timo.<sup>6,8</sup>

JNK por su parte parece no tener un papel importante en el desarrollo de timocitos inmaduros. Esta aseveración está confirmada por estudios realizados en ratones deficientes de la proteína JNK2. Sin embargo, en el ratón JNK2<sup>-/-</sup> los timocitos DP estimulados con un anticuerpo anti-CD3 se mantuvieron resistentes a la apoptosis, mientras que en ratones silvestres se presentó una disminución considerable de esta subpoblación<sup>32</sup>. Por lo tanto, la vía de JNK ha sido implicada en la selección negativa pero no en la selección positiva (Fig. 6). En estudios realizados con ratones transgénicos expresando el dominante negativo de JNK1, se observó que la deleción de timocitos DP era en gran medida disminuida. JNK1 fue activado de manera considerable mediante la estimulación de los timocitos DP con un anticuerpo anti-CD3, el cual causa la inducción de apoptosis en estos timocitos. Al parecer, la activación de JNK1 en timocitos es mediada por MKK7 y no por MKK4, debido a que la expresión de MKK7 es mayor en el timo<sup>33</sup>.

## **Importancia de microambientes especializados en el timo**

El microambiente de los factores solubles y los tipos celulares generado en el timo es un factor importante en la regulación de las señales inducidas por el pre-TCR y el TCR, modulando así el desarrollo de las células T. La selección positiva de las células T $\alpha\beta$  ocurre principalmente en la corteza del timo, donde se lleva a cabo la presentación de péptidos por las células epiteliales tímicas (TECs) a los timocitos corticales induciendo su maduración y sobrevivencia (Fig. 2).<sup>34</sup>

La médula del timo presenta un microambiente especializado en la eliminación de timocitos que presentan TCRs autoreactivos (selección negativa). La médula está conformado por los timocitos medulares, células dendríticas, macrófagos y células epiteliales tímicas (mTECS). Las mTECs expresan una amplia variedad de antígenos propios restringidos a los tejidos periféricos como la insulina (Fig. 7). El responsable de esta expresión es el factor de transcripción Aire (“Autoimmune regulator”). Las mutaciones inducidas en este factor confieren una autoinmunidad órgano-específica en ratones y humanos. <sup>34,35</sup>



**Fig. 7. Diversos tejidos son representados por expresión génica promiscua en células epiteliales medulares (mTECs).** Tomada de Kyewski B & Derbinski J, 2004.

El timo presenta nichos especializados conformados de diferentes tipos celulares que expresan ligandos y receptores necesarios para la diferenciación de estos precursores. Por ejemplo, la expresión de P-selectina y proteínas de unión a carbohidratos en el endotelio tímico son necesarios para la migración y entrada al timo de células precursoras. <sup>34</sup>

Los timocitos DN1 se localizan cerca del sitio de entrada en región córtico-medular, la subpoblación DN2 se localiza a lo largo de la corteza y la subpoblación DN3 y DN4 se concentra en la región subcapsular. Los timocitos DP se localizan en la corteza, y los simples positivos se restringen a la región de la médula. Este patrón de localización de las subpoblaciones de los timocitos en el timo está determinado por las quimiocinas. <sup>34</sup>

Las quimiocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (de 8 a 10 kDa) que tienen como función principal la generación de gradientes quimiotácticos que promueven una migración direccionada, participando en el reclutamiento de células en tejidos específicos.<sup>34</sup>

## Señalización de la Superfamilia del TGF- $\beta$

La superfamilia del TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) comprende una variedad de factores de crecimiento polipeptídicos relacionados estructuralmente, cada uno es capaz de regular una diversidad de funciones celulares dependiendo del tejido en el cual actúen. Estas funciones incluyen proliferación, diferenciación, movilidad, adhesión y muerte celular.<sup>36</sup>

Estos factores multifuncionales son clasificados en subfamilias dependiendo de su homología estructural y funcional. En mamíferos, la superfamilia del TGF- $\beta$  está dividida en tres subfamilias: TGF- $\beta$ , Activinas/Inhibinas y BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)(Tabla 1).<sup>36-38</sup>

### Receptores

Los ligandos de esta superfamilia señalizan mediante la activación de los receptores transmembranales que presentan actividad de cinasa en los residuos de serina y treonina. Estos receptores se agrupan en dos subfamilias: los receptores Tipo I, y los receptores Tipo II (Tabla 1). Ambos receptores pueden unir con diferentes afinidades a más de un ligando.

Los receptores Tipo I de vertebrados incluyen tres grupos: el grupo de T $\beta$ R-I, ActR-IB y ALK7 (Activin receptor-Like Kinase), el segundo incluye BMPR-IA y BMPR-IB, y en el último grupo se encuentran los receptores ALK1 y ALK2. La subfamilia de receptores Tipo II incluyen T $\beta$ R-II, BMPR-II, y AMHR (Anti-Müllerian Hormone Receptor), los cuales unen específicamente TGF- $\beta$ , BMPs y MIS (Müllerian Inhibiting Substance) respectivamente. Por otro lado, ActR-IIA y ActR-IIB unen activinas en presencia y ausencia de receptores tipo I.

Los receptores de Tipo I y II son glucoproteínas transmembranales que presentan en su región extracelular 10 ó más cisteínas que confieren el plegamiento de esta región, tres de estas cisteínas forman un grupo cerca de la secuencia transmembranal, y las otras cisteínas se encuentran de manera más espaciada en receptores Tipo I que en Tipo II. La región transmembranal no presenta características únicas en ambas familias de receptores.<sup>37</sup>

**Tabla 1. Componentes de la señalización inducida por la Superfamilia del TGF- $\beta$ .**

Subfamilia	TGF- $\beta$	Activinas/Inhibinas	BMPs
<b>Ejemplos de Ligandos</b>	TGF- $\beta$ 1 TGF- $\beta$ 2 TGF- $\beta$ 3	Activina A Activina B *Inhibina $\alpha$	BMP-2 BMP-4 BMP-7 GDF-1 GDF-5
<b>Receptores tipo II</b>	T $\beta$ R-II	ActR-II ActR-IIB	BMPR-II ActR-II BMPR-IIB
<b>Receptores tipo I</b>	T $\beta$ R-I (ALK5) TSR-I (ALK1)	ActR-IB (ALK4)	BMPR-IA (ALK3) BMPR-IB (ALK6) ActR-I (ALK2) ALK7
<b>R-Smads</b>	Smad 2, Smad3	Smad 2, Smad3	Smad1, Smad5, Smad8
<b>Smad común</b>	Smad4	Smad4	Smad4
<b>Smads Inhibidoras</b>	Smad6, Smad7	Smad6, Smad7	Smad6, Smad7

\*Ligando asociado a ActR-II, ActR-IIB y ALK4, no se ha descrito una activación de Smads específica.

Sin embargo, en la región intracelular los receptores tipo I presentan una secuencia altamente conservada que precede al dominio de cinasa. Esta región se denomina dominio GS, por la secuencia característica SGSGSG que contiene <sup>37</sup>. En general, los receptores Tipo II presentan un extremo carboxilo terminal corto, mientras que los receptores tipo I no presentan esta región de manera común <sup>37</sup>.

Se han descrito receptores accesorios que intervienen en la unión del ligando a los receptores tipo I y tipo II. Uno de ellos es la glicoproteína unida a membrana denominada Betaglicano, la cual porta cadenas sulfatadas de heparano y condroitina. Betaglicano une a las tres formas del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) con alta afinidad y facilita la unión al receptor de tipo II, formándose un complejo con estas tres moléculas. Otra molécula en superficie que funciona como un receptor accesorio es la endogлина, ésta proteína regula la unión del TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 a los receptores Tipo II formando un complejo, aunque la afinidad de la endogлина por TGF- $\beta$  es menor en comparación con la que presenta Betaglicano por los ligandos. <sup>37</sup>

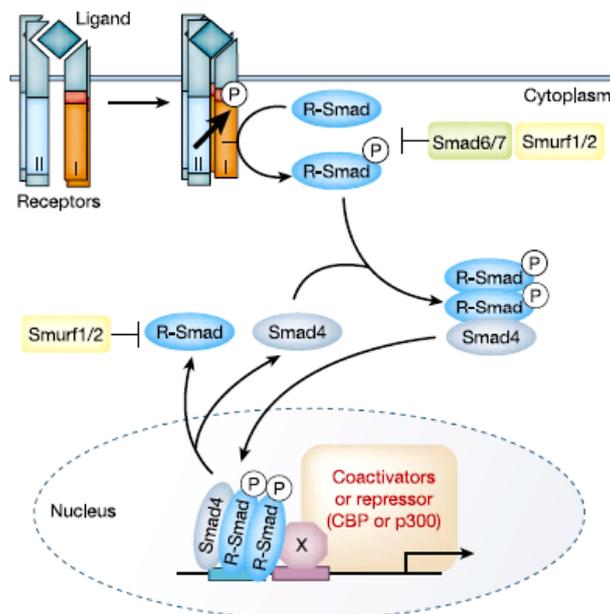
### **Activación de receptores**

Se han descrito dos maneras de unión del ligando a los receptores tipo I y II. Uno es denominado secuencial, es decir, el ligando se une primero al receptor tipo II formando un complejo, el cual posteriormente induce el reclutamiento del receptor tipo I formando así un heterotetrámero en superficie. Esta forma de unión secuencial se ha descrito para los receptores del TGF- $\beta$  y Activinas. La otra manera de unión es la denominada cooperativa y es típica de los receptores de BMPs, este tipo de unión involucra a ambos receptores para unir al ligando con una alta afinidad cuando son expresados juntos. <sup>37</sup>

Independientemente de la manera de unión del ligando a los receptores, los receptores tipo II son activados mediante su autofosforilación en residuos de serina y treonina. El receptor tipo II mediante su dominio de cinasa fosforila al receptor Tipo I en residuos de serina y treonina en el dominio GS (Fig.8). <sup>37</sup>

El dominio GS es una región reguladora de la actividad señalizadora de los receptores Tipo I. El penúltimo residuo en este dominio (serina o glutamina) es sustancial en esta actividad, si este residuo es mutado se presenta una elevada actividad de cinasa.<sup>37</sup>

Cercano al dominio GS del receptor tipo I se localiza el motivo Leu-Pro que mantiene unida a la inmunofilina FKBP12, la cual en condiciones basales actúa como un regulador negativo de la señal inducida por los receptores tipo I y II, cuando éstos receptores son activados formando un complejo, FKBP12 es liberado del motivo Leu-Pro.<sup>36,37</sup>

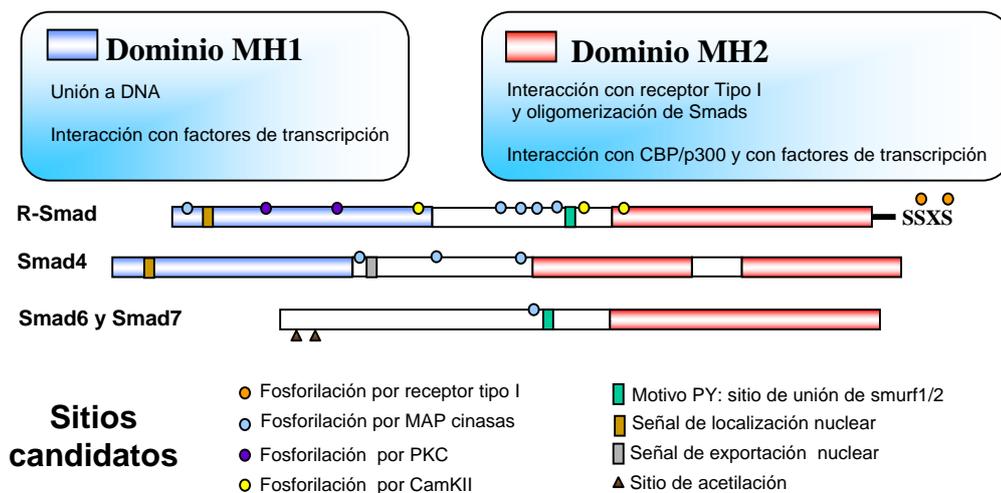


**Fig. 8. Mecanismo general de activación de receptores y proteínas Smads de la superfamilia del TGF- $\beta$ .** Los ligandos se unen a los receptores tipo II desencadenando su autofosforilación, el receptor Tipo II fosforila al receptor Tipo I desencadenando su activación. El receptor Tipo I fosforila a las proteínas R-Smads en el motivo SSXS de la región carboxilo terminal induciendo su activación. Las R-Smads se unen a Smad4 o co-Smad formando un complejo, este complejo transloca a núcleo e induce la transcripción de diversos genes de manera directa ó reclutando a co-activadores y factores de transcripción. La Smad6 y 7 inhiben de manera directa el reclutamiento de R-Smads a los receptores Tipo I, o pueden promover la degradación de R-Smads por el proteosoma mediante su asociación con la ligasa de ubiquitina Smurf1/2. Tomado de Derynck & Zhang, 2003

## Activación de Smads

Los receptores Tipo I activados fosforilan a mediadores protéicos denominados Smads (SMA/MAD related). Estas Smads fosforiladas por el receptor Tipo I se denominan R-Smads, existen Smads que inhiben la señal de las R-Smads denominadas inhibidoras o antagonistas, y por último Smad4 que se asocia con las R-Smads formando un complejo, el cual transloca al núcleo (Fig.8.).<sup>36</sup>

En los vertebrados existen ocho R-Smads descritas: Smad2 y Smad3 son activadas por receptores Tipo I de TGF- $\beta$  y Activinas, mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 son activados por los receptores ALK-1, ALK-2, BMPR-IA/ALK-3 y BMP-RIB/ALK6 en respuesta a BMPs y a otros ligandos. Las proteínas Smads presentan en su estructura dominios de interacción con otras proteínas, dominios de unión a DNA y sitios de fosforilación mediados por receptores de Tipo I y por otras proteínas de señalización (Fig. 8.).<sup>36-38</sup>



**Fig. 9. Estructura y papel de los dominios de Smads, sitios candidatos como blanco de otras vías de cinasas.** Ciertas vías incluyen la de MAP cinasas, PKC y CamKII. El significado de los sitios candidatos para la fosforilación por MAP cinasas en Smad6/7 es desconocido. *Adaptado de Derynck & Zhang, 2003.*

Las R-Smads son activadas por los receptores tipo I mediante la fosforilación en el motivo SSXS del extremo carboxilo terminal de estas proteínas, esta interacción es altamente específica. Los dominios MH1 de R-Smads y Smad4 confieren la capacidad de unión a DNA (excepto Smad2) y a factores de transcripción.<sup>38</sup>

Los dominios MH2 además de interactuar con factores de transcripción permiten la interacción específica con el co-activador transcripcional CBP/p300, la oligomerización de Smads y su interacción con receptores tipo I. Ambos dominios se encuentran estructuralmente unidos por medio de una región denominada linker (Fig. 9).<sup>38</sup>

La translocación al núcleo del complejo de R-Smads/Smad4 es llevada a cabo mediante el reconocimiento de las secuencias de localización nuclear que presentan estas proteínas (Fig. 9). Una vez dentro del núcleo la co-Smad puede regresar a citosol mediante el reconocimiento de sus secuencias de exportación nuclear a reclutar otro complejo de R-Smads (Fig. 9). Esta regulación de la actividad de R-Smads por parte de la co-Smad es importante para mantener disponible complejos protéicos en el núcleo que lleven a cabo la transcripción genética directamente o en cooperación con factores de transcripción<sup>37</sup>. Por otro lado, las Smads antagonistas (Smad 6 y 7) constituyen un mecanismo de regulación de las señales inducidas por los receptores de tipo I. Estas Smads no poseen el dominio MH1, pero mediante sus dominios MH2 se unen a los receptores tipo I inhibiendo el reclutamiento y activación de las R-Smads (Fig. 9). La Smad7 posee la capacidad de formar un complejo con Smurf1 y Smurf2 induciendo la degradación de receptores tipo I por el proteosoma (Fig. 8). Las proteínas Smurf1 y Smurf2 pertenecen a la familia de ligasas de ubiquitina E3: su función principal es promover la degradación de proteínas mediante la unión de grupos de ubiquitina. Se ha observado que independientemente de la interacción con Smad7, Smurf1 y Smurf2 regulan directamente los niveles de R-Smads.<sup>36-38</sup>

## **Ligandos**

Los ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  se expresan de manera monomérica y adquieren una naturaleza dimérica cuando son secretados, los dímeros son formados por uniones disulfuro. Cabe señalar que los ligandos pueden ser homodímeros o heterodímeros como TGF- $\beta$  1.2, TGF $\beta$  2.3 y Activina AB<sup>37</sup>. Las isoformas del TGF- $\beta$  en mamíferos son TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, los cuales son codificados por distintos genes y a nivel de proteína presentan un 80% de identidad.<sup>37</sup>

Las isoformas del TGF- $\beta$  son secretadas en forma de moléculas precursoras latentes (LTGF- $\beta$ ) con una longitud de 390 a 414 aminoácidos y contienen una región hidrofóbica en el extremo amino terminal denominada “péptido señal”, una región denominada LAP (Latent-Associated Peptide) y en el extremo carboxilo terminal una región bioactiva que contiene 112 aminoácidos por monómero.<sup>37</sup> La región LAP permite la unión covalente con la proteína denominada proteína de unión a LTGF $\beta$  (LTBP), la cual permite el anclaje de este complejo proteico a la matriz extracelular, promoviendo la proteólisis de la región LAP por varias proteasas dando como resultado la liberación de la forma madura de TGF- $\beta$ .<sup>37</sup>

Los ligandos de la familia de BMPs presentan la propiedad de inducir la formación de cartílago y hueso *in vivo*, y estudios *in vitro* han confirmado la regulación del crecimiento y diferenciación de linajes de condroblastos y osteoblastos. Además de estas funciones, presentan actividades biológicas en otros tipos celulares como son monocitos, células epiteliales, células de mesénquima y neuronas. Estos factores regulan la apoptosis, el crecimiento, la quimiotaxis y los procesos de morfogénesis de varios tejidos y órganos.<sup>39</sup>

Esta familia puede ser dividida en varios subgrupos en relación a su estructura y función que realizan. Las proteínas BMP-2 y BMP-4 juegan un papel importante en los procesos de morfogénesis que se presentan en el desarrollo embrionario. BMP-2 y BMP-4 se encuentran relacionadas estructuralmente con el producto génico Dpp de *Drosophila*, la cual regula los procesos de establecimiento del eje dorso-ventral, morfogénesis de intestino y formación de las venas de las alas. Otro subgrupo está representado por las proteínas BMP-7, BMP-8, BMP-8B, BMP-5 y BMP-6. Los animales que son deficientes de miembros de este subgrupo no mueren en la etapa de desarrollo embrionario pero sí presentan defectos en varios tejidos incluyendo tejidos esqueléticos.<sup>39,40</sup>

BMP-7 induce la formación de cartílago y hueso *in vitro*, y se ha relacionado a la morfogénesis de ojos y riñones. BMP-8 se ha visto relacionada a la regulación de procesos de espermatogénesis, mientras que BMP-5 se ha relacionado a la morfogénesis del cráneo y al establecimiento de partes axiales del esqueleto.<sup>39</sup>

El último subgrupo está conformado por los ligandos GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5), GDF-6 y GDF-7. Este subgrupo está involucrado en los procesos de condrogénesis como la formación de tendones, ligamentos, y extremidades. La señalización por las BMPs está regulada por inhibidores extracelulares que se unen a estas proteínas con alta afinidad, de manera que inhiben su interacción con los receptores en membrana. Los inhibidores de BMP-2 y BMP-4 son Noguina, Cordina y Tsg. Tsg de manera particular se puede unir directamente a la BMP-4 o unir la cordina mejorando la inhibición.

39,40

Los ligandos de la familia de Activinas/Inhibinas se expresan en subunidades monoméricas: las isoformas expresadas son  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ E y  $\alpha$ . Las Activinas son dímeros conformados por subunidades  $\beta$ , y por lo tanto se utiliza cierta nomenclatura para definirlos: Activina A ( $\beta$ A-BA), Activina B ( $\beta$ B- $\beta$ B), Activina AB ( $\beta$ A- $\beta$ B), etc. La subunidad  $\beta$ A se expresa en diversos tejidos y se encuentra junto con la subunidad  $\beta$ B en las gónadas. La expresión de la subunidad  $\beta$ C ha sido identificada en el hígado. La nomenclatura de los ligandos de Inhibina se basa en la formación de heterodímeros entre las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$ : Inhibina A ( $\alpha$ -BA) e Inhibina B( $\alpha$ - $\beta$ B).<sup>41</sup>

### **Antagonismo de las funciones de Activinas**

Antagonismo de Inhibina: La proteína Inhibina fue identificada como un inhibidor de la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) en cultivos de glándula pituitaria. Posteriormente, se identificó a las Activinas como dímeros de subunidades  $\beta$  que promovían la producción de FSH en la pituitaria, antagonizando así la función de las Inhibinas.

Otras funciones en los procesos reproductivos donde se presenta el antagonismo de Activinas e Inhibinas son el control de la estereoidogénesis en las gónadas, la síntesis de andrógenos en células de la teca, la proliferación de células de la granulosa y la secreción de hormonas en la placenta. También se ha observado antagonismo en los procesos de condrogénesis de extremidades de pollos y en proliferación de timocitos de rata.<sup>42</sup>

Se han propuesto varios modelos para el antagonismo de Activinas e Inhibinas. El primero de ellos se refiere a la producción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , ya que si se presentan diferentes niveles de expresión de éstas, la disponibilidad de Activinas o Inhibinas en forma de dímeros funcionales será también diferente.

Por ejemplo, en los folículos generados por la acción de FSH, la expresión de la subunidad  $\alpha$  es de 10 a 20 veces más que la producción de la subunidad  $\beta$ , esto asegura la biosíntesis de proteínas involucradas en el crecimiento del folículo, deteniendo los efectos de arresto en la maduración folicular promovidos por la Activina. En testículo, las inhibinas son producidas por células de Sertoli en el epitelio seminífero y por las células de Leydig en la región intersticial. Se ha observado que los niveles de las inhibinas en la sangre se encuentran negativamente correlacionados con los niveles de la FSH, por tal razón las inhibinas han sido utilizadas como marcadores de la función testicular.<sup>41</sup>

Otros niveles de regulación del antagonismo de estos ligandos se centran en la unión a los receptores de Tipo II (ActRII). La Activina se une con alta afinidad a ActRII, mientras que la afinidad de estos receptores por Inhibina es baja. Esto puede explicar de alguna manera el requerimiento de una alta producción de subunidades  $\alpha$  en los folículos para poder ejercer alguna función antagonista. Otro mecanismo de antagonismo de las funciones de las Activinas propuesto, se basa en la participación de co-receptores para las Inhibinas como proteínas Betaglicano. La Afinidad de la unión de la Inhibina a moléculas de betaglicano es alta. Se ha observado que la Inhibina puede inducir un complejo con moléculas de Betaglicano y el ActRII, excluyendo a los receptores de Tipo I de este complejo<sup>42-44</sup>. Aunado a lo anterior, la expresión de la proteína betaglicano y su RNAm en tejidos de cerebro de rata, pituitaria y gónadas sugiere un posible papel modulador de la actividad de las Inhibinas en estos tejidos.<sup>42</sup>

Otra proteína que se ha descrito como co-receptor de Inhibina es la proteína InhBP (Inhibin-Binding Protein), InhBP media el antagonismo de Inhibina secuestrando al receptor de tipo I e inhibiendo las funciones de Activinas<sup>45</sup>. Sin embargo, no se descarta la existencia de otro co-receptor para Inhibinas que facilite la inhibición de las funciones de activinas.

Antagonismo de Folistatina: Folistatina se une a Activina enmascarando los residuos indispensables para la interacción con ActRII y ALK4. Folistatina posee una alta afinidad de unión a Activina A, mientras que para Activina B es diez veces más baja. Un miembro de la familia de Folistatina denominado FLRG (Follistatin-Related Gene) une a la Activina con una alta afinidad. La FLRG es una proteína circulante y actúa secuestrando a Activina, impidiendo la unión a sus receptores de la misma forma que folistatina.<sup>42</sup>

## **Papel de la superfamilia del TGF- $\beta$ en el desarrollo de linfocitos T**

### **TGF- $\beta$**

Posiblemente una primera evidencia del papel de TGF- $\beta$  como modulador de la función de linfocitos T, es el hecho de que inhibe la proliferación celular dependiente de IL-2, disminuyendo la expresión de su receptor (IL-2R). Sin embargo, la simple activación de un linfocito T puede inducir la expresión de TGF- $\beta$  regulando negativa y temporalmente la proliferación de linfocitos T<sup>46</sup>.

Por otro lado, TGF- $\beta$  participa en la inhibición de la proliferación de timocitos en respuesta a IL-1<sup>47</sup>. También se ha reportado que TGF- $\beta$ 1 puede inducir la expresión de CD8 en la subpoblación CD25<sup>+</sup> Triple negativa (TN: CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>) cultivada en presencia de IL-7<sup>48</sup>. Esta expresión de CD8 previa a la expresión de CD3 y CD4 origina una subpoblación intermedia (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha^+\beta^-$ ) que continúa su diferenciación a timocitos DP<sup>49</sup>.

Por otro lado, se ha reportado que las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 son expresadas por las células epiteliales de la corteza y de la zona subcapsular de timos fetales y adultos de ratón. Estas isoformas se han visto involucradas en regular la progresión del ciclo celular y la diferenciación de timocitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup> a timocitos dobles positivos<sup>50</sup>.

Estudios realizados en el timo humano indican que la subpoblación TN expresa la forma latente de TGF- $\beta$ 1, y se requiere de la interacción de esta subpoblación con células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> para convertirse a su forma activa y regular de manera autócrina la proliferación de timocitos TN inducida por citocinas como IL-2, IL-4 e IL-7 <sup>51</sup>. De manera paralela, TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 regula la expresión de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y LIF (Leukemia Inhibitory Factor) inducidas por EGF (Epidermal Growth Factor) en TECs humanas <sup>52</sup>.

También se ha descrito la importancia de TGF- $\beta$ 1 en el mantenimiento de la arquitectura de los órganos linfoides. En ratones deficientes de TGF- $\beta$ 1 se presenta una disminución en tamaño y celularidad del timo, una hiperplasia de la región medular y una corteza reducida, mientras que los nodos linfáticos se distinguen más grandes <sup>53</sup>. En lo que se refiere al fenotipo de las células presentes en el timo de este ratón, existe un alto porcentaje de células con una alta expresión de CD3, los timocitos DP disminuyen ligeramente y el porcentaje de células positivas para MHC-I incrementa considerablemente comparado con el control (TGF- $\beta$ <sup>+/+</sup>). Además, los timocitos <sup>+/+</sup> presentan una respuesta proliferativa muy reducida a la estimulación *in vitro* con diversos mitógenos <sup>53</sup>.

En cultivos de timos fetales, TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 agregado de manera exógena al medio de cultivo genera una disminución de un 90% en el crecimiento de los timocitos, este fenómeno es dosis dependiente. Las dos isoformas modifican en número las subpoblaciones en desarrollo: los timocitos DN, DP y CD4<sup>+</sup> disminuyen considerablemente, mientras que los números absolutos de timocitos CD8<sup>+</sup> se mantienen normales <sup>54</sup>. En el caso de las subpoblaciones de DN, los timocitos DN1 incrementan en gran proporción, mientras que los timocitos DN3 y DN4 disminuyen de manera considerable, sugiriendo que TGF- $\beta$  induce un bloqueo importante en el estadio DN1. De manera contraria, los timocitos CD8<sup>+</sup> generados por el tratamiento de TGF- $\beta$  presentan un fenotipo maduro CD3<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+\beta^+$ , excluyendo la posible generación de una subpoblación transicional CD8 $\alpha^+\beta^-$  anteriormente reportada. Además, mediante un análisis de ciclo celular se observó que los timocitos CD8<sup>+</sup> no surgen por expansión de las células pre-existentes, indicando que TGF- $\beta$  puede participar de manera directa en el compromiso de las células DP hacia el fenotipo CD8<sup>+</sup> ó inhibiendo la diferenciación hacia células T CD4<sup>+</sup> <sup>54</sup>.

En lo que respecta a la activación de Smads en linfocitos T, la primera evidencia reportada fue la fosforilación de Smad2 inducida por la estimulación del TCR en células T periféricas<sup>55</sup>. Esto resalta la posible importancia de la regulación de estos mediadores intracelulares bajo la influencia de las señales del TCR y de los ligandos de TGF- $\beta$  en los timocitos.

Recientemente, se ha caracterizado la expresión de receptores tipo I y II, la proteína Smad2 así como su forma fosforilada en los distintos compartimentos del timo. La expresión del receptor ALK5 (T $\beta$ RI) y el receptor Tipo II es alta en médula, mientras que en la corteza ALK5 se expresa considerablemente y de manera heterogénea. Por último, el receptor Tipo II se expresa a bajos niveles en todo el timo<sup>56</sup>.

La expresión de Smad2 así como su forma fosforilada se presenta importantemente en la médula y la región subcapsular, y en la corteza se presenta de manera heterogénea. Los timocitos DN y SP expresan Smad2, mientras que en timocitos DP la expresión es muy baja. Todas las subpoblaciones de timocitos responden a la estimulación *in vitro* con TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$  induce una mayor fosforilación de Smad2 en timocitos SP mientras que en timocitos DN es menor. Este patrón de fosforilación inducido por TGF- $\beta$  conforme al avance de los distintos estadios de diferenciación en el timo, es compatible con la distribución celular de los receptores T $\beta$ RIIB y ALK5.<sup>56</sup>

Análisis realizados con un ratón transgénico que expresa una forma dominante negativa de T $\beta$ RII bajo el control del promotor para el receptor CD4, dió como resultado una manifestación de respuestas autoinmunes causadas por una disfunción en la actividad de células T. Sin embargo, este ratón transgénico presenta porcentajes similares de subpoblaciones de timocitos a los de un ratón normal<sup>57</sup>.

En estudios realizados con timocitos murinos deficientes de T $\beta$ RII, se demostró que TGF- $\beta$  no es necesario para que la transición de los estadios en desarrollo ocurra normalmente. Sin embargo, TGF- $\beta$  parece regular la entrada a ciclo celular de timocitos CD8<sup>+</sup>, ya que se presenta una alta proliferación de esta subpoblación<sup>58</sup>. Al parecer TGF- $\beta$  podría regular el compromiso de timocitos DP al fenotipo CD8<sup>+</sup>, modulando la proliferación celular de esta subpoblación diferenciada.

## BMPs

El papel de la familia de BMPs ha sido poco descrito en el desarrollo de células T. Sin embargo, BMP-2 y BMP-4 son expresados preferencialmente en el estroma tímico. Los receptores BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II así como las Smads (1, 5 y 8) son expresados en el estroma tímico y en los timocitos<sup>59-61</sup>.

Los reguladores negativos de la señalización de BMP2/4 como Noguina, Cordina y Tsg también son expresados en el timo de manera diferencial. La proteína Noguina se expresa en bajas cantidades por el estroma<sup>60</sup>, Cordina es expresada en el estroma y en menor grado en timocitos<sup>60,61</sup>, mientras que en el estroma y en timocitos se expresa Tsg<sup>61</sup>.

La expresión de Tsg se induce en timocitos considerablemente durante la señalización del pre-TCR, induciendo así el avance al estadio DP en los timocitos CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>RAG1<sup>-/-</sup> estimulados con un anticuerpo anti-CD3. De manera paralela, Tsg revierte la inhibición de la diferenciación de los timocitos DN a DP mediada por BMP-4, sugiriendo que la señalización del pre-TCR induce la expresión de Tsg para contrarrestar el efecto inhibitorio de la BMP-4 y continuar con la diferenciación hacia el estadio DP<sup>61</sup>. La señalización de BMP2/4 disminuye los porcentajes de los timocitos DN2, DN3 y DN4, debido a que inhibe la proliferación de timocitos DN1. Este efecto puede ser revertido al agregar Noguina de manera exógena en FTOCs<sup>60</sup>.

Interesantemente, el factor de transcripción Schnurri-2 (Shn-2) es requerido en el proceso de la selección positiva. Shn-2 junto con Mad-Medea son parte de la vía de señalización de Dpp (Decapentaplegic) que se presenta en *Drosophila*, las cuales son representantes ortólogos de las vías de TGF- $\beta$ , Activinas/Inhibinas y BMPs en vertebrados. En el ratón deficiente de Shn-2 se presenta una disminución considerable de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, además la condición heterocigota de este factor (Shn-2<sup>+/-</sup>) resulta en una disminución de estas subpoblaciones pero en menor grado<sup>62</sup>. Aunque Shn-2 pertenezca a la vía de señalización de Dpp, no podemos excluir que la activación de este factor esté mediada por los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  debido a que ambas vías están relacionados evolutivamente y presentan un mecanismo similar de transducción de señales.

Sin embargo, el papel de la señalización de BMPs se ha reportado a ser requerida para el mantenimiento celular del estroma tímico y no para el desarrollo normal de timocitos, debido a que mediante la expresión transgénica de Noguina bajo el control de un promotor de Foxn1 que especifica esta expresión a la células epiteliales del estroma, los timocitos se desarrollan normalmente comparado con un ratón silvestre, mientras que el estroma tímico se observa displásico y reducido en tamaño <sup>63</sup>. Este resultado contradice el papel que podría tener BMP2/4 en regular la diferenciación de los timocitos DN1, aunque todavía es necesario realizar más estudios que aclaren los papeles funcionales que desempeñan la familia de BMPs en el desarrollo de Linfocitos T.

### **Activinas/Inhibinas**

Muy pocos estudios se han realizado que involucren un papel de la subfamilia de Activinas/Inhibinas en el desarrollo de las células T. Sin embargo, se ha observado que la Activina A inhibe la proliferación de timocitos de rata estimulados a la par con los mitógenos ConA (Concanavalin A) y PHA (Phytohaemagglutinin) antagonizando la señal de Inhibina, la cual promueve proliferación celular <sup>64</sup>. La Activina A puede ejercer funciones diferentes dependiendo del ambiente de citocinas que regulen la respuesta proliferativa de células T. Por ejemplo, la Activina A disminuye el crecimiento de los timocitos mediante la inhibición de la producción de IL-6, sin embargo al agregar IL-6 de manera exógena, Activina A es capaz de aumentar la proliferación celular inducida por esta citocina <sup>65</sup>.

Recientemente se ha reportado que las subpoblaciones de timocitos se encuentran bajo influencia de Activinas/Inhibinas. En el timo se expresan los receptores ALK4, ActRIIA, ActRIIB y las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4. <sup>56,66</sup>

El receptor ALK4 se expresa moderadamente en la médula y en niveles bajos en la corteza. A diferencia de ActRIIB, la expresión de ActRIIA es alta en médula y corteza <sup>56</sup>. La expresión de ALK4 es mayor en la subpoblación DN y disminuye durante la maduración a timocitos SP <sup>56,66</sup>.

Mediante un análisis cuantitativo, nuestro laboratorio reportó la expresión de ActRIIA principalmente en el estroma del timo, mientras que en timocitos ésta expresión es muy baja. Por su parte, la expresión de ActRIIB es mayoritaria en la subpoblación DN y en el estroma tímico, mientras que en timocitos DP se expresa en menor grado <sup>66</sup>.

La expresión de Smad2 así como su forma fosforilada es alta en médula y en la región subcapsular, mientras que en la corteza la expresión es heterogénea <sup>56</sup>. Sin embargo, un análisis más detallado de la expresión, no sólo de Smad2 sino de Smad3 y Smad4, realizado en nuestro laboratorio indica que la mayor expresión de estas proteínas ocurre en la subpoblación DN y disminuye en los siguientes estadios de diferenciación <sup>66</sup>. Aunado a lo anterior, todas las subpoblaciones de timocitos responden a la estimulación *in vitro* con Activina A, presentando mayor fosforilación de Smad2 en las subpoblaciones DN1 y DN2. Cabe señalar que esta fosforilación decrece con el avance en los estadios de desarrollo <sup>56</sup>. Las subunidades  $\beta$ A,  $\beta$ B y  $\alpha$  que conforman a los ligandos de la familia de Activinas/Inhibinas también se expresan en el timo. Las subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B se expresan en gran cantidad en el estroma tímico. En timocitos la expresión de la subunidad  $\beta$ A es baja, mientras que la subunidad  $\beta$ B no se expresa. Por otro lado, nuestro laboratorio reportó por primera vez, mediante análisis por RT-PCR cuantitativa, que las subunidades  $\alpha$  son las que se expresan mayoritariamente tanto en el estroma de timo fetal como en timo adulto. <sup>66</sup>

En resumen, estas evidencias sugieren la expresión conjunta de ALK4 y ActRIIB en timocitos DN podría mediar la señalización de Inhibina B secretada por el estroma, indicando así un papel regulador potencial durante estadios tempranos del desarrollo de los timocitos. De manera interesante, datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que las Inhibinas, son capaces de inducir la fosforilación de Smad2/3 en timocitos murinos y en una línea celular de linfocitos T humanos. Sin embargo, todavía se requieren estudios más detallados de esta familia de ligandos que demuestren de manera directa el papel funcional en los diferentes procesos celulares que ocurren en el desarrollo de células T.

## **Interacción de las Vías de señalización de TGFβ y MAP cinasas**

Las interacciones entre MAP cinasas y componentes de la señalización de TGF-β podemos dividirla en las siguientes categorías:

### **Activación de MAP cinasas por TGF-β**

La primera evidencia de activación de MAP cinasas fue observada con la estimulación de TGF-β1 y TGF-β2 en líneas celulares de epitelio intestinal y pulmonar, donde se demostró que ambas isoformas pueden activar a la GTPasa Ras con diferente magnitud a tiempos cortos <sup>67</sup>. También se ha reportado la activación de ERK1 (p44) en estas líneas celulares en tiempos de 5 a 10 minutos. Este efecto de TGF-β en la activación de ERK fue determinante en la inhibición de la síntesis de DNA en un 95-98% <sup>68</sup>. Además, el bloqueo de la señalización de Ras mediante la expresión de un dominante negativo de esta GTPasa, suprime la activación de ERK1 y como consecuencia, revierte el efecto inhibitorio de TGF-β en el crecimiento de las células de epitelio intestinal <sup>69,70</sup>. También se ha reportado que se requiere de la activación de Ras, Mek1 y MKK4 para inducir la transcripción de TGF-β1 mediante estimulación con TGF-β3 <sup>71</sup>.

Sin embargo, los efectos de TGF-β en la activación de ERK en células no transformadas son modestos en comparación a la presentada en células transformadas. Por ejemplo, TGF-β puede activar de manera considerable a ERK2 (p42) en varias líneas celulares de cáncer de mama teniendo un efecto inhibitorio en el crecimiento de estas células <sup>72</sup>. También se ha reportado la activación de p38 y JNK por TGF-β. TAK1 (TGF-β-activated Kinase 1) es una MAPKKK originalmente identificada al ser activada por TAB1 (TGF-β-Activated kinase-Binding protein-1), se ha observado que TGF-β activa a TAK1 mediante su reclutamiento a los receptores tipo I por XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), regulando positivamente las vías de p38 y JNK <sup>73-75</sup>.

TGF- $\beta$  puede activar a p38 con una cinética diferencial dependiendo del tipo celular. Se ha observado que en neutrófilos, en líneas celulares como HEK293 y C2C12, la activación de p38 por TGF- $\beta$  puede ser rápida pero transitoria, mientras que en células de carcinoma pancreático, hepatocitos y osteoblastos la activación de p38 es retrasada pero sostenida <sup>76</sup>. p38 media la actividad transcripcional de TGF- $\beta$  mediante la fosforilación de factores de transcripción como ATF2. Esta activación de p38 es dependiente de la actividad de TAK1 y MKK3 <sup>77,78</sup>.

Por otro lado, se ha reportado en líneas celulares de epitelio de mama, que la activación de p38 por TGF- $\beta$  no depende de la fosforilación ejercida por los receptores de Tipo I, ya que al ser mutados estos receptores y en consecuencia, suprimir la fosforilación de R-Smads, p38 permanece activa en respuesta a la estimulación con TGF- $\beta$  <sup>79</sup>.

JNK también es activada por TGF- $\beta$  de manera independiente de Smads e induce la síntesis de fibronectina en una línea celular de fibrosarcoma humano, la transcripción de fibronectina es regulada por c-Jun en conjunto con ATF2, factores de transcripción activados por esta MAP cinasa <sup>80</sup>.

La activación de JNK por TGF- $\beta$  puede ocurrir de manera rápida o retrasada, ambas cinéticas de activación requieren de la función de la familia de GTPasas Rho <sup>81</sup>. También se ha observado que JNK activado por TGF- $\beta$ , al igual que ERK, está involucrado en el control negativo del crecimiento de varias líneas celulares de cáncer de mama <sup>72</sup>.

## **Modulación de la actividad de Smads por MAP cinasas**

Las MAP cinasas pueden regular la señalización de Smads de manera positiva ó negativa. En el caso de la señalización de Ras, en específico la actividad de ERK, el estado de transformación de la célula juega un papel muy importante.

En una línea celular de epitelio de pulmón se observó que ERK puede fosforilar a Smad2 en el extremo amino terminal (Thr8) en respuesta a la estimulación de EGF, estabilizando su asociación con Smad4 y mejorando su actividad transcripcional <sup>82</sup>.

En contraste, ERK puede regular negativamente la señal de Smads mediante la fosforilación en la región linker de Smad1, Smad2 y Smad3 en diferentes líneas celulares de diferentes epitelios y derivadas de tumores.<sup>83</sup>

En una línea celular de epitelio intestinal se observó que TGF- $\beta$  puede inducir la fosforilación de la región linker del Smad1 endógeno mediada por ERK, esta fosforilación se presentó en cuatro sitios de la región linker<sup>84,85</sup>. En líneas celulares derivadas de tumores epiteliales, se ha observado que en presencia de Ras oncogénico, ERK inhibe la translocación nuclear de Smad2 y Smad3 mediante la fosforilación en la región linker de estas proteínas. Smad2 presenta un solo sitio de fosforilación (Thr-220) por ERK, mientras que Smad3 presenta 2 sitios (Thr-178 y Ser-212)<sup>86</sup>.

Sin embargo, es necesario resaltar que la estimulación con EGF en células no transformantes también indujo la fosforilación por medio de ERK de los sitios presentes en la región linker de Smad2 y 3, interfiriendo en menor grado su translocación al núcleo<sup>86</sup>. Esto indica que la activación de ERK por una serie de estímulos externos puede regular la señalización de TGF- $\beta$  a nivel de translocación nuclear de Smads.

La vía de ERK no ha sido la única involucrada en la fosforilación de Smads. Se ha observado que JNK puede fosforilar directamente en la región linker de Smad2 y Smad3 en respuesta a los estímulos de HGF (Hepatocyte Growth Factor) y EGF, mientras que p38 por su parte fosforila a Smad3 únicamente en la región linker. Estas fosforilaciones inducidas por JNK y p38 estabilizan la asociación de R-Smads con Smad4, aumentando su actividad transcripcional<sup>87</sup>.

### **Interacciones nucleares entre complejos de Smads y factores de transcripción activados por MAP cinasas**

Componentes río abajo de la vía de señalización de MAP cinasas, en especial la familia de factores de transcripción AP1 (Jun-Fos), pueden interactuar con complejos de R-Smads/Smad4 a nivel nuclear<sup>88</sup>.

Se ha observado que Smad3 y Smad4 interactúan físicamente con c-Jun/c-Fos (factores de transcripción activados por JNK) y potencian la actividad transcripcional en respuesta a TGF- $\beta$ <sup>89</sup>.

Sin embargo, también se ha observado que c-Jun y JunB son capaces de antagonizar la actividad transcripcional de Smad3, mediante la formación de complejos heterotetraméricos con esta Smad, para así limitar su unión a secuencias de ADN<sup>90</sup>. JNK también puede regular la actividad transcripcional de Smad2/3 mediante mecanismos alternativos, como la unión de c-Fos a factores co-activadores como p300/CBP o a co-represores como TGIF y c-Ski<sup>91</sup>. Por otro lado, las vías de p38 y JNK mejoran la actividad del factor de transcripción ATF2, el cual puede cooperar con las Smads mediante su unión física y regular la transcripción inducida por TGF- $\beta$ <sup>92</sup>.

La vía de ERK puede aumentar los niveles del co-represor TGIF. Esta proteína, al igual que SKI y SnoN, se une a Smad2 y Smad3 compitiendo con el co-activador p300/CBP. Por lo tanto, los niveles de estas proteínas co-represoras y co-activadoras pueden influir en la transcripción diferencial de genes<sup>92</sup>.

Como hemos visto, las MAP cinasas pueden modular la actividad de la señalización mediada por Smads a diferentes niveles. La vía de señalización de TGF- $\beta$  está estrechamente vinculada a diferentes estímulos externos como factores de crecimiento o condiciones de estrés que activan a MAP cinasas y regulan una respuesta diferencial dependiendo del tipo celular del cual se trate. Estas interacciones adquieren importancia, y reflejan la característica multifuncional de la señalización de la superfamilia de TGF- $\beta$  en la regulación de procesos celulares como diferenciación, proliferación, adhesión y muerte celular en diferentes tejidos.

## **Justificación**

Se ha demostrado que las moléculas involucradas en la señalización de la superfamilia de TGF- $\beta$  se expresan en el timo y que la interacción de los ligandos con sus receptores en los timocitos participa en la regulación de los diferentes procesos de diferenciación que ocurren durante la maduración de los timocitos, incluyendo la transición de timocitos inmaduros DN a DP y la selección positiva y negativa, así como el compromiso hacia un linaje específico. En forma paralela, la actividad de la MAP cinasa ERK es esencial en el destino de los timocitos, ya que es requerida como parte de la señalización inducida por el pre-TCR para continuar la diferenciación a timocitos DP, como también en la señalización inducida por el TCR que es fundamental para mediar los procesos de selección positiva y negativa, así como el compromiso hacia el linaje CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>.

Considerando el hecho de que componentes de la vía de ERK pueden ser activados por el TGF- $\beta$ , y desencadenar efectos en el crecimiento de las células del epitelio pulmonar, intestinal y derivadas del cáncer de mama, es necesario comprobar si los ligandos de esta superfamilia inducen la activación de la MAP cinasa ERK en las diferentes subpoblaciones de timocitos en desarrollo e investigar si esta probable activación es modulada por la señales provenientes del TCR.

## **Hipótesis**

Los ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  inducen una activación de la cinasa ERK en timocitos y modulan las señales provenientes del TCR.

## **Objetivo general**

Determinar si ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  inducen la fosforilación de la MAP cinasa ERK, e investigar su posible modulación con las señales provenientes del TCR en timocitos murinos.

## **Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de la estimulación con TGF- $\beta$ , Activinas e Inhibinas sobre la fosforilación de la cinasa Erk1/2 en timocitos murinos.
- Investigar si la coestimulación con los ligandos TGF- $\beta$ , Activinas e Inhibinas modulan la fosforilación de la cinasa Erk1/2 en timocitos activados con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 murino.

## **Estrategia experimental**

### **Obtención de timocitos**

Se extrajeron quirúrgicamente timos de un ratón de la cepa C57/BL6 (de 4 a 8 semanas de edad) y se disgregaron mecánicamente en 1 ml de PBS 1X ("Phosphate Buffer Saline") en una caja de petri (35mm x 10mm) hasta obtener una suspensión celular en un volumen de 1.5 ml.

Posteriormente se tomó una alícuota de 20µl y se realizó una dilución 1:3 con azul de tripano para observar la viabilidad celular. Un volumen de 10µl fue tomado para realizar el conteo de células en una cámara de Newbauer. Posteriormente las muestras se centrifugaron (5 minutos, 1200rpm a 4°C) para eliminar el sobrenadante. Las muestras se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640 con 0.5% de SBF (Suero Bovino Fetal) suplementado con PSG (Penicilina-Estreptomocina-Glutamina), Fungizona y Hepes (12.5mM) pH 7.4. Se dividieron de 2 a 3 millones de células por cada tubo de FACs.

### **Tinción Superficial**

La tinción superficial se realizó en un volumen de 50 µl de medio RPMI 1640 suplementado, mediante una incubación de las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales Anti-CD4 y Anti-CD8 acoplados a diferentes fluorocromos, para así determinar las subpoblaciones de timocitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos (todos de Pharmingen, BD Biosciences, USA ): Anti-CD4 FITC utilizado a una dilución 1/100 ; Anti-CD4 PE utilizado a una dilución 1/400, Anti-CD8 PE, utilizado a una dilución 1/200, y Anti-CD8 PE-Cy5 utilizado a una dilución 1/300. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado (5 minutos, 1200rpm a 4°C) con RPMI 1640 con 0.5% de SBF para eliminar los anticuerpos que no se acoplaron a las moléculas de superficie mencionadas.

## **Inhibición de la vía de ERK**

En experimentos donde se utilizó el inhibidor PD98059 para MEK1/2 (Cell Signaling Technology, Boston, Massachusetts, EUA), las células teñidas superficialmente se incubaron con el inhibidor en un volumen aproximado de 1 ml a una concentración de 60 $\mu$ M durante 30 minutos y a 37°C. Como control negativo se utilizó el medio sin inhibidor y DMSO (vehículo de PD98059) a una concentración de 0.3%.

## **Ensayos de estimulación**

Después de la tinción superficial, las células fueron estimuladas a 37°C con diversos agonistas y a diferentes tiempos en un volumen de 100 $\mu$ l de medio RPMI 1640 suplementado. Los controles positivos empleados fueron los siguientes:

- 1) Estimulación con un inhibidor de fosfatasa en tirosina denominado Pervanadato bajo una concentración de 100 $\mu$ M durante 3 y 5 minutos.
- 2) Estimulación durante 5 minutos con los mitógenos PMA (“Phorbol Myristate Acetate”, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Ionomicina (Sigma-Aldrich) una concentración de 20 ng/ml y 200ng/ml respectivamente.
- 3) Estimulación con los anticuerpos monoclonales Anti-CD3 (BD) y Anti-CD28 (BD) durante 5 minutos y con las siguientes concentraciones: 10, 5, 4, y 2.5 $\mu$ g/ml. Como control de estimulación, se agregó la condición sin estímulo para obtener la fosforilación basal de ERK.

En las estimulaciones realizadas con anticuerpos biotinilados se utilizó estreptavidina (Pierce Inc, Rockford, Illinois, USA) al doble de la concentración utilizada con los anticuerpos, la estreptavidina se requiere para inducir la agregación de receptores y aumentar la señal inducida por el complejo de CD3. En estímulos con ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  se utilizaron diferentes tiempos pero se obtuvo la máxima señal en 5 minutos. TGF- $\beta$ 1 (Peprotech, Inc, Rocky Hill, New Jersey, USA) se utilizó a una concentración de 4 y 8 ng/ml, Activina A (Peprotech, Inc) a una concentración de 500ng/ml, Inhibina A (Diagnostic Systems Laboratories, Beckman Inc, Texas, USA) a una

concentración de 500ng/ml e Inhibina B (DSL, Beckman Inc) a una concentración de 500ng/ml.

Los ligandos de TGF- $\beta$  se utilizaron junto con los anticuerpos monoclonales Anti-CD3 y Anti-CD28 durante 5 minutos para observar los efectos en la fosforilación de ERK1/2. La condición sin estímulo fue contemplada para tener la fosforilación basal de la cinasa ERK1/2.

Transcurridos los tiempos de estimulación, las reacciones fueron detenidas incubando las muestras durante 10 minutos a 37°C y en condiciones de oscuridad con 300 $\mu$ l de Buffer Lyse/Fyx 1X (BD). Después de que las muestras fueran fijadas, se centrifugó (5 minutos, 1200rpm a 4°C) para eliminar el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 ml de Buffer de tinción (PBS + 5% de SBF + 0.02% de Azida de Sodio). Se realizó un lavado (5 minutos, 1200rpm a 4°C) con 1 ml de buffer de tinción.

### **Permeabilización**

Las células fueron permeabilizadas durante 20 minutos a 4°C, en oscuridad con 100 $\mu$ l de Buffer de permeabilización (Pharmlingen). Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados continuos con Buffer de tinción para eliminar restos del buffer de fijación utilizado.

### **Tinción intracelular**

Después de que las células fueron permeabilizadas, se adicionó directamente al pellet 3 $\mu$ l de anticuerpo monoclonal Anti-pERK1/2 (T202/Y204) acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 647 (Pharmlingen) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo, se realizó un lavado con 1 ml de buffer de tinción y las muestras se fijaron con buffer de fijación (PBS 1X + 0.5% de paraformaldehído).

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Calibur (Becton & Dickinson). Se capturaron 200,000 eventos para todos los experimentos realizados y se realizó el análisis de los resultados mediante el uso de los programas Cell Quest pro y Flow-Jo (Becton & Dickinson).

## **Análisis estadístico**

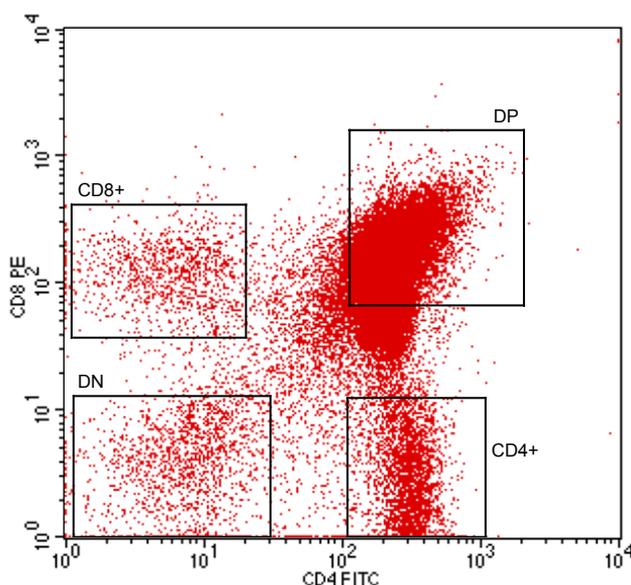
El análisis de los datos de citometría fueron realizados en el programa Flow-Jo, mediante el empleo de una modificación de la herramienta estadística de  $\chi^2$  ("Probability Binning" (Chi(T) ó PB), la cual permite minimizar la máxima variación esperada. Este algoritmo permite detectar pequeñas diferencias entre dos distribuciones de una manera cuantitativa. El valor de  $\chi^2$  es convertido a unidades métricas (T(x)), donde una T(x) = 0 implica que las distribuciones son similares, mientras que para un valor de T(x)>4 las dos distribuciones son significativamente diferentes con un valor de p < 0.01 (99% de confianza).

Mediante el uso del programa Cell Quest pro se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada condición, para realizar un análisis posterior en el programa de Excel, donde la fosforilación basal de ERK fue ponderado a 1 obteniendo valores relativos de las condiciones de estimulación con los ligandos.

## Resultados

Basándonos en el antecedente de que el TGF- $\beta$ 1, la Activina A y las Inhibinas son secretados en el timo, la funcionalidad de los ligandos a nivel de la activación de Smads se verificó de manera previa en timocitos murinos y en la línea celular humana Jurkat E6. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio aún no publicados indican que las Inhibinas, siendo antagonistas de la función de activinas, pueden inducir la fosforilación de Smads de manera notable e incluso en ocasiones, mayores a los obtenidos por TGF- $\beta$  y Activina A. Esta observación es importante en el sentido que abre paso a estudiar el posible desencadenamiento de la fosforilación de ERK en timocitos murinos, no sólo de TGF- $\beta$ 1 y la Activina A, sino también de las Inhibinas.

Para dar paso a la determinación del estado de la fosforilación de ERK en las distintas subpoblaciones de los timocitos, se realizó la tinción superficial de los marcadores CD4 y CD8 como se muestra en la figura 10. Esta técnica permite analizar las subpoblaciones por separado de una población total de células, la cual es tratada con un estímulo específico.



**Fig. 10. Identificación de las subpoblaciones de timocitos.** Los timocitos fueron incubados con los anticuerpos anti CD4-FITC y anti-CD8 PE-Cy5 para su análisis en un citómetro de Flujo. Las células positivas para los marcadores CD4 y CD8 son representadas en el diagrama de puntos mostrado, donde se puede distinguir 4 subpoblaciones de timocitos: DN, DP, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. El análisis de la fosforilación de ERK se determinó por cada región mostrada.

## **ERK es fosforilado en todas las subpoblaciones de timocitos**

Como se ha mencionado la vía de ERK tiene una gran relevancia durante el proceso de la diferenciación y la selección del linfocito T en el timo. Puesto que se ha reportado previamente la activación de esta vía por TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en distintas líneas celulares, nuestro objetivo fue evaluar si en timocitos dichos ligandos son capaces de inducir fosforilación de esta MAP cinasa. Para ello se estimularon timocitos murinos obtenidos de ratones C57/BL6 de 6-8 semanas y se incubaron durante distintos tiempos a 37°C en presencia de los ligandos de TGF- $\beta$ 1, Activina A, y las Inhibinas A y B.

En experimentos iniciales se realizaron curvas de dosis respuesta así como el curso temporal de la respuesta para identificar la dosis y el tiempo idóneo de la estimulación para cada ligando. Con estos datos se decidió utilizar un tiempo de estimulación de 5 minutos, para todos los ligandos, mientras que la dosis óptima varió dependiendo del ligando. Como control positivo se utilizó la estimulación conjunta con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 induciéndose una fuerte fosforilación de ERK (Fig. 11). Cabe señalar que la subpoblación DN respondió ligeramente al estímulo con estos anticuerpos, probablemente este ligero efecto se deba a la respuesta de sólo los timocitos DN3, los cuales expresan moléculas de CD3 agregadas con los TCRs inmaduros (Fig. 11).

De acuerdo a lo reportado, TGF- $\beta$ 1 indujo la fosforilación de ERK en todas las subpoblaciones de timocitos presentándose un mayor efecto en timocitos DN (Fig. 12). De manera relevante, la estimulación con Activina A indujo una ligera fosforilación de manera similar en todas las subpoblaciones, esta fosforilación no se había reportado anteriormente (Fig. 13). Puesto que las evidencias de nuestro laboratorio demostraron que las Inhibinas son capaces de inducir fosforilación de Smad2 en timocitos, quisimos investigar si las Inhibinas también eran capaces de inducir otras vías de señalización como las MAP cinasas. Para ello, se estimularon timocitos murinos con Inhibina A (Fig. 14) e Inhibina B (Fig. 15), y sorpresivamente ambas Inhibinas promovieron la fosforilación de ERK presentándose un mayor efecto por Inhibina B en las subpoblaciones de timocitos DP, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Fig. 16).

En resumen, la cinasa ERK1/2 es fosforilada por los ligandos de TGF- $\beta$ 1, la Activina A, y sorprendentemente por las dos isoformas de las Inhibinas (A y B) en todas las subpoblaciones de los timocitos (Fig. 16). Esta fosforilación representada como incremento relativo de la intensidad media de fluorescencia de cada histograma (IMF), respecto al control no estimulado, fue detectada a un tiempo de estimulación de 5 minutos, y la magnitud de esta fosforilación inducida por los ligandos es modesta en comparación a la obtenida por la estimulación con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Fig. 11).

Sin embargo, mediante un análisis realizado en el programa Flow-Jo (BD), el cual utiliza una modificación de la herramienta estadística de  $\chi^2$  (Chi(T)), se determinó estadísticamente significativo la fosforilación detectada con respecto a los niveles basales de pERK1/2. Cabe señalar que este algoritmo permite detectar pequeñas diferencias entre dos distribuciones de una manera cuantitativa.

### **La fosforilación de ERK depende de la actividad de MEK1/2**

Para corroborar si esta fosforilación detectada por los 4 ligandos es específica y depende de la actividad de MEK1/2, se incubaron los timocitos con el inhibidor PD98059 previo a la estimulación con los ligandos TGF- $\beta$ 1, Activina A, y las Inhibinas A y B. El inhibidor de MEK1/2 presenta la propiedad de unirse a las formas inactivas de esta cinasa, reprimiendo su activación con eficacia demostrada en diversos estudios<sup>93</sup>.

La fosforilación inducida por los ligandos TGF- $\beta$ 1, Activina A, y las Inhibinas A y B fue inhibida de manera notable por la droga PD98059 en todas las subpoblaciones de timocitos analizadas (Fig. 17), sugiriendo que el ERK fosforilado en timocitos depende de la actividad de cinasa de MEK1/2. Sin embargo la inhibición de MEK1/2 no se presentó a un nivel similar de la fosforilación basal, aunque este efecto parcial en la inhibición de la fosforilación también se observó con el control positivo PMA e ionomicina (Fig. 18).

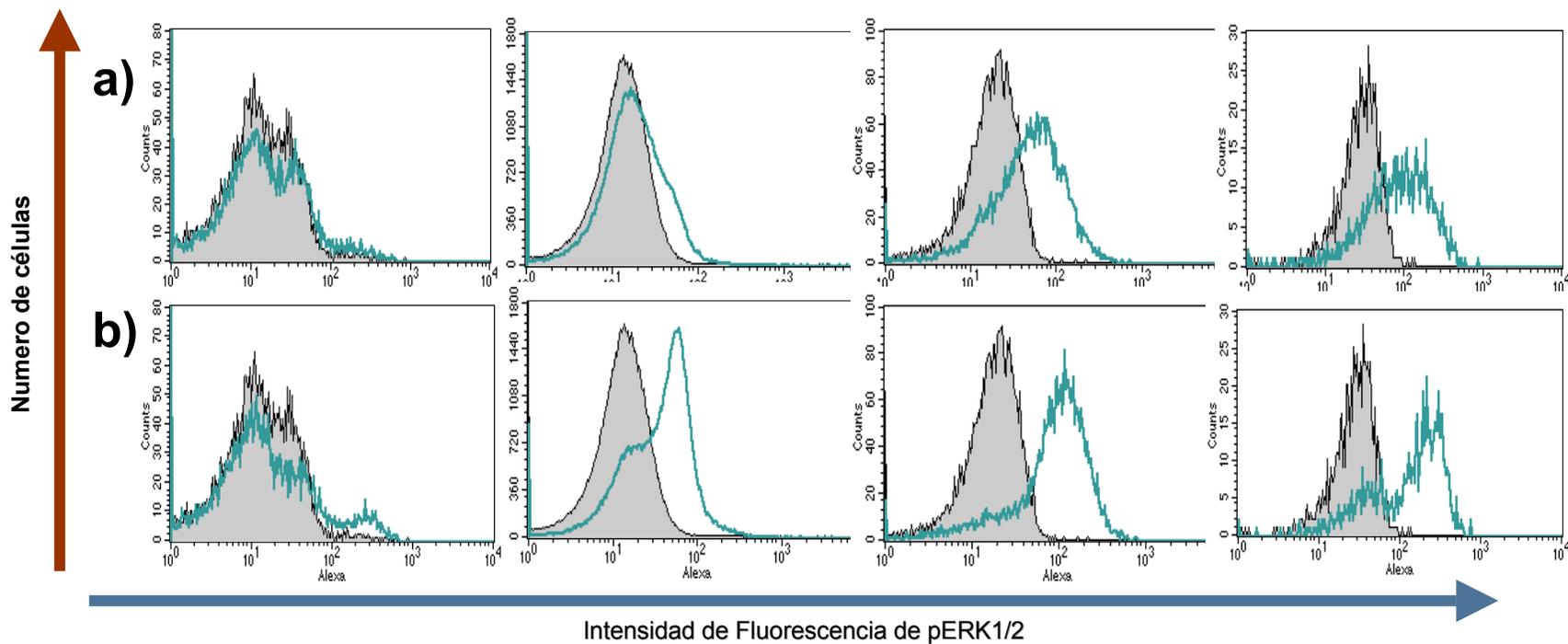
## **La fosforilación de ERK inducida por el TCR es disminuida en condiciones de estimulación con Inhibinas**

Una de las señales cruciales para el desarrollo de los timocitos es la señal de ERK en respuesta al entrecruzamiento del TCR. Como se mencionó, la intensidad de la señal del TCR puede llevar a distintos destinos celulares: sobrevivencia y rescate de la apoptosis, o muerte por delección clonal. Para poder estudiar la contribución de las señales inducidas por la Superfamilia del TGF- $\beta$  se investigó la posible modulación de la fosforilación mediada por el TCR en presencia o ausencia de los ligandos TGF- $\beta$ , la Activina A, la Inhibina A y la Inhibina B.

Para ello se co-estimularon los timocitos murinos de ratones de 6 semanas de edad con anticuerpos anti-CD3 en presencia de los ligandos mencionados. Puesto que el entrecruzamiento del TCR induce una gran activación de la vía de ERK, se utilizó una dosis subóptima para poder observar un efecto de los diferentes ligandos sobre la señal de ERK inducida por el TCR.

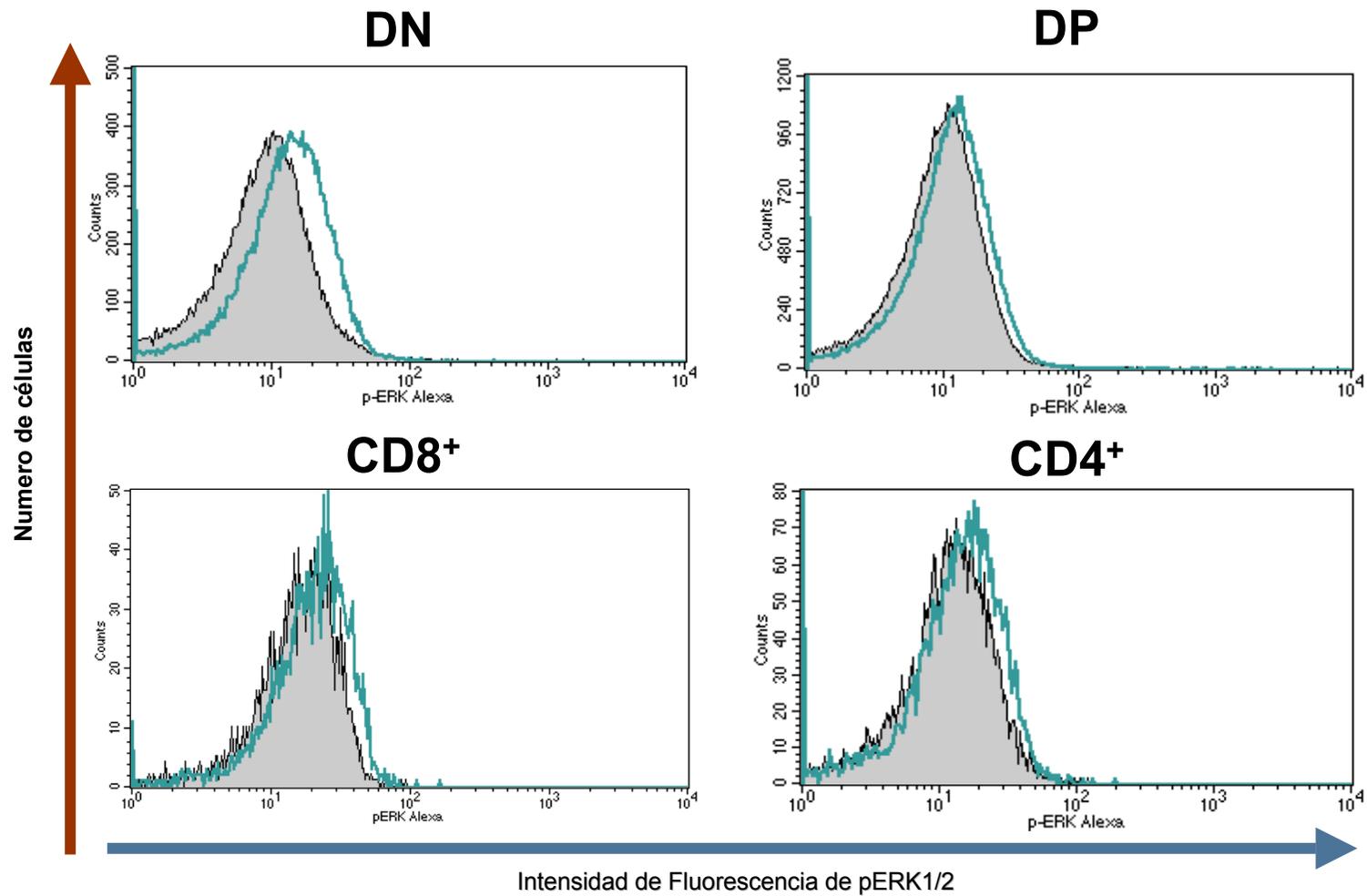
Para determinar la dosis subóptima, inicialmente se realizaron distintos estudios de fosforilación de ERK, utilizando dosis crecientes de anti-CD3 biotinilado, el cual se entrecruzó con estreptavidina. La concentración subóptima determinada fue de 4  $\mu\text{g/ml}$ , el cual induce una fosforilación detectable pero inferior a la obtenida por la dosis óptima (Fig. 19). Esta concentración subóptima fue determinada con claridad en timocitos simples positivos ( $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ ), los cuales expresan en mayor grado complejos de TCR/CD3 en comparación a la presentada en timocitos DP. Es necesario señalar que ninguna de las concentraciones empleadas del anticuerpo anti-CD3 pudo permitir una fosforilación clara y observable en la subpoblación doble negativa, aunque en el estadio DN3 se exprese el complejo del pre-TCR.

Todos los ligandos probados fueron capaces de disminuir la fosforilación de ERK1/2 inducida por la concentración subóptima escogida de anticuerpo anti-CD3 principalmente en las subpoblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  (Fig. 20). Este efecto negativo en la fosforilación inducido por el TCR no es claro en los timocitos DP ni en la subpoblación DN. De manera sorprendente, las inhibinas son los ligandos que disminuyen de manera considerable esta fosforilación, en específico este efecto es mayor en presencia de Inhibina B (Fig. 14).

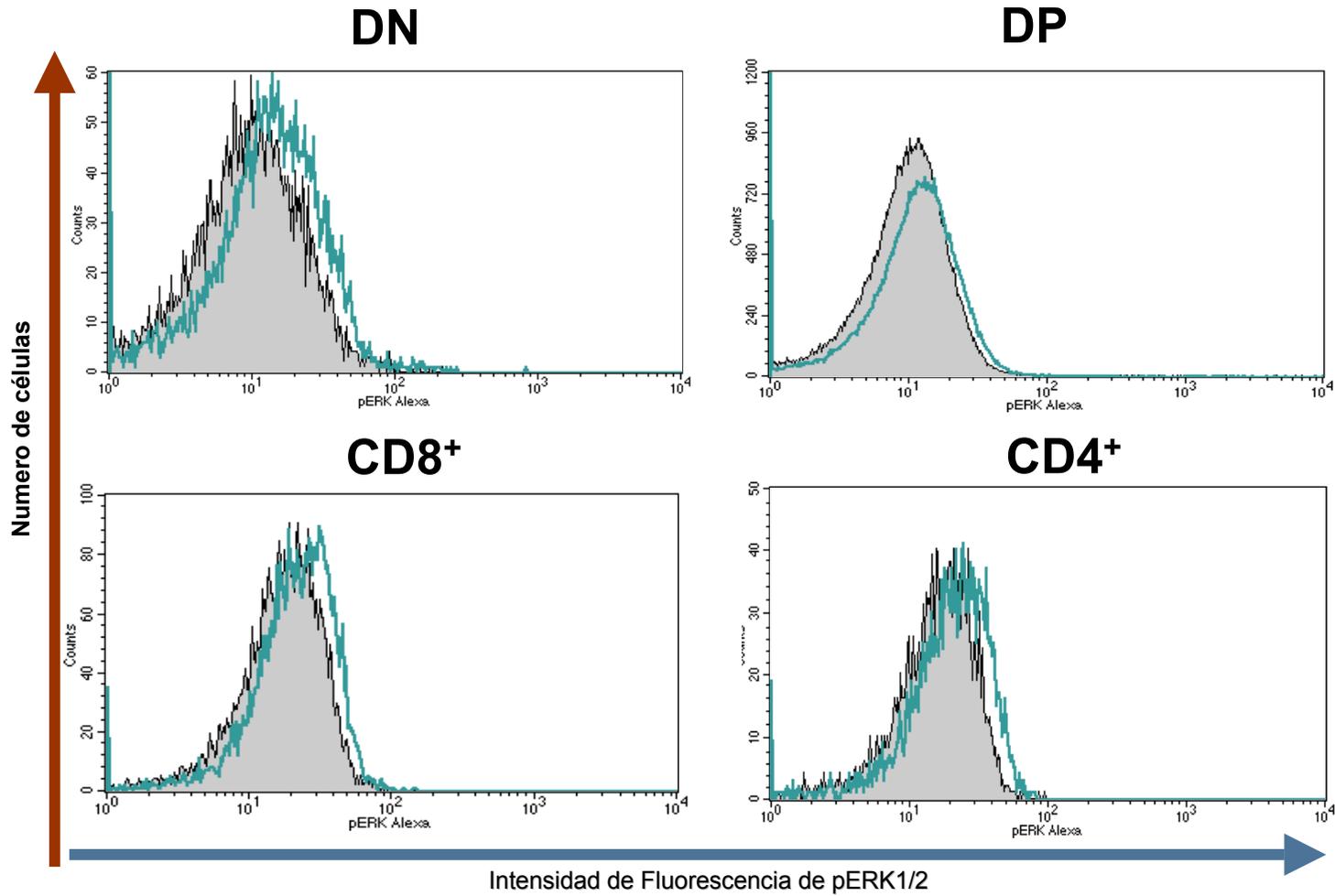


**Fig. 11. Fosforilación de ERK1/2 inducida por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en las distintas subpoblaciones tímicas.**

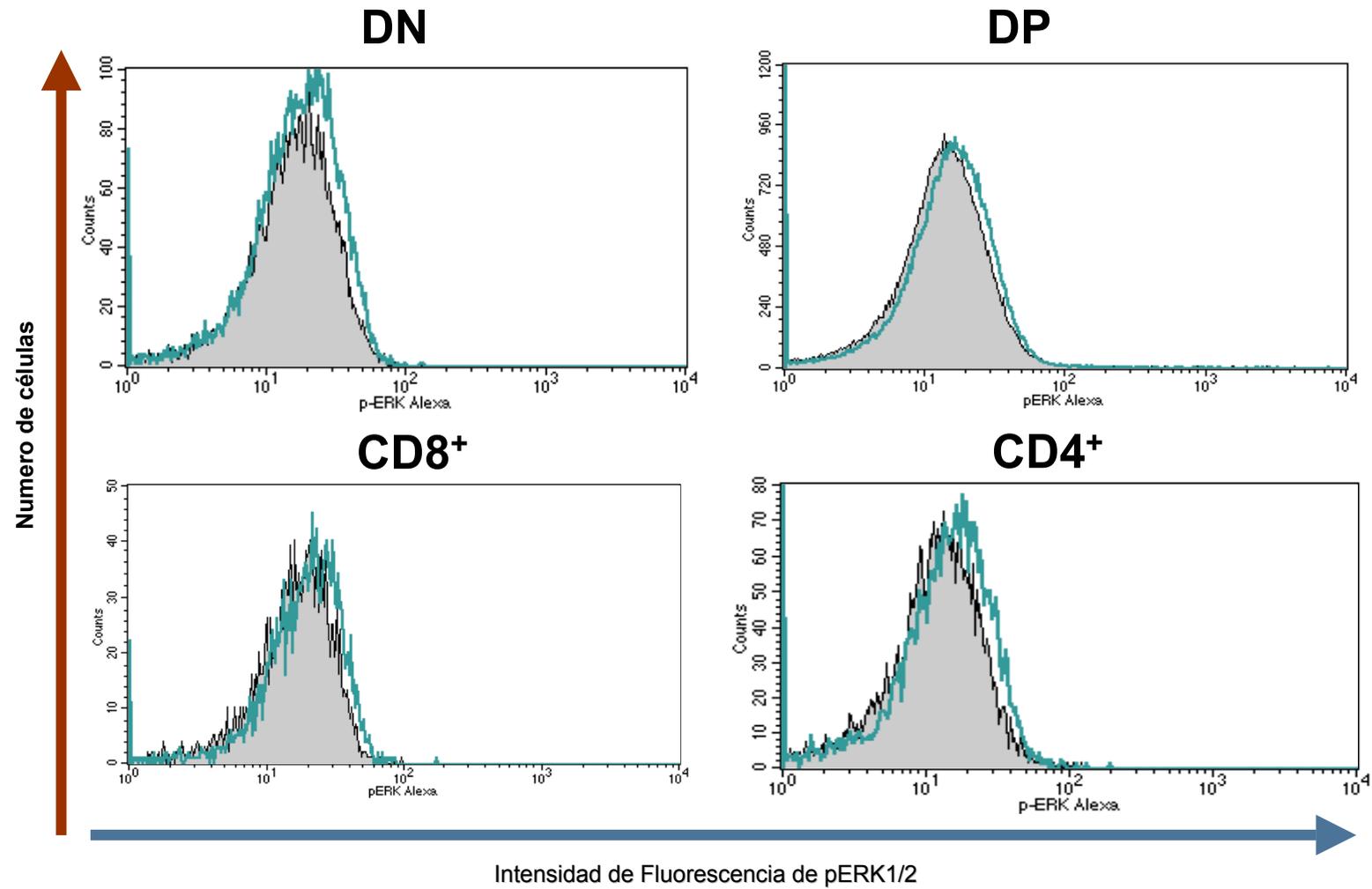
Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con los siguientes anticuerpos: **a)** anti-CD3 (10µg/mL), **b)** anti-CD3 (10µg/mL) + anti-CD28 (10µg/mL), ambos anticuerpos fueron entrecruzados con estreptavidina (20µg/mL). Los niveles basales de ERK fosforilado se muestran en gris, y los recorrimientos inducidos por los estímulos señalados en verde. Todos los recorrimientos mostrados fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ ) con respecto a su basal, valores obtenidos en el programa Flow-Jo (BD).



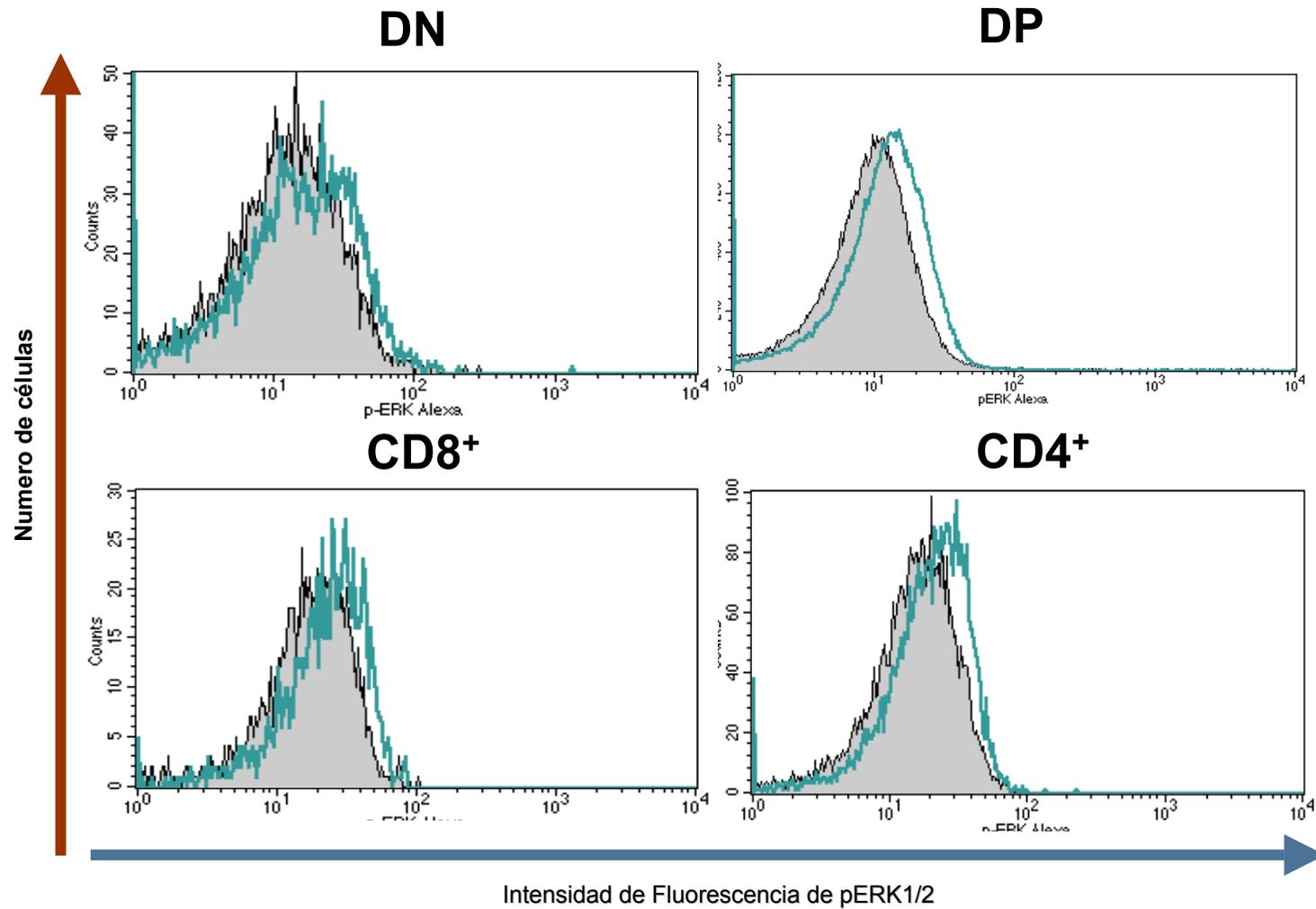
**Fig. 12. Fosforilación de ERK1/2 inducida por TGF- $\beta$  en las distintas subpoblaciones tímicas.** Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con TGF- $\beta$ 1 (4ng/ml). Los niveles basales de ERK fosforilado se muestran en gris, y los recorrimientos inducidos por los estímulos señalados en verde. Todos los recorrimientos mostrados fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ ) con respecto a su basal, valores obtenidos en el programa Flow-Jo (BD).



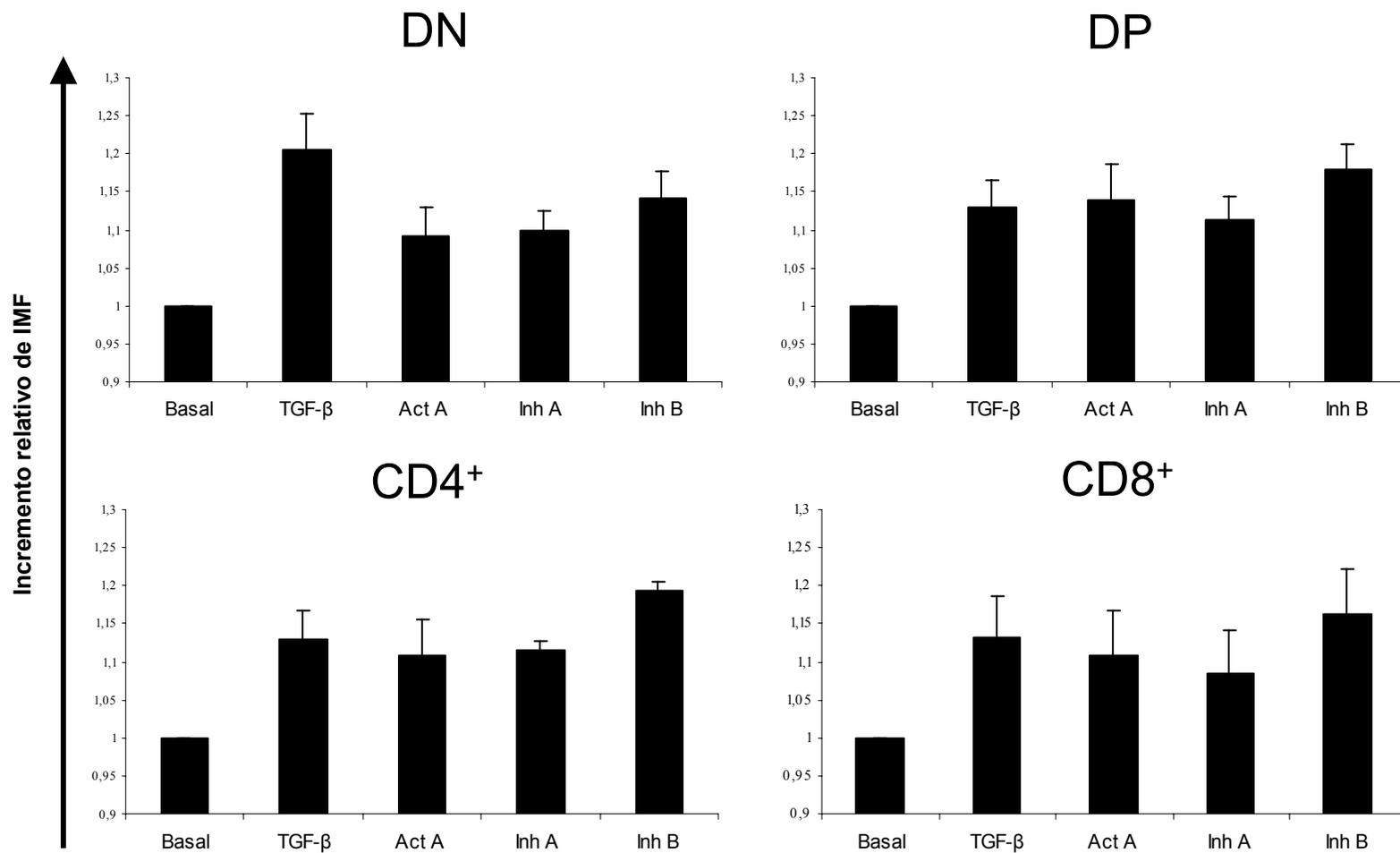
**Fig. 13. Fosforilación de ERK1/2 inducida por Activina A en las distintas subpoblaciones tímicas.** Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con Activina A (500ng/ml). Los niveles basales de ERK fosforilado se muestran en gris, y los recorrimientos inducidos por los estímulos señalados en verde. Todos los recorrimientos mostrados fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x)>4$  ( $p<0.01$ ) con respecto a su basal, valores obtenidos en el programa Flow-Jo (BD).



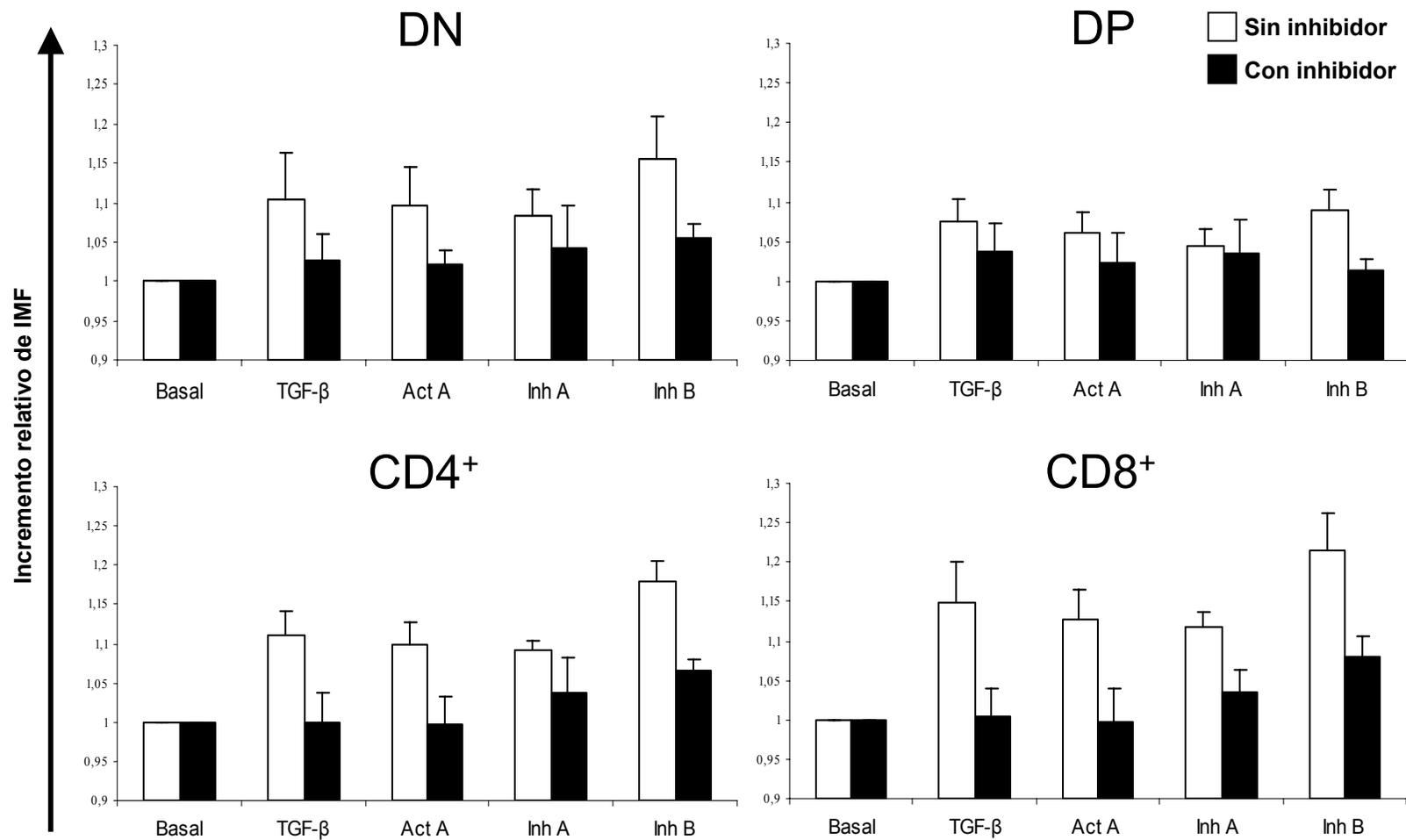
**Fig. 14. Fosforilación de ERK1/2 inducida por Inhibina A en las distintas subpoblaciones tímicas.** Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con Inhibina A (500ng/ml). Los niveles basales de ERK fosforilado se muestran en gris, y los recorrimientos inducidos por los estímulos señalados en verde. Todos los recorrimientos mostrados fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ ) con respecto a su basal, valores obtenidos en el programa Flow-Jo (BD).



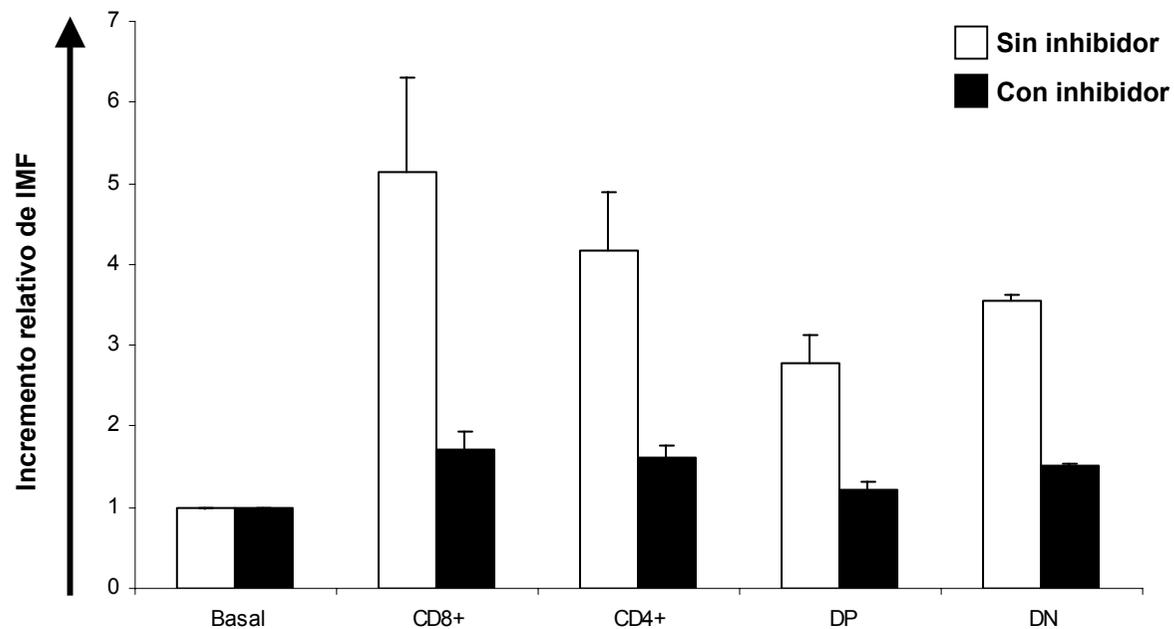
**Fig. 15. Fosforilación de ERK1/2 inducida por Inhibina B en las distintas subpoblaciones tímicas.** Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con Inhibina B (500ng/ml). Los niveles basales de ERK fosforilado se muestran en gris, y los recorrimientos inducidos por los estímulos señalados en verde. Todos los recorrimientos mostrados fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ ) con respecto a su basal, valores obtenidos en el programa Flow-Jo (BD).



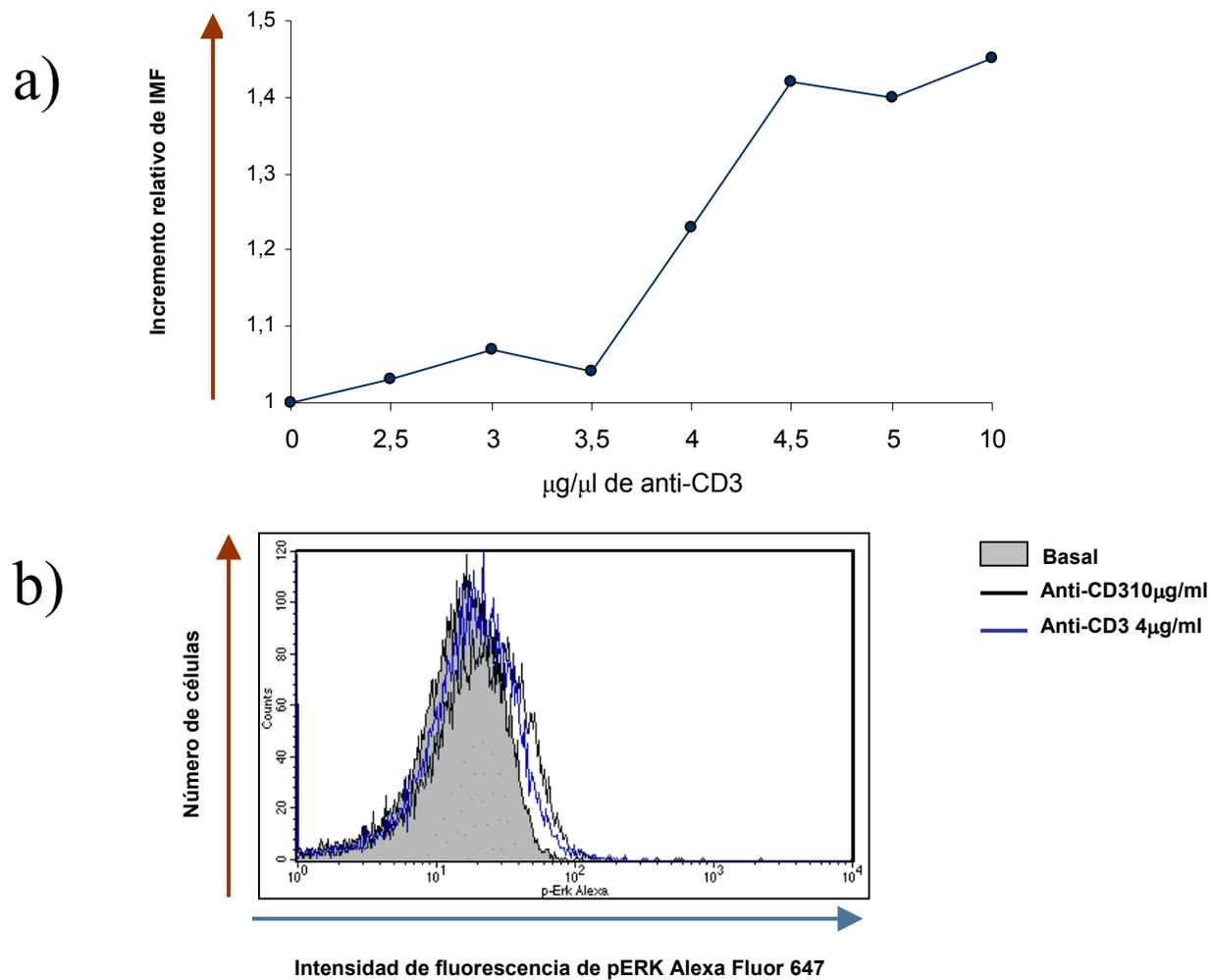
**Fig. 16. Fosforilación de la cinasa ERK1/2 inducida por los ligandos en las distintas subpoblaciones tímicas.** Los timocitos previamente teñidos superficialmente fueron estimulados durante 5 minutos con los ligandos TGF-β1 (4ng/ml), Activina A (500ng/ml), Inhibina A (500ng/ml) e Inhibina B (500ng/ml). Posteriormente, los timocitos fueron incubados con el anticuerpo anti-pERK1/2 marcado con Alexa Fluor 647, y por último fijados para su lectura en el citómetro de flujo. Los resultados son mostrados como incremento relativo de IMF con respecto al basal obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (Alexa Fluor 647) de todas las condiciones mostradas. Promedio de 7 experimentos independientes. Todos los recorrimientos en intensidad de fluorescencia con respecto al basal fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ ).



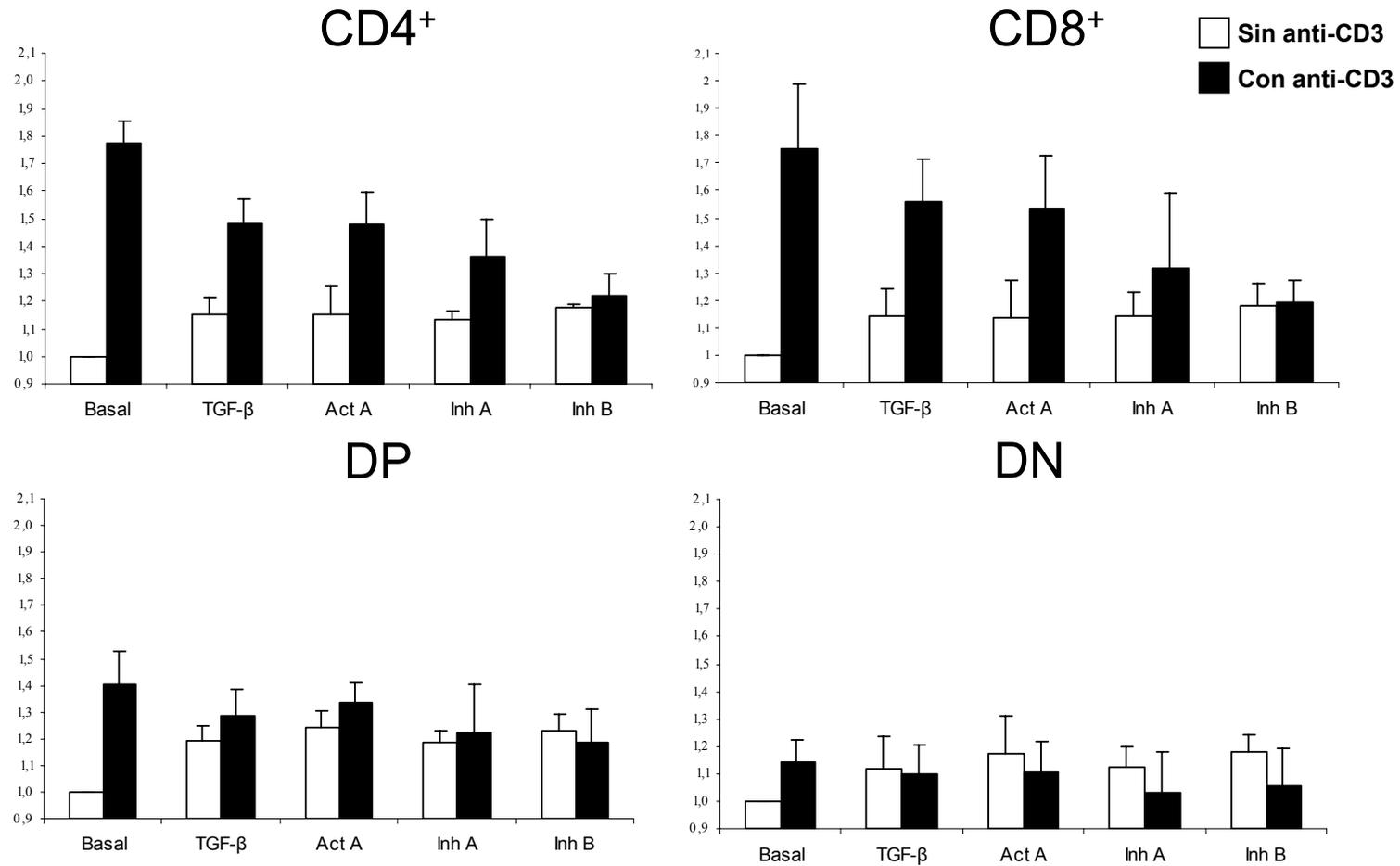
**Fig. 17. Inhibición de la fosforilación de ERK.** Las células fueron incubadas con el inhibidor de MEK1/2 PD98059 (60 $\mu$ M) y posteriormente estimuladas durante 5 minutos con los ligandos TGF- $\beta$ 1 (4ng/ml), Activina A (500ng/ml), Inhibina A (500ng/ml) e Inhibina B (500ng/ml). Los resultados se muestran como valores relativos con respecto al basal obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (Alexa Fluor 647) de todas las condiciones mostradas. Promedio de 3 experimentos independientes. Todos los recorrimientos en intensidad de fluorescencia con respecto al basal fueron estadísticamente significativos con un valor de T(x) >4 ( $p < 0.01$ )



**Fig. 18. Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por PMA-Ionomicina en las distintas subpoblaciones de timocitos.** Las células fueron incubadas con el inhibidor de MEK1/2 PD98059 (60 $\mu$ M) y posteriormente estimuladas durante 5 minutos con PMA (20ng/ml) e Ionomicina (200ng/ml). Los resultados se muestran como incremento relativo de IMF con respecto al basal obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (Alexa Fluor 647) de todas las condiciones mostradas. Promedio de 3 experimentos independientes. Todos los recorrimientos en intensidad de fluorescencia con respecto al basal fueron estadísticamente significativos con un valor de T(x) >4 (p<0.01)



**Fig. 19. Fosforilación de ERK1/2 inducido por el Anticuerpo Anti-CD3 en timocitos CD4<sup>+</sup>.** a) Curva dosis respuesta. Las células previamente teñidas de manera superficial fueron estimuladas durante 5 minutos a diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-CD3. La fosforilación de ERK1/2 se determinó en las subpoblaciones simples positivas. La curva de dosis respuesta es mostrada en la región de CD4<sup>+</sup>. Los resultados se muestran como valores relativos con respecto al basal obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (Alexa Fluor 647). b) Fosforilación óptima y subóptima de ERK inducida por el anticuerpo anti-CD3. Histograma que representa la intensidad de fluorescencia de ERK en timocitos CD4<sup>+</sup>. Todos los recorrimientos e intensidad de fluorescencia con respecto al basal fueron estadísticamente significativos con un valor de T(x) >4 (p<0.01)



**Fig. 20. Fosforilación de ERK1/2 en condiciones de coestimulación con los ligandos y con el anticuerpo Anti-CD3.** Los timocitos previamente teñidos de manera superficial fueron sujetos a coestimulación durante 5 minutos con el anticuerpo anti-CD3 (4µg/ml) y a la par con los ligandos TGF-β1 (4ng/ml), Activina A (500ng/ml), Inhibina A (500ng/ml) e Inhibina B (500ng/ml). Las muestras se capturaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD) y analizadas con los programas Cell Quest Pro y Flow Jo. Los resultados se muestran como valores relativos con respecto al basal obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (Alexa Fluor 647) de todas las condiciones mostradas. Todos los recorrimientos e intensidad de fluorescencia con respecto al basal fueron estadísticamente significativos con un valor de  $T(x) > 4$  ( $p < 0.01$ )

## Discusión

Uno de los principales aportes de este trabajo es la observación del desencadenamiento de la fosforilación de ERK en los timocitos murinos por el TGF- $\beta$ 1, la Activina A, la Inhibina A y B, presentando este último una fosforilación ligeramente mayor (Fig. 11). Esta fosforilación de ERK observada por los 4 ligandos es dependiente de la actividad de cinasa de MEK1/2 (Fig. 12), la cual es cinasa río arriba de ERK, como se había descrito en varios estudios 8-11.

La activación de la cinasa ERK sólo se había descrito para los ligandos del TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 en diferentes líneas celulares de epitelio pulmonar e intestinal y en condiciones de transformación celular <sup>68,70,72</sup>. Sin embargo, este trabajo muestra que el TGF- $\beta$ 1 puede inducir la fosforilación de ERK en los timocitos, presentando un efecto ligeramente mayor en la subpoblación DN (Fig. 16). A pesar de la ausencia de la caracterización de los distintos estadios de la subpoblación DN en este estudio, nuestros resultados podrían estar relacionados al efecto de TGF- $\beta$ 1 en el aumento de la proliferación de timocitos DN1 <sup>54</sup>, en el sentido de que una de las vías requeridas en la proliferación celular es la MAP cinasa ERK. Por otro lado, la detección en este estudio de la fosforilación de ERK en timocitos DN por TGF- $\beta$ 1 no es compatible con la observación anteriormente reportada del patrón expresión del receptor ALK5, y la fosforilación de Smad2 en respuesta a este factor, donde el mayor efecto se presentó en los timocitos SP <sup>56</sup>.

Es necesario considerar que en los estudios anteriormente señalados que abordan los niveles de activación de ERK, dependen de las condiciones de transformación celular. En ausencia de procesos carcinogénicos, los niveles de activación de ERK inducidos por el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 son ligeros en comparación a los niveles obtenidos mediante estimulación por EGF y HGF que inducen la activación específica de ERK dependiente de la activación previa de Ras-GTP <sup>67-69</sup>. Es necesario señalar que la activación de ERK en estos reportes está determinada con el empleo de ensayos de cinasa *in vitro*, mediante el uso de la proteína básica de mielina ("Myelin basic protein") como sustrato. Nuestros resultados se basan en la detección de la fosforilación de ERK mediante tinción intracelular y no en la medición de su activación.

Sin embargo, la magnitud en la fosforilación detectada en este trabajo a tiempos cortos de estimulación (5 minutos) es compatible con la activación reportada de ERK con los ensayos de cinasa *in vitro* a tiempos de entre 5 y 10 minutos <sup>68</sup>.

Otro punto que hay que considerar es que a pesar de esta ligera fosforilación detectada pero con significancia estadística, es posible que la amplificación de la señal mediada por ERK sea relevante a niveles de funciones celulares. Esta consideración está relacionada a la naturaleza de las señales de transducción en una célula, la cual se basa en la susceptibilidad de las cascadas de señalización a estímulos externos y a la graduación en la amplificación de la señal por sus diversos componentes. Esta amplificación de la señal que depende de los estímulos externos es un factor determinante en la culminación hacia funciones celulares como la apoptosis, la proliferación o la secreción de diversos factores protéicos. Las vías de las MAP cinasas funcionan como un prototipo de estudio en la naturaleza de las señales de transducción, debido a que la señal que generan está regulada por otras vías o por sí misma dependiendo de su umbral de activación <sup>94</sup>.

Con relación a lo anterior, mediante la activación de ERK, los ligandos de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 promueven la inhibición de síntesis de DNA de manera notable repercutiendo en el crecimiento de células de epitelio intestinal <sup>68</sup>. Con base en este hecho, es probable que la ligera fosforilación de ERK inducida por los ligandos detectada en este trabajo sea amplificada a niveles de activación de sustratos en citosol y de factores de transcripción, repercutiendo en la generación de funciones celulares como proliferación celular y diferenciación, procesos en los cuales se ha visto involucrado la cinasa ERK durante el desarrollo de linfocitos T <sup>20,21,23-25,27-31</sup>.

Otro aporte importante de este trabajo es la detección de la fosforilación de ERK por la Activina A en todas las subpoblaciones de timocitos. Nuestros resultados no coinciden con el patrón reportado de la disminución en la fosforilación de Smads inducido por este ligando conforme el avance a los estadios más diferenciados de timocitos <sup>56</sup>, debido a que en este trabajo no se presentaron diferencias en la fosforilación de ERK entre las subpoblaciones de timocitos estudiadas.

De manera significativa, aunada a la fosforilación de Smads observada en nuestro laboratorio por las Inhibinas, este trabajo describe por primera vez la fosforilación de ERK por estos factores como vía alterna a la de Smads, presentándose un efecto más marcado por la Inhibina B en las subpoblaciones DP, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Estas observaciones concuerdan con la alta expresión de la subunidad  $\alpha$  que conforma a las inhibinas por el estroma tímico<sup>66</sup>, y los resultados de este trabajo sugieren que las Inhibinas podrían tener un papel importante en la regulación de diferentes procesos celulares mediados por ERK en timocitos.

En conjunto estos resultados sugieren la necesidad de estudiar el mecanismo por el cual las Inhibinas están desencadenando de manera notable la fosforilación de Smads y de la cinasa ERK. Debido a que el mecanismo reportado de Inhibinas en antagonizar las funciones de Activinas se ha basado en el secuestro de los receptores tipo II y exclusión de los receptores tipo I, con lo cual se afirmaba que las Inhibinas no podían inducir ninguna señal<sup>41-44</sup>.

En relación a esta controversia, posiblemente el mecanismo de señalización observado por las Inhibinas dependa de otro tipo de receptor I aún no relacionado, o de la participación de un co-receptor aún no descrito que desempeñe un papel señalizador de estos factores, ó quizás el mecanismo resida en una fosforilación diferencial de Smad2 y 3 en comparación a la presentada por Activinas .

Es necesario señalar que en presencia de las Inhibinas, principalmente la Inhibina B, la fosforilación de ERK inducida por la activación del TCR es disminuida de manera notable (Fig. 14). Esta observación adquiere importancia en el sentido que abre paso a definir cuáles son las repercusiones de esta disminución en la fosforilación de ERK en el desarrollo de linfocitos T, debido a que los niveles en magnitud y duración de la activación de ERK son puntos cruciales en el destino de los timocitos, ya que se han involucrado en distinguir los procesos de selección negativa y positiva, así como en el compromiso a un linaje específico CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup><sup>20,21,23-25,27-31</sup>.

## Conclusiones

Este trabajo describe por primera vez la fosforilación de la MAP cinasa ERK por miembros de las subfamilias de TGF- $\beta$  y Activinas/Inhibinas en todas las subpoblaciones de timocitos murinos.

De manera particular, por primera vez se describe la generación de la fosforilación de ERK por Activina A. La fosforilación de ERK mediada por las Inhibinas aporta de manera importante elementos para estudiar en detalle el mecanismo de acción de estas proteínas.

Sorprendentemente, la fosforilación de ERK inducida por el TCR es disminuida por Inhibinas. Sin embargo, es necesario definir el mecanismo que opera en la regulación negativa de la señal del TCR en presencia de Inhibinas, debido a que el umbral de activación de la cinasa ERK es crucial en los procesos de selección positiva y negativa, así como en el compromiso a un linaje específico.

## Literatura consultada

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. . *Molecular Biology of the Cell*, ( Garland Publishing, Inc. , 1994).
2. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
3. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-17 (2000).
4. Chien, Y.-H. & Bonneville, M. Gamma delta T Cell Receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 2089-94 (2006).
5. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-22 (2002).
6. Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. & Reichardt, H.M. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* **61**, 263-80 (2004).
7. Nava, K. & Soldevila, G. Molecular signals involved in CD4 versus CD8 T cell commitment. *Inmunología* **23**, 313-27 (2004).
8. Rincon, M. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* **13**, 339-45 (2001).
9. Kondoh, K., Torii, S. & Nishida, E. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* **114**, 86-91 (2005).
10. Qi, M. & Elion, E.A. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**, 3569-72 (2005).
11. Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 827-37 (2005).
12. Ashwell, J.D. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 532-40 (2006).
13. Dong, C., Davis, R.J. & Flavell, R.A. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J Clin Immunol* **21**, 253-7 (2001).
14. Davis, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-52 (2000).
15. Winslow, M.M., Neilson, J.R. & Crabtree, G.R. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **15**, 299-307 (2003).
16. Gallo, E.M., Cante-Barrett, K. & Crabtree, G.R. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol* **7**, 25-32 (2006).
17. Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y. & Mills, G.B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 988-1004 (2005).
18. Becker, K.P.H.Y.A. Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Moll Life Sci* **62**, 1448-61 (2005).
19. Hornstein, I., Alcover, A. & Katzav, S. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* **16**, 1-11 (2004).
20. Crompton, T., Gilmour, K.C. & Owen, M.J. The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* **86**, 243-51 (1996).
21. Iritani, B.M., Alberola-Ila, J., Forbush, K.A. & Perimutter, R.M. Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity* **10**, 713-22 (1999).
22. Diehl, N.L. et al. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo. *J Exp Med* **191**, 321-34 (2000).

23. Swan, K.A. et al. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *Embo J* **14**, 276-85 (1995).
24. Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J. & Perlmutter, R.M. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* **184**, 9-18 (1996).
25. Swat, W., Shinkai, Y., Cheng, H.L., Davidson, L. & Alt, F.W. Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4683-7 (1996).
26. Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D. & Alarcon, B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* **406**, 426-30 (2000).
27. Pages, G. et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**, 1374-7 (1999).
28. Bommhardt, U., Scheuring, Y., Bickel, C., Zamoyska, R. & Hunig, T. MEK activity regulates negative selection of immature CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* **164**, 2326-37 (2000).
29. Mariathasan, S. et al. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* **167**, 4966-73 (2001).
30. Bommhardt, U., Basson, M.A., Krummrei, U. & Zamoyska, R. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* **163**, 715-22 (1999).
31. Sharp, L.L. & Hedrick, S.M. Commitment to the CD4 lineage mediated by extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase and lck signaling. *J Immunol* **163**, 6598-605 (1999).
32. Sabapathy, K. et al. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* **9**, 116-25 (1999).
33. Rincon, M. et al. The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J Exp Med* **188**, 1817-30 (1998).
34. Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T. & Robey, E.A. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* **7**, 338-43 (2006).
35. Kyewski, B., & Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature reviews Immunology* **4**, 688-98 (2004).
36. Attisano, L. & Wrana, J.L. Signal transduction by the TGF-b superfamily. *Science* **296**, 1646-47 (2002).
37. Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91 (1998).
38. Derynck, R. & Zhang, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84 (2003).
39. Kawabata, M., Imamura, T. & Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 49-61 (1998).
40. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 251-63 (2005).
41. Pangas, S.A.W.T.K. Activin Signal transduction pathways. *TEM* **11**, 309-14 (2000).

42. Harrison, C.A., Gray, P.C., Vale, W.W. & Robertson, D.M. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 73-8 (2005).
43. Abe, Y., Minegishi, T. & Leung, P. Activin receptor signalling. *Growth Factors* **22**, 105-10 (2004).
44. Gray, P.C., Bilezikjian, L.M. & Vale, W.W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Molecular and Cellular Endocrinology* **180**, 47-53 (2001).
45. Chapman, S.C. & Woodruff, T.K. Modulation of activin signal transduction by Inhibin B and Inhibin-Binding Protein (InhBP). *Molecular Endocrinology* **15**, 668-79 (2001).
46. Kehrl, J.H. et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* **163**, 1037-50 (1986).
47. Wahl, S.M. et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* **140**, 3026-32 (1988).
48. Suda, T. & Zlotnik, A. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha induce CD8 expression on CD8- thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8- pre-T cell subset. *J Immunol* **148**, 1737-45 (1992).
49. Suda, T. & Zlotnik, A. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3-CD4-CD8 alpha + cells generated in vitro by culturing CD25+CD3-CD4-CD8- thymocytes with T cell growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **149**, 71-6 (1992).
50. Takahama, Y., Letterio, J.J., Suzuki, H., Farr, A.G. & Singer, A. Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta. *J Exp Med* **179**, 1495-506 (1994).
51. Mossalayi, M.D. et al. Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor-beta 1 mechanism. *Blood* **85**, 3594-601 (1995).
52. Schluns, K.S., Cook, J.E. & Le, P.T. TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells. *J Immunol* **158**, 2704-12 (1997).
53. Christ, M. et al. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* **153**, 1936-46 (1994).
54. Plum, J., De Smedt, M., Leclercq, G. & Vandekerckhove, B. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* **154**, 5789-98 (1995).
55. Mamura, M. et al. Ligation of the T cell receptor complex results in phosphorylation of Smad2 in T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 124-7 (2000).
56. Rosendahl, A., Speletas, M., Leandersson, K., Ivars, F. & Sideras, P. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoeisis. *Int Immunol* **15**, 1401-14 (2003).

57. Gorelik, L. & Flavell, R.A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**, 171-81 (2000).
58. Leveen, P. et al. TGF-beta type II receptor-deficient thymocytes develop normally but demonstrate increased CD8+ proliferation in vivo. *Blood* **106**, 4234-40 (2005).
59. Varas, A. et al. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* **24**, 197-206 (2003).
60. Hager-Theodorides, A.L. et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* **169**, 5496-504 (2002).
61. Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G. & Merckenschlager, M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* **196**, 163-71 (2002).
62. Takagi, T., Harada, J. & Ishii, S. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* **2**, 1048-53 (2001).
63. Bleul, C.C. & Boehm, T. BMP signaling is required for normal thymus development. *Journal of Immunology* **175**, 5213-5221 (2005).
64. Hedger, M.P., Drummond, A.E., Robertson, D.M., Risbridger, G.P. & de Kretser, D.M. Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **61**, 133-8 (1989).
65. Hedger, M.P., Phillips, D.J. & de Kretser, D.M. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* **12**, 595-602 (2000).
66. Licona, P., Chimal-Monroy, J. & Soldevila, G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* **235**, 1124-32 (2006).
67. Mulder, K.M. & Morris, S.L. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* **267**, 5029-31 (1992).
68. Hartsough, M.T. & Mulder, K.M. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* **270**, 7117-24 (1995).
69. Hartsough, M.T. et al. Altered transforming growth factor signaling in epithelial cells when ras activation is blocked. *J Biol Chem* **271**, 22368-75 (1996).
70. Yue, J., Buard, A. & Mulder, K.M. Blockade of TGFbeta3 up-regulation of p27Kip1 and p21Cip1 by expression of RasN17 in epithelial cells. *Oncogene* **17**, 47-55 (1998).
71. Yue, J. & Mulder, K.M. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 30765-73 (2000).
72. Frey, R.S. & Mulder, K.M. Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res* **57**, 628-33 (1997).
73. Yamaguchi, K. et al. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* **18**, 179-87 (1999).
74. Birkey Reffey, S., Wurthner, J.U., Parks, W.T., Roberts, A.B. & Duckett, C.S. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **276**, 26542-9 (2001).

75. Takatsu, Y. et al. TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during Drosophila development. *Mol Cell Biol* **20**, 3015-26 (2000).
76. Takekawa, M. et al. Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *Embo J* **21**, 6473-82 (2002).
77. Hanafusa, H. et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* **274**, 27161-7 (1999).
78. Sano, Y. et al. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **274**, 8949-57 (1999).
79. Yu, L., Hebert, M.C. & Zhang, Y.E. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *Embo J* **21**, 3749-59 (2002).
80. Hocevar, B.A., Brown, T.L. & Howe, P.H. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* **18**, 1345-56 (1999).
81. Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. & Moses, H.L. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* **274**, 37413-20 (1999).
82. Funaba, M., Zimmerman, C.M. & Mathews, L.S. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* **277**, 41361-8 (2002).
83. Kretschmar, M. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor-beta/SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res* **2**, 107-15 (2000).
84. Yue, J., Frey, R.S. & Mulder, K.M. Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGFbeta. *Oncogene* **18**, 2033-7 (1999).
85. Yue, J., Hartsough, M.T., Frey, R.S., Frielle, T. & Mulder, K.M. Cloning and expression of a rat Smad1: regulation by TGFbeta and modulation by the Ras/MEK pathway. *J Cell Physiol* **178**, 387-96 (1999).
86. Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massague, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**, 804-16 (1999).
87. Mori, S. et al. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* **23**, 7416-29 (2004).
88. Zhang, Y., Feng, X.H. & Derynck, R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909-13 (1998).
89. Wong, C. et al. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* **19**, 1821-30 (1999).
90. Verrecchia, F., Tacheau, C., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. & Mauviel, A. Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene* **20**, 2205-11 (2001).
91. Pessah, M. et al. c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6198-203 (2001).
92. Massague, J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-78 (2000).

93. R., A.D., Ana, C., Philip, C., D, D.T. & Saltiel, A.R. PD98059 is a specific inhibitor of activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Jornal of Biological Chemistry* **270**, 27489-27494 (1995).
94. Nils, B. & Hanspeter, H. How robust are switches in intracellular signaling cascades. *Journal of Theoretical Biology* **225**, 293-300 (2003).