

. "ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA QUIMIOCINA
CCL13 (MCP-4)"

Lic. en Investigación Biomédica Básica Francisco Javier Martínez
Becerra

Tutor: Dr. Eduardo García Zepeda

Comité Tutoral: Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo,

Dr. Manuel Soriano García.

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Satanás y la ciencia, con sus sospechosos avances en genética, son dos de los grandes enemigos de estos tiempos..”

Lorena Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Paco, Lupita, Rodrigo y Guillermo, por su apoyo constante.

A mis tíos y mi abuela Guille.

A Olivia, por su sonrisa en tiempos difíciles.

A todos mis compañeros de laboratorio(s), gracias por su apoyo todos estos años.

Al grupo de Físicoquímica de Proteínas, por darle ese toque al trabajo que lo hace meritorio.

A mi comité tutorial y a los revisores de esta tesis, por sus valiosos comentarios.

Este trabajo está dedicado principalmente a mi tío y padrino Memo, por hacerme entender de manera directa e indirecta muchas cosas en estos días complicados.

I. ÍNDICE

I. Índice.....	4
II. Resumen.....	5
III. Introducción.....	6
a. Las quimiocinas.....	6
b. Estructura de las Quimiocinas.....	7
c. Vías de Señalización.....	11
d. Interacción Quimiocina-Receptor.....	14
e. Modulación de la Actividad de Quimiocinas.....	17
f. Procesos asociados a Quimiocinas.....	18
i. Desarrollo y Organogénesis.....	19
ii. Angiogénesis y Angiostasis.....	20
iii. Reclutamiento de Células Efectoras.....	21
iv. Actividad Antimicrobiana de Quimiocinas.....	22
g. Patologías asociadas a Quimiocinas.....	27
i. Asma.....	27
ii. Aterosclerosis.....	28
iii. Generación de Tumores y Metástasis.....	28
iv. Infecciones virales y Quimiocinas.....	30
v. Agonismo y Antagonismo de Péptidos de Quimiocinas.....	31
vi. Subfamilia MCP.....	33
IV. Justificación.....	36
V. Hipótesis.....	38
VI. Objetivos.....	38
VII. Materiales y Métodos.....	39
VIII. Resultados.....	46
IX. Discusión.....	73
X. Conclusiones.....	80
XI. Bibliografía.....	81

II. RESUMEN

Dentro de las moléculas encargadas de inducir el reclutamiento de células del sistema inmune se encuentran las quimiocinas, citocinas quimioatrayentes que actúan a través de la activación de receptores de siete dominios transmembranales. Las quimiocinas participan en diferentes procesos mediante el reclutamiento selectivo de leucocitos a sitios de inflamación. Estas proteínas presentan una estructura conservada que consiste de un extremo amino terminal flexible, seguido de 3 hebras β plegadas y una hélice α en el extremo carboxilo.

CCL13 (MCP-4) es una quimiocina de la subfamilia MCP que actúa a través de los receptores CCR1, 2 y 3 expresados en monocitos, linfocitos T, eosinófilos, basófilos y células dendríticas.

Las regiones de esta quimiocina involucradas en la unión y activación de cada uno de sus receptores no han sido determinadas. Para abordar este problema se sintetizaron péptidos basados en la secuencia primaria de CCL13. Estos péptidos fueron usados para definir si las secuencias que contienen inducen o inhiben las respuestas de CCL13.

Se encontró que uno de estos péptidos (CDIP-2) correspondiente a los residuos 19-37 de CCL13 es capaz de inhibir la migración inducida *in vitro* por CCL13 y CCL12 (MCP-5), así como reducir el número de macrófagos infiltrantes en un modelo de inflamación *in vivo*; lo que permite explorar el uso de este péptido como terapia anti-inflamatoria. Por otro lado se encontró que 2 de estos péptidos (CDIP-2 y CDAP-4) tienen actividad antimicrobiana contra varios microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*. Este hallazgo puede ser importante en la generación de nuevos compuestos antimicrobianos basados en secuencias de quimiocinas.

III. INTRODUCCIÓN

Las quimiocinas.

El sistema inmune se especializa en la vigilancia del organismo y su defensa en contra de patógenos y agentes dañinos tanto externos como internos. Las células que conforman el sistema inmune requieren de una localización particular para llevar a cabo sus funciones. Por otro lado, se requiere de un reclutamiento orquestado de estas células para su interacción en diferentes órganos y tejidos. Dentro de las moléculas encargadas de esta migración selectiva se encuentran las quimiocinas, o citocinas quimioatrayentes.

Las quimiocinas son citocinas de bajo peso molecular implicadas en una gran variedad de procesos tanto del sistema inmune como del desarrollo y organización de órganos y tejidos. Las quimiocinas son encargadas de dirigir el reclutamiento selectivo de células a sitios de inflamación y diferenciación. Adicionalmente participan en diferentes procesos de diferenciación y activación celular, lo que les confiere una importancia crítica para muchos procesos celulares (1-4).

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular caracterizadas por un motivo de cisteínas presente en su extremo amino. La organización de este motivo permite dividir a estas proteínas en 4 diferentes familias con respecto al ordenamiento de los aminoácidos presentes en este motivo. Las quimiocinas de la familia CXC presentan un aminoácido entre las 2 cisteínas; las quimiocinas CC carecen de aminoácido intermedio, mientras que las quimiocinas XC tienen solamente una de las cisteínas. Por otro lado, la quimiocina CX3CL1 presenta tres aminoácidos intermedios (5).

Las quimiocinas son sintetizadas con un péptido señal en el extremo amino; el cual es posteriormente proteolizado al momento de ser secretadas. Adicionalmente, las quimiocinas CXCL16 y CX3CL1 tienen una forma membranal. Estas quimiocinas presentan un “tallo” parecido a mucina que las mantiene ancladas a la membrana celular. Adicionalmente estas quimiocinas presentan un segmento transmembranal y una cola intracitoplásmica.

Las quimiocinas se unen a sus células blanco por medio de la interacción con receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR). Esta interacción les permite activar diferentes vías de señalización que llevan a diferentes respuestas funcionales dentro de la célula.

Este proceso lleva a la activación celular y la extravasación de los leucocitos. Este proceso ha sido dividido en cuatro pasos secuenciales (Figura 1).

Los leucocitos se encuentran en los vasos sanguíneos interaccionando con moléculas tipo lectinas presentes en las células del endotelio. Estas interacciones permiten al leucocito “rodar” por la pared de los vasos (Paso 1).

Cuando el leucocito encuentra las quimiocinas presentadas en la pared del endotelio sufre un proceso de activación, en el cual el receptor de quimiocinas se activa y comienza el encendido de diferentes vías de señalización (Paso 2). Dentro de esta activación se modifica tanto la estructura como el patrón de agregación de las integrinas, lo que permite la adhesión firme a la pared del endotelio (Paso 3). Una vez detenido, el leucocito atraviesa la pared del endotelio para llegar a los sitios de infección e inflamación (Paso 4).

Se han descrito más de 50 quimiocinas y 20 receptores para quimiocinas. Hay quimiocinas que pueden unirse a más de un receptor, mientras que hay receptores de quimiocinas que unen varios ligandos diferentes. Esta características le dan al sistema de quimiocinas/receptores una gran complejidad y una aparente redundancia. Debido a esta característica, generalmente es complicado determinar las funciones específicas de cada quimiocina. Esto se debe en parte a que existen otros ligandos expresados que tienen un papel similar en reclutamiento celular.

Estructura de las quimiocinas

Debido a los múltiples procesos celulares en los cuales participan las quimiocinas, es de interés determinar los mecanismos de acción de estas proteínas. El análisis de los mecanismos de actividad y de los principios de la selectividad y posible redundancia son un objetivo en varios estudios sobre estos quimioatrayentes. Las quimiocinas presentan una secuencia de

aminoácidos con un nivel de homología variable. Esta secuencia presenta algunas características conservadas. El punto isoeléctrico de estas proteínas

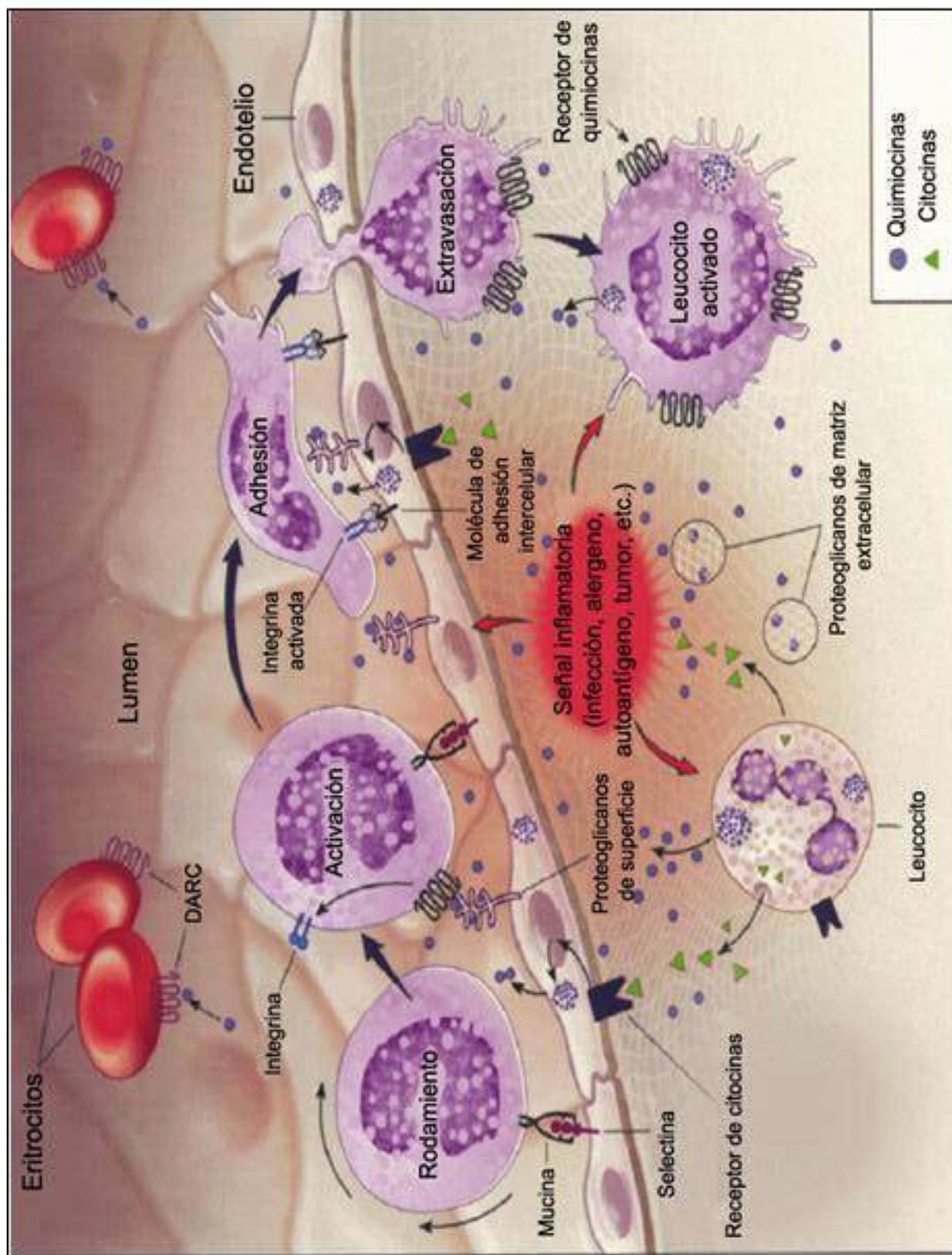


Figura 1: Proceso de migración de leucocitos mediado por quimiocinas. Los leucocitos "ruedan" por la pared del endotelio hasta que las quimiocinas presentadas en la superficie activan a las integrinas. Las integrinas permiten que la célula se detenga sobre el endotelio, lo que le permite realizar el proceso de extravasación para llegar a sitios de infección e inflamación. (Figura modificada de Luster, 1998)

es generalmente arriba de 7, debido a la predominancia de aminoácidos con carga positiva en su secuencia. La carga positiva de estas proteínas puede ser importante para interactuar con componentes de matriz extracelular. En el caso de quimiocinas CXC, el motivo ELR se encuentra presente en algunos miembros de esta familia, lo cual se asocia a su actividad angiogénica. Adicionalmente las quimiocinas de la familia CC presentan en su secuencia un aminoácido hidrofóbico grande (F o W) en la posición 13, que forma parte de la interfase de dimerización de estas quimiocinas (6).

Las quimiocinas presentan una estructura terciaria conservada, con un extremo amino-terminal desordenado, seguido de 3 hebras β plegadas antiparalelas interconectadas con asas, y una hélice α en el extremo carboxilo-terminal. Esta estructura ha sido determinada por difracción de rayos X y por estudios de resonancia magnética nuclear (7) (8-10) (Figura 2a). En las estructuras descritas, los puentes disulfuro (1 a 3) se encargan de darle rigidez al extremo amino.

Las quimiocinas forman dímeros y otros multímeros en solución a altas concentraciones (generalmente mayores a 100 μ M). Esta dimerización forma una interfase cargada positivamente que le permite interactuar con proteoglicanos como el heparán sulfato (11).

Los aminoácidos que forman estas interfases varían en las quimiocinas, ya que la forma de dimerización es diferente entre las 2 familias (10). En el caso de la familia CC la dimerización esta formada por residuos del extremo amino terminal, un ejemplo de esto es la quimiocina CCL3 (MIP-1 α) donde los residuos que forman parte de la interfase son en el extremo amino terminal 2-13, y las asas que conectan a las hojas β 1- β 2 y β 2- β 3 (residuos 34-35 y 46-51) (9). En la quimiocina CCL2 (MCP-1) los residuos P8 y F13 son necesarios para la formación de dímeros. Por otro lado, en la quimiocina CXCL8 existen interacciones entre las hojas β 1 de ambos monómeros, lo que forma una estructura molecular con 6 hebras β antiparalelas, con las hélices α en el plano opuesto (8).

Adicionalmente se ha descrito en algunas quimiocinas la formación de agregados más complejos. Durante la caracterización de la estructura

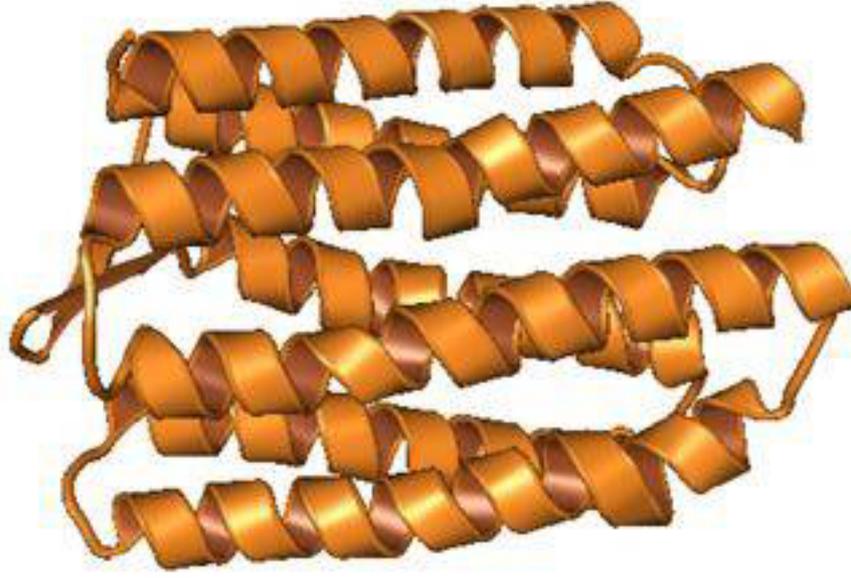
A**B**

Figura 2: (A) Estructura terciaria de quimiocinas. Las quimiocinas presentan una estructura terciaria conservada con 3 hebras β antiparalelas y una hélice α en el extremo carboxilo (PDB 1ESR). (B) La estructura de receptores de quimiocinas se desconoce. Para ejemplificar la estructura de proteínas de esta familia se muestra la rodopsina (PDB 1GUE).

cristalográfica de la quimiocina CCL2 (MCP-1) se encontró que es capaz de formar tetrámeros. Estos tetrámeros se forman utilizando la interfase de dimerización tanto de quimiocinas CC como de CXC (12). La quimiocina CXCL4 (PF-4) es otra quimiocina de la familia CXC capaz de formar tetrámeros (13).

Finalmente, de manera reciente se ha demostrado que las quimiocinas son capaces de formar heterodímeros, lo cual agrega otro grado de complejidad al sistema de quimiocinas-receptor. Este proceso se ha descrito para varias quimiocinas. En el caso de CXCL4 (PF-4) y CXCL8 (IL-8), se determinó que la constante de disociación es de 42 nM, lo que indica que la formación de heterodímeros es relativamente estable (14).

Adicionalmente, el proceso de heterodimerización modifica de manera importante la actividad de las quimiocinas. Las quimiocinas CXCL13 y CCL21 son capaces de formar heterodímeros e interactuar con células que expresan el receptor CCR7. Las respuestas inducidas por estas quimiocinas (quimiotaxis e internalización de receptores) son de mayor potencia que las del ligando CCL21 solo, a pesar de que las células empleadas no expresan CXCR5; el receptor de CXCL13. Esto demuestra que la heterodimerización potencia las respuestas de estas quimiocinas (15).

La estructura de los receptores de quimiocinas corresponde a una proteína transmembranal con 7 hélices α (Figura 2b). Estas hélices están conectadas con asas tanto por la porción extracelular como por el lado intracitoplásmico. Los receptores de quimiocinas son susceptibles a sulfonación de tirosinas, lo que puede modular su actividad (16).

Actualmente se desconoce la estructura cristalográfica de estos receptores, por lo que los estudios de estructura de los mismos se realizan utilizando modelos *in silico* basados en la rodopsina (proteína de siete dominios transmembranales con homología a estos receptores) o mediante el uso de mutantes.

Vías de señalización

La activación de los receptores de quimiocinas lleva a la disociación de la subunidad α inhibitoria de las subunidades $\beta\gamma$ en su proteína G heterotrimérica. Esta disociación es inhibida por la toxina de *Bordetella*

pertussis, la cual reduce de manera importante la señalización de receptores de quimiocinas (17). Los receptores de quimiocinas utilizan principalmente proteínas G conformadas con subunidades α_i o α inhibitoria, aunque existen otras familias de subunidades que pueden participar en estos procesos de señalización (18). En el caso de receptores de quimiocinas codificados por virus (mencionados posteriormente) se ha demostrado la participación de subunidades como $G\alpha_q$ y $G\alpha_{13}$ (19).

Las subunidades activan posteriormente moléculas de señalización implicadas en diferentes respuestas funcionales (20). La subunidad α inhibitoria participa de manera directa en la señalización por medio de la interacción con proteínas cinasas de la familia SRC. La subunidad $\beta\gamma$ se une directamente a la enzima fosfatidilinositol-3 cinasa γ (PI3K γ). Esta enzima fosforila lípidos en la membrana de las células que sirven de anclaje para otras moléculas efectoras (11, 21). Se ha demostrado en algunos receptores de quimioatrayentes la participación de la proteína Ras en la activación de PI3K γ .

Dentro de las moléculas reclutadas por estos fosfolípidos generados por PI3K γ se encuentran la proteína-cinasa B (PKB), así como factores de intercambio de GTP como Rac y Cdc42, que participan en el rearrreglo de citoesqueleto. Este rearrreglo es un proceso dinámico que involucra múltiples proteínas dentro de la célula. Estos procesos permiten a la célula cambiar de forma y de dirección de movimiento manteniendo la posibilidad de realizar ajustes en un lapso de tiempo relativamente rápido.

Las moléculas encargadas de la señalización que regulan este proceso incluyen a la GTPasa Rho, que activa proteínas de la familia WASp. La activación de estas proteínas activa al complejo Arp2/3, que finalmente permite la polimerización de proteínas estructurales que forman parte del citoesqueleto como las subunidades de actina. Adicionalmente se ha demostrado la participación de las proteínas cinasas Pyk-2 y FAK en este proceso de rearrreglo (22-25).

Por otro lado, la subunidad $\beta\gamma$ puede activar de manera directa varias isoformas de la enzima fosfolipasa C β . Estas enzimas se encargan de cortar el fosfatidil inositol bifosfato que se encuentra en la membrana celular. El corte de este lípido genera 2 productos que contribuyen a la transducción de la señal:

inositol 1, 4, 5 trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato se encarga de liberar las reservas de calcio del retículo endoplásmico al unirse a canales de calcio en este organelo. Otras moléculas que están involucradas en el flujo de calcio incluyen a la enzima CD38, que genera ADP ribosa cíclico. Esta molécula puede interactuar con canales iónicos promoviendo la entrada de calcio a la célula (26, 27).

La activación de la proteína cinasa C (PKC) por el diacilglicerol se requiere para desensibilizar al receptor de quimiocina, así como para algunas respuestas como la liberación de gránulos contenedores de enzimas en neutrófilos

En neuronas se ha demostrado que la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α) participa en los procesos de regulación de la apoptosis. Esto se debe a que su interacción con CXCL12 induce la fosforilación de AKT, que promueve sobrevivencia en estas células, mientras que la activación de MAPK (p38) promueve la muerte de estas células. Esto indica que las quimiocinas participan en el balance de estas señales pro y antiapoptóticas (28).

Se ha demostrado que las quimiocinas CCL19 y 21 inducen la fosforilación de la cinasa AKT, Esta molécula participa mediante la expresión de BCL-2 lo que promovería la sobrevivencia de linfocitos CD8+ (29).

Asimismo, se ha implicado la activación de la vía de señalización de JAK/STAT en la respuesta a quimiocinas (30-32). En el caso de receptores de citocinas esta cinasa requiere que el receptor al que se acopla se encuentre en forma dimérica para poder activarse. La dimerización de los receptores permite la trans-fosforilación de esta cinasa. Esta fosforilación permite la unión de los factores de transcripción STAT. La cinasa JAK fosforila a la proteína STAT, permitiendo que este factor de transcripción se transporte al núcleo de la célula, donde participa en la activación de la transcripción de varios genes. La participación de esta vía parece ser crítica para la función de los receptores de quimiocinas, ya que la inhibición de cinasas de la familia JAK afecta la respuesta a varias quimiocinas. Así pues, se observa una inhibición casi completa de la quimiotaxis en células tratadas con inhibidores de esta cinasa (33-35).

Interacción Quimiocina-Receptor

Las quimiocinas se unen a los receptores 7TM por medio de interacciones secuenciales que llevan a la activación del receptor de quimiocinas. A nivel molecular, las quimiocinas interactúan con sus receptores mediante un proceso denominado de 2 pasos. Este modelo define que las quimiocinas se unen al receptor por medio de interacción inicial que tiene como principal característica la falta de activación. Esta unión inicial tiene una mayor afinidad que las interacciones posteriores (36). Los residuos de aminoácidos que participan en este proceso han sido descritos para algunas quimiocinas.

Posteriormente el extremo amino interactúa con el receptor de quimiocinas, lo cual lleva a la activación, por lo que el extremo amino es muy importante para la activación de los receptores. La quimiocina CXCL8 (IL-8) fue la primera en ser estudiada estructuralmente usando mutantes y proteínas truncadas. En estos estudios se encontró que modificaciones en su extremo amino terminal tenían efectos en su capacidad de activar a sus receptores CXCR1 y 2, ya que variantes de esta quimiocina sin los 4 o 6 primeros aminoácidos pierden la capacidad de inducir quimiotaxis y estallido respiratorio, manteniendo su afinidad por estos receptores (37, 38). En el caso de la quimiocina CCL2, variantes que carecen de los 6 primeros residuos son capaces de unirse pero no de activar al receptor de quimiocinas CCR2 (39).

Se han realizado estudios de mutantes de la quimiocina CCL2 para identificar residuos importantes en la unión y activación de receptores de quimiocinas. Para determinar los aminoácidos de la quimiocina encargados de unirse y activar al receptor se realizaron mutaciones puntuales en los aminoácidos de esta quimiocina. Los residuos Y13, R24, K35, K49 y H66 cambiados por alanina disminuyen la unión a su receptor CCR2. Estos aminoácidos sugieren que la región de la proteína encargada de unirse al receptor está distribuida a lo largo de la proteína, y consiste principalmente de aminoácidos básicos. Espacialmente estos aminoácidos forman un surco básico en la proteína, que contacta al extremo amino-terminal del receptor CCR2 (40). Adicionalmente, varias mutaciones tienen efecto en quimiotaxis y flujo de calcio mediados por CCL2. La eliminación del extremo amino terminal

anula la actividad de la quimiocina, como se había demostrado anteriormente. La sustitución de la tirosina Y13 por una alanina genera una quimiocina incapaz de formar dímeros y que tiene una afinidad muy baja por su receptor CCR2. La capacidad de CCL2 para inducir flujo de calcio disminuye 43 veces en la mutación Y13A. Esta disminución en flujo de calcio se explica por la baja afinidad que tiene esta variante por el receptor. Sin embargo, la mutante no es capaz de inducir quimiotaxis a concentraciones de hasta 100 μM , lo cual no es explicable por la afinidad de la mutante por CCR2, lo que implica que Y13 es más importante para la activación de quimiotaxis que para flujo de calcio (41).

La estequiometría de la unión quimiocina receptor ha sido estudiada en numerosas ocasiones, sin embargo, no existe un consenso general (6, 42). Existen estudios que sugieren que las quimiocinas interactúan de forma monomérica con los receptores. Sin embargo el estudio de algunas mutantes señala que la formación de dímeros es necesaria para la señalización.

Para la quimiocina CXCL8 se determinó que es necesaria la disociación de los dímeros para la unión con un fragmento del receptor CXCR1 (43). Esto se determinó mediante el uso de técnicas de calorimetría isotérmica de titulación y de centrifugación analítica. En el caso de quimiocinas que se comporten de una manera similar a la de CXCL8, la dimerización jugaría un papel de regulador negativo de la activación de receptores. Esta dimerización favorecería la interacción con proteoglicanos, lo que permitiría regular de manera indirecta los procesos de activación de las quimiocinas.

Para determinar si otras quimiocinas requieren actuar en forma dimérica o si los monómeros de las quimiocinas son capaces de activar a los receptores se generaron varias mutantes en la interfase del dímero de la quimiocina CCL2 (MCP-1). Una de estas mutantes, en la cual se sustituye el aminoácido prolina de la posición 8 por alanina (P8A) no forma dímeros en solución, y es capaz de inducir todas las respuestas funcionales de CCL2 silvestre, lo que indica que la dimerización no es necesaria para la actividad *in vitro* de esta quimiocina (44).

Resultados similares se observaron al usar una proteína de fusión (CCL2 fusionada a fosfatasa alcalina) incapaz de formar dímeros. En la quimiocina CCL4 (MIP-1 β) se probaron mutantes con sustituciones similares, como P8A, en las cuales no se forman dímeros. Estas mutantes tienen una afinidad por el receptor similar a la quimiocina normal (45).

Sin embargo, en estudios estructurales se ha determinado que el sitio de unión a proteoglicanos se forma en la interfase de los dímeros de varias quimiocinas (CXCL11, CCL2) (46, 47) lo que indica que la dimerización es necesaria para esta interacción. La presentación de quimiocinas en forma dimérica por proteoglicanos en la superficie de las células puede ser importante para la formación de un gradiente estable que las células son capaces de detectar. Esta presentación puede activar al receptor de otra manera, induciendo respuestas que la quimiocina en forma soluble y monomérica no es capaz de inducir (48). Adicionalmente, la relevancia de estas formar oligoméricas no se ha determinado en todos los trabajos mediante actividad *in vivo*, lo que existe la posibilidad de que sea en estos modelos donde la multimerización de quimiocinas tenga importancia biológica (49, 50). Tal es el caso de CCL5 (RANTES) se demostró que la formación de multímeros es necesaria para su actividad *in vivo*, pero no *in vitro*. En estudios utilizando esta quimiocina, se encontró que las formas diméricas no son funcionales, mientras que las formas completamente multimerizadas lo son. Para determinar esto, se utilizó una variante de CCL5 (RANTES) mutada en el sitio de unión a proteoglicanos. Esta variante es capaz de reclutar células que expresan CCR5 *in vitro*, pero no *in vivo*. Al utilizar esta proteína mutada en modelos de inflamación en ratón, se encontró que es capaz de inhibir el reclutamiento celular (51). El mecanismo detrás de esta inhibición se encuentra en su capacidad para modular los diferentes estados de agregación *in vivo* de CCL5. Se encontró que esta variante forma heterodímeros con la proteína silvestre. Estos heterodímeros no son funcionales, y no son capaces de formar multímeros mediante la unión a proteoglicanos.

En cuanto al estado de agregación de los receptores de quimiocinas, existen diferentes estudios que exploran la posibilidad de que los receptores de quimiocinas funcionen como dímeros o multímeros (52, 53). Muchos receptores de la misma familia utilizan la agregación como un mecanismo de modulación de la actividad. Se ha analizado la posible agregación de receptores mediante el uso de anticuerpos agonistas (54). En estos estudios se ha demostrado que anticuerpos capaces de inducir agregación de receptores de quimiocinas son capaces de activar los receptores; inclusive inducir quimiotaxis de células que expresan dichos receptores. Esos estudios fueron posteriormente debatidos

debido a estudios de agregación que utilizaban transferencia de energía de fluoróforos acoplados a receptores de quimiocinas. Estos estudios demostraron que los receptores de quimiocinas existen en la superficie en un estado de agregación basal, y que la interacción con ligandos no modifica detectablemente dicha agregación (55).

Otro estudio utilizó receptores de quimiocinas mutados en regiones que corresponden al sitio de dimerización. Estos receptores, al ser transfectados en células y estimulados, no son funcionales (56). Este dato se confirma al utilizar un péptido que corresponde a la interfase de dimerización. Este péptido es capaz de inhibir la señalización inducida por el ligando CXCL12 (SDF-1 α) por medio de competencia, inhibiendo la oligomerización (57), lo que sugiere que la formación basal de dímeros es necesaria para la señalización adecuada de los receptores de quimiocinas.

Modulación de la Actividad de Quimiocinas

El sistema de quimiocinas es regulado a diferentes niveles; desde la transcripción génica hasta la modificación de las proteínas. De manera particular se ha estudiado el papel de las modificaciones post-traduccionales de las quimiocinas (58).

La glicosilación de las quimiocinas es una modificación que modula la actividad de algunas de estas proteínas. Algunas quimiocinas son glicosiladas en residuos particulares, como CCL11 (eotaxina) en el aminoácido T71 (59); esta modificación puede alterar la actividad de la proteína madura. En el caso de la quimiocina CCL2 se ha demostrado la expresión de variantes glicosiladas en monocitos. Estas variantes presentan una actividad quimiotáctica menor que la proteína sin glicosilar (60).

Por otro lado, debido a que el extremo amino puede ser esencial para la señalización a través de sus receptores, existen modificaciones asociadas a esta región de las quimiocinas. De manera predominante, el procesamiento proteolítico por metaloproteasas (MMPs) es un mecanismo importante de regulación de las quimiocinas. Este corte tiene diferentes efectos según la quimiocina. Las variantes truncadas de CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2) y CCL13 (MCP-4) pierden su capacidad de inducir quimiotaxis. Adicionalmente el corte por metaloproteasas genera moléculas con capacidad

antagonista, debido a que son capaces de unirse a los receptores sin activarlos. Esta capacidad de antagonismo se comprobó en modelos de inflamación *in vivo* (61) La quimiocina CCL5 (RANTES) es cortada por la proteasa CD26 soluble y membranal, dando lugar a variantes que carecen de los 3 o 4 primeros aminoácidos, estas proteínas truncadas son antagonistas del receptor CCR5. Se ha demostrado que la actividad anti-VIH de esta quimiocina se debe principalmente a las variantes truncadas y no a la proteína completa (63).

Los cortes proteolíticos también potencian la actividad de algunas quimiocinas. La quimiocina CXCL8 (IL-8) aumenta su actividad 10 veces después de ser cortada por la metaloproteasa 9 en sus primeros 6 aminoácidos (62). Otras quimiocinas que incrementan su actividad al ser cortadas son CXCL1, 3 y 5.

Procesos asociados a Quimiocinas

Desarrollo y Organogénesis.

Los estudios de ratones deficientes en quimiocinas y sus receptores identificaron el papel importante de una quimiocina de la familia CXC, CXCL12 (SDF-1 α), en el desarrollo embrionario. La quimiocina CXCL12 está altamente conservada en los organismos en los que se ha descrito: entre las secuencias de CXCL12 humana y de ratón sólo hay un aminoácido diferente. Los ratones deficientes en esta quimiocina o su único receptor CXCR4 tienen defectos durante el desarrollo de órganos como el corazón y el cerebelo. Debido a estas deficiencias, estos ratones no son viables y mueren antes de nacer. Se ha demostrado que esta quimiocina participa en la proliferación de progenitores de linfocitos B y en la salida de precursores hematopoyéticos de la médula ósea durante la embriogénesis (64, 65).

El papel de CXCL12 en el desarrollo embrionario se encuentra ejemplificado en el pez zebra (*Danio rerio*) (66). En este organismo se ha descrito que esta quimiocina dirige la migración de células progenitoras que expresan el receptor CXCR4. Estas células posteriormente dan lugar a la línea lateral del embrión. Las células progenitoras de los organismos deficientes en

estas proteínas tienen patrones de migración erráticos, por lo que existen defectos en la generación de órganos en este pez (67).

Durante la generación de linfocitos T, los timocitos deben migrar a través del timo durante su proceso de maduración. Dentro de las quimiocinas que se expresan en el timo están CCL25, CCL17, CCL21, CCL19 y CXCL12 (68). Las quimiocinas dirigen esta migración a través de los diferentes compartimentos del timo para permitir su selección y maduración. Los receptores de quimiocinas son expresados de manera concertada durante los procesos de maduración de los timocitos.

Un ejemplo de esto es la quimiocina CCL25, que es expresada por células dendríticas del timo. El receptor de esta quimiocina es expresado en timocitos inmaduros lo que les permite su maduración en el timo (69, 70).

Adicionalmente, las quimiocinas participan de manera importante en la generación y organización de los órganos linfoides secundarios. Estos órganos son importantes para la generación y maduración de la respuesta inmune. La quimiocina CXCL13 y su receptor CCR5 participan de manera importante en la organización de estos órganos linfoides. Los ratones deficientes de esta quimiocina o de su receptor tienen defectos en la formación y organización de ganglios linfáticos periféricos y de placas de Peyer (71).

Los linfocitos B expresan el receptor de quimiocinas CXCR5, que les permite responder a la quimiocina CXCL13. Esta quimiocina dirige tanto a estas células como a los linfocitos T a la zona folicular en los órganos linfoides, donde se lleva a cabo la interacción entre ambos tipos celulares.

Los linfocitos de memoria pueden subdividirse según la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en células de memoria central o periférica, debido a que este receptor les confiere la capacidad de entrar a los ganglios linfáticos (72).

Por otro lado, se ha demostrado que el receptor CCR2 y sus ligandos CCL2 y CCL7 son necesarios para la migración de monocitos de médula ósea a sangre. Este paso es necesario para posteriormente reclutar estas células a sitios de infección e inflamación (73).

Otras quimiocinas implicadas en la formación de órganos linfoides secundarios son CCL21 y 19. La expresión ectópica de estos ligandos promueve la formación de ganglios en modelos de ratón (74).

El papel de las quimiocinas CCL19 y 21 durante los procesos de presentación de antígeno ha sido estudiado extensivamente. La presentación de antígenos a linfocitos T es el paso iniciador de la inmunidad adaptativa. Las células T que expresen receptores con afinidad a los antígenos procesados y expuestos por células presentadoras de antígeno son seleccionadas, permitiendo su proliferación y activación. La expresión de quimiocinas y sus receptores durante este proceso permite el encuentro entre las células presentadoras y los antígenos, así como entre las células T y las células presentadoras (sinapsis inumológica).

Las células dendríticas inmaduras son células presentadoras que migran constantemente a sitios de encuentro antigénico, como la piel y el intestino. Al captar antígenos y procesarlos las células dendríticas maduran y cambian la expresión de CCR6 por la expresión del receptor CCR7. Este receptor les permite migrar en respuesta a las quimiocinas CCL21 (SLC) y CCL19 (ELC), expresadas por células endoteliales en los ganglios linfáticos (75).

Las células T que salen del timo migran a los ganglios linfáticos donde se encuentran con células dendríticas (debido a que expresan CCR7). Al llegar a los ganglios las células T interactúan con células dendríticas por medio del receptor TCR (Receptor de Células T), que reconoce al MHC (Complejo principal de histocompatibilidad) en células dendríticas. Una vez activados, los linfocitos T migran a la periferia respondiendo a quimiocinas secretadas en los sitios de inflamación para realizar sus funciones efectoras (76, 77).

Angiogénesis y angiostasis.

Las quimiocinas de la familia CXC tienen un papel fundamental en los procesos de formación de vasos sanguíneos durante la curación de heridas (78). Este proceso es dirigido por la regulación de diferentes factores angiogénicos, promotores de la formación de vasos, y angiostáticos que lo inhiben. La interacción de los factores angiogénicos y angiostáticos tiene una gran importancia en la formación de vasos; se observa un desbalance de estos factores en enfermedades como psoriasis, artritis reumatoide y crecimiento de tumores. La capacidad de las quimiocinas de la subfamilia CXC de promover o inhibir la formación de vasos sanguíneos se basa en la presencia (o ausencia) de los aminoácidos ELR (Glutamina, Leucina, Arginina) en su extremo amino,

Las quimiocinas ELR son factores angiogénicos capaces de inducir la quimiotaxis de células endoteliales, dentro de estas quimiocinas se encuentran CXCL1-3, y CXCL5-8 mientras que las quimiocinas no-ELR son factores angiostáticos, inhiben la quimiotaxis y la activación de estas células. Las quimiocinas angiostáticas descritas incluyen a CXCL4, y CXCL9-12.

El receptor de quimiocinas CXCR2 se ha visto implicado de manera importante en estos procesos, debido a que las células endoteliales que responden a las quimiocinas ELR+ lo expresan (79). Por otro lado, muchas quimiocinas angiostáticas se unen al receptor CXCR3, lo que le da a este receptor un papel importante en la modulación de formación de vasos (80, 81).

En los procesos inflamatorios y enfermedades crónicas mencionados, se ha observado un desbalance en la expresión de estos 2 tipos de quimiocinas. Asimismo, en los procesos de formación y crecimiento de tumores se ven aumentadas las quimiocinas ELR (82).

Reclutamiento de células efectoras.

Las quimiocinas participan de manera predominante en muchos procesos infecciosos por medio del reclutamiento de diversas células del sistema inmune. Estos quimioatrayentes se encargan de promover la migración de células con múltiples actividades efectoras que son necesarias para la resolución de la infección (83).

En modelos de infección de *Bacillus anthracis* utilizando tejido de pulmón humano se ha detectado la expresión de quimiocinas como CXCL8 y CCL2. La secreción de estas quimiocinas por el epitelio pulmonar puede participar de manera importante en la respuesta inflamatoria causada por esta bacteria (84). En el caso de *Toxoplasma gondii*, la participación directa de células CD8+ reclutadas a través del receptor de quimiocinas CCR5 es esencial para una respuesta inmune eficiente. Este parásito ha respondido a este mecanismo mediante la secreción de la ciclofilina 18, esta molécula es capaz de unirse al receptor CCR5 y evitar la interacción con la quimiocina CCL5 (85).

A pesar de existir redundancia en los ligandos que interaccionan con receptores, en algunos casos se ha asociado la falta de receptores de quimiocinas o sus ligandos con susceptibilidad a procesos infecciosos.

En la respuesta a *Aspergillus fumigatus* se ha demostrado que el receptor CCR6 es crucial para la defensa contra este patógeno. Las células que expresan CCR6 en el modelo de infección de ratón son principalmente células dendríticas de pulmón. La eliminación del gen de CCR6 da por resultado una infección más severa en el ratón (86).

En contraste, existen ejemplos donde el bloqueo o inhibición de las respuestas mediadas por quimiocinas promueven la resolución de infecciones.

Un ejemplo de esto es el ratón deficiente del receptor CCR2. Este ratón es más resistente a la infección por el virus Influenza A que el ratón que expresa CCR2. Esto sugiere que en esta infección la inflamación mediada por este receptor es dañina para el ratón (87).

Actividad antimicrobiana de quimiocinas.

Las quimiocinas y las defensinas son moléculas de la repuesta inmune con múltiples actividades en común. La actividad antimicrobiana directa es una actividad que comparten moléculas de diversas familias. Dentro de las moléculas mediadoras que tienen actividad directa contra microorganismos se encuentran las defensinas. Las defensinas son péptidos pequeños con actividad antimicrobiana contra varios microorganismos. Estas moléculas se clasifican según el patrón de sus puentes disulfuro en defensinas α y β . Las defensinas α tienen un patrón 1-6, 2-4 y 3-5 en sus puentes disulfuro, mientras que las defensinas β tienen el patrón 1-5, 2-4 y 3-6. La familia ϕ se describió posteriormente, con un péptido que adopta una estructura cíclica (88, 89).

Las defensinas α son secretadas principalmente en gránulos de neutrófilos, aunque otros miembros de esta familia son secretados por células de Paneth en el intestino. La estructura terciaria que adoptan estas moléculas consiste en una hoja β con 3 hebras unidas con un asa que contiene residuos cargados positivamente.

Por otro lado, las defensinas β son secretadas por células epiteliales de piel, pulmón e intestino. A pesar de no tener una alta homología de secuencia con las defensinas α , la estructura terciaria que adoptan es similar. Por medio

de análisis de secuencias del genoma humano se han identificado más de 28 genes para defensinas β en regiones del cromosoma 8 (90).

Existen varios mecanismos de acción descritos para explicar la actividad microbicida de las defensinas. Por un lado se ha demostrado que estos péptidos son capaces de interactuar directamente con la membrana de las bacterias. Este paso depende de los residuos cargados positivamente que se encuentran en estas proteínas. Posteriormente, dado que estas proteínas son anfipáticas, se favorece su inserción en las membranas lipídicas. Posteriormente ocurre un paso de oligomerización de la molécula antimicrobiana en la membrana, llevando a la formación de poros. Esto lleva a una pérdida de integridad de la membrana, llevando a salida de material citoplasmático. Otros mecanismos conocidos de actividad antimicrobiana incluyen la unión a proteínas receptoras en las células blanco, internalización y unión a ADN, y en el caso de algunos hongos, daño mitocondrial y desacoplamiento de la cadena respiratoria (91).

El análisis de características comunes entre quimiocinas y defensinas surgió de la descripción de la capacidad de la defensina hDB2 de unirse y activar al receptor CCR6 (92, 93). Esta unión es capaz de desplazar la unión del ligando natural de CCR6 (CCL20), aunque con una afinidad menor. La activación del receptor CCR6 por hDB2 promueve la migración de células dendríticas inmaduras y linfocitos T de memoria. Esto demuestra que las defensinas son capaces de enlazar las dos principales ramas del sistema inmune. Por un lado tienen una actividad directa contra los patógenos presentes en el organismo, formando una barrera de defensa contra infecciones; por otro lado las defensinas permiten el reclutamiento de células de la respuesta adaptativa, lo que permite montar una respuesta eficiente contra estos microorganismos (94).

La identificación de quimiocinas con actividad antimicrobiana inició con estudios de péptidos derivados de plaquetas. En estos trabajos se encontró que quimiocinas como CTAP, son procesadas mediante estimulación con trombina de plaquetas. Estas variantes tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, así como contra hongos (95).

Un análisis de otras quimiocinas de varias familias identificó a las quimiocinas ELR- CXCL9-11 con actividad contra *E. coli* y *L. monocytogenes*. Esta

actividad es dependiente de la concentración de sales. Estas quimiocinas son expresadas después del estímulo de la citocina interferón γ , lo que les permitiría in vivo llegar a las concentraciones necesarias para tener actividad (96).

Al analizar a la quimiocina CCL20, el ligando del receptor CCR6, se encontró que comparte con las defensinas la actividad antimicrobiana. Esta actividad se mantiene contra bacterias Gram positivas, negativas y algunos hongos. Adicionalmente, la actividad de CCL20 depende de las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) presentes en el medio (97).

Posteriormente otros trabajos identificaron varias quimiocinas con actividad contra bacterias Gram positivas y negativas principalmente. Existe una gran variedad de quimiocinas con actividad antimicrobiana. Esta actividad varía en niveles de potencia y en capacidad de reconocer tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas (97).

La actividad antimicrobiana de estas quimiocinas no correlaciona por completo con algunas características fisicoquímicas de estas proteínas; como lo son el punto isoeléctrico y el perfil de hidrofobicidad. Existen quimiocinas con un punto isoeléctrico alto que no tienen actividad antimicrobiana, mientras que hay quimiocinas antimicrobianas cuyo punto isoeléctrico se mantiene relativamente bajo. Sin embargo, un estudio del potencial electrostático de superficie reveló que las quimiocinas con actividad antimicrobiana presentan una superficie con carga positiva y una región hidrofóbica que les permitiría interactuar con la pared de algunas bacterias. Esta característica de anfipaticidad sería determinante para la actividad antimicrobiana de estas quimiocinas.

La quimiocina CCL28 es expresada principalmente en tejidos con mucosas, como glándulas exocrinas, tráquea y colon. Se ha detectado la expresión de esta quimiocina en saliva y leche. Dentro de las células que responden a esta quimiocina se encuentran linfocitos B que expresan el receptor de quimiocinas CCR10. El extremo carboxilo terminal de esta quimiocina presenta un número alto de histidinas en su secuencia. Esta característica la hace similar a las histatinas, moléculas pequeñas con actividad antimicrobiana. En la caracterización de la actividad antimicrobiana se demostró que CCL28 inhibe a *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y

otras bacterias. Al analizar el fragmento correspondiente al extremo carboxilo de esta quimiocina se encontró que mantenía la actividad contra algunos de estos microorganismos (98).

Otro análisis de actividad de fragmento de quimiocina fue realizado utilizando el producto de proteólisis de Catepsina-D (CCL20 59-70). Este fragmento mantiene actividad, aunque con menor potencia, contra *E. coli*. Este trabajo revela que es posible que se generen estos fragmentos con actividad a partir de los cortes de la proteína completa (99).

Se describió que un fragmento correspondiente a los residuos que forman la hélice α del extremo carboxilo de CXCL8 (II-8) tiene homología con el péptido antimicrobiano Hp(2-20) derivado de *Helicobacter pylori*. A pesar de que la quimiocina CXCL8 no tiene por si sola actividad antimicrobiana, este fragmento presenta actividad contra diferentes microorganismos. Por otro lado se encontró que este fragmento es generado por hidrólisis a partir de la proteína CXCL8 completa, lo que abre la posibilidad de que este péptido se genere *in vivo* como un mecanismo de respuesta a microorganismos (100).

Otro estudio de fragmentos de quimiocina se realizó con CXCL4. En este estudio se encontró que el fragmento carboxilo terminal retiene la actividad antimicrobiana de la quimiocina completa, característica al parecer conservada en el resto de las quimiocinas estudiadas. Adicionalmente, en este estudio se determinó que el extremo carboxilo puede retener su estructura secundaria independientemente del resto de la proteína (101).

Existen algunas defensas que adicionalmente tienen actividad contra algunos virus. En el caso de las quimiocinas, se encontró que el virus HSV-1 es susceptible a ser inactivado por varias quimiocinas, entre ellas CCL3, 4 y 5. Es interesante recalcar que estas quimiocinas son expresadas por células CD8 citotóxicas, que tienen un papel importante en el control de infecciones por virus (102).

Quimiocina	Actividad	Referencia
CCL1	B-	(97)
CCL11	B+, B-	(97)
CCL13	B-	(97)
CCL17	B+, B-	(97)
CCL18	B+, B-	(97)
CCL19	B-	(97)
CCL20	B+, B-, H	(93), (97)
CCL21	B+, B-	(97)
CCL22	B+, B-	(97)
CCL25	B+, B-	(97)
CCL28	B+, B-, H	(98)
CXCL1	B-	(97)
CXCL2	B-	(97)
CXCL3	B-	(97)
CXCL4	B+, B-, H	(95)
CXCL9	B+, B-	(96), (97)
CXCL10	B+, B-	(96), (97)
CXCL11	B+, B-	(96), (97)
CXCL12	B+, B-	(97)
CXCL13	B+, B-	(97)
CXCL14	B-	(97)
XCL1	B+, B-	(97)

Tabla 1. Actividad antimicrobiana descrita de quimiocinas contra varios microorganismos: B+: Bacterias Gram Positivas, B-: bacterias Gram Negativas, H: hongos.

Enfermedades asociadas a Quimiocinas

La participación de las quimiocinas en el reclutamiento celular inducido por procesos de infección es esencial para la resolución de la invasión de muchos patógenos. Sin embargo existen diferentes ejemplos de patologías asociadas a la presencia de las quimiocinas y sus receptores. Este hecho ha motivado el uso de antagonistas de la actividad de las quimiocinas (103).

Asma

En el asma, la submucosa de las vías respiratorias se infiltra con eosinófilos, células cebadas, linfocitos y otras células mononucleares. Adicionalmente se presenta hiperplasia y fibrosis subepitelial (104, 105).

La respuesta asmática puede dividirse en fase temprana y tardía. La fase temprana es una respuesta inmediata a un estímulo antigénico o ambiental que activa a las células cebadas promoviendo la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Adicionalmente, se generan anticuerpos IgE que reconocen antígenos ambientales.

La fase tardía se caracteriza por infiltración de varios tipos celulares al pulmón y dura tiempos largos. Los macrófagos alveolares y las células epiteliales secretan quimiocinas en respuesta a estímulos. Algunas de las quimiocinas que han sido detectadas en estos procesos incluyen a CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-2), CCL11 (Eotaxina) y CCL13 (MCP-4). Estas quimiocinas pueden reclutar eosinófilos mediante su interacción con el receptor CCR3 (106-108).

La cinética de producción de estas quimiocinas correlaciona con el reclutamiento de células que expresan los receptores correspondientes.

Durante la fase tardía del proceso asmático participan linfocitos T CD4 cooperadores. Estos linfocitos secretan citocinas que activan otras células y amplifican la respuesta inmune. Los linfocitos que participan en el asma tienen un perfil de citocinas tipo TH2; como IL-4, IL-6 e IL-10 entre otras. Estas citocinas tienen varias funciones; como activación celular, factores de crecimiento para células cebadas, etc.

Ateroesclerosis

La ateroesclerosis es un proceso inflamatorio caracterizado por la formación de placas o ateromas en los vasos sanguíneos (109).

Estas placas se forman en respuesta a daños arteriales debidos a hipercolesterolemia o a estrés de hipertensión. Las células endoteliales o de músculo liso; en respuesta a estas lesiones en la arteria, liberan quimiocinas que atraen monocitos circulantes (110). Estos monocitos migran a través del endotelio vascular y se diferencian en el espacio subendotelial en macrófagos por la presencia de citocinas inflamatorias tipo TH1, como IFN- γ y TNF- α . Estos macrófagos internalizan lípidos que encuentran en el espacio subendotelial y dan lugar a las células "foam".

Estudios clínicos han demostrado que hay un aumento en la expresión de la quimocina CCL13 (MCP-4), junto con quimiocinas como CCL2 (MCP-1) y CXCL10 (IP-10), que atraen monocitos y células de músculo liso, presentes en estas lesiones. Otros factores de riesgo para el desarrollo de la ateroesclerosis, como son el colesterol en plasma, la hipertensión y la diabetes, estimulan la liberación de quimiocinas en estas placas.

Ratones que sobreexpresan la lipoproteína B desarrollan ateromas si consumen dietas ricas en lípidos. La eliminación del gen para CCL2 (MCP-1) disminuye las lesiones ateroescleróticas en estos ratones. La eliminación del gen del receptor CCR2 tiene un efecto similar (111, 112). Por otro lado, se ha demostrado la participación de la quimiocina CX3CL1 y su receptor CX3CR1 (113) en este proceso tanto en ratones deficientes en el receptor como en estudios clínicos que muestran que existen polimorfismos asociados a protección contra esta enfermedad (114-116).

Las quimiocinas que participan en los procesos de angiogénesis se encuentran asociadas a la ateroesclerosis. De manera particular, en estudios con tejido humano, se ha detectado la sobreexpresión de la quimiocina CXCL8 en placas de arterias coronarias.

Generación de Tumores y Metástasis.

Algunas quimiocinas y sus receptores participan en los procesos de crecimiento tumoral, invasión y metástasis de células transformadas.

La variante del receptor de quimiocinas CXCR2 codificada por virus (KSHV-GPCR) participa en el proceso de transformación de células. Esta proteína se encuentra en un estado activado constitutivamente, y es capaz de unir a las quimiocinas CXCL8 y CXCL1. La expresión de este receptor o de una forma activa de CXCR2 lleva a la transformación de las células.

Algunas células cancerosas responden de manera directa a la estimulación de quimiocinas. Un ejemplo es el linfoma ESb-MP1 (117). Estas células realizan metástasis al riñón cuando son inyectadas en ratones. Cuando fueron aisladas las moléculas secretadas por líneas celulares de riñón, se encontró que las quimiocinas CCL2 y CCL5 son capaces de activar este linfoma; lo que indica que estas quimiocinas participan en la metástasis de esta línea celular hacia el riñón.

Un estudio importante de la participación de las quimiocinas en los procesos de metástasis de células cancerosas fue llevado a cabo en líneas celulares derivadas de cáncer de mama. En este estudio se demostró que estas líneas expresan de manera importante los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR7. La expresión de los ligandos CCL21 y CXCL12 correlaciona con los órganos y tejidos donde estas células migran predominantemente, lo que implica que la expresión de receptores de quimiocinas define en parte el patrón de metástasis que presentan algunos tumores (118).

Estudios posteriores han demostrado que el receptor CXCR4 tiene un papel importante en la migración y metástasis de cáncer de próstata. En este estudio se determinó que las variantes de líneas celulares que realizan metástasis tienen niveles de expresión de CXCR4 superiores a las líneas que no realizan metástasis (119).

Otro proceso en el que las quimiocinas participan en el cáncer es en la angiogénesis y vascularización de tumores.

En modelos de ratón se ha demostrado que las quimiocinas CXCL1,2 y 3 participan en la generación de tumores sólidos altamente vascularizados (120).

Las líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas expresan diferentes niveles de las quimiocinas CXCL1 y CXCL8 (121). En algunos casos, la angiogénesis de estos tumores puede ser bloqueada con anticuerpos neutralizantes contra el receptor de quimiocinas CXCR2 (122).

El papel de CXCL1 fue explorado en respuesta a estímulos pro-inflamatorios inducidos por prostaglandina E-2. Esta molécula promueve la secreción de CXCL1 en células de cáncer de colon. En modelos in vivo se ha demostrado que esta quimiocina promueve la formación de vasos en el tumor sólido (123).

Infecciones virales y Quimiocinas.

El sistema inmune ha evolucionado a la par con los patógenos que invaden el organismo. Debido a esta coevolución existen diversos mecanismos donde las funciones del sistema inmune son aprovechadas por virus y otros organismos.

El virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); es capaz de infectar varios tipos celulares como macrófagos, neuronas y linfocitos T. Existen cepas del virus conocidas originalmente como M trópicas cuyo hospedero son los macrófagos y la cepa T trópica, que infecta linfocitos T. Varios estudios indicaron que los receptores de quimiocinas participaban en la entrada del VIH (124, 125). Este virus, por medio de la glicoproteína de superficie viral gp120 interacciona con varios receptores de quimiocinas, entre ellos CCR5 y CXCR4, facilitando la activación de gp41, una proteína que promueve la fusión de las membranas del VIH y de la célula hospedera. La expresión de CCR5 por los macrófagos y la de CXCR4 por linfocitos T explica el tropismo del virus, por lo que la nomenclatura de las cepas fue cambiada de M y T a R5 y XR4 respectivamente, para indicar el tipo de receptor de quimiocinas al que se une el virus.

La importancia de esta interacción se enfatizó al encontrar una delección en el receptor CCR5 ($\Delta 32$). Los individuos infectados con VIH heterocigos para este alelo tienen disminuida la progresión de la enfermedad. Si el portador es homocigo tiene protección contra infecciones por algunas cepas del virus (126).

Debido a que tanto los ligandos naturales como gp120 se unen a los receptores de quimiocinas en regiones similares, la unión de uno bloquea la interacción del otro. Se sintetizó una variante de CCL5 denominada aop-RANTES (aminooxipentano); que se une al receptor CCR5 sin activarlo. Al preincubar células que expresan CCR5 con esta variante se bloquea la fusión

del VIH. Adicionalmente se han sintetizado varios compuestos que se unen a los receptores de quimiocinas e inhiben la entrada viral (127).

Otro receptor de quimiocinas implicado en la unión del VIH es CX3CR1. La quimiocina CX3CL1 es capaz de inhibir la fusión del VIH en células que expresan CX3CR1 y el co-receptor CD4 (128).

Posteriormente se identificaron variantes de CX3CR1 que tienen una mayor actividad de co-receptor (129).

La inhibición o el bloqueo de la interacción entre gp120 y los receptores de quimiocinas se han vuelto estrategias recurrentes en la búsqueda de fármacos o grupos de fármacos para el tratamiento del SIDA.

El citomegalovirus humano tiene un gen que codifica para un receptor de quimiocinas. Este receptor, US28, es capaz de unir a varias quimiocinas de la familia CC, como la quimiocina CCL5, así como a CX3CL1 (130, 131). Este receptor, al ser expresado en las células infectadas, secuestra a las quimiocinas evitando la migración de células efectoras, lo que previene una respuesta inflamatoria.

Por otro lado, el γ -herpes virus sintetiza una proteína soluble capaz de unir varias quimiocinas de diferentes familias. Esta unión inactiva las quimiocinas y evita que se unan a sus receptores (132).

Virus como el citomegalovirus humano y murino, el *Herpesvirus saimiri* y algunos poxvirus sintetizan variantes de quimiocinas. Estas quimiocinas bloquean los receptores inhibiendo la activación mediada por sus ligandos endógenos. Todos estos mecanismos le permiten al virus evadir la respuesta inmune mediada por las quimiocinas y les permite montar una infección en el organismo (133).

Agonismo y Antagonismo de Péptidos de Quimiocinas.

La importancia que las quimiocinas y sus receptores tienen en diversos procesos del sistema inmune ha llevado al análisis de secuencias mínimas necesarias para la unión y/o activación de receptores

En estudios de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α) se demostró que péptidos sintéticos correspondientes a los 9 primeros aminoácidos tenían la actividad de la quimiocina completa (quimiotaxis y flujo de calcio), aunque 100 veces menos potente. Dichos péptidos competían con CXCL12 por el receptor

CXCR4 y lograban activar a las células T utilizadas. La dimerización química de estos péptidos aumentaba la afinidad por el receptor. Por otro lado, la sustitución de un sólo aminoácido (P2G) abatía por completo la actividad del péptido (134, 135).

Este resultado concuerda con la información obtenida de los análisis de los productos de proteólisis generados a partir de las quimiocinas donde se muestra que el extremo amino es necesario para la actividad de las quimiocinas (58, 116).

Los péptidos generados a partir de quimiocinas no son siempre agonistas. Estudios realizados con péptidos basados en la quimocina CCL2 identificaron un péptido con actividad antagonista. Este péptido es reconocido por anticuerpos que neutralizan la actividad de CCL2, por lo que es posible que sean parecidos estructuralmente al sitio de unión de esta quimiocina con su receptor CCR2 (136).

Otros estudios con CCL2 identificaron un péptido, cuya secuencia corresponde a los aminoácidos 51-62 de CCL2. Este péptido es capaz de bloquear la actividad quimiotáctica de varias quimiocinas, compitiendo por sus receptores (137).

Posteriormente se han identificado secuencias en el extremo carboxilo de CCL2 que tienen actividad antagonista tanto *in vitro* como *in vivo* (138, 139).

Adicionalmente, estudios de expresión de péptidos en fagos identificaron péptidos con homología a las asas extracelulares de CCR2 (140). Estas secuencias son capaces de inhibir la angiogénesis inducida por CCL2 *in vivo*.

Como se ha mencionado anteriormente, en el caso de la actividad antimicrobiana se ha demostrado que péptidos correspondientes al extremo carboxilo terminal de algunas quimiocinas retienen la actividad antimicrobiana.

El dato obtenido de la quimiocina CXCL8 es particularmente relevante debido a que la quimiocina completa no tiene actividad antimicrobiana, mientras que el péptido aislado sí. Este resultado le confiere al extremo carboxilo un papel importante en la actividad antimicrobiana de las quimiocinas.

Subfamilia MCP

Dentro de la familia de quimiocinas CC se encuentra la subfamilia de quimiocinas MCP, con 7 miembros en humanos y 6 en ratón. Estas quimiocinas son agrupadas en una familia por su alto porcentaje de identidad en sus secuencias de aminoácidos (60%) y baja identidad con las otras quimiocinas CC (menos del 40%) (141).

	hCCL2	hCCL8	hCCL7	hCCL13	hCCL11	hCCL24	hCCL26
hCCL2	100	62	71	61	66	42	36
hCCL8		100	58	56	66	43	44
hCCL7			100	59	65	46	40
hCCL13				100	63	48	44
hCCL11					100	38	40
hCCL24						100	40
hCCL26							100

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las quimiocinas humanas de la subfamilia MCP.

Nomenclatura	Quimiocina	Receptores
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL8	MCP-2	CCR1,2,5
CCL7	MCP-3	CCR1,2,3
CCL13	MCP-4	CCR1,2,3
CCL11	Eotaxina	CCR3
CCL24	Eotaxina 2	CCR3
CCL26	Eotaxina 3	CCR3

Tabla 3. Miembros de la subfamilia de quimiocinas MCP en humanos.

La quimiocina CCL13 actúa a través de la activación de los receptores CCR1, 2 y 3. Esta quimiocina promueve migración de eosinófilos, linfocitos T, células dendríticas, monocitos y macrófagos, células efectoras que participan

en procesos inmunes en respuesta a patógenos, alérgenos y otros antígenos. Dentro de las respuestas que induce esta quimiocina se encuentran la inducción de estallido respiratorio y expresión de CD11b en eosinófilos, liberación de histamina en basófilos y adhesión de monocitos (142, 143).

La quimiocina CCL13 (MCP-4) no tiene homólogo en ratón, mientras que la quimiocina murina CCL12 (MCP-5) no tiene homólogo humano. El gen humano se encuentra localizado en el cromosoma 17q11.2-12. CCL13 se expresa constitutivamente en tejidos como pulmón, intestino delgado y colon, (órganos con alta migración de eosinófilos). Su expresión se puede detectar en timo, placenta y corazón (142). Las células endoteliales HUVECs no expresan esta quimiocina de manera constitutiva. Las citocinas IL1- α (interleucina 1 alfa) y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) estimulan la expresión de CCL13. La citocina IFN- γ (interferón gama) aumenta moderadamente la expresión esta quimiocina y actúa sinérgicamente con TNF- α aumentando los niveles de expresión (144).

La línea celular de epitelio alveolar A549 y la línea BEAS-2B de epitelio bronquial secretan CCL13 en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL1 β , IFN- γ e IL-4 (interleucina 4) (145).

Esta quimiocina es procesada e inactivada por MMP-9 y por la proteasa de Entamoeba histolytica EhCP2 (116, 146). Adicionalmente, la heparina puede inhibir las respuestas inducidas por CCL13 (147).

Se ha demostrado que existe una subpoblación de células dendríticas presentadoras de antígeno que responden a CCL13. Esta quimiocina se expresa en la pared del endotelio vascular, donde promueve la migración de las células para encontrar antígenos (148).

Se ha detectado un aumento en la expresión de esta quimiocina en pacientes con rechazo a trasplante de riñón y glomerulonefritis (149), así como en lesiones de placas ateroscleróticas, en pacientes con asma y sinusitis alérgica (150), lo que indica que esta quimiocina puede participar en el desarrollo de dichos procesos inflamatorios.

Otros estudios han demostrado la expresión de esta quimiocina en dermatitis atópica, donde puede ser importante para el desarrollo de la inflamación en piel (151).

Otro proceso en donde se ha descrito un aumento en la expresión de la quimiocina es en artritis reumatoide, donde induce la proliferación de células asociadas al líquido sinovial (152).

La presencia de células infiltradas que median el daño observado en estas enfermedades permite subrayar la importancia de la presencia de CCL13 para el desarrollo de estas enfermedades y procesos inflamatorios.

IV. JUSTIFICACIÓN.

Los procesos asociados a quimiocinas tienen una gran relevancia en diferentes funciones del organismo. De manera particular se ha descrito la participación de quimiocinas y sus receptores en diferentes patologías, que van desde procesos inflamatorios hasta metástasis de células cancerosas e infección viral.

Debido a esto se han explorado los mecanismos de unión y activación de los receptores de quimiocinas. El extremo amino terminal de las quimiocinas ha sido implicado en los procesos de activación del receptor, y existen estudios de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α) donde se ha demostrado que esta región es suficiente por sí sola para inducir quimiotaxis. Sin embargo, las diferentes regiones de las quimiocinas implicadas en la unión de los diferentes receptores y en la activación de cada vía de señalización y respuesta funcional no han sido determinadas con claridad para muchas quimiocinas.

La quimiocina CCL13 actúa a través de los receptores CCR1, CCR2 Y CCR3. Las regiones de CCL13 involucradas en la unión y activación de dichos receptores no han sido determinadas. La identificación de los aminoácidos involucrados en cada uno de estos procesos nos ayudaría a entender mejor el mecanismo de interacción de esta quimiocina con sus receptores, determinaría las regiones que confieren especificidad por dichos receptores, e identificaría regiones blanco para la síntesis de agonistas y antagonistas peptídicos y no-peptídicos.

La identificación de los aminoácidos involucrados en la unión de los receptores y la posterior activación de cada vía de señalización por CCL13 nos permitirá aclarar la posible redundancia del sistema de funcionamiento de CCL13 sobre CCR1, 2 y 3.

Adicionalmente la expresión de la quimiocina CCL13 en enfermedades inflamatorias como asma y glomerulonefritis nos sugiere la importancia de esta quimiocina como molécula efectora, debido al papel central que juegan las células atraídas en estos procesos inflamatorios. La información obtenida a partir de estudios de estructura-función de esta quimiocina permitiría diseñar

terapias anti-inflamatorias alternativas, que serían importantes para el tratamiento de estas patologías.

La identificación de residuos que mantienen la actividad antimicrobiana de las quimiocinas abre la posibilidad de explorar la modificación y el uso de dichas secuencias para el tratamiento de microorganismos con resistencia a antibióticos. Existen diferentes bacterias que poseen resistencia a antibióticos inherente. Entre estos organismos se encuentra el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria Gram negativa posee una resistencia inherente a diversos antibióticos (153-155).

Dentro de los mecanismos por los cuales esta bacteria presenta esta resistencia intrínseca se encuentran la expresión de β - lactamasas, la reducida capacidad de importación de moléculas debido a la baja eficiencia de sus porinas y la expresión de genes de resistencia mediante la eliminación por mutación de supresores. Esta bacteria se encuentra en infecciones nosocomiales, tanto en pacientes con fibrosis quística, como en quemaduras y en pacientes inmunosuprimidos. Debido a la frecuencia con la que ocurren estas infecciones, y dado a la resistencia a antibióticos que presenta esta bacteria, es de interés generar o identificar moléculas antimicrobianas con actividad contra este tipo de patógenos.

Por otro lado, la identificación directa de péptidos agonistas y antagonistas abren camino a entender las regiones de la quimiocina implicadas en la inducción de cada actividad. Por un lado, esto aporta datos relevantes en cuanto a los mecanismos de inducción de estas proteínas. Finalmente, la utilización de estos péptidos y/o la generación de variantes con mayor afinidad o actividad podrán ser aplicadas de manera directa en varias patologías en las cuales participa esta quimiocina.

V. HIPÓTESIS

La quimiocina CCL13 presenta regiones que promueven diferentes respuestas funcionales como quimiotaxis, flujo de calcio y actividad antimicrobiana. Las secuencias contenidas en estas regiones podrían actuar de manera independiente, lo que permitiría inducir o inhibir de manera diferencial las respuestas generadas por esta quimiocina.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las regiones de CCL13 involucradas en las respuestas funcionales de esta quimiocina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la actividad biológica de péptidos sintéticos de CCL13 en ensayos de quimiotaxis y flujo de calcio, buscando péptidos agonistas y antagonistas.

.Analizar la estructura de los péptidos sintéticos con actividad agonista o antagonista.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Péptidos

Se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia de la quimiocina CCL13 (Figura 3, Tabla 4). La secuencia de estos péptidos fue verificada por secuenciación en el extremo amino para comprobar su identidad.

Péptido	Aminoácidos	Secuencia	Punto isoeléctrico/P.M.
CDP-1	1-18	QPDALNVPSTCCFTFSSK	5.82 / 1945.19
CDIP-2	19-37	KISLQRLKSYVITTSRCPQ	10.31 / 2221.65
CDP-3	38-56	KAVIFRTKLGKEICADPKE	9.11 / 2146.58
CDAP-4	57-75	KWVQNYMKHLGRKAHTLKT	10.58 / 2339.79

Tabla 4. Secuencia de los péptidos sintéticos. Se muestra el número de aminoácidos correspondientes a la quimiocina CCL13, su secuencia, peso molecular (P.M.) y punto isoeléctrico calculado.

Quimiotaxis

Para determinar el efecto de la quimiocina y los péptidos en la migración de células se usan ensayos de quimiotaxis.

Se usó una línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC; TIB-202). Esta línea se mantuvo en cultivo usando un medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, y con piruvato de sodio 1mM, glutamina, 2mM penicilina/streptomina, aminoácidos no-esenciales (0.1 mM), y β -2 Mercaptoetanol (5×10^{-5} M). Estas células se mantuvieron a una densidad de 0.2 a 0.8 millones por mililitro a 37° con 5% de CO₂.

Las células a una densidad de 5 millones por mililitro son marcadas incubando 15 minutos a 37° con el fluoróforo calceína AM (Molecular Probes, C1430) a una concentración de 0.5 micromolar. Las células se lavan 2 veces centrifugando a 1000 rpm por 4 minutos en una minicentrífuga Beckman y descartando el medio. En los ensayos de inhibición las células son

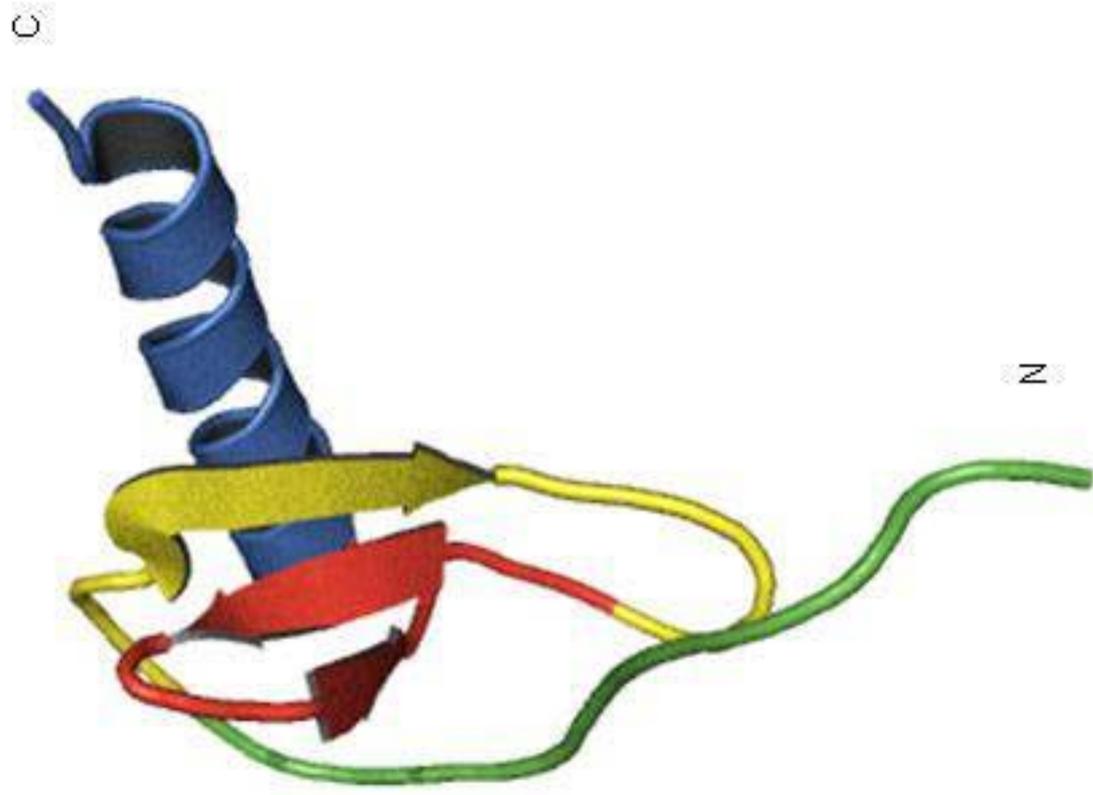


Figura 3: Localización de los péptidos de la quimiocina CCL13 en el contexto de la estructura de las quimiocinas. El péptido CDP-1 (1-18) se muestra en verde, péptido CDIP-2 (19-37) en amarillo, péptido CDP-3 (38-56) en rojo y péptido CDAP-4 (57-75) en azul.

preincubadas con la molécula a probar durante 15 minutos a una temperatura de 4°. Las quimiocinas liofilizadas (Peprotech #300-24, 300-17, 250-04 y 300-04) se disuelven en agua desionizada estéril llegando a una concentración de 1 miligramo por mililitro. A partir de esta solución se hacen diluciones en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (GIBCO # 14170-112) sin calcio y magnesio; suplementando con albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA# A-1933) libre de endotoxinas a una concentración final de 0.5 gramos por litro. Las quimiocinas se cargan en la parte inferior de una cámara modificada de Boyden (Neuroprobe AP48). En la parte intermedia se utilizó una membrana de policarbonato con poros de 5 micras (Neuroprobe PFD5). Las células marcadas resuspendidas en HBSS con calcio y magnesio (GIBCO# 14025076) se cargan en la parte superior de la cámara y se deja a una temperatura de 37° durante 1 ½ horas.

Después del tiempo de incubación se desarma la cámara y se raspan las células que no migraron con un scrapper (Neuroprobe# P48AP) lavando con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO₄ 10 mM Y KH₂PO₄ 2mM, pH 7.4). La membrana se deja secar al aire y se fija con una solución de metanol. Para medir las células que migraron se usó un detector de fluorescencia (FX, Biorad)

Determinación de Flujo de Calcio en Citómetro

Las células a una densidad de 10X10⁶ son incubadas con una solución con 6 µg/ml Fura Red (Molecular Probes# F-3021), 10 µg/ml Fluo 3 (Molecular Probes# F-1242), ácido plurónico (Molecular Probes# P-6867) a 0.1% en RPMI sin suero durante 45 min a 37° en oscuridad. Posteriormente las células son lavadas con RPMI dos veces centrifugando a 1,500 rpm durante 5 min. Las células se incuban 45 min en RPMI sin suero a temperatura ambiente para equilibrar. Posteriormente se lavan 2 veces centrifugando a 1,500 rpm durante 5 min. Las células se conservan a 4° hasta que son utilizadas en el citómetro. Para pasar las células con el citómetro se diluyen en 1 ml de RPMI sin suero para una densidad final de 1.6X10⁶ células por ml. Las células se mantienen a 37° usando un baño. Los resultados se grafican calculando la relación entre las 2 fluorescencias con respecto al tiempo.

Modelo de inflamación in vivo

Para determinar el efecto del péptido CDIP-2 en un proceso de inflamación *in vivo*, se utilizó un sistema de inflamación inducido por tioglicolato. Ratones machos Balb-c AMN de 6 a 8 semanas son inyectados vía intraperitoneal con 3 ml de tioglicolato al 3%. Para inhibir el proceso inflamatorio se inyectó péptido diluido en PBS vía intraperitoneal 24 horas después de la estimulación con tioglicolato, 48 horas después de la estimulación con tioglicolato, los ratones son sacrificados y las células de la cavidad peritoneal se extraen mediante lavados con PBS. Las células obtenidas son contadas y se preparan en portaobjetos mediante un cytopspin. Estas laminillas son teñidas utilizando una tinción de Giemsa para realizar un conteo diferencial de células.

Actividad antimicrobiana

Las bacterias (*Escherichia coli* (ATCC 25922 y 39403), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (ATCC 9993) y *typhimurium* (ATCC 14028) son crecidas en medio líquido (5% soya tripticasa) a partir de un inóculo crecido "overnight" (*E. coli* y *S. typhi*) o en placa y resuspendidas en medio líquido (*P. aeruginosa*) hasta llegar a una densidad óptica entre 0.1 y 1 a 620 nm. Una densidad de 1 corresponde a $1-5 \times 10^8$ bacterias por ml. Las bacterias son diluidas en medio soya tripticasa al 1% en buffer de fosfatos 10mM pH 7.4 hasta llegar a una densidad de $1-5 \times 10^7$ microorganismos por ml. Se inoculan 10 μ l de esta suspensión (total de 5×10^5 microorganismos/ml) a 50 μ l de una dilución de péptido o quimiocina en medio soya tripticasa al 1% en buffer de fosfatos. Esta mezcla se incuba durante 3 horas a 37°. Una dilución de este cultivo es sembrado en placas de Agar-LB. Posteriormente, 25 μ l son mezclados con 25 μ l del reactivo Bactiterglo (Promega G8230) para detectar células viables. Este reactivo utiliza la enzima luciferasa para cuantificar el ATP presente en el cultivo de bacterias, lo que indica de manera indirecta el número de bacterias viables. El reactivo y las bacterias se incuban a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se utiliza una placa opaca para detectar la señal de

luminiscencia en un luminómetro (TheReporter, Turner Biosystems). Para calcular la viabilidad se utilizan bacterias sin tratar.

Para determinar el efecto de los péptidos en aislados clínicos de *P. aeruginosa* (obtenidas del Programa de Investigación Médico Microbiológico de la UNAM) (PIMM-UNAM) y de *Klebsiella pneumoniae* (PIMM-UNAM28), las bacterias crecidas en placa fueron resuspendidas hasta llegar a una densidad de 0.5 McFarland. Posteriormente fueron diluidas hasta una densidad de 5×10^5 microorganismos por ml y utilizadas con el kit Bactiter-glo.

En los ensayos de actividad en presencia de sal, se agregó cloruro de sodio (NaCl) a la mezcla de reacción en concentraciones de 50 a 200 mM.

Microscopía Electrónica.

Para determinar el efecto de los péptidos en la estructura de las bacterias, se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión. Brevemente, las bacterias (*P. aeruginosa*) fueron tratadas 3 horas a 37°C con los péptidos (0.42 y 4.2 μ M) y fijadas posteriormente utilizando una solución de glutaraldehído al 2.5%. Estas muestras fueron procesadas en el servicio de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular.

Modelos de estructura tridimensional de la quimiocina CCL13.

Para generar el modelo de la quimiocina CCL13 se utilizó el programa QUANTA (Accelrys). La estructura de la quimiocina CCL2 (1DOK) fue utilizada como base en el modelo de CCL13. La secuencia de CCL2 fue reemplazada con los aminoácidos de CCL13. La estructura resultante fue sometida a ciclos de minimización, seguidos de hidratación de la molécula y calentamiento a 37°C. Para construir las superficies de potencial electrostático se utilizó el programa GRASP (156). Las superficies fueron contorneadas utilizando valores de +/- 5 kT. Las superficies positivas son coloreadas en azul y las negativas en rojo.

Modelaje de la estructura de péptidos de la quimiocina.

Para la simulación de dinámica molecular y el análisis subsiguiente se utilizó el programa GROMACS <http://www.gromacs.org/>. Para la simulación el péptido de CCL13 CDAP-4 fue modelado inicialmente como una hélice α ideal

utilizando el programa SPDBV <http://ca.expasy.org/spdbv/>. Este péptido de 19 aminoácidos contiene 2 histidinas que fueron modeladas en su forma neutral (HISB). La hélice de 19 aminoácidos fue solvatada de manera independiente en una caja de 5.414 nm x 5.414 nm x 5.414 nm llena con 5091 SPC (simple point charge) moléculas de agua y cinco iones de cloro como contra carga. La distancia mínima de la proteína al borde de la caja de simulación fue de 1.0 nm. Las moléculas de agua sobrelapantes se removieron cuando la distancia entre un átomo de solvente y un átomo de la proteína fue menor a la suma de sus radios de van der Waals. La minimización de energía del solvente fue realizada utilizando el algoritmo “steepest descent” durante 100 pasos. Posteriormente, se realizó una dinámica molecular restringida de 100 picosegundos (ps) para permitir que las moléculas de agua y de la proteína se relajen. Durante esta simulación, los átomos del péptido fueron armónicamente restringidos en su posición en la caja utilizando una fuerza constante de 1000 kJ por mol por nm². La temperatura fue controlada por acoplamiento débil a un baño de temperatura constante ($T_0=310$ K, tiempo de acoplamiento $t_t=0.1$ ps) mientras que la presión fue controlada utilizando un acoplamiento débil a un baño a presión constante ($P_0=1$ bar, tiempo de acoplamiento $t_t =0.5$ ps). La dinámica molecular libre fue realizada por 10 nanosegundos con las mismas constantes de acoplamiento de temperatura y presión de la corrida restringida.

Cálculos de potencial electrostático de péptidos.

Los potenciales electrostáticos fueron calculados mediante la ecuación linealizada de Poisson-Boltzmann utilizando el programa “Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) “, versión 0.4.0 (157). Posteriormente se utilizó el programa PDB2PQR versión 1.1.2 (158) y el programa PROPKA versión 1.0 (159) para construir átomos de hidrógeno en la estructura y para asignar cargas atómicas parciales utilizando un campo de fuerza CHARMM y un pH de 7.4 (157).

Para visualizar las moléculas se utilizó el programa PyMol versión 0.99 (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Los potenciales electrostáticos fueron calculados utilizando celdas rectangulares de un tamaño de 97, 97,129 puntos en los ejes x, y, z. Para cada péptido se generaron 2 mallas rodeando la molécula. Una malla laxa con

tamaños de 70, 70, 120 Å en x, y, z, y una malla fina con un tamaño de 65, 65, 107 Å en x, y, z.

Durante el cálculo la constante dieléctrica del solvente fue fijada en 78.54 y la constante dieléctrica del soluto en 2.0. El radio de los iones de sodio y potasio fueron fijadas en 1.16 Å y 1.67 Å respectivamente. La temperatura fue fijada a 298.15 K.

Análisis Comparativo de Potenciales Electroestáticos.

Para comparar el potencial electrostático de péptidos carboxilo terminal se utilizaron las estructuras descritas de diversas quimiocinas con y sin actividad antimicrobiana descrita. Los archivos de estructura PDB fueron editados utilizando el programa PyMol para eliminar el resto de la proteína y dejar exclusivamente la porción carboxilo terminal a analizar. El potencial electrostático de estos péptidos fue calculado utilizando el mismo procedimiento que para el péptido de CCL13. Posteriormente se utilizó el programa Chimera (160) para calcular el volumen que abarcan los potenciales electrostáticos. Estos volúmenes fueron utilizados para calcular el porcentaje de volumen positivo presente en la molécula.

VIII. RESULTADOS

Capacidad quimiotáctica de los péptidos.

Para identificar los residuos de CCL13 involucrados en su actividad se sintetizaron péptidos con un tamaño de entre 18 y 20 aminoácidos con la secuencia de CCL13 (Figura 3). Estos péptidos pueden tener las secuencias suficientes para unirse a los receptores de CCL13 e inducir una o más respuestas como quimotaxis y flujo de calcio.

Para determinar la funcionalidad de los péptidos sintéticos en quimiotaxis, se usaron diferentes concentraciones de péptido como quimioatrayente de células THP-1. Estas células expresan 2 de los receptores de CCL13: CCR1 y CCR2. Como control positivo se usó la quimiocina CCL13 y como blanco se empleó HBSS (Figura 4).

La quimiocina CCL13 indujo quimiotaxis con un pico de actividad a una concentración de 0.1 μM . En esta concentración se ha reportado el pico de actividad de CCL13 en células mononucleares (142).

Los péptidos CDP-1 (1-18), CDIP-2 (19-38), CDP-3 (39-57) y CDAP-4 (58-75) no fueron capaces de inducir quimiotaxis en las células THP-1, la actividad no fue obtenida aun usando concentraciones mayores a las que la quimiocina completa tiene su pico de actividad.

Inducción de Flujo de Calcio

Estos ensayos se realizaron utilizando el citómetro (FACS). El flujo de calcio se calculó usando la relación entre la fluorescencia emitida por Fura Red y Fluo 3. En estos experimentos se adicionaron los péptidos CDIP-1 (1-18), CDP-2 (19-38), CDP-3 (39-57) y CDAP-4 (58-75) a una concentración de 4.25 μM a las células THP-1. Como control positivo de flujo de calcio se empleó la quimiocina CCL13 a una concentración de 0.1 μM . Los péptidos no indujeron un flujo de calcio detectable a estas concentraciones. En contraste, la quimiocina mostró una inducción de flujo de calcio en estas células (Figura 5).

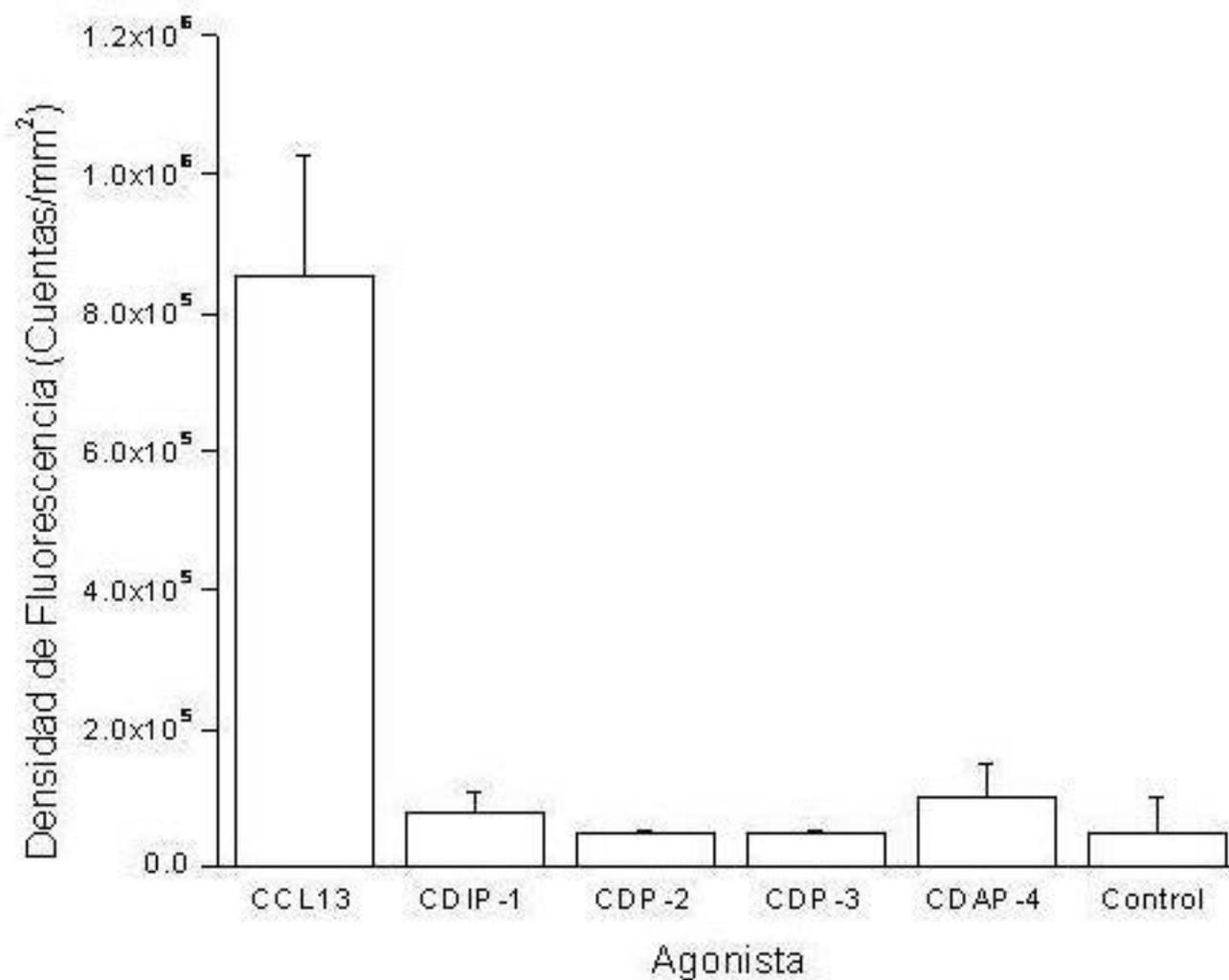


Figura 4: Actividad agonista de péptidos de la quimiocina CCL13. Se utilizaron cada uno de los péptidos sintéticos (0.42 μM) y la quimiocina CCL13 (0.1 μM) en ensayos de quimiotaxis con células THP-1. La migración se cuantifica por fluorescencia de el marcador Calceína AM.

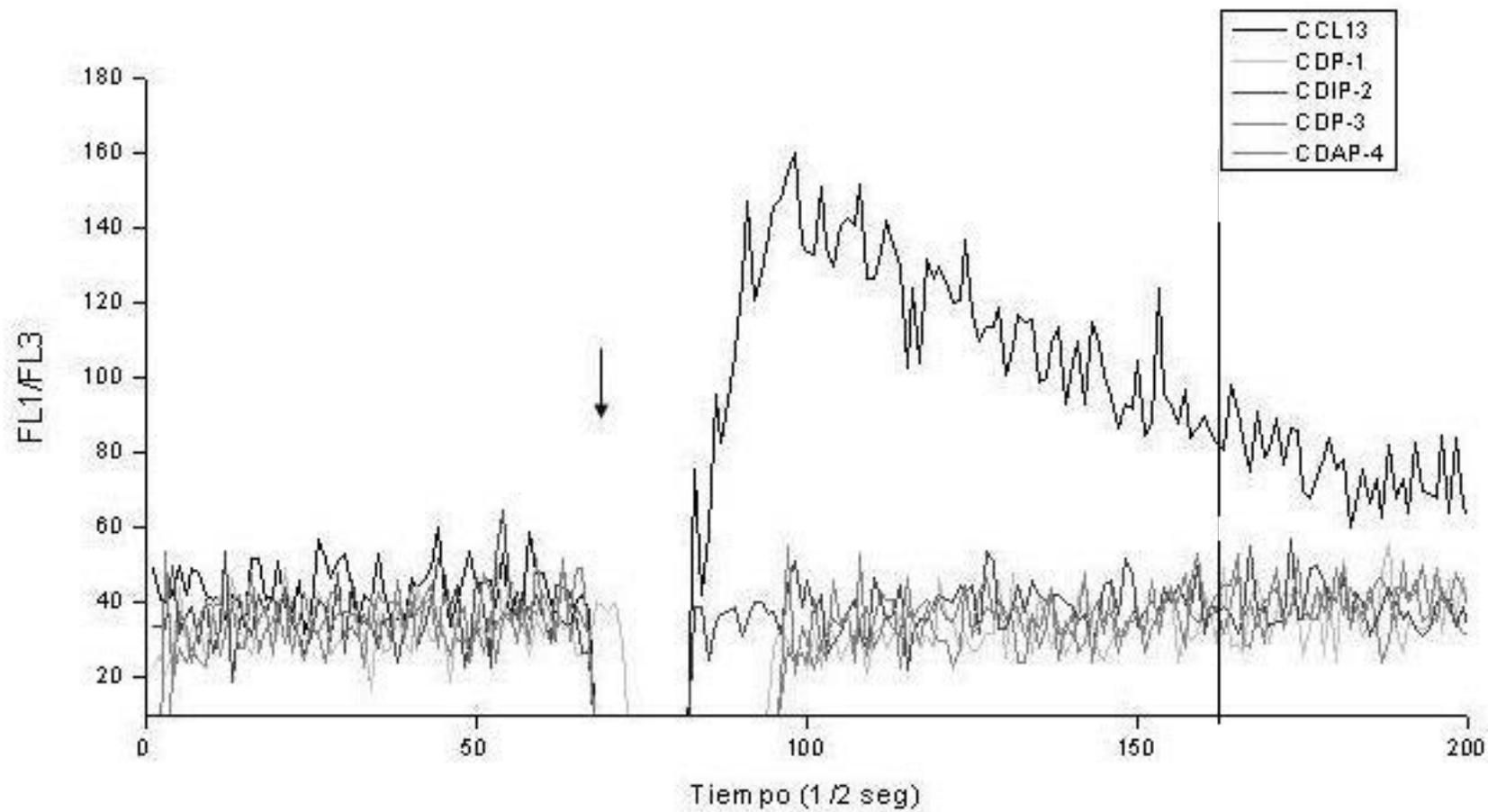


Figura 5: Ensayo de flujo de calcio con células THP-1. Las células son cargadas con los fluoróforos FURA-2 y FLUO-3. Posteriormente son estimuladas con los péptidos ($4.25 \mu\text{M}$) y con la quimiocina CCL13 ($0.1 \mu\text{M}$) (Flecha). La fluorescencia es detectada y cuantificada en el citómetro.

Inhibición de quimiotaxis en células THP-1

Para determinar si los péptidos son capaces de unirse al receptor, pero no de activarlo, ocupando el receptor y antagonizando con la actividad de la quimiocina completa, o si son capaces de interferir en los procesos de migración por otros mecanismos; se realizaron ensayos de inhibición de quimiotaxis preincubando las células con los péptidos (2 μM) y con la quimiocina CCL13 (0.1 μM). Estas células se usaron en ensayos de quimiotaxis, usando una sola concentración de CCL13 (0.05 μM).

La quimiocina CCL13 inhibió la migración de las células en respuesta a la misma quimiocina debido a que es capaz de unirse a los receptores CCR1 y CCR2, posiblemente internalizando los receptores. Esta inhibición también puede ser atribuida a que se tienen concentraciones de quimioatrayente en las dos partes de la cámara y no se forma un gradiente.

Por otro lado, se observó que el péptido CDIP-2 (19-37) es capaz de inhibir la quimiotaxis hacia la quimiocina CCL13. Ninguno de los otros péptidos logro inhibir de manera significativa la migración inducida por CCL13 (Figura 6).

Para determinar si el efecto de inhibir la quimiotaxis mediada por CCL13 del péptido CDIP-2 (19-37) es dependiente de concentración, se usaron diferentes concentraciones del péptido CDIP-2 de 1 a 4 μM y el péptido CDP-1 (1-18) en ensayos de inhibición de quimiotaxis.

El péptido CDIP-2 (19-37) fue capaz de disminuir la quimiotaxis contra CCL13 después de ser incubado con las células THP-1. Este efecto aumenta al aumentar la concentración del péptido. No se observó este efecto inhibitorio al utilizar el péptido CDP-1 (Figura 7).

Esta quimiocina comparte varios receptores con los otros miembros de la subfamilia MCP. Para determinar si la quimiotaxis inducida por otras quimiocinas MCP es inhibida, se utilizaron las quimiocinas CCL2 y CCL7 en ensayos de inhibición de quimiotaxis. Las células fueron preincubadas con el péptido CDIP-2 (19-37) y posteriormente estimuladas con 0.05 μM de cada quimiocina. Se utilizó el péptido 1 (1-18) como control negativo. En estos ensayos se observa que ninguno de los péptidos es capaz de inhibir la quimiotaxis inducida por estos 2 ligandos (Figuras 8 y 9).

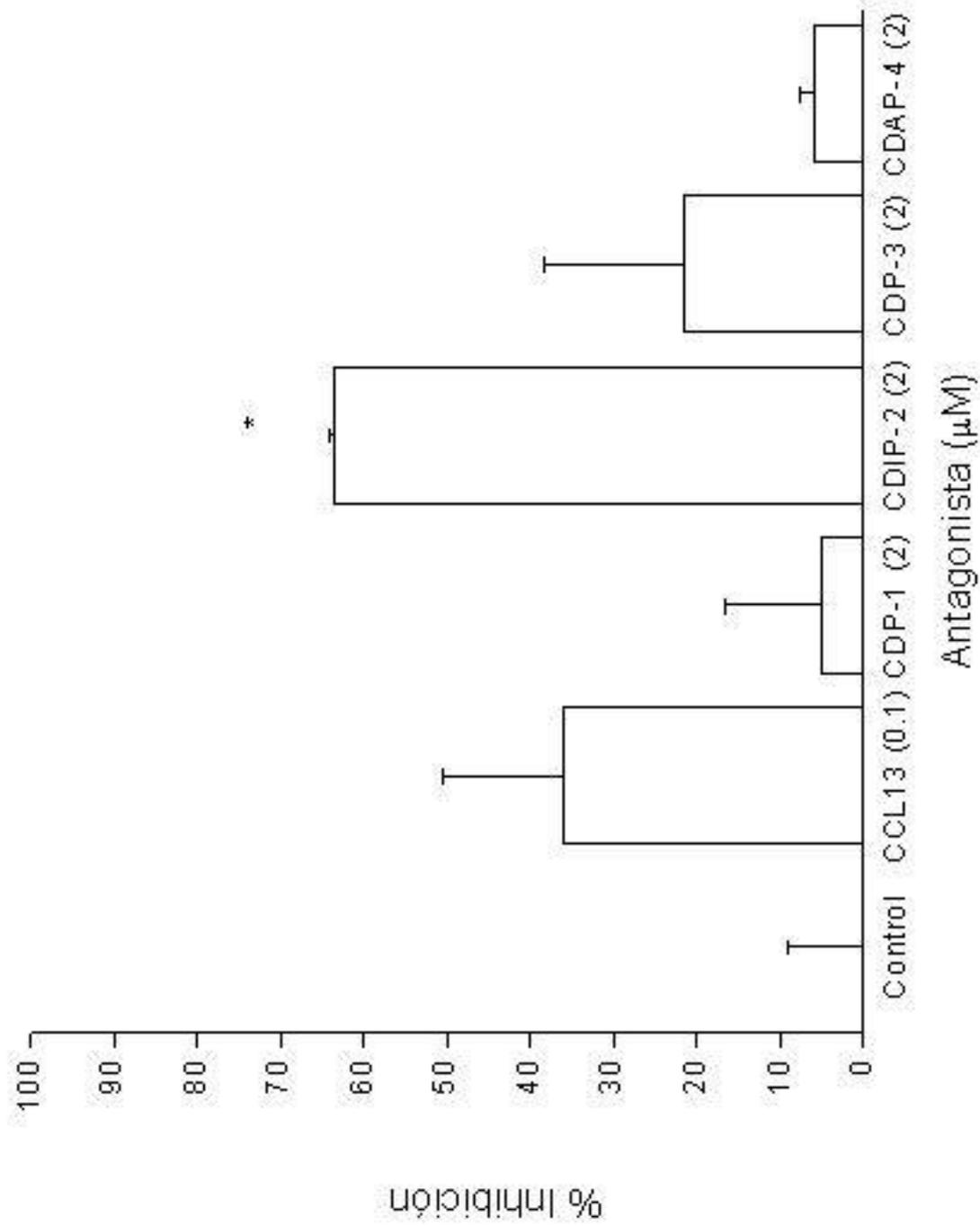


Figura 6: Actividad antagonista de péptidos derivados de la quimiocina CCL13. Se utilizaron cada uno de los péptidos sintéticos y CCL13 para inhibir quimiotaxis de células THP-1 hacia CCL13 (0.05 µM). El porcentaje de inhibición se calcula con respecto a células incubadas con medio HBSS. *P=0.01 comparado vs. Control.

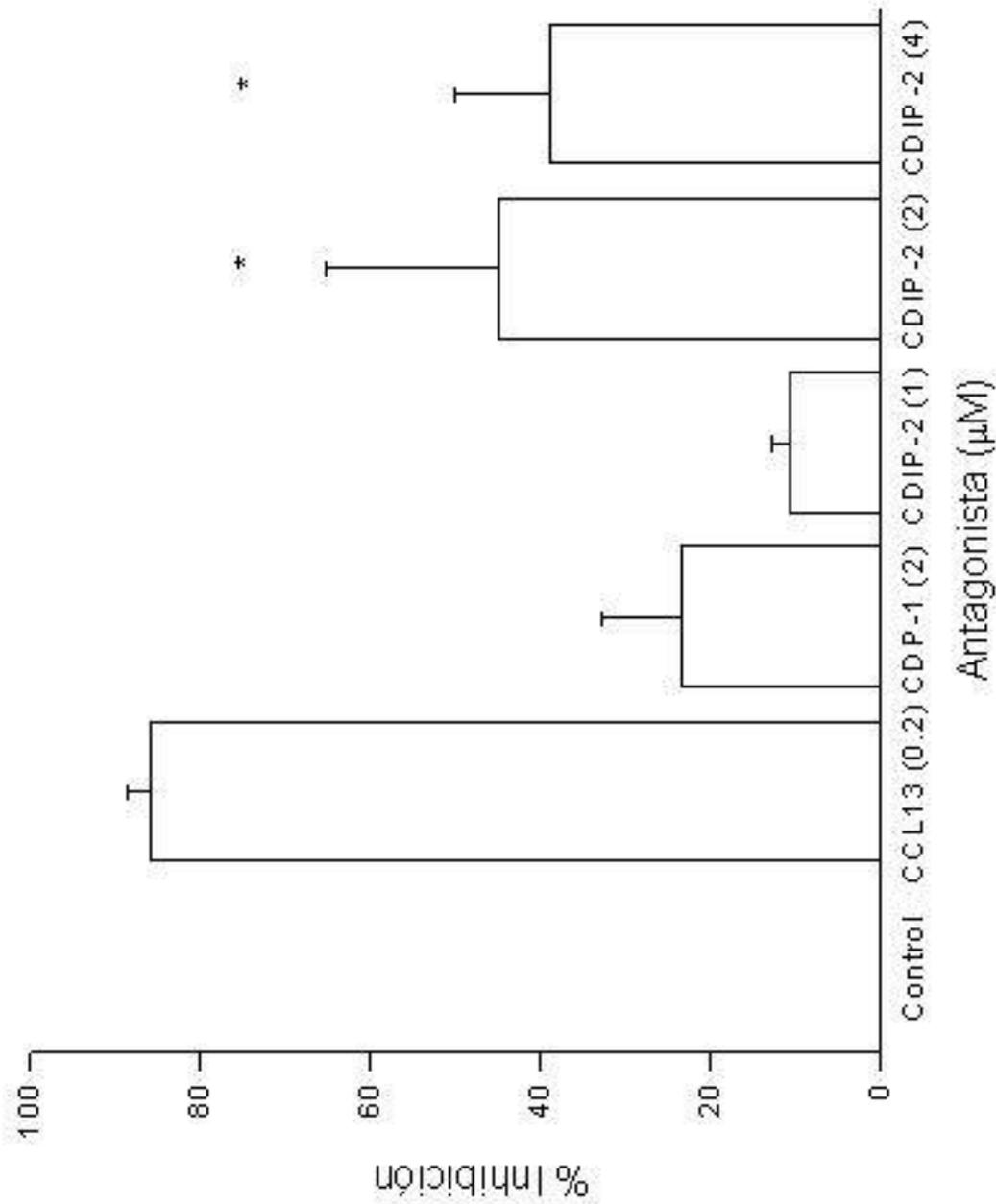


Figura 7: Capacidad antagonista de CDIP-2. Se utilizaron concentraciones crecientes del péptido para inhibir la quimiotaxis de células THP-1 hacia CCL13 (0.05 µM). El porcentaje de inhibición se calcula con respecto a células incubadas con medio HBSS. *P<0.005 comparado vs. Control.

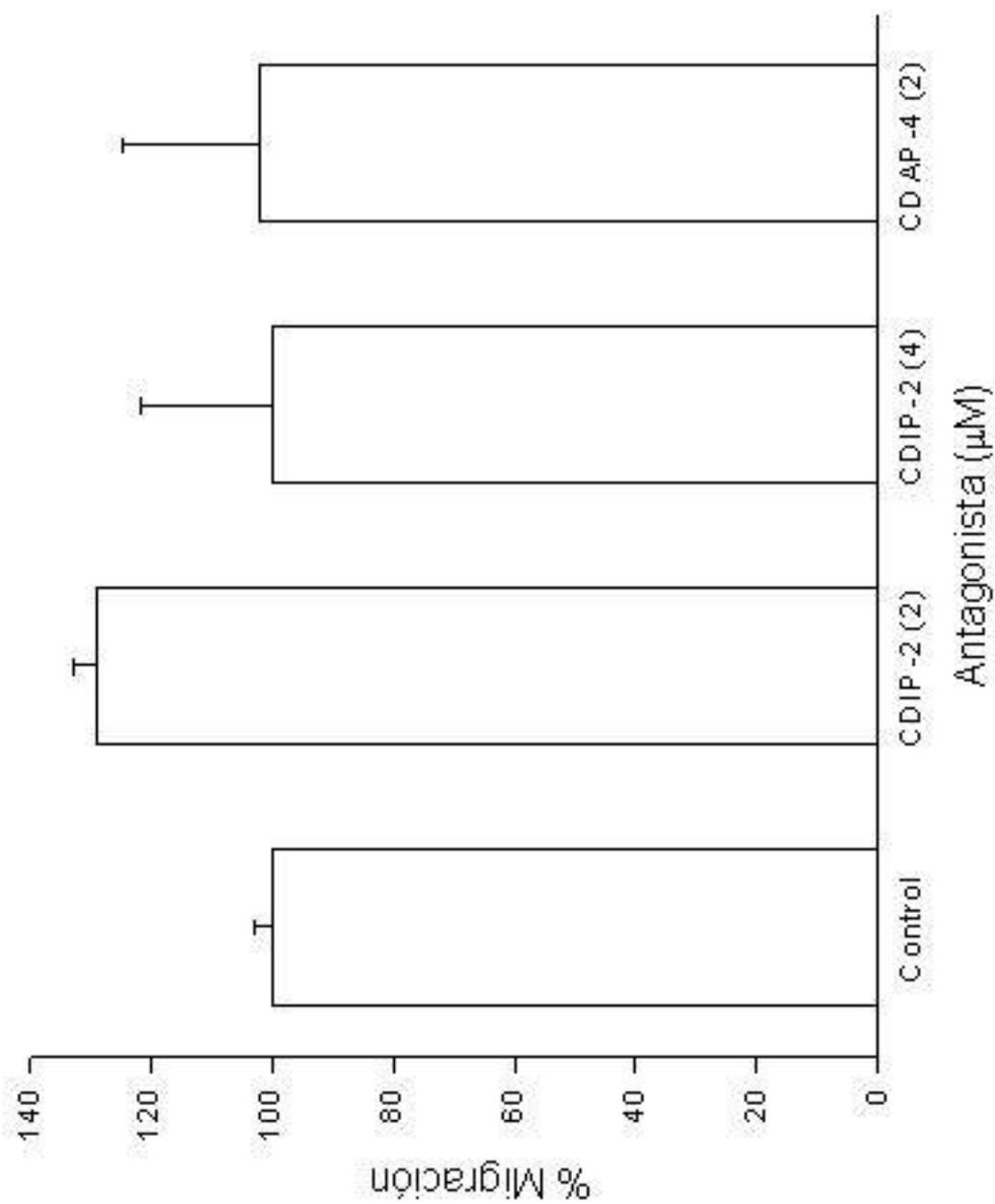


Figura 8: Ensayos de antagonismo contra CCL2. Se utilizaron concentraciones crecientes de CDIP-2 para inhibir la quimiotaxis de células THP-1 hacia CCL2 (0.05 µM). El porcentaje de migración se calcula con respecto a células incubadas con medio HBSS.

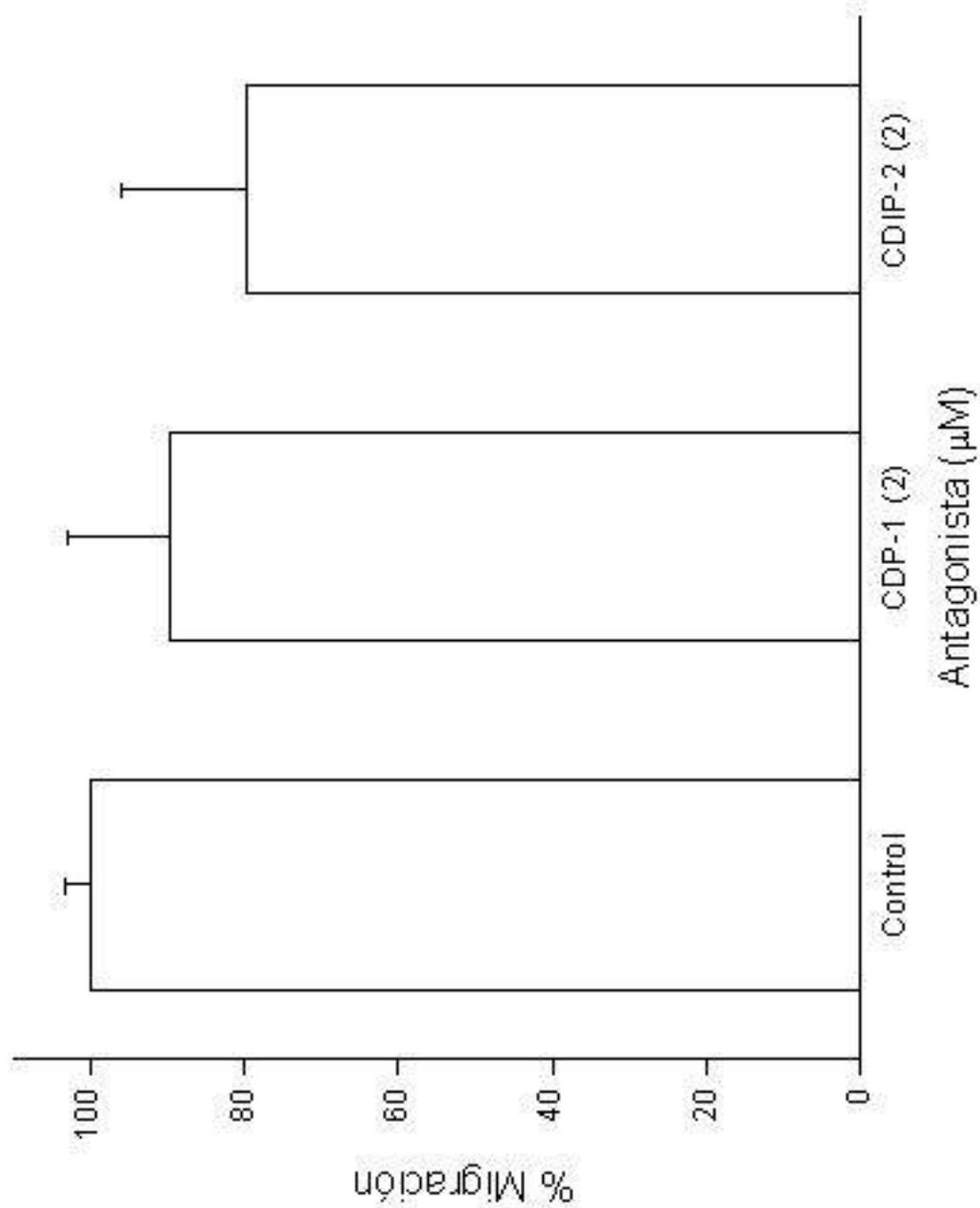


Figura 9: Ensayos de antagonismo contra CCL7. Se utilizó el péptido CDIP-2 para inhibir la quimiotaxis de células THP-1 hacia CCL7 (0.05 μM). El porcentaje de migración se calcula con respecto a células incubadas con medio HBSS.

Inhibición de flujo de calcio.

Para determinar si los péptidos CDP-1 y CDIP-2 tienen capacidad para inhibir actividades de la quimiocina CCL13 como el flujo de calcio se realizaron ensayos utilizando el FACS para medir esta respuesta. Se adicionó el péptido a una concentración de 4.25 μM . Posteriormente se agregó la quimiocina CCL13 a una concentración de 0.1 μM . No se observó un efecto inhibitorio en la respuesta de flujo de calcio (Figura 10).

Para comparar la respuesta con otras quimiocinas de la subfamilia MCP, se utilizaron los péptidos CDP-1 y CDIP-2 para evaluar la modulación del flujo de calcio inducido por CCL2 (MCP-1) y CCL7 (MCP-3) a una concentración de 0.01 μM . En ninguno de estos ensayos se observó una inhibición del flujo de calcio (Figuras 11 y 12).

Inhibición de inflamación *in vivo*.

Para determinar si la inhibición de quimiotaxis encontrada para el péptido CDIP-2 es extrapolable a procesos de inflamación *in vivo*, se utilizó un modelo de tioglicolato. En este modelo se induce una inflamación peritoneal por la inyección de una solución de tioglicolato en el peritoneo y se caracteriza por un infiltrado de macrófagos principalmente 72 horas post-estimulación. 24 horas después de la estimulación con tioglicolato se les fue suministrado 25 microgramos del péptido CDIP-2 vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados después de 72 horas, y las células fueron colectadas mediante lavado peritoneal utilizando PBS. Estas células fueron preparadas en laminillas para su caracterización utilizando una citofuga. Se observó que el número total de células infiltrantes se reduce al inyectar el péptido CDIP-2 a los ratones estimulados con tioglicolato. Esta reducción se observó al inyectar el péptido CDP-1, sin embargo la diferencia no fue significativa. Para realizar un estudio de las poblaciones celulares afectadas, se realizó una tinción diferencial con Giemsa. La población celular que se reduce principalmente son los macrófagos, mientras que el número de linfocitos no se afecta (Figura 13).

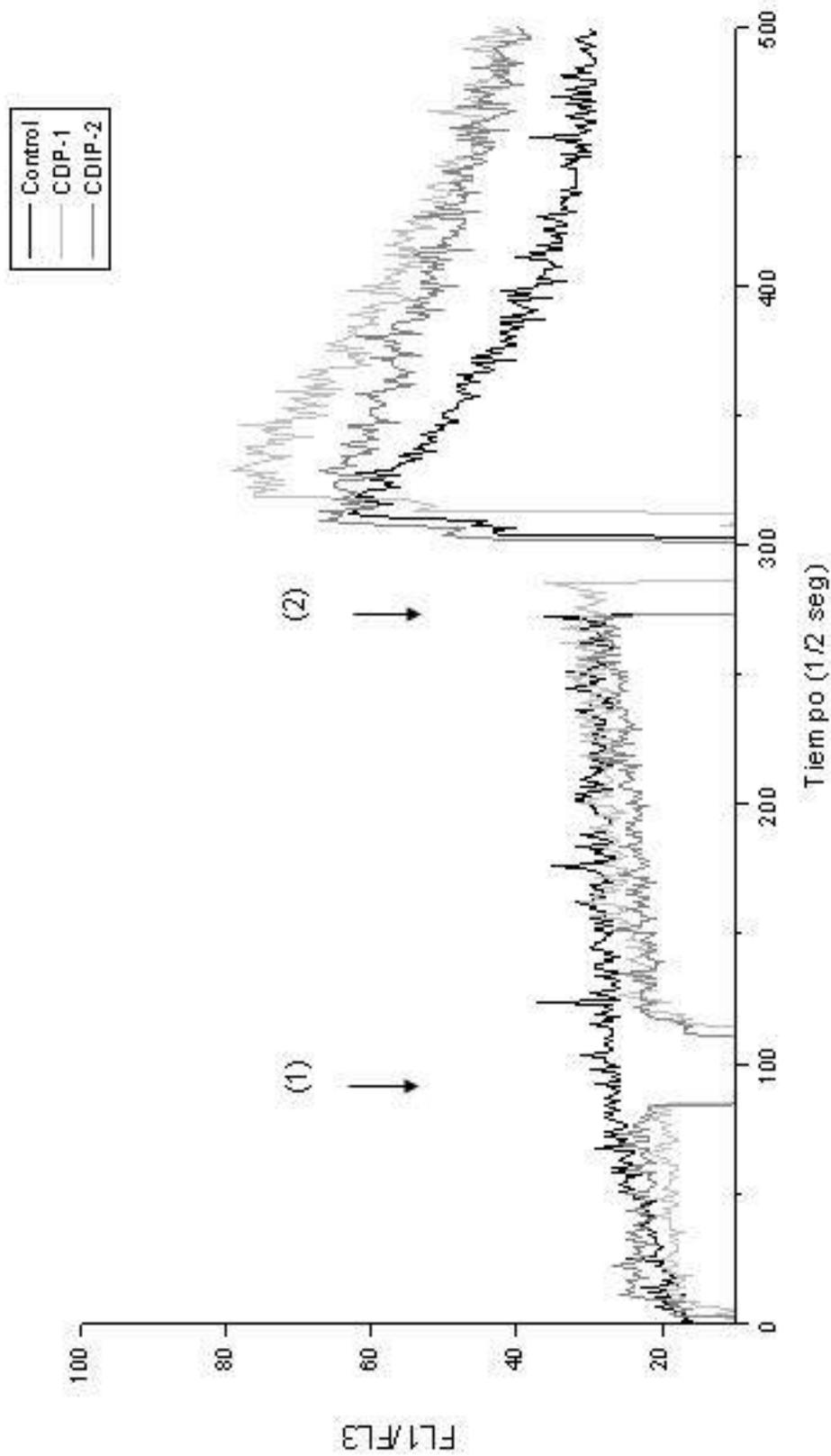


Figura 10: Ensayos de inhibición de flujo de calcio. Las células THP-1 fueron tratadas con $4.25 \mu\text{M}$ de cada péptido (flecha 1) antes de ser estimuladas con $0.1 \mu\text{M}$ de CCL13 (flecha 2). La fluorescencia fue monitoreada en el citómetro.

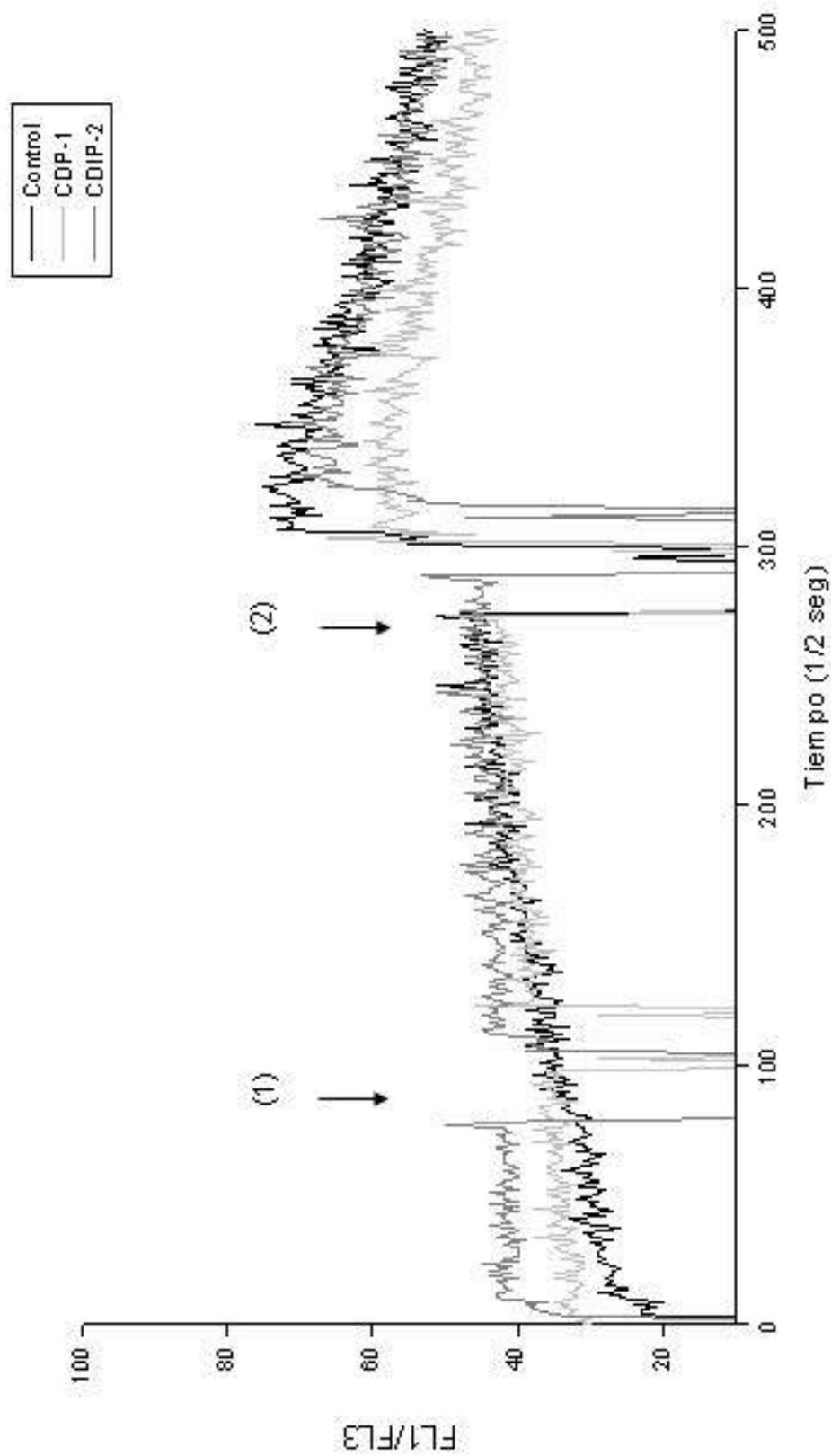


Figura 11 : Ensayos de inhibición de flujo de calcio. Las células THP-1 fueron tratadas con $4.25 \mu\text{M}$ de cada péptido (flecha 1) antes de ser estimuladas con $0.01 \mu\text{M}$ de CCL2 (flecha 2). La fluorescencia fue monitoreada en el citómetro.

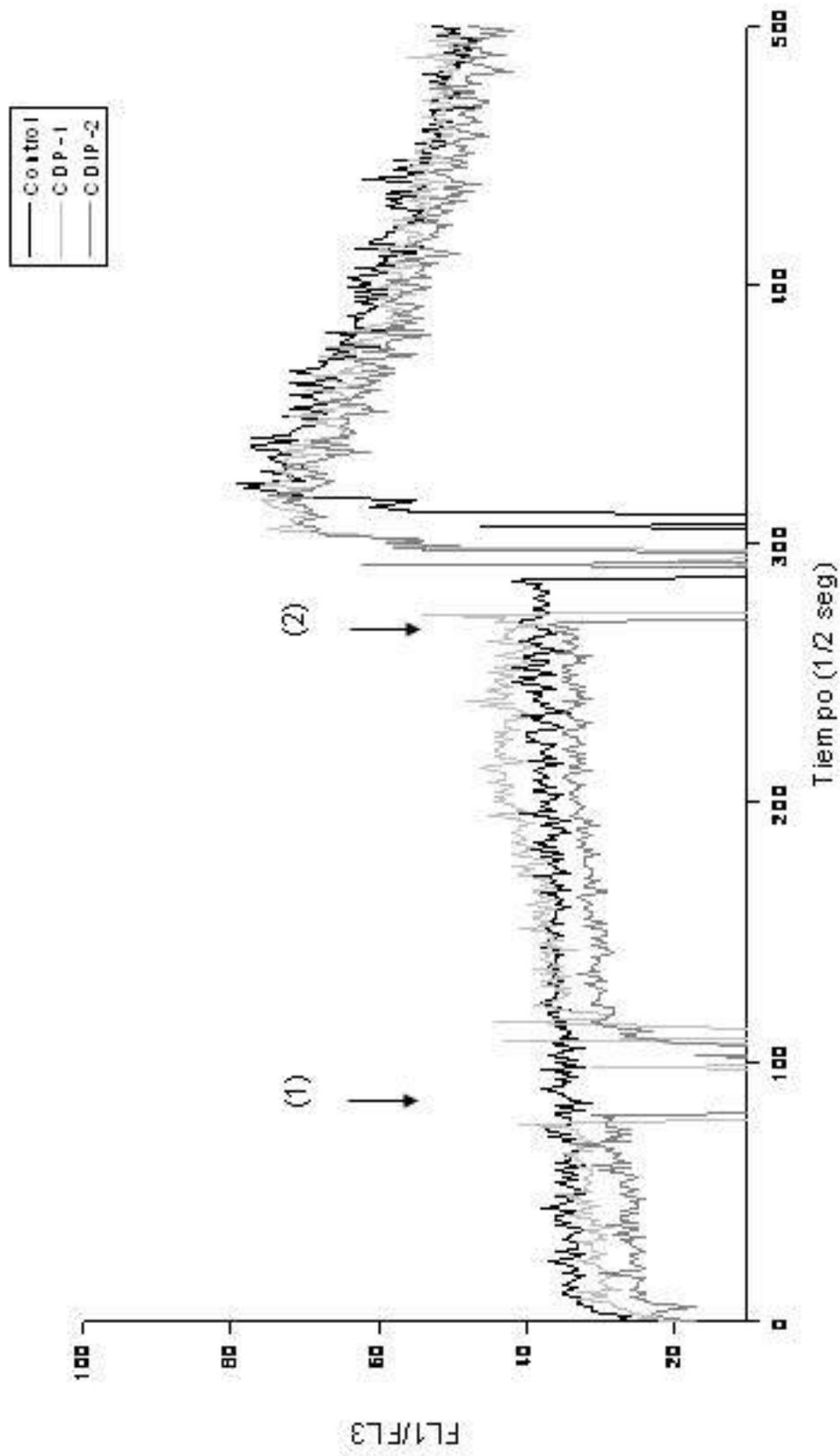


Figura 12: Ensayos de inhibición de flujo de calcio. Las células THP-1 fueron tratadas con $4.25 \mu\text{M}$ de cada péptido (flecha 1) antes de ser estimuladas con $0.01 \mu\text{M}$ de CCL7 (flecha 2). La fluorescencia fue monitoreada en el citómetro.

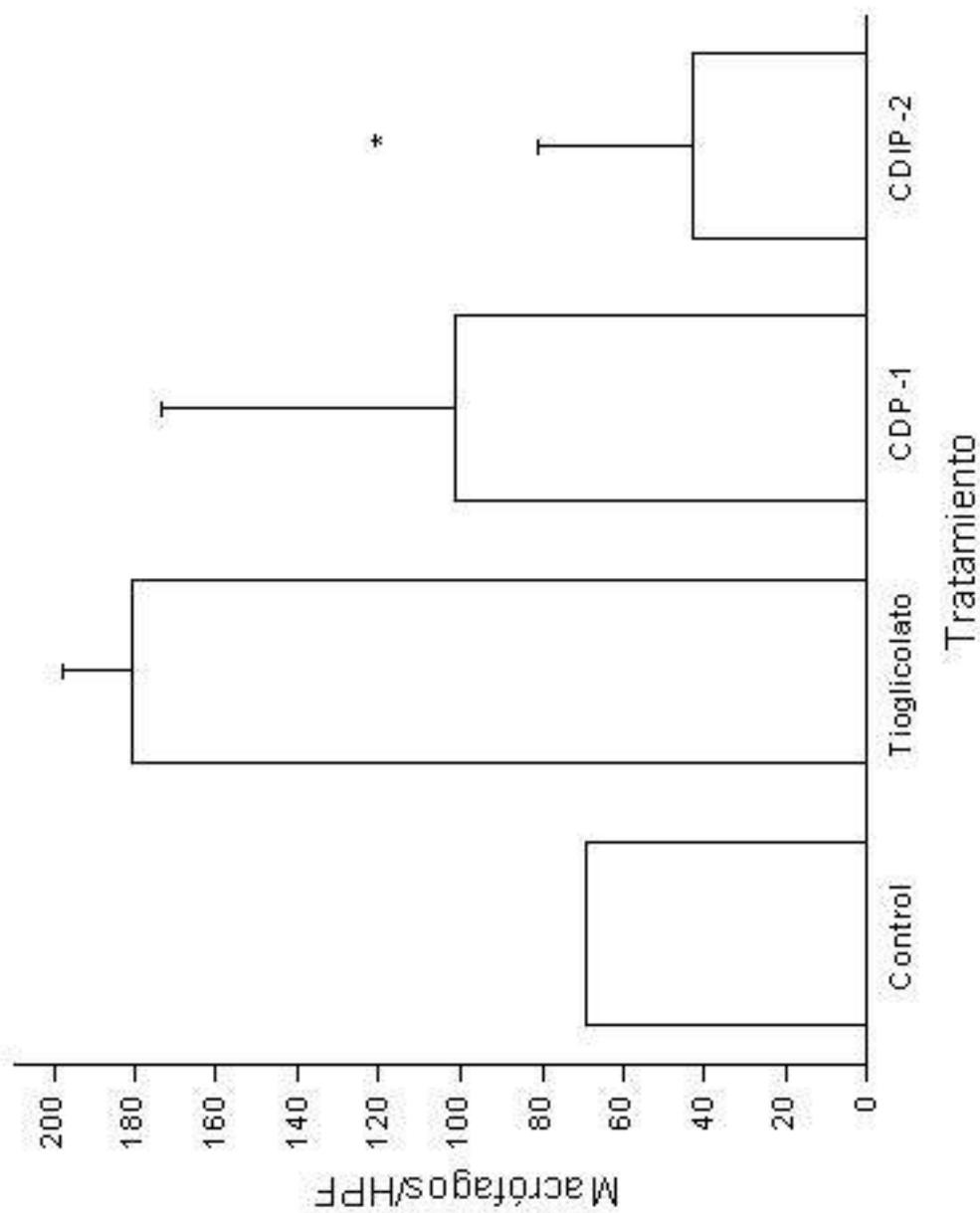


Figura 13: Ensayos de inhibición *in vivo*. Los ratones fueron tratados con 25 μg de cada péptido 24 horas después de ser estimulados con tioglicolato. Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se contaron las células obtenidas de lavados en el peritoneo. * $P \leq 0.05$ comparado vs. Tioglicolato.

Actividad antimicrobiana.

Para determinar si los péptidos derivados de CCL13 presentan actividad antimicrobiana, se realizaron ensayos en la bacteria *E. coli* JM103 (ATCC 39403). Posteriormente se plaquearon diluciones de las bacterias para conteo de colonias. En estos ensayos se encontró que 2 de los péptidos (CDIP-2 y CDAP-4) tienen actividad contra esta bacteria. Como control positivo se utilizó la quimiocina CCL13 completa (Figura 14). La actividad del péptido CDP-3 solo se obtiene utilizando concentraciones bajas de péptido. El péptido CDAP-4 mantiene una mejor actividad que los otros péptidos, por lo que se decidió explorar a detalle el intervalo de actividad que presenta este péptido.

Para determinar la actividad sobre la bacteria *E. coli* JM103 (ATCC 39403) de manera sensible se utilizó el kit Bactiter-glo para detectar bacterias viables. En estos ensayos se observó que el péptido CDAP-4 inhibe el 100% de las bacterias utilizando concentraciones de 3.4 μ M (Figura 15).

Adicionalmente en estos ensayos se utilizaron las bacterias Gram negativas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhi* y *S. typhimurium*. Encontramos que el péptido CDAP-4 es capaz de inhibir a las bacterias Gram negativas utilizadas.

Las bacterias más susceptibles en estos ensayos fueron *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. typhimurium*, mientras que la *E. coli* (ATCC 25922) muestra más resistencia a la actividad de este péptido (Tabla 5).

La susceptibilidad de *P. aeruginosa* a la actividad de este péptido motivó a explorar más en detalle las características de esta inhibición. En estos ensayos se utilizaron concentraciones de 0.42 a 13.6 μ M de CDAP-4. Se observó que a todas las concentraciones usadas CDAP-4 inhibe más del 80% a este microorganismo (Figura 16).

Actividad antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se utilizaron aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (PIMM-UNAM). Estos aislados presentan diferentes perfiles de resistencia a antibióticos. Para este análisis se incluyeron algunos aislados con alta multi-resistencia (PIMM-UNAM 17 y 18). En estos ensayos se utilizó una

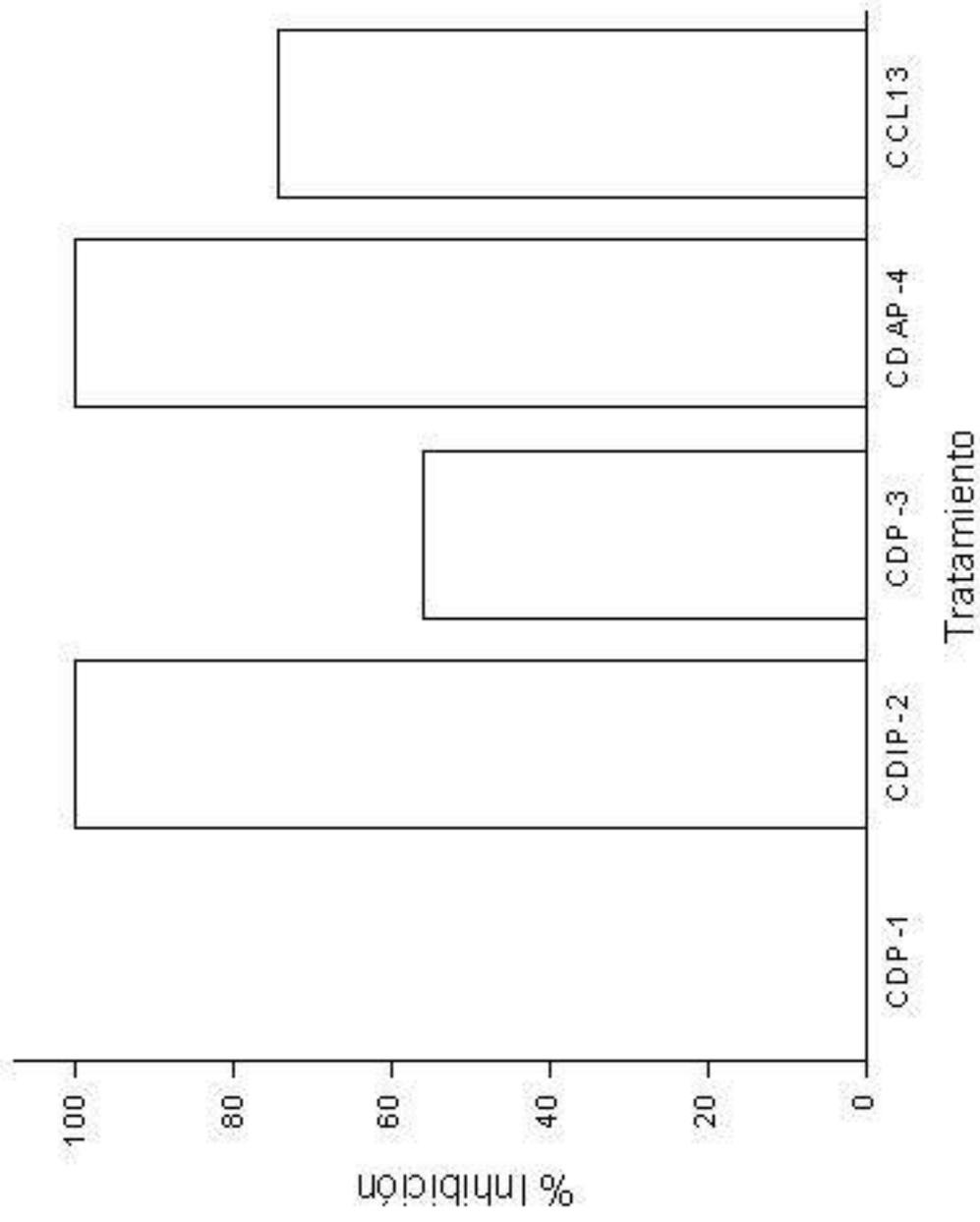


Figura 14. Actividad Antimicrobiana de péptidos de la quimiocina CCL13. La bacteria *E. Coli* ATCC 39403 fue incubada con 21.25 μM de cada péptido indicado o con 10 μM de quimiocina. Después de 3 horas se hicieron diluciones de las bacterias para sembrar en placas de LB-agar. El porcentaje de inhibición se calcula a partir de bacterias sin tratamiento.

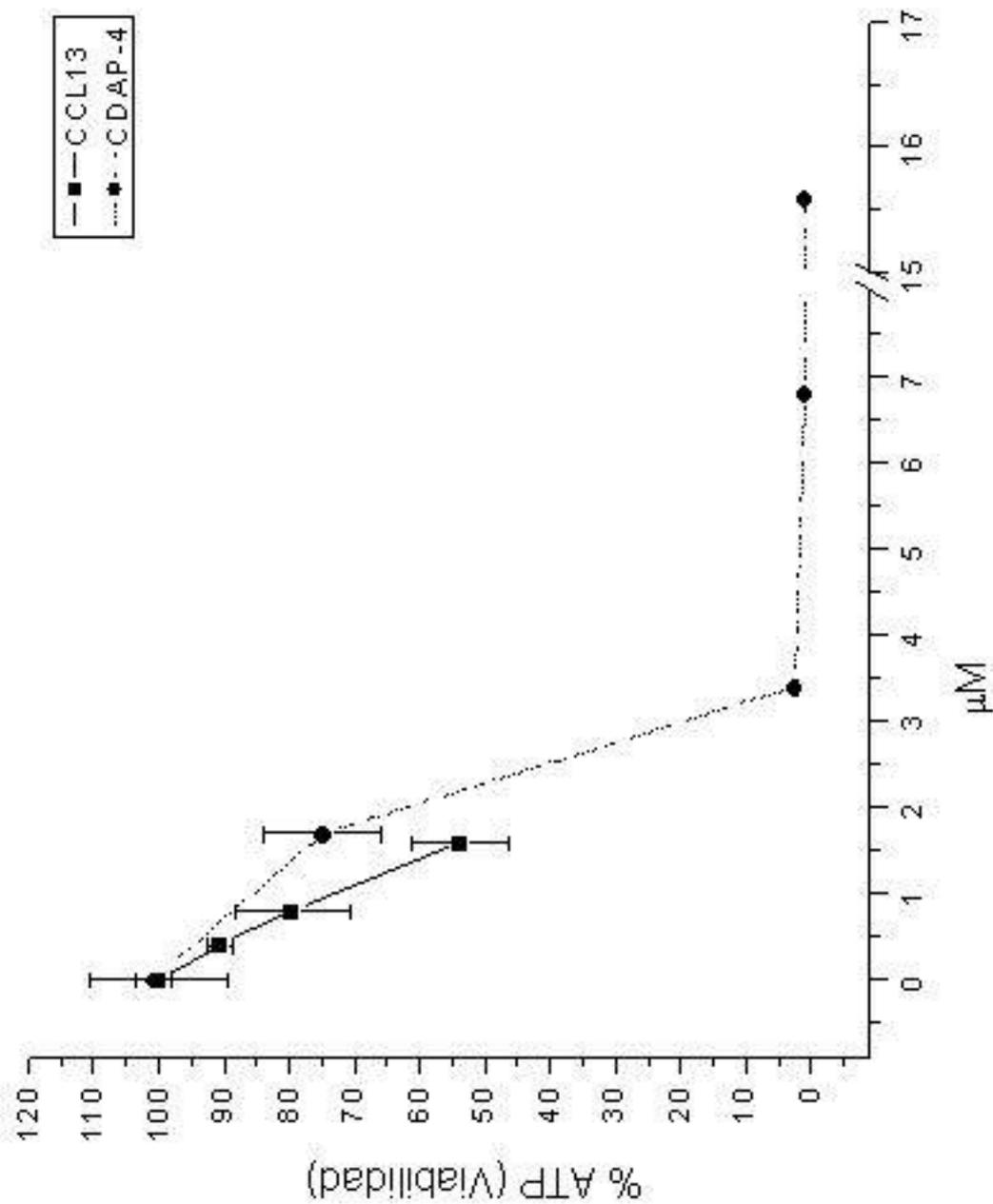


Figura 15. Actividad antimicrobiana de péptidos derivados de la quimiocina CCL13. La bacteria *E. Coli* ATCC 39403 fue incubada con concentraciones crecientes de cada molécula. Después de 3 horas se incubó con el reactivo Bacteri-glo para determinar viabilidad del cultivo.

Microorganismo	% Inhibición 3.4 μM	% Inhibición 6.8 μM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	47.0
<i>E. coli</i> ATCC 39403	97.5	99
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	91.0	91.6
<i>S. typhi</i> ATCC 9993	90.9	84.6
<i>K. pneumoniae</i> P1MM-UNAM 28	ND	47.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	91.0	91.6

Tabla 5: Actividad antimicrobiana de CDAP-4 sobre diferentes microorganismos. Se muestra el porcentaje de inhibición utilizando 2 diferentes concentraciones de cada péptido. ND= No determinado.

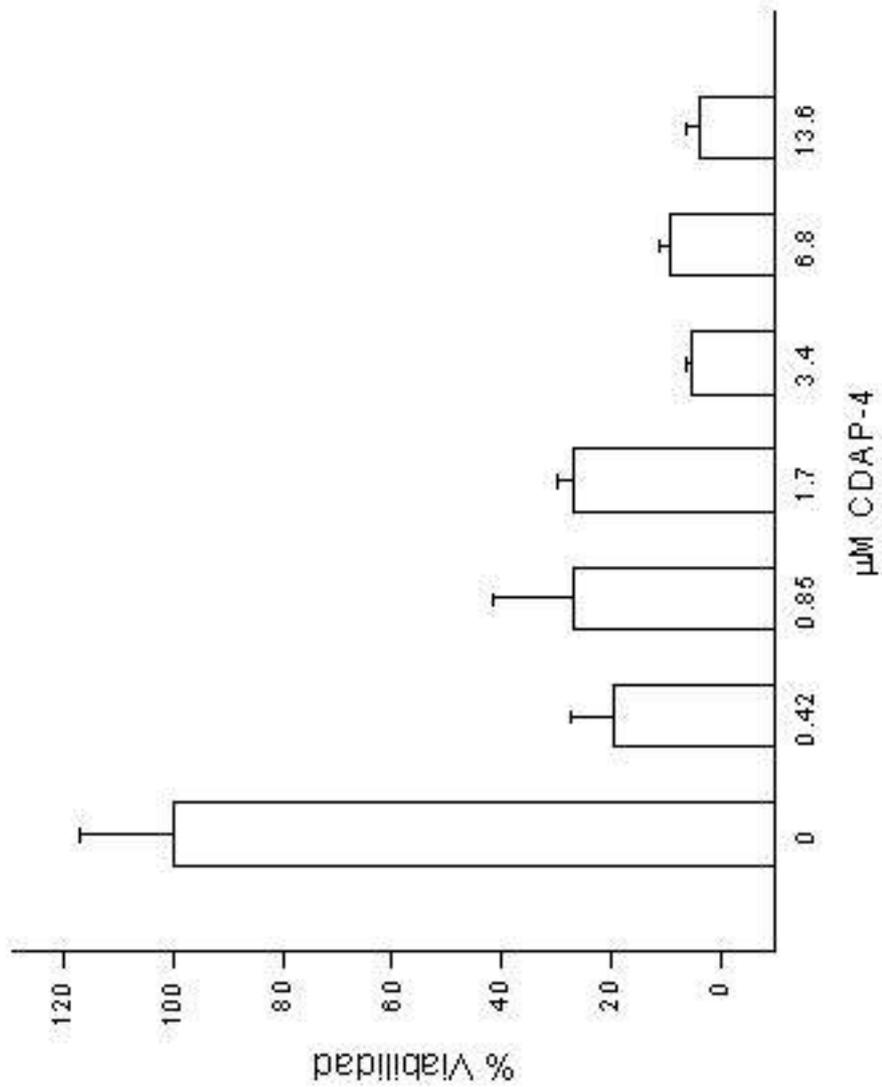


Figura 16: Actividad antimicrobiana de P4 contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se utilizó la cepa ATCC 15692 incubada con concentraciones crecientes del péptido CDAP-4 durante 3 horas. La viabilidad fue calculada con respecto a bacterias sin péptido. $P \leq 0.05$ comparando con bacterias sin péptido.

concentración de péptido de 6.8 μM . El péptido CDAP-4 es capaz de inhibir a la mayoría de los aislados probados en un intervalo del 50% al 95%. Existen algunos aislados que resisten este péptido, sin embargo su resistencia no correlaciona con su perfil de resistencia a antibióticos (Tabla 6).

Efecto de la concentración de NaCl en la actividad antimicrobiana.

Las actividades de péptidos antimicrobianos dependen generalmente de interacciones iónicas debido a su carga positiva que les permite interactuar con las membranas de los microorganismos. Para determinar si la actividad del péptido depende de la concentración de NaCl, se realizaron ensayos con *P. aeruginosa* (ATCC 15692) en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. En estos ensayos se observó que la actividad de CDAP-4 (6.8 μM) se mantiene en concentraciones de hasta 100 mM de NaCl. Al utilizar concentraciones de 150 y 200 mM se pierde la actividad antimicrobiana (Figura 17).

Ensayos de microscopía electrónica

Para determinar los efectos a nivel estructural inducidos por CDAP-4, se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión de *P. aeruginosa* (ATCC 15692) incubada con 2 concentraciones de CDAP-4; 0.42 y 4.2 μM .

A analizar el efecto de la dosis sub-letal (0.42 μM) se observan cambios en la membrana de estas células; mientras que al usar la dosis letal (4.2 μM), se observa que la mayoría de las células aparecen vacías de material citoplasmático; y con forma irregular (Figura 18).

Modelaje Molecular

La región carboxilo terminal de las quimiocinas se ha descrito en varios estudios estructurales. Esta parte de las quimiocinas presenta una estructura de α hélice en todas las quimiocinas en las que la estructura se ha determinado, tanto por cristalografía como por resonancia magnética nuclear. Hemos generado un modelo *in silico* de CDAP-4 como una aproximación para analizar la estructura y propiedades electrostáticas de este péptido. Una hélice α fue generada en el programa SPDBV. Esta hélice fue sujeta a dinámica

<i>Aislados P. aeruginosa</i>	% Inhibición (6.8 μm)
PIMM-UNAM 16	82.5
PIMM-UNAM 17*	20
PIMM-UNAM 18*	95
PIMM-UNAM 19	52.5
PIMM-UNAM 21	63
PIMM-UNAM 22	95
PIMM-UNAM 23	75
PIMM-UNAM 24	99
PIMM-UNAM 69	60
PIMM-UNAM 70	82.5
PIMM-UNAM 71	70
PIMM-UNAM 72	93
PIMM-UNAM 104	85
PIMM-UNAM 107	87.5
PIMM-UNAM 112	75

Tabla 6: Inhibición de aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Cada aislado fue incubado con 6.8 μ M de CDAP-4 durante 3 horas. Posteriormente la inhibición fue calculada midiendo la viabilidad con el reactivo Bactiter-glo y comparando con bacterias sin tratar. * Aislados multiresistentes.

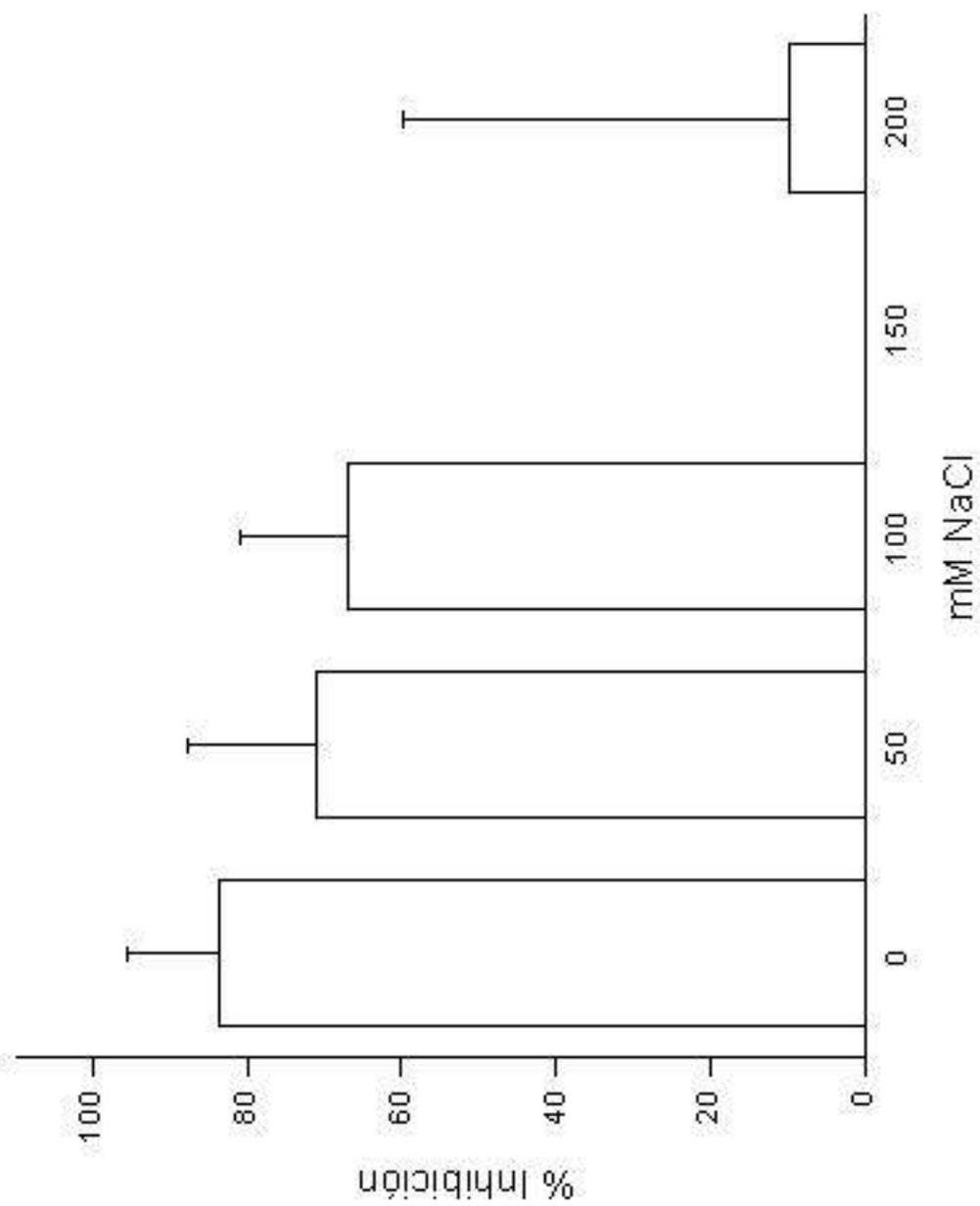


Figura 17. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad antimicrobiana. Los ensayos de actividad se realizaron utilizando la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Las bacterias fueron incubadas con 6.8 μ M de CDAP-4 durante 3 horas. Posteriormente se cuantificó la viabilidad con el kit Bactiter-glo.

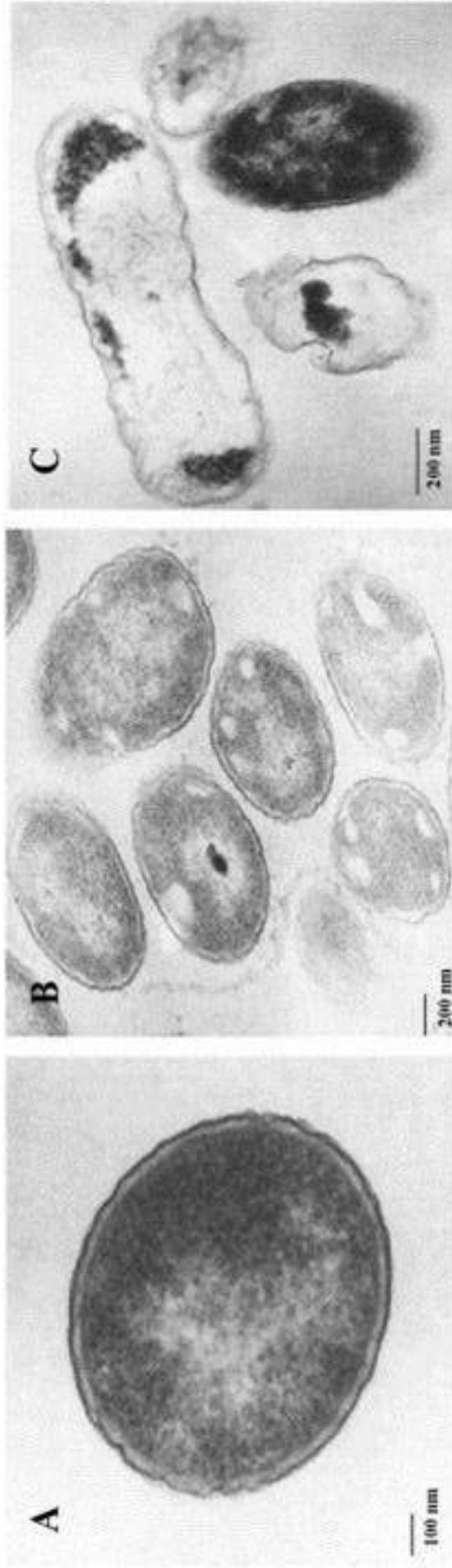


Figura 18. Microscopía electrónica de bacterias tratadas con CDAP-4. Las bacterias *P. aeruginosa* ATCC 15692 fueron tratadas con 0.42 (B) y 4.2 μM (C) de CDAP-4 durante 3 horas. Adicionalmente se utilizaron bacterias sin tratar (A). Posteriormente, las bacterias fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica. Las fotos fueron tomadas a aumentos de 60,000X (A) y 30,000X (B y C).

molecular. Después de esta dinámica, la hélice α fue reemplazada con una hélice π , mientras que el extremo carboxilo del péptido perdió estructura secundaria hasta quedar desordenada. Este dato correlaciona con las determinaciones de estructura de quimiocinas. En igual concordancia, el extremo amino de este péptido mantuvo su estructura helical (Figura 20A-C).

Análisis de potencial electrostático

Para comparar el potencial electrostático de la quimiocina CCL13 con el de otras quimiocinas con actividad antimicrobiana, se calculó el potencial electrostático del modelo de CCL13 en el programa GRASP.

El potencial electrostático obtenido muestra una zona con carga positiva que se localiza principalmente en el extremo carboxilo de la quimiocina (Figura 19). Este potencial es similar al de las quimiocinas reportadas con actividad antimicrobiana.

Para determinar si el péptido CDAP-4 mantiene este perfil de potencial electrostático, se utilizó el modelo generado de este péptido. Los cálculos de potencial electrostático realizados sin fuerza iónica mostraron que este péptido presenta un parche con carga positiva polarizado hacia un lado de la hélice. El contorno del potencial electrostático positivo a 4 kt excede la superficie de la molécula. En contraste, el potencial negativo rara vez excede la superficie molecular de este péptido. El potencial positivo es más abundante que su contraparte negativa y es prácticamente continuo en la región que abarca. La única carga negativa presente en dicha región corresponde al residuo Q4. Por el otro lado de la hélice se encuentran la mayoría de los residuos hidrofóbicos, junto con algunos con carga negativa (Figura 20D-F).

Adicionalmente se exploró el efecto de la adición de NaCl en potenciales electrostáticos. Cuando los iones se agregan para hacer los cálculos de potencial; el parche positivo se ve reducido de manera importante. A 150 mM de NaCl algunos de los contornos llegan a niveles debajo de la superficie molecular. El efecto de la concentración de NaCl en el potencial negativo es mínimo dado que los parches negativos no parecen afectarse. Esto sugiere que la generación del potencial positivo coincide con la presencia de la actividad antimicrobiana, lo que explica la pérdida de actividad en altas concentraciones de NaCl (Figura 20G-I).

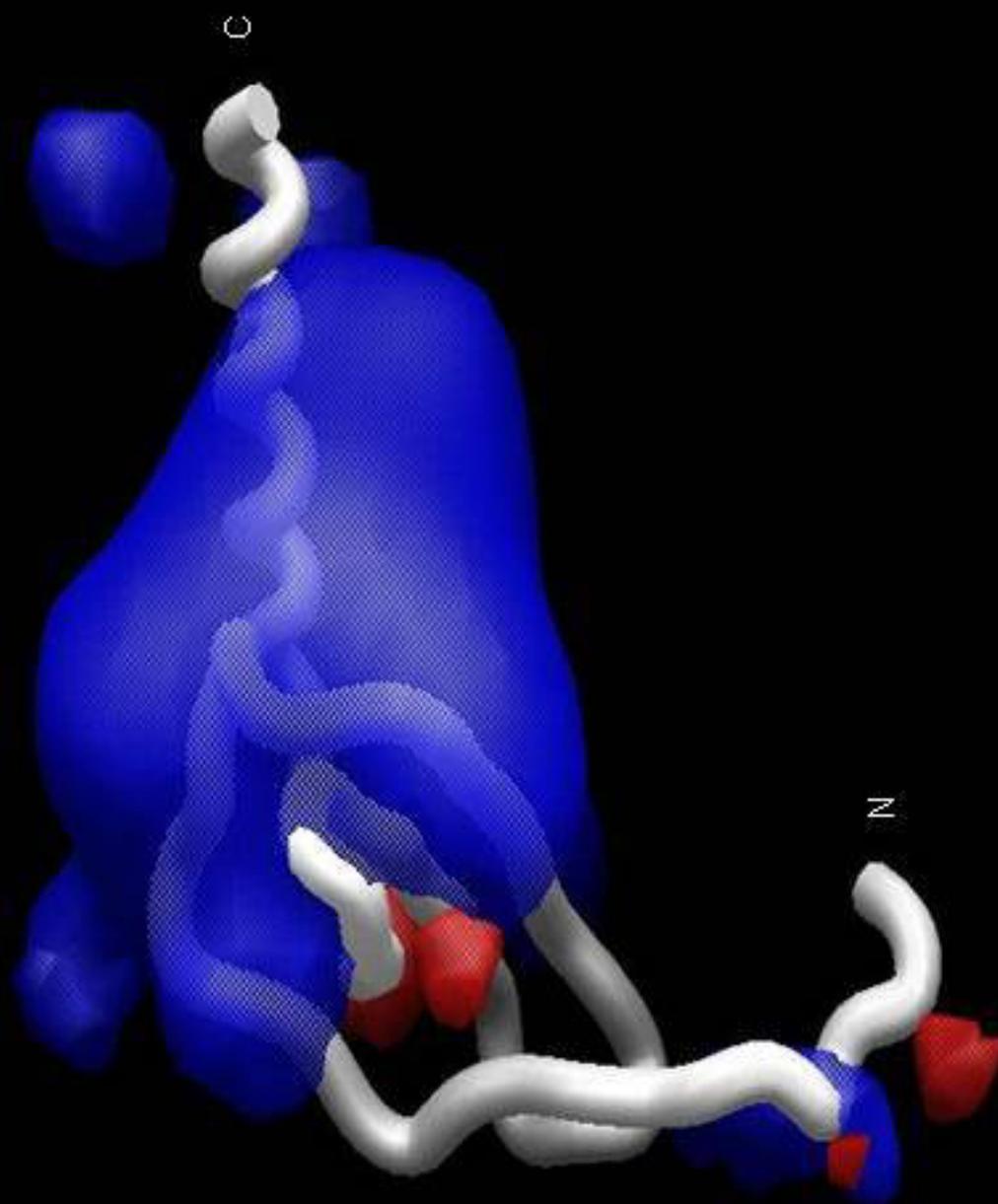


Figura 19. Potencial electrostático de la quinolona CCL13. El modelo de la quinolona fue utilizado para calcular el potencial electrostático. En azul se muestra el potencial con carga positiva, en rojo el potencial con carga negativa y en blanco cadena principal de la proteína.

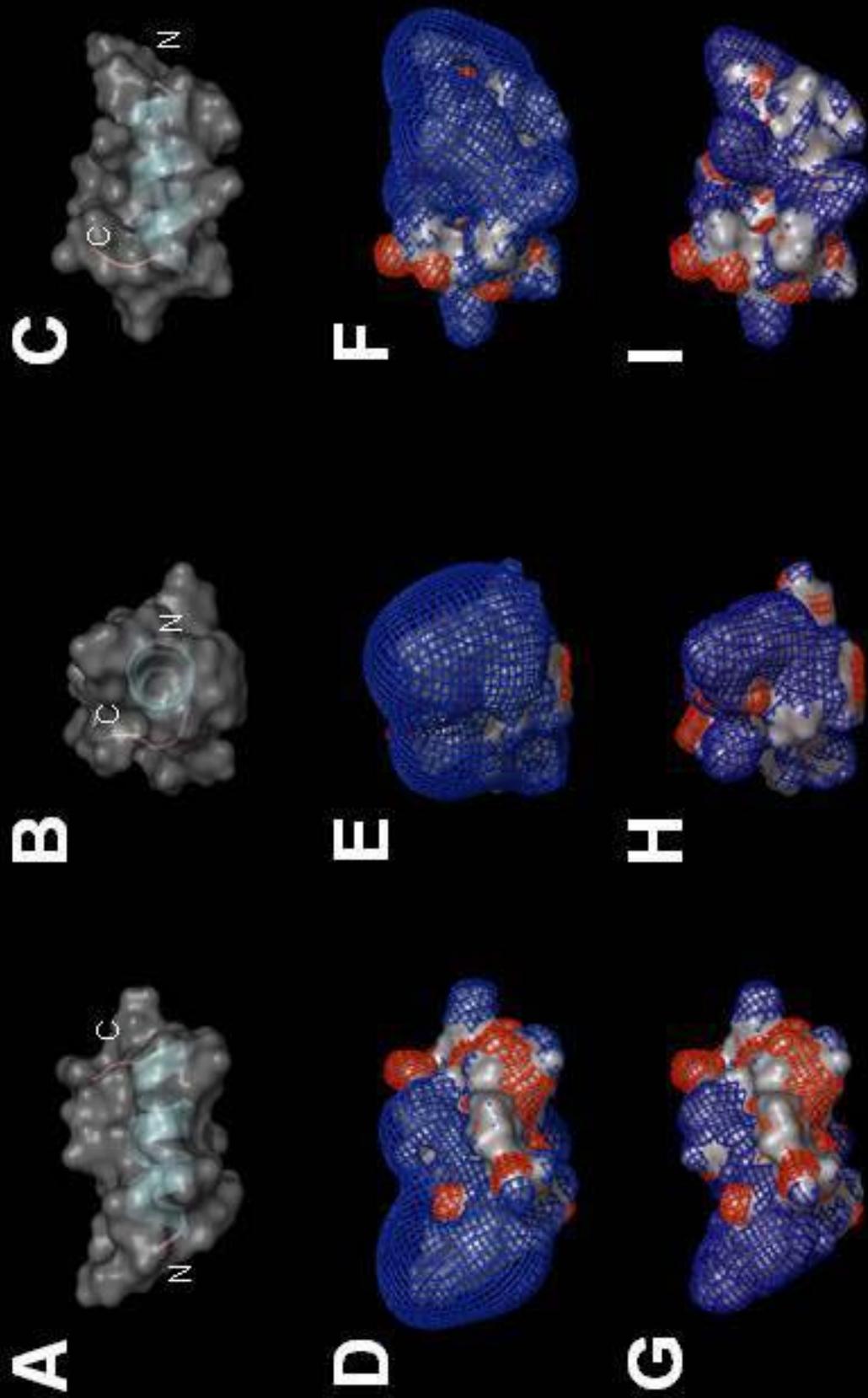


Figura 20. Modelaje molecular y análisis de potencial electrostático de CDAP-4. El extremo carboxilo de la quimiocina CCL13 fue modelado y sujeto a un proceso de dinámica molecular. La estructura resultante se muestra en (A-C) girada 90° a la derecha. (D-F) El potencial electrostático de este modelo a 4 kT fue calculado y representado sobre la molécula. El potencial positivo se muestra en azul y el negativo en rojo. El efecto de la adición de 150 mM de NaCl fue simulado en (G-I).

Por otro lado, se comparó el potencial electrostático de CDAP-4 con el de los péptidos carboxilo terminal de otras quimiocinas. Este análisis demostró que de las quimiocinas de la subfamilia MCP, el péptido de CCL13 tiene el potencial electrostático positivo más abundante (Figura 21). Al realizar el análisis con otros péptidos de quimiocinas con actividad antimicrobiana descrita, se encontró que en la mayoría de los casos existe un potencial positivo amplio en esta región. La excepción se encuentra en el análisis del fragmento carboxilo terminal de CXCL12 (SDF-1 α) donde se observa un porcentaje de potencial positivo bajo. En contraste, las quimiocinas sin actividad antimicrobiana presentan porcentajes de potencial positivos bajos en su porción carboxilo terminal. El péptido de CXCL8 (IL-8) descrito con actividad antimicrobiana con anterioridad, tiene un porcentaje de potencial positivo alto (Tabla 6). Esto demuestra una correlación entre la actividad antimicrobiana y los potenciales electrostáticos de los péptidos del extremo carboxilo.

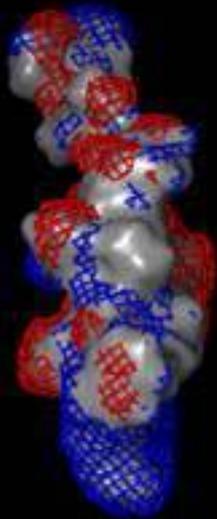
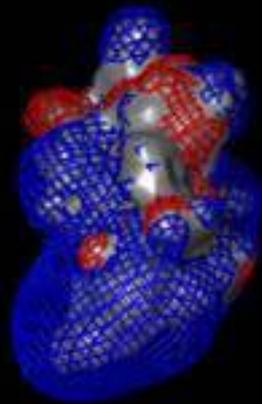
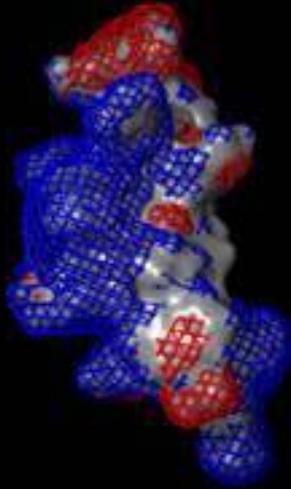
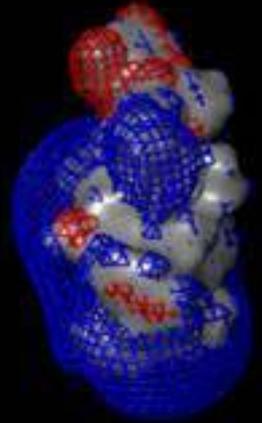
A**B****C****D****E****F**

Figura 21. Análisis comparativo de los potenciales electrostáticos de péptidos carboxilo terminal de quimiocinas. Los péptidos de las quimiocinas CCL2 (A), CCL8 (B), CCL7 (C), CCL13 (D), CXCL8 (E) y CCL20 (F) se muestran a la misma escala y orientación.

IX. DISCUSIÓN.

Los aminoácidos de CCL13 implicados en los procesos de unión y activación de cada uno de sus receptores no están descritos detalladamente. El extremo amino terminal de esta quimiocina ha sido caracterizado en ensayos de proteólisis y aunque no es necesario para unirse a células blanco se requiere para activar a sus receptores. Para determinar las secuencias involucradas en estos procesos se sintetizaron péptidos con la secuencia de la quimiocina CCL13. Estos péptidos fueron empleados en ensayos funcionales de quimiotaxis y flujo de calcio para determinar si los aminoácidos incluidos en su secuencia son suficientes para inducir o inhibir las respuestas funcionales de la quimiocina CCL13. En estos ensayos se encontró que ninguno de los péptidos es capaz de inducir una respuesta de quimiotaxis o de flujo de calcio en células que expresan los receptores de CCL13. Esto puede deberse a que en el caso de esta quimiocina se requieran regiones que se encuentran espacialmente cerca en la estructura de la proteína completa, pero que por separado en un péptido no son capaces de activarse o de unir al receptor. Este dato es sustancialmente diferente al del péptido amino terminal correspondiente de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α), donde se demuestra una capacidad agonista (135).

Por otro lado, es posible que los péptidos sintetizados de CCL13 sean capaces de antagonizar las respuestas funcionales inducidas por CCL13. Existen varios reportes de quimiocinas truncadas que al ser capaces de unirse pero no activar a los receptores, antagonizan la actividad de las quimiocinas completas (58, 116).

En nuestros ensayos de antagonismo identificamos al péptido CDIP-2 como un inhibidor de la quimiotaxis inducida por CCL13. Esta inhibición es dependiente de concentración. La inhibición obtenida fue de 50-80% de la migración inducida por CCL13. Ninguno de los otros péptidos logró inhibir de manera significativa la quimiotaxis inducida por CCL13.

Para determinar si CDIP-2 es capaz de inhibir otras quimiocinas de la subfamilia MCP, se realizaron ensayos de inhibición utilizando las quimiocinas CCL2 y CCL7. El péptido CDIP-2 no logró inhibir la quimiotaxis de las células THP-1 hacia estas 2 quimiocinas. Este dato es relevante debido a que estas

quimiocinas comparten receptores con CCL13, por lo que el mecanismo de inhibición parece ser específico.

Al analizar la capacidad del péptido CDIP-2 de inhibir el flujo de calcio, se encontró que no es capaz de inhibir esta respuesta inducida por CCL13. Esto indica que la inhibición de CDIP-2 no es completa.

Existen antecedentes de mutantes en el extremo amino de la quimiocina CCL2 (MCP-1) que pierden principalmente la capacidad de inducir quimiotaxis, y no flujo de calcio, por lo que es posible encontrar estas respuestas de manera separada en ligandos.

Para determinar la actividad antagonista de CDIP-2 en procesos inflamatorios *in vivo* utilizamos un modelo de inflamación de peritoneo de ratones utilizando tioglicolato como irritante. En este modelo, se suministró 25 microgramos de CDIP-2 a cada ratón después de ser estimulados con tioglicolato. Se observó que el péptido CDIP-2 es capaz de reducir casi por completo el infiltrado celular que se recluta en respuesta a la estimulación. La inhibición de este infiltrado se da principalmente en los macrófagos, ya que los linfocitos no se ven afectados. No se evaluó la posible inhibición sobre neutrófilos, ya que éstos son reclutados en etapas más tempranas de este modelo.

La quimiocina inhibida en este modelo puede ser CCL12. En ratón no se ha identificado el gen que codifica para CCL13, aunque se ha propuesto que CCL12 puede jugar un papel similar al de CCL13. En ensayos *in vitro* se observó que el péptido CDIP-2 puede inhibir la quimiotaxis de células de ratón hacia CCL12 (no mostrado).

Los resultados obtenidos en este modelo permiten proponer el uso de este péptido y sus derivados en otros procesos inflamatorios, dado que retiene en modelos *in vivo* su capacidad antagonista.

El mecanismo de inhibición de este péptido es un tema de investigación a desarrollar. La mayoría de los antagonistas descritos para quimiocinas y sus receptores involucran la unión a los receptores y el bloqueo de la unión de la quimiocina por competencia. Sin embargo, la falta de inhibición en los ensayos de flujo de calcio sugiere que este péptido no es capaz de inhibir por completo la unión de CCL13. Este dato sugiere que CCL13 puede unirse y activar a sus receptores al menos de manera parcial a pesar de la unión de CDIP-2. Otra

posibilidad es que este péptido interfiera con el ligando de manera directa. Existen quimiocinas modificadas que antagonizan la quimiotaxis cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la multimerización (50). Este péptido podría interferir con la formación de multímeros en solución, evitando la activación completa de los receptores.

Una actividad recientemente descrita de algunas quimiocinas es la capacidad de interactuar directamente con algunos microorganismos y reducir su viabilidad. Esta actividad ha sido descrita en varias quimiocinas de diferentes familias. Para determinar si péptidos de CCL13 son capaces de matar directamente microorganismos se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana. En estos ensayos los microorganismos fueron incubados durante 3 horas con cada péptido, y la viabilidad fue determinada inicialmente por medio de un conteo de colonias. En estos ensayos se observó que los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 son capaces de inhibir a la bacteria Gram negativa *E. coli* JM103 (ATCC 39403). El péptido CDP-3 mostró actividad que se reduce al aumentar la concentración del péptido.

El péptido que mostró más actividad fue el CDAP-4, por lo que se decidió analizar su actividad más a detalle en ensayos de actividad antimicrobiana contra otros microorganismos. En estos ensayos se utilizó un ensayo de detección de bacterias viables. En este ensayo se lisa a las bacterias y por medio de la enzima luciferasa permite cuantificar el ATP presente, lo que permite estimar la viabilidad del cultivo.

En estos ensayos se encontró que el péptido CDAP-4 es capaz de inhibir de manera importante a las bacterias *E. coli*, *S. Typhi* y *typhimurium*. En ensayos de actividad contra hongos se encontró que este péptido es capaz de inhibir a *T. mentagrophytes* y *C. albicans* (no mostrado). Adicionalmente se probaron *E. histolytica* y *T. cruzi*, en donde no se encontró actividad microbicida (no mostrado). La bacteria *P. aeruginosa* fue particularmente susceptible a la actividad de este péptido, por lo que se analizó más a detalle la actividad de CDAP-4 sobre este microorganismo. En ensayos de actividad antimicrobiana se observó que el péptido CDAP-4 es capaz de inhibir más del 90% la viabilidad del cultivo incluso a concentraciones bajas (0.42 μ M).

El patógeno *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra asociado de manera importante a enfermedades nosocomiales. De manera particular, se ha

encontrado en infecciones en pacientes con quemaduras, fibrosis quística y con inmunosupresión.

Para determinar si la actividad del péptido se mantiene en aislados clínicos de *P. aeruginosa*, se utilizaron aislados obtenidos de hospitales en México. En estos ensayos cada aislado fue incubado con el CDAP-4 para determinar su capacidad de reducir la viabilidad. Se encontró que la mayoría de los aislados probados (15/16) son inhibidos por el péptido CDAP-4. La inhibición fue de arriba del 70% para la mayoría de los aislados. En los aislados con alta resistencia a antibióticos (PIMM-UNAM 17 y 18) se observó que existe tanto resistencia como susceptibilidad a la actividad de este péptido, por lo que no es posible correlacionar estas resistencias. Se han reportado para otros microorganismos mecanismos de resistencia a péptidos antimicrobianos que involucran la modificación de lipopolisacáridos de membrana (LPS), lo que lleva a una reducción en la unión de péptidos catiónicos y una inhibición de la actividad antimicrobiana (161, 162).

Un análisis de las diferencias entre las bacterias resistentes y susceptibles a la actividad de este péptido podría dar datos sobre el mecanismo de acción de este péptido. Un ejemplo de esto son las 2 cepas de *E. coli* empleadas en este estudio (ATCC 25922 y 39403). CDAP-4 es capaz de inhibir a la cepa resistente a β -lactámicos (39403); sin embargo su actividad es menor en la cepa susceptible (25922).

La actividad de este péptido es dependiente de las concentraciones de NaCl en el sistema. Esto se ha observado para muchos péptidos antimicrobianos catiónicos, cuya actividad depende de interacciones iónicas entre la molécula antimicrobiana y la membrana de los microorganismos. Se determinó que la actividad antimicrobiana de CDAP-4 se abate al estar presente una concentración de NaCl de 150 mM. Esta concentración puede estar presente en algunos tejidos, lo que podría limitar la actividad de este péptido *in vivo*. Por otro lado existen tejidos donde la concentración de iones permitiría la actividad de este péptido. Para el caso de otros péptidos antimicrobianos se ha explorado la posibilidad de generar mutantes con actividades más resistentes a concentraciones altas de iones. Esta posibilidad permitiría utilizar péptidos sensibles a concentraciones de sal en tejidos restrictivos(163).

Los ensayos de microscopía electrónica realizados demuestran que existe un daño directo en la estructura de las bacterias tratadas con el péptido. Estos daños incluyen un posible incremento en la permeabilidad de la membrana, lo que llevaría a que las células vacíen su contenido citoplasmático. Esto se observa en las micrografías como pérdida de material electrodensito del interior de las bacterias.

En un intento para correlacionar la estructura y la actividad antimicrobiana, analizamos varias propiedades fisicoquímicas del péptido CDAP-4. Encontramos que tiene un número alto de residuos con carga positiva, lo que lleva a un punto isoeléctrico de 10.58 y una carga parcial de +5e. Esto sugiere que para este péptido existe alguna correlación entre la carga y la actividad antimicrobiana. Sin embargo, existen reportes en los que se demuestra que la carga total no siempre es coincidente con la actividad antimicrobiana, y que existen otras características que son relevantes para la actividad en estas moléculas. A pesar que la estructura tridimensional de CCL13 no ha sido resuelta, se generó un modelo *in silico* de CDAP-4. La estructura obtenida después de los procesos de dinámica molecular es congruente con las estructuras descritas para el extremo carboxilo terminal de las quimiocinas.

En este modelo, CDAP-4 muestra un parche positivo amplio. Esto está de acuerdo con los reportes de las quimiocinas con actividad antimicrobiana. El tamaño de estos parches no correlaciona directamente con la actividad antimicrobiana, sin embargo es una característica distintiva de las quimiocinas con actividad antimicrobiana. El parche de potencial electrostático con carga positiva se encuentra localizado en un lado del eje longitudinal de la molécula, mientras que en lado opuesto se encuentran residuos sin carga y algunas zonas con carga negativa. Se ha descrito que esta polarización de residuos tiene un papel importante en la actividad de moléculas antimicrobianas (97).

En nuestro modelo, la zona de potencial electrostático positivo se interrumpe por el residuo Q4. La presencia de este residuo en esta localización particular podría afectar de manera negativa la generación del contorno positivo y posiblemente la actividad antimicrobiana, por lo que podría ser un buen candidato para modificar la actividad de este péptido.

Nuestros resultados demuestran que la actividad antimicrobiana de este péptido depende de las concentraciones de NaCl presentes en el medio. Por este motivo, realizamos cálculos electrostáticos simulando concentraciones altas de NaCl.

En condiciones de 150 mM de NaCl se observó que el potencial electrostático positivo disminuye considerablemente; mientras que el potencial negativo se mantiene. El potencial positivo llegó a niveles de la superficie molecular en algunos residuos. Esta reducción de potencial electrostático positivo correlaciona con la pérdida de actividad de este péptido en estas condiciones.

Este dato sugiere que el porcentaje de potencial positivo y en general el comportamiento electrostático de las quimiocinas correlaciona con la presencia de actividad antimicrobiana.

Para analizar el comportamiento de los potenciales electrostáticos en otras quimiocinas, se analizó el comportamiento del extremo carboxilo de diversas quimiocinas con y sin actividad antimicrobiana. Los péptidos de las quimiocinas fueron aislados del resto de la estructura de la molécula y el potencial electrostático fue calculado. Posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje que representaba el volumen de potencial con carga positiva con respecto al potencial electrostático completo. En estos cálculos se observó que dentro de la subfamilia MCP, el péptido CDAP-4 correspondiente a la quimiocina CCL13 tiene el porcentaje de potencial positivo más alto. Esto se correlaciona con la capacidad antimicrobiana que se ha demostrado tanto de la quimiocina completa como del fragmento carboxilo terminal aislado.

En otras quimiocinas, existe en general una correlación entre el porcentaje de volumen positivo y la actividad antimicrobiana. Las quimiocinas con actividad descrita tienen en sus péptidos del extremo carboxilo potenciales positivos amplios. La excepción a esta observación es el péptido de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α). A pesar de que se ha descrito que esta quimiocina tiene actividad antimicrobiana, su porcentaje de potencial positivo es bajo. Esto se puede deber a que en esta proteína otras regiones sean las encargadas de conferirle potencial positivo, o que el mecanismo de acción sea completamente diferente al de el resto de las quimiocinas con actividad.

Es interesante postular que parte importante de la actividad antimicrobiana de las quimiocinas reside en el extremo carboxilo. Se ha demostrado que fragmentos que contienen esta región pueden ser generados mediante proteólisis de quimiocinas (CXCL8), por lo que es posible que estos péptidos se generen *in vivo* como una estrategia de amplificación de la respuesta antimicrobiana respondiendo al corte proteolítico de las quimiocinas.

La actividad que presenta el péptido CDIP-2 es interesante debido a que este péptido abarca una región de la quimiocina bajo en cargas positivas. Adicionalmente el hecho que presente actividades antagonistas y anti-inflamatorias puede ser útil en el contexto de algunos procesos infecciosos donde sea benéfico tanto inhibir inflamación como actuar de manera directa contra el microorganismo causante.

X. CONCLUSIONES

- 1) Ninguno de los péptidos sintéticos analizados tienen actividad agonista al no ser capaces de inducir quimiotaxis o flujo de calcio en ensayos *in vitro* utilizando células THP-1.
- 2) El péptido CDIP-2 tiene actividad antagonista parcial ya que bloquea la actividad quimiotáctica de CCL13 al ser preincubado con las células THP-1.
- 3) Ninguno de los péptidos probados son capaces de bloquear el flujo de calcio inducido por CCL13, CCL2 o CCL7.
- 4) La actividad inhibitoria de CDIP-2 se mantiene en un modelo de inflamación *in vivo*.
- 5) Los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas.
- 6) El péptido CDAP-4 inhibe de manera potente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Esta inhibición se observa en aislados clínicos de esta bacteria
- 7) La actividad de este péptido depende de la concentración iónica en el medio
- 8) El análisis de potencial electrostático correlaciona el potencial positivo con la actividad antimicrobiana.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de CDAP-4 fueron publicados en (164)

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Luster, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine* 338:436-445.
2. Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* 18:217-242.
3. Baggiolini, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of internal medicine* 250:91-104.
4. Rot, A., and U. H. von Andrian. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual review of immunology* 22:891-928.
5. Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.
6. Fernandez, E. J., and E. Lolis. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42:469-499.
7. Dealwis, C., E. J. Fernandez, D. A. Thompson, R. J. Simon, M. A. Siani, and E. Lolis. 1998. Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6941-6946.
8. Clore, G. M., E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, and A. M. Gronenborn. 1990. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* 29:1689-1696.
9. Lodi, P. J., D. S. Garrett, J. Kuszewski, M. L. Tsang, J. A. Weatherbee, W. J. Leonard, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore. 1994. High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science (New York, N.Y)* 263:1762-1767.
10. Clore, G. M., and A. M. Gronenborn. 1995. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *Faseb J* 9:57-62.
11. Allen, S. J., S. E. Crown, and T. M. Handel. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* 25:787-820.
12. Lubkowski, J., G. Bujacz, L. Boque, P. J. Domaille, T. M. Handel, and A. Wlodawer. 1997. The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nature structural biology* 4:64-69.
13. Zhang, X., L. Chen, D. P. Bancroft, C. K. Lai, and T. E. Maione. 1994. Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* 33:8361-8366.
14. Nesmelova, I. V., Y. Sham, A. Z. Dudek, L. I. van Eijk, G. Wu, A. Slungaard, F. Mortari, A. W. Griffioen, and K. H. Mayo. 2005. Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *The Journal of biological chemistry* 280:4948-4958.
15. Paoletti, S., V. Petkovic, S. Sebastiani, M. G. Danelon, M. Ugucioni, and B. O. Gerber. 2005. A rich chemokine environment strongly enhances leukocyte migration and activities. *Blood* 105:3405-3412.

16. Farzan, M., T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, and H. Choe. 1999. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96:667-676.
17. Bokoch, G. M., T. Katada, J. K. Northup, E. L. Hewlett, and A. G. Gilman. 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *The Journal of biological chemistry* 258:2072-2075.
18. Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzone, and H. E. Hamm. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* 24:765-781.
19. Liu, C., G. Sandford, G. Fei, and J. Nicholas. 2004. Galpha protein selectivity determinant specified by a viral chemokine receptor-conserved region in the C tail of the human herpesvirus 8 g protein-coupled receptor. *Journal of virology* 78:2460-2471.
20. Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nature immunology* 2:129-134.
21. Miller, A. F., and J. J. Falke. 2004. Chemotaxis receptors and signaling. *Advances in protein chemistry* 68:393-444.
22. Higgs, H. N., and T. D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual review of biochemistry* 70:649-676.
23. Maghazachi, A. A. 2000. Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32:931-943.
24. Parent, C. A., B. J. Blacklock, W. M. Froehlich, D. B. Murphy, and P. N. Devreotes. 1998. G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95:81-91.
25. Servant, G., O. D. Weiner, P. Herzmark, T. Balla, J. W. Sedat, and H. R. Bourne. 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science (New York, N.Y)* 287:1037-1040.
26. Partida-Sanchez, S., L. Rivero-Nava, G. Shi, and F. E. Lund. 2007. CD38: an ecto-enzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses. *Advances in experimental medicine and biology* 590:171-183.
27. Rah, S. Y., K. H. Park, M. K. Han, M. J. Im, and U. H. Kim. 2005. Activation of CD38 by interleukin-8 signaling regulates intracellular Ca²⁺ level and motility of lymphokine-activated killer cells. *The Journal of biological chemistry* 280:2888-2895.
28. Vlahakis, S. R., A. Villasis-Keever, T. Gomez, M. Vanegas, N. Vlahakis, and C. V. Paya. 2002. G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 169:5546-5554.
29. Kim, J. W., R. L. Ferris, and T. L. Whiteside. 2005. Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8⁺ T lymphocytes from apoptosis. *Clin Cancer Res* 11:7901-7910.
30. Soriano, S. F., A. Serrano, P. Hernanz-Falcon, A. Martin de Ana, M. Monterrubio, C. Martinez, J. M. Rodriguez-Frade, and M. Mellado. 2003. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during

- chemotaxis and calcium flux responses. *European journal of immunology* 33:1328-1333.
31. Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, S. Manes, and A. C. Martinez. 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual review of immunology* 19:397-421.
 32. Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, A. Martin De Ana, M. C. Moreno-Ortiz, A. C. Martinez, and M. Mellado. 1999. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J* 13:1699-1710.
 33. Stein, J. V., S. F. Soriano, C. M'Rini, C. Nombela-Arrieta, G. G. de Buitrago, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, J. P. Girard, and A. C. Martinez. 2003. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101:38-44.
 34. Garcia-Zepeda, E. A., I. Licona-Limon, M. F. Jimenez-Solomon, and G. Soldevila. 2007. Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs. *Immunology*.
 35. Soldevila, G., I. Licona, A. Salgado, M. Ramirez, R. Chavez, and E. Garcia-Zepeda. 2004. Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology* 112:191-200.
 36. Crump, M. P., J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes, and I. Clark-Lewis. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal* 16:6996-7007.
 37. Clark-Lewis, I., C. Schumacher, M. Baggiolini, and B. Moser. 1991. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *The Journal of biological chemistry* 266:23128-23134.
 38. Moser, B., B. Dewald, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis. 1993. Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification. *The Journal of biological chemistry* 268:7125-7128.
 39. Monteclaro, F. S., and I. F. Charo. 1996. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *The Journal of biological chemistry* 271:19084-19092.
 40. Hemmerich, S., C. Paavola, A. Bloom, S. Bhakta, R. Freedman, D. Grunberger, J. Krstenansky, S. Lee, D. McCarley, M. Mulkins, B. Wong, J. Pease, L. Mizoue, T. Mirzadegan, I. Polsky, K. Thompson, T. M. Handel, and K. Jarnagin. 1999. Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38:13013-13025.
 41. Jarnagin, K., D. Grunberger, M. Mulkins, B. Wong, S. Hemmerich, C. Paavola, A. Bloom, S. Bhakta, F. Diehl, R. Freedman, D. McCarley, I. Polsky, A. Ping-Tsou, A. Kosaka, and T. M. Handel. 1999. Identification

- of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry* 38:16167-16177.
42. Paolini, J. F., D. Willard, T. Consler, M. Luther, and M. S. Krangel. 1994. The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J Immunol* 153:2704-2717.
 43. Fernando, H., C. Chin, J. Rosgen, and K. Rajarathnam. 2004. Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor. *The Journal of biological chemistry* 279:36175-36178.
 44. Paavola, C. D., S. Hemmerich, D. Grunberger, I. Polsky, A. Bloom, R. Freedman, M. Mulkins, S. Bhakta, D. McCarley, L. Wiesent, B. Wong, K. Jarnagin, and T. M. Handel. 1998. Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *The Journal of biological chemistry* 273:33157-33165.
 45. Ali, S., A. C. Palmer, S. J. Fritchley, Y. Maley, and J. A. Kirby. 2001. Multimerization of monocyte chemoattractant protein-1 is not required for glycosaminoglycan-dependent transendothelial chemotaxis. *The Biochemical journal* 358:737-745.
 46. Lau, E. K., C. D. Paavola, Z. Johnson, J. P. Gaudry, E. Geretti, F. Borlat, A. J. Kungl, A. E. Proudfoot, and T. M. Handel. 2004. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279:22294-22305.
 47. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty. 2002. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1229-1234.
 48. McCornack, M. A., D. M. Boren, and P. J. LiWang. 2004. Glycosaminoglycan disaccharide alters the dimer dissociation constant of the chemokine MIP-1 beta. *Biochemistry* 43:10090-10101.
 49. Kuschert, G. S., F. Coulin, C. A. Power, A. E. Proudfoot, R. E. Hubbard, A. J. Hoogewerf, and T. N. Wells. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38:12959-12968.
 50. Proudfoot, A. E., T. M. Handel, Z. Johnson, E. K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T. N. Wells, and M. H. Kosco-Vilbois. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1885-1890.
 51. Proudfoot, A. E., S. Fritchley, F. Borlat, J. P. Shaw, F. Vilbois, C. Zwahlen, A. Trkola, D. Marchant, P. R. Clapham, and T. N. Wells. 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *The Journal of biological chemistry* 276:10620-10626.
 52. Thelen, M., and M. Baggiolini. 2001. Is dimerization of chemokine receptors functionally relevant? *Sci STKE* 2001:PE34.
 53. Mellado, M., A. J. Vila-Coro, C. Martinez, and J. M. Rodriguez-Frade. 2001. Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 47:575-582.

54. Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez, and M. Mellado. 1999. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3628-3633.
55. Babcock, G. J., M. Farzan, and J. Sodroski. 2003. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *The Journal of biological chemistry* 278:3378-3385.
56. Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, A. Serrano, D. Juan, A. del Sol, S. F. Soriano, F. Roncal, L. Gomez, A. Valencia, A. C. Martinez, and M. Mellado. 2004. Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nature immunology* 5:216-223.
57. Wang, J., L. He, C. A. Combs, G. Roderiquez, and M. A. Norcross. 2006. Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. *Molecular cancer therapeutics* 5:2474-2483.
58. Proost, P., S. Struyf, and J. Van Damme. 2006. Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochemical Society transactions* 34:997-1001.
59. Noso, N., J. Bartels, A. I. Mallet, M. Mochizuki, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1998. Delayed production of biologically active O-glycosylated forms of human eotaxin by tumor-necrosis-factor-alpha-stimulated dermal fibroblasts. *European journal of biochemistry / FEBS* 253:114-122.
60. Proost, P., S. Struyf, M. Couvreur, J. P. Lenaerts, R. Conings, P. Menten, P. Verhaert, A. Wuyts, and J. Van Damme. 1998. Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2(6-76) as a natural chemokine inhibitor. *J Immunol* 160:4034-4041.
61. McQuibban, G. A., J. H. Gong, E. M. Tam, C. A. McCulloch, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science (New York, N.Y)* 289:1202-1206.
62. Van den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673-2681.
63. Schols, D., P. Proost, S. Struyf, A. Wuyts, I. De Meester, S. Scharpe, J. Van Damme, and E. De Clercq. 1998. CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV-1 activity. *Antiviral research* 39:175-187.
64. Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9448-9453.
65. Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, and T. Kishimoto. 1996. Defects of B-

- cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635-638.
66. Haas, P., and D. Gilmour. 2006. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Developmental cell* 10:673-680.
 67. Knaut, H., C. Werz, R. Geisler, and C. Nusslein-Volhard. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421:279-282.
 68. Le, Y., Y. Zhou, P. Iribarren, and J. Wang. 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & molecular immunology* 1:95-104.
 69. Wilkinson, B., J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1999. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J Immunol* 162:3873-3881.
 70. Vicari, A. P., D. J. Figueroa, J. A. Hedrick, J. S. Foster, K. P. Singh, S. Menon, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. B. Bacon, and A. Zlotnik. 1997. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291-301.
 71. Ebert, L. M., P. Schaerli, and B. Moser. 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Molecular immunology* 42:799-809.
 72. Moser, B., and P. Loetscher. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature immunology* 2:123-128.
 73. Tsou, C. L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* 117:902-909.
 74. Luther, S. A., A. Bidgol, D. C. Hargreaves, A. Schmidt, Y. Xu, J. Paniyadi, M. Matloubian, and J. G. Cyster. 2002. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 169:424-433.
 75. Luther, S. A., H. L. Tang, P. L. Hyman, A. G. Farr, and J. G. Cyster. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12694-12699.
 76. Kellermann, S. A., S. Hudak, E. R. Oldham, Y. J. Liu, and L. M. McEvoy. 1999. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 162:3859-3864.
 77. Kim, C. H., L. Rott, E. J. Kunkel, M. C. Genovese, D. P. Andrew, L. Wu, and E. C. Butcher. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *The Journal of clinical investigation* 108:1331-1339.
 78. Mehrad, B., M. P. Keane, and R. M. Strieter. 2007. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis* 97:755-762.
 79. Addison, C. L., T. O. Daniel, M. D. Burdick, H. Liu, J. E. Ehler, Y. Y. Xue, L. Buechi, A. Walz, A. Richmond, and R. M. Strieter. 2000. The CXC

- chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 165:5269-5277.
80. Lasagni, L., M. Francalanci, F. Annunziato, E. Lazzeri, S. Giannini, L. Cosmi, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, C. Orlando, E. Maggi, F. Marra, S. Romagnani, M. Serio, and P. Romagnani. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *The Journal of experimental medicine* 197:1537-1549.
 81. Romagnani, P., F. Annunziato, L. Lasagni, E. Lazzeri, C. Beltrame, M. Francalanci, M. Ugucioni, G. Galli, L. Cosmi, L. Maurenzig, M. Baggiolini, E. Maggi, S. Romagnani, and M. Serio. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *The Journal of clinical investigation* 107:53-63.
 82. Zipin-Roitman, A., T. Meshel, O. Sagi-Assif, B. Shalmon, C. Avivi, R. M. Pfeffer, I. P. Witz, and A. Ben-Baruch. 2007. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer research* 67:3396-3405.
 83. Brenier-Pinchart, M. P., H. Pelloux, D. Derouich-Guergour, and P. Ambroise-Thomas. 2001. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends in parasitology* 17:292-296.
 84. Chakrabarty, K., W. Wu, J. L. Booth, E. S. Duggan, N. N. Nagle, K. M. Coggeshall, and J. P. Metcalf. 2007. Human Lung Innate Immune Response to Bacillus anthracis Spore Infection. *Infection and immunity*.
 85. Golding, H., J. Aliberti, L. R. King, J. Manischewitz, J. Andersen, J. Valenzuela, N. R. Landau, and A. Sher. 2003. Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from Toxoplasma gondii. *Blood* 102:3280-3286.
 86. Phadke, A. P., G. Akangire, S. J. Park, S. A. Lira, and B. Mehrad. 2007. The Role of CC Chemokine Receptor 6 in Host Defense in a Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175:1165-1172.
 87. Wareing, M. D., A. Lyon, C. Inglis, F. Giannoni, I. Charo, and S. R. Sarawar. 2007. Chemokine regulation of the inflammatory response to a low-dose influenza infection in CCR2^{-/-} mice. *Journal of leukocyte biology* 81:793-801.
 88. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews* 3:710-720.
 89. Ganz, T. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes rendus biologies* 327:539-549.
 90. Schutte, B. C., J. P. Mitros, J. A. Bartlett, J. D. Walters, H. P. Jia, M. J. Welsh, T. L. Casavant, and P. B. McCray, Jr. 2002. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2129-2133.
 91. Yeaman, M. R., and N. Y. Yount. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews* 55:27-55.
 92. Hoover, D. M., C. Boulegue, D. Yang, J. J. Oppenheim, K. Tucker, W. Lu, and J. Lubkowski. 2002. The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC

- chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *The Journal of biological chemistry* 277:37647-37654.
93. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science (New York, N.Y)* 286:525-528.
 94. Durr, M., and A. Peschel. 2002. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infection and immunity* 70:6515-6517.
 95. Tang, Y. Q., M. R. Yeaman, and M. E. Selsted. 2002. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and immunity* 70:6524-6533.
 96. Cole, A. M., T. Ganz, A. M. Liese, M. D. Burdick, L. Liu, and R. M. Strieter. 2001. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167:623-627.
 97. Yang, D., Q. Chen, D. M. Hoover, P. Staley, K. D. Tucker, J. Lubkowski, and J. J. Oppenheim. 2003. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *Journal of leukocyte biology* 74:448-455.
 98. Hieshima, K., H. Ohtani, M. Shibano, D. Izawa, T. Nakayama, Y. Kawasaki, F. Shiba, M. Shiota, F. Katou, T. Saito, and O. Yoshie. 2003. CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 170:1452-1461.
 99. Hasan, L., L. Mazzucchelli, M. Liebi, M. Lis, R. E. Hunger, A. Tester, C. M. Overall, and M. Wolf. 2006. Function of liver activation-regulated chemokine/CC chemokine ligand 20 is differently affected by cathepsin B and cathepsin D processing. *J Immunol* 176:6512-6522.
 100. Bjorstad, A., H. Fu, A. Karlsson, C. Dahlgren, and J. Bylund. 2005. Interleukin-8-derived peptide has antibacterial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:3889-3895.
 101. Yeaman, M. R., N. Y. Yount, A. J. Waring, K. D. Gank, D. Kupferwasser, R. Wiese, A. S. Bayer, and W. H. Welch. 2007. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochimica et biophysica acta* 1768:609-619.
 102. Nakayama, T., J. Shirane, K. Hieshima, M. Shibano, M. Watanabe, Z. Jin, D. Nagakubo, T. Saito, Y. Shimomura, and O. Yoshie. 2006. Novel antiviral activity of chemokines. *Virology* 350:484-492.
 103. Elsner, J., S. E. Escher, and U. Forssmann. 2004. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy* 59:1243-1258.
 104. Gerard, C., and B. J. Rollins. 2001. Chemokines and disease. *Nature immunology* 2:108-115.
 105. Muro, S., E. M. Minshall, and Q. A. Hamid. 2000. The pathology of chronic asthma. *Clinics in chest medicine* 21:225-244.
 106. Lamkhieoued, B., E. A. Garcia-Zepeda, S. Abi-Younes, H. Nakamura, S. Jedrzkiewicz, L. Wagner, P. M. Renzi, Z. Allakhverdi, C. Lilly, Q. Hamid, and A. D. Luster. 2000. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *American journal of respiratory and critical care medicine* 162:723-732.

107. Taha, R. A., E. M. Minshall, D. Miotto, A. Shimbara, A. Luster, J. C. Hogg, and Q. A. Hamid. 1999. Eotaxin and monocyte chemotactic protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *The Journal of allergy and clinical immunology* 103:476-483.
108. Ying, S., Q. Meng, K. Zeibecoglou, D. S. Robinson, A. Macfarlane, M. Humbert, and A. B. Kay. 1999. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 163:6321-6329.
109. Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95:3032-3043.
110. Braunersreuther, V., F. Mach, and S. Steffens. 2007. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 97:714-721.
111. Gosling, J., S. Slaymaker, L. Gu, S. Tseng, C. H. Zlot, S. G. Young, B. J. Rollins, and I. F. Charo. 1999. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *The Journal of clinical investigation* 103:773-778.
112. Harrington, J. R. 2000. The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 18:65-66.
113. Wong, B. W., D. Wong, and B. M. McManus. 2002. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 11:332-338.
114. Lucas, A. D., C. Bursill, T. J. Guzik, J. Sadowski, K. M. Channon, and D. R. Greaves. 2003. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 108:2498-2504.
115. Combadiere, C., S. Potteaux, J. L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E. J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P. M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107:1009-1016.
116. McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100:1160-1167.
117. Wang, J. M., O. Chertov, P. Proost, J. J. Li, P. Menton, L. Xu, S. Sozzani, A. Mantovani, W. Gong, V. Schirrmacher, J. Van Damme, and J. J. Oppenheim. 1998. Purification and identification of chemokines potentially involved in kidney-specific metastasis by a murine lymphoma variant: induction of migration and NFkappaB activation. *International journal of cancer* 75:900-907.
118. Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.

119. Arya, M., H. R. Patel, C. McGurk, R. Tatoud, H. Klocker, J. Masters, and M. Williamson. 2004. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 4:291-303.
120. Owen, J. D., R. Strieter, M. Burdick, H. Haghnegahdar, L. Nanney, R. Shattuck-Brandt, and A. Richmond. 1997. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *International journal of cancer* 73:94-103.
121. Takamori, H., Z. G. Oades, O. C. Hoch, M. Burger, and I. U. Schraufstatter. 2000. Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas* 21:52-56.
122. Wenthe, M. N., M. P. Keane, M. D. Burdick, H. Friess, M. W. Buchler, G. O. Ceyhan, H. A. Reber, R. M. Strieter, and O. J. Hines. 2006. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis. *Cancer letters* 241:221-227.
123. Wang, D., H. Wang, J. Brown, T. Daikoku, W. Ning, Q. Shi, A. Richmond, R. Strieter, S. K. Dey, and R. N. DuBois. 2006. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *The Journal of experimental medicine* 203:941-951.
124. Endres, M. J., P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, and J. A. Hoxie. 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87:745-756.
125. Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-183.
126. Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725.
127. Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells, and A. E. Proudfoot. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science (New York, N.Y)* 276:276-279.
128. Combadiere, C., K. Salzwedel, E. D. Smith, H. L. Tiffany, E. A. Berger, and P. M. Murphy. 1998. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *The Journal of biological chemistry* 273:23799-23804.
129. Garin, A., N. Tarantino, S. Faure, M. Daoudi, C. Lecureuil, A. Bourdais, P. Debre, P. Deterre, and C. Combadiere. 2003. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. *J Immunol* 171:5305-5312.

130. Gao, J. L., and P. M. Murphy. 1994. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *The Journal of biological chemistry* 269:28539-28542.
131. Casarosa, P., M. Waldhoer, P. J. LiWang, H. F. Vischer, T. Kledal, H. Timmerman, T. W. Schwartz, M. J. Smit, and R. Leurs. 2005. CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *The Journal of biological chemistry* 280:3275-3285.
132. Parry, C. M., J. P. Simas, V. P. Smith, C. A. Stewart, A. C. Minson, S. Efstathiou, and A. Alcami. 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *The Journal of experimental medicine* 191:573-578.
133. Murphy, P. M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature immunology* 2:116-122.
134. Elisseeva, E. L., C. M. Slupsky, M. P. Crump, I. Clark-Lewis, and B. D. Sykes. 2000. NMR studies of active N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1. Structural basis for receptor binding. *The Journal of biological chemistry* 275:26799-26805.
135. Loetscher, P., J. H. Gong, B. Dewald, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis. 1998. N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *The Journal of biological chemistry* 273:22279-22283.
136. Kaji, M., M. Ikari, S. Hashiguchi, Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu, and K. Sugimura. 2001. Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *Journal of biochemistry* 129:577-583.
137. Reckless, J., and D. J. Grainger. 1999. Identification of oligopeptide sequences which inhibit migration induced by a wide range of chemokines. *The Biochemical journal* 340 (Pt 3):803-811.
138. Sidorova, M. V., A. S. Molokoedov, A. A. Az'muko, T. I. Aref'eva, M. G. Melekhov, N. B. Kukhtina, T. L. Krasnikova, D. Beshpalova Zh, and V. N. Bushuev. 2006. [Peptide fragment 66-77 of monocyte chemoattractant protein 1 and its retro-enantio analogue inhibits the migration of cells in vitro and in vivo]. *Bioorganicheskaja khimiia* 32:161-168.
139. Chazov, E. I., T. L. Krasnikova, Z. D. Beshpalova, N. B. Kukhtina, M. G. Melekhov, T. I. Aref'eva, M. V. Sidorova, A. S. Molokoedov, T. E. Gvozdik, B. M. Mart'yanov, V. V. Pozdeev, V. B. Sergienko, and T. L. Bushueva. 2006. Inhibition of migration of monocytes and granulocytes in vivo by the peptide corresponding to sequence 65-76 of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). *Doklady* 411:339-341.
140. Kim, M. Y., C. W. Byeon, K. H. Hong, K. H. Han, and S. Jeong. 2005. Inhibition of the angiogenesis by the MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) binding peptide. *FEBS letters* 579:1597-1601.
141. Van Coillie, E., J. Van Damme, and G. Opdenakker. 1999. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine & growth factor reviews* 10:61-86.
142. Garcia-Zepeda, E. A., C. Combadiere, M. E. Rothenberg, M. N. Sarafi, F. Lavigne, Q. Hamid, P. M. Murphy, and A. D. Luster. 1996. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in

- allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157:5613-5626.
143. Uguccioni, M., P. Loetscher, U. Forssmann, B. Dewald, H. Li, S. H. Lima, Y. Li, B. Kreider, G. Garotta, M. Thelen, and M. Baggiolini. 1996. Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *The Journal of experimental medicine* 183:2379-2384.
 144. Tenscher, K., B. Metzner, C. Hofmann, E. Schopf, and J. Norgauer. 1997. The monocyte chemotactic protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils. *Biochemical and biophysical research communications* 240:32-35.
 145. Nakamura, H., A. D. Luster, H. Tateno, S. Jedrzkiewicz, G. Tamura, K. J. Haley, E. A. Garcia-Zepeda, K. Yamaguchi, and C. M. Lilly. 2001. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *American journal of physiology* 281:L1288-1302.
 146. Pertuz Belloso, S., P. Ostoa Saloma, I. Benitez, G. Soldevila, A. Olivos, and E. Garcia-Zepeda. 2004. Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite immunology* 26:237-241.
 147. Culley, F. J., E. J. Fadlon, A. Kirchem, T. J. Williams, P. J. Jose, and J. E. Pease. 2003. Proteoglycans are potent modulators of the biological responses of eosinophils to chemokines. *European journal of immunology* 33:1302-1310.
 148. Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European journal of immunology* 32:231-242.
 149. Chakravorty, S. J., A. J. Howie, J. Girdlestone, D. Gentle, and C. O. Savage. 2001. Potential role for monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *The Journal of pathology* 194:239-246.
 150. Stellato, C., P. Collins, P. D. Ponath, D. Soler, W. Newman, G. La Rosa, H. Li, J. White, L. M. Schwiebert, C. Bickel, M. Liu, B. S. Bochner, T. Williams, and R. P. Schleimer. 1997. Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. *The Journal of clinical investigation* 99:926-936.
 151. Homey, B., S. Meller, T. Savinko, H. Alenius, and A. Lauerma. 2007. Modulation of chemokines by staphylococcal superantigen in atopic dermatitis. *Chemical immunology and allergy* 93:181-194.
 152. Iwamoto, T., H. Okamoto, N. Iikuni, M. Takeuchi, Y. Toyama, T. Tomatsu, N. Kamatani, and S. Momohara. 2006. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 45:421-424.

153. Hancock, R. E., and D. P. Speert. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 3:247-255.
154. Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2:1051-1060.
155. Hancock, R. E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1:S93-99.
156. Nicholls, A., K. A. Sharp, and B. Honig. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11:281-296.
157. Baker, N. A., D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10037-10041.
158. Dolinsky, T. J., J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker. 2004. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research* 32:W665-667.
159. Li, H., A. D. Robertson, and J. H. Jensen. 2005. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* 61:704-721.
160. Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25:1605-1612.
161. Ernst, R. K., T. Guina, and S. I. Miller. 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3:1327-1334.
162. Kawasaki, K. 2006. [Outer membrane remodeling of *Salmonella typhimurium* and host innate immunity]. *Yakugaku Zasshi* 126:1227-1234.
163. Landon, C., C. Thouzeau, H. Labbe, P. Bulet, and F. Vovelle. 2004. Solution structure of spheniscin, a beta-defensin from the penguin stomach. *The Journal of biological chemistry* 279:30433-30439.
164. Martinez-Becerra, F., D. A. Silva, L. Dominguez-Ramirez, G. Mendoza-Hernandez, Y. Lopez-Vidal, G. Soldevila, and E. A. Garcia-Zepeda. 2007. Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and biophysical research communications* 355:352-358.