



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PARTICIPACIÓN DE ACTIVINAS EN EL DESARROLLO DEL LINFOCITO T

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
PAULA LICONA LIMÓN

TUTOR:
DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

UNAM
POSGRADO

MÉXICO, D. F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por permitirme realizar este proyecto a pesar de ser un tema nuevo en su laboratorio y apoyarme durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Jesús Chimal Monroy y Dra. Sara Huerta Yopez por todas sus aportaciones y sugerencias a mi proyecto doctoral.

Al comité de evaluación, Dr. Leopoldo Santos Argumedo, Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete, Dra. Marina Macias Silva y Dra. María del Carmen Clapp Jiménez por tomarse el tiempo para revisar esta tesis.

Al Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos por su asistencia técnica en la realización de este trabajo, a Minerva Rodríguez Castro por su ayuda con el material de trabajo, a María Petra Muñoz García por su apoyo en la biblioteca, a la MVZ. Georgina Díaz Herrera y al MVZ. Gerardo Arrellín Rosas por las facilidades del bioterio proporcionadas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Dianita, Germán, Horacio, Karen, Ramsés y Violeta por aguantar mis histerias y compartir sus experiencias todos estos años.

A mis amigos y confidentes Alejandro, Alarcón, Alfonso, Cei, Clelia, Emiliano, Frida, Gisela, Helena, Karina, Luciana, Lulú, Miguelito, Naika, Norma, Paco y Roberto, por todos los momentos, lágrimas, risas, comidas, cafecitos, consejos y vivencias compartidas, porque siempre estuvieron ahí, muchas gracias.

A mis maestros y amigos, Armando, Celis, Clementina, Diego, Fabiola, Gaby, Irma, Julieta, Laura y Luis por sus enseñanzas y por contagiarme el amor por la ciencia.

A mis padres porque sin ellos no estaría aquí, por apoyarme incondicionalmente, por creer en mí, pero sobretodo por todo el amor que me han brindado y por ser personas irremplazables e imprescindibles en mi vida, los quiero.

A mis hermanos por darme la seguridad que en momentos necesité, por impulsarme a seguir mis sueños y porque sé que siempre contaré con ustedes.

A mi familia, a mi abuelita, tíos, primos y sobrinos por su respaldo, apoyo y amor a largo de mi vida. Por incontables y únicos momentos y por estar conmigo en todo.

A Ale por ser un ejemplo de tolerancia, paciencia y amor, por enseñarme a ser mejor persona y por darme la maravillosa oportunidad de compartir su vida conmigo.

A la familia Mora Contreras por adoptarme, consentirme y por hacerme sentir como en casa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecerme la oportunidad de formar parte de ella y permitir mi desarrollo profesional.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fue financiado por el proyecto de CONACYT (42797-Q). P.L.L recibió una beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología y un complemento de beca por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Resumen

El desarrollo del linfocito T es un proceso que ocurre en el timo y depende tanto de interacciones celulares entre timocitos y células del estroma como de la presencia de factores solubles como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Dentro de los factores de crecimiento, diversos reportes han descrito la importancia de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) en la regulación de la respuesta inmune, sin embargo no se han hecho estudios detallados que demuestren el papel de estos factores durante el desarrollo y la maduración del linfocito T.

La superfamilia del TGF- β se divide en tres subfamilias: TGF- β s, BMPs (Bone morphogenetic proteins) y Activinas/Inhibinas. El mecanismo de señalización es conservado y depende de pares de receptores tipo I y II con actividad de cinasa de serina/treonina que transducen su señal a través de la activación de proteínas Smad. La expresión y función de esta superfamilia en el desarrollo del linfocito T ha sido recientemente descrito para el caso de TGF- β s y BMPs, donde se ha demostrado que regulan la transición de timocitos del estadio Doble Negativo (DN) al estadio Doble Positivo (DP); sin embargo, la función y expresión de Activinas/Inhibinas en el desarrollo tímico aún no ha sido caracterizada.

Este trabajo demuestra la expresión de Activinas/Inhibinas en el timo tanto durante la ontogenia como en las subpoblaciones del timo adulto. Los receptores tipo I para Activina (Alk4) y tipo II (ActRIIA, ActRIIB); al igual que las proteínas de señalización intracelular propias de esta vía: Smad 2, 3, y 4; se expresan diferencialmente en etapas fetales (E14 > E15 > E16) y en timocitos de timo adulto, principalmente en timocitos inmaduros DN. Las subunidades que conforman a los ligandos Activinas e Inhibinas: β A, β B, y α son expresadas mayoritariamente por células del estroma tímico. Análisis cuantitativos nos permitieron determinar que la subunidad del ligando más abundante expresada en el timo es la subunidad α ; sugiriendo una mayor expresión de Inhibinas

(heterodímeros α/β) que de Activinas (β/β), y demostrando por primera vez un papel potencial para estos ligandos como mediadores del desarrollo del linfocito T.

Funcionalmente, nuestros ensayos *in vitro* demuestran que la naturaleza antagónica clásica de Activinas e Inhibinas no ocurre en el timo: tanto Activina A como Inhibina A inducen la maduración de timocitos en la transición de DN3 a DN4 y de DN a ISP (Intermediate Single Positive) ó DP respectivamente. Por otro lado, la Inhibina B induce un arresto en el estadio más temprano en desarrollo DN1, inhibiendo el paso de DN a DP y reduce la celularidad del timo en cultivo, indicando que existen subpoblaciones de timocitos específicas afectadas dependiendo del tipo de ligando.

Finalmente, los datos presentados en esta tesis, demuestran por primera vez que las Inhibinas poseen un mecanismo de señalización propio que, contrario a lo que se postulaba, se comparte con Activinas y depende de la fosforilación de proteínas Smad. Datos obtenidos utilizando el hepatoma HepG2 sugieren que la fosforilación inducida por Inhibinas no es específico de timocitos, sino un mecanismo general y conservado en distintos linajes celulares. Nuestros hallazgos contradicen el dogma postulado durante años, sobre la incapacidad de las Inhibinas por inducir señales intracelulares, y abren la puerta a investigar el mecanismo molecular específico utilizado por estos ligandos.

Abstract

T lymphocyte development is a process that takes place in the thymus and is regulated by cellular interactions between early T cell precursors and stromal cells but also by the action of soluble factors such as cytokines, chemokines and growth factors. Between the growth factors, several reports have described the influence of the Transforming Growth Factor Superfamily (TGF- β) in the regulation of immune responses, however detailed studies involving these molecules during T cell maturation and development are still missing.

TGF- β superfamily is divided into three different subfamilies: TGF- β s, BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) and Activins/Inhibins. The signaling mechanism is conserved and depends on serine/threonine kinase coupled receptors known as Type I (ALKs) and Type II receptors as well as on cytoplasmic Smad proteins. Among the subfamily members of TGF- β superfamily, TGF- β 's and BMPs have been recently shown to be expressed in the thymus and regulate the transition between DN and DP stages of T cell development, however, no reports had yet described the role of Activins/Inhibins during thymocyte differentiation.

Here we show report the expression of Activin/Inhibin ligands in fetal thymus and adult thymic subpopulations. Our data showed that type I receptor (Alk4), type II receptors (ActRIIA, ActRIIB), and Smads 2, 3, and 4, are expressed in fetal thymus (E14 > E15 > E16) and in thymocytes from adult mice, mostly in the double negative (DN) subpopulation. Ligand subunits expression β A, β B, and α were mainly detected in thymic stromal cells, and the quantitative analysis demonstrated that α subunits were expressed at much higher levels compared to β A and β B subunits, demonstrating for the first time the potential role of Inhibins as important mediators during early T cell development.

Our *in vitro* data demonstrate that both Activins and Inhibins regulate thymocyte differentiation, at different stages of development. Interestingly, Inhibins do not antagonize Activin-mediated functions in thymocytes: Activin A and Inhibin A promote early thymocyte differentiation from DN3 to DN4 and from DN to ISP (Intermediate Single Positive) or DP respectively. On the other hand, Inhibin B induces an accumulation at the DN1 stage; inhibiting the DN to DP transition and reducing the total cell number in culture, suggesting that there are specific subpopulations of thymocytes affected depending on the ligand.

Finally, our data demonstrate for the first time that Inhibins induce a signaling mechanism that, unexpectedly, is shared with Activins and depends on Smad phosphorylation. Results obtained with the HepG2 line suggests that the phosphorylation induced by Inhibins is not restricted to thymocytes; but a general and conserved mechanism between different cell types. Our data are against the current model for Inhibin signaling and provides a new model not yet described.

Índice

Introducción	3
Linfocito T	3
Desarrollo del linfocito T	4
Procesos de señalización durante el desarrollo de los timocitos	8
Elección de Linaje T	8
Linaje $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$	9
Señales inducidas por el pre-TCR	9
Señales inducidas por el TCR	10
Diferenciación CD4 vs. CD8	11
Interacciones con el estroma tímico	12
Superfamilia del TGF-β	14
Ligandos	16
Receptores	17
Smads	18
Reguladores positivos y negativos de la señal del TGF-β	20
Antagonismo de Activinas por Inhibinas	20
La superfamilia del TGF-β en el desarrollo del linfocito T	24
TGF-βs	24
BMPs	30
Activinas	33
Justificación	35
Hipótesis	36

Objetivos	36
Materiales y Métodos	37
Resultados	46
Expresión de los mRNAs de Activinas, Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smad en Timo fetal y timo adulto	46
Expresión de los mRNAs de Activinas, Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smad en timocitos y estroma	48
Análisis de la abundancia relativa de los genes relacionados con Activinas en timo fetal y adulto	50
Análisis de la abundancia relativa de los genes relacionados con Activinas en subpoblaciones de timocitos y estroma	52
Expresión de las proteínas Alk-4, Activina βA e Inhibina α en el timo	54
Papel de las Activinas e Inhibinas durante el desarrollo de precursores tempranos Dobles Negativos	57
Papel de las Activinas e Inhibinas durante el desarrollo de timocitos DN, DP, CD4 y CD8	60
Caracterización de las subpoblaciones de timocitos en ratones deficientes para Inhibina	68
Activación de señales mediadas por Activinas en timocitos	72
Discusión	86
Conclusiones	100
Perspectivas	101
Bibliografía	102

Introducción

Linfocito T

El linfocito T es el responsable de la respuesta inmune celular adaptativa, el reconocimiento de antígenos por linfocitos T depende de la expresión del receptor de células T ó TCR (T Cell Receptor) cuyo ligando es un péptido presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC: Major Histocompatibility Complex) en la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC: Antigen Presenting Cell). La mayoría de los linfocitos T poseen TCRs formados por cadenas polimórficas $TCR\alpha$ y $TCR\beta$ unidas por puentes disulfuro, aunque también existe una población minoritaria de linfocitos T con receptores compuestos por cadenas $TCR\gamma$ y $TCR\delta$, estas se encuentran principalmente en epitelios. Interesantemente, la naturaleza del ligando que reconocen los linfocitos T $\gamma\delta$ es distinta a la de los $\alpha\beta$, y su función en el sistema inmune aún no se ha caracterizado por completo [1].

Existen dos tipos de linfocitos $\alpha\beta$ T en periferia, dependiendo del correceptor que expresen ya sea CD4 ó CD8. Dicho correceptor interacciona con regiones invariantes del MHC y caracteriza el fenotipo de la célula T ya sea CD4 ayudador ó CD8 citotóxico [2-4]. La expresión del correceptor está asociada con el contexto en el que el TCR reconocerá a su antígeno; los linfocitos CD4 poseen un TCR que reconoce antígenos derivados de patógenos o que han sido internalizados del medio extracelular y son presentados en moléculas de MHC de Clase II por células presentadoras profesionales como células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y células epiteliales del timo [5]. Por otro lado, los linfocitos CD8 reconocen antígenos derivados de patógenos intracelulares presentados en moléculas de MHC de Clase I [6] cuya expresión no está restringida a ningún tipo celular y se da en todas las células nucleadas del cuerpo [7-10].

Los linfocitos T vírgenes recirculan en sangre y tejidos linfoides secundarios recibiendo señales de supervivencia que los mantienen hasta encontrar a su antígeno específico presentado en el contexto de MHC en la superficie de la APC [11]; dicho reconocimiento induce una serie de cambios genéticos y fenotípicos que llevan finalmente a una expansión clonal y diferenciación del linfocito T generando una progenie de células T efectoras y/o células T de memoria [12]. La activación del linfocito T virgen depende tanto del reconocimiento de antígeno a través del TCR como de señales de coestimulación mediada por moléculas como CD28, necesarias para la producción de citocinas, que inducirán la proliferación de los mismos [13]. In vitro, se ha demostrado que en ausencia de coestimulación, el linfocito T adquiere un fenotipo anérgico o muere, por lo que se postula que se puede impedir así la activación de linfocitos en respuesta a antígenos propios presentados en células de tejidos que carecen de señales coestimuladoras [14]. Sin embargo, in vivo se ha demostrado que la ausencia de coestimulación no explica la anergia, y por el contrario, se requieren señales inhibitorias activas para la inducción de anergia a través de distintos receptores inhibitorios como CTLA-4 y PD-1 [15] (revisado en [16]). Una vez activado, el linfocito T puede ejercer su función efectora, que en el caso de los linfocitos T CD8 consiste en la eliminación de células infectadas por virus o transformadas y en el caso de linfocitos CD4 lleva a la activación de macrófagos y linfocitos B [14, 17-19].

Desarrollo del linfocito T

El desarrollo del linfocito T es un proceso estrictamente regulado que depende tanto de interacciones celulares entre timocitos y células estromales, como de la presencia de factores solubles en el entorno como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento entre otros. La maduración de linfocitos ocurre en el timo, órgano linfoide primario ubicado en la

parte superior del tórax, anterior al corazón [20]. El timo es un órgano bilobulado formado por células estromales y timocitos que interactúan estrechamente formando microambientes definidos en el timo conocidos como región subcapsular, corteza y médula [21]. El compartimiento estromal formado por células epiteliales corticales y medulares, se deriva a partir del mesodermo ubicado en la tercera bolsa faríngea en el día 9.5 de gestación (E9.5). A partir del día 11 de gestación [22-25], precursores de timocitos derivados de hígado fetal, migran al primordio tímico para iniciar su proceso de maduración. En etapas neonata y adulta, los precursores provenientes de médula ósea continúan irrigando el timo a través del torrente sanguíneo entrando por la región cortico-medular tímica [26]. En el timo, tres diferentes subpoblaciones de timocitos se han descrito con base a la expresión de los correceptores CD4 y CD8: dobles negativas (DN, CD4⁻ CD8⁻), dobles positivas (DP, CD4⁺ CD8⁺) y simples positivas (SP, CD4⁺ ó CD8⁺). Las células DN se dividen a su vez en cuatro subpoblaciones (DN1-DN4) con base a la expresión de los marcadores superficiales CD44 [27] y CD25 [28]: DN1: CD44⁺CD25⁻; DN2: CD44⁺CD25⁺; DN3: CD44⁻CD25⁺ y DN4: CD44⁻CD25⁻ (revisado en [29]). En la región subcapsular del timo, a nivel del estadio DN3 ocurre la selección β o primer punto de control en desarrollo, mismo que permite la maduración de aquellos timocitos cuyo rearrreglo de la cadena TCR β ha sido exitoso formando junto con la cadena surrogada invariante pre-T α , un receptor inmaduro conocido como pre-TCR [30]. Las señales a través del Pre-TCR detienen el rearrreglo de TCR β (exclusión alélica), inducen proliferación y llevan a la expresión de las moléculas correceptoras y el rearrreglo de la cadena TCR α (revisado en [31]). La expresión del receptor maduro TCR $\alpha\beta$ en el estadio DP, permite a los timocitos ser seleccionados positiva o negativamente en respuesta a péptidos endógenos expresados en el contexto de

MHC por células estromales del timo. El destino de los timocitos depende de la avidéz del TCR por su ligando (péptido endógeno/MHC); el 95% de los timocitos totales expresan receptores que reconocen con muy baja avidéz al ligando y mueren por negligencia [32, 33] mientras que aquellos que lo reconocen con avidéz intermedia a baja son seleccionados positivamente permitiendo su maduración al estadio CD4⁺ o CD8⁺ simple positivo (elección de linaje). La selección positiva ocurre en la región cortical del timo y depende de antígenos expresados por células epiteliales corticales carentes de señales coestimuladoras [34] (revisado en [35]). La selección negativa ocurre en la región cortico-medular del timo y es dependiente de la expresión del ligando por células epiteliales medulares y células dendríticas derivadas de médula ósea, cuya expresión de moléculas coestimuladoras, asegura la eliminación de timocitos que reconocen con alta avidéz al ligando eliminando así posibles clonas autoreactivas (tolerancia central) [36, 37] (revisado en [38]). Aquellos timocitos que sobreviven a los procesos de selección maduran en la médula y migran a los órganos linfoides secundarios donde son activados para ejercer sus función efectora: CD4⁺ ayudador ó CD8⁺ citotóxico (Figura 1) [39].

El desarrollo del linfocito T es un proceso finamente regulado en el que el compartimiento estromal, formado por células epiteliales, macrófagos y células dendríticas, provee de las interacciones y señales necesarias para una maduración eficiente de los precursores tímicos (revisado en [40-42]); los timocitos a su vez, también contribuyen al crecimiento y mantenimiento del estroma [43]. La estrecha relación de timocitos y estroma se ve claramente reflejada por la definición de microambientes dentro del timo donde la expresión diferencial de factores solubles como quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, así como proteínas de matriz extracelular, controlan la migración ordenada de timocitos necesaria para su maduración (revisado en [44]).

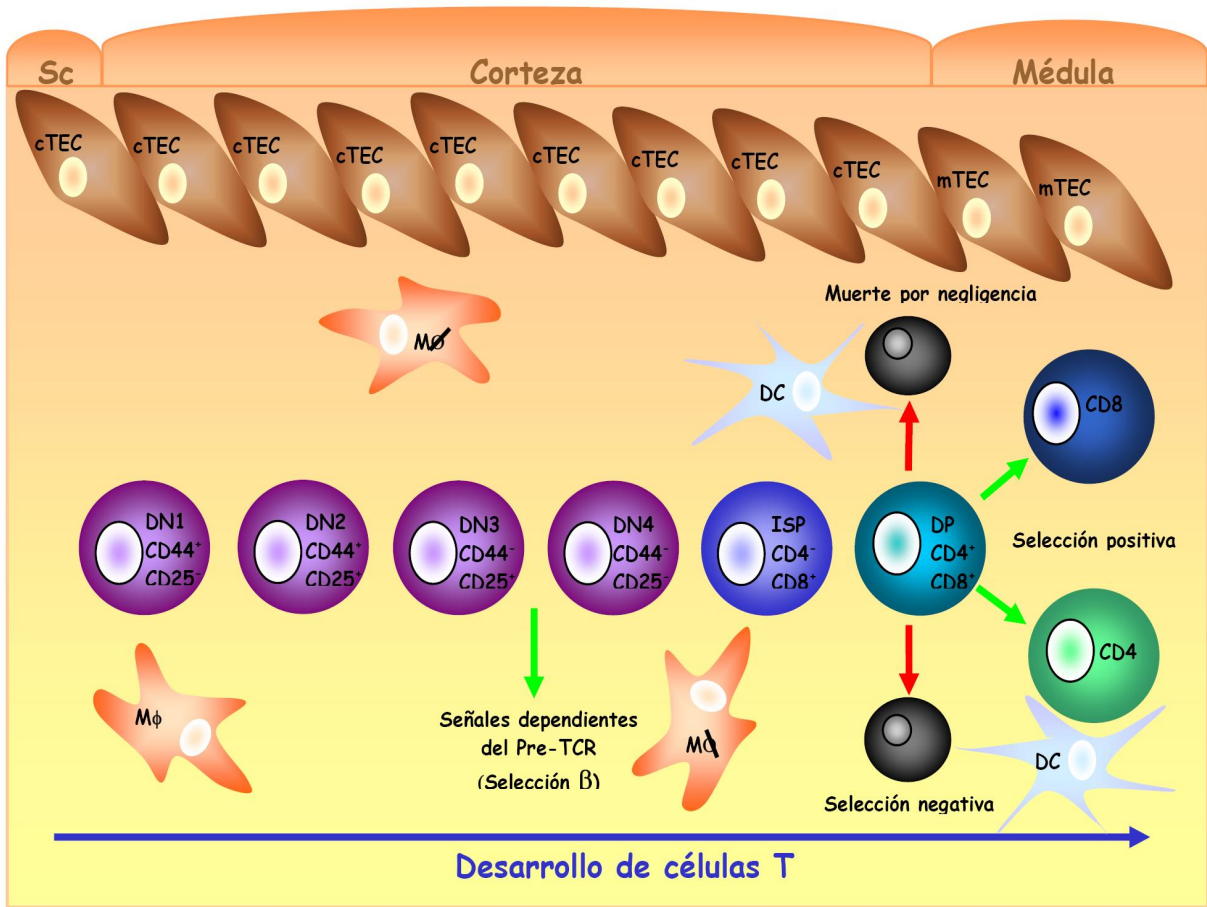


Figura 1. Desarrollo del linfocito T. Los progenitores linfoides migran a timo para iniciar su proceso de maduración. El timo se divide en tres regiones definidas histológicamente conocidas como subcápsula (SC), corteza y médula. En timo se han encontrado tres diferentes subpoblaciones de timocitos con base a la expresión de moléculas correceptoras CD4 y CD8: dobles negativas (DN, CD4⁻ CD8⁻), dobles positivas (DP, CD4⁺ CD8⁺) y simples positivas (SP, CD4⁺ ó CD8⁺). Los timocitos inicialmente son DN y se dividen de DN1 a DN4 dependiendo de la expresión de CD44 y CD25, después pasan a un estadio intermedio simple positivo donde sólo expresan CD8 (ISP) previo a la adquisición de la expresión de CD4 hacia el paso a DP para finalmente llegar al estadio maduro SP. La expresión de un receptor de células T inmaduro o pre-TCR en DN3 permite el paso del estadio DN al estadio DP en un proceso conocido como selección β. Por otro lado la expresión del TCR maduro y el reconocimiento del ligando presentado por células estromales en el estadio DP permite a los timocitos ser seleccionados positiva o negativamente. La mayoría de los timocitos mueren por negligencia en ausencia de reconocimiento de ligandos. Una vez que llegan al estadio final de SP, salen del timo para migrar a periferia donde son activadas y ejercen sus funciones efectoras. cTEC: cortical thymic epithelial cell, mTEC: medullary thymic epithelial cell, Mφ: macrófago, DC: célula dendrítica.

Procesos de Señalización durante el desarrollo de los timocitos

Elección de linaje T

Los precursores que entran al timo están parcialmente restringidos al linaje T y tienen potencial para generar células B y células del linaje mieloide [45-47]. Las señales dependientes de la vía de Notch son indispensables para la especificación del linaje T [48]; en mamíferos la vía de Notch incluye cuatro receptores (Notch1-4) y cinco ligandos: Delta-like 1,3,4 (Dll), Jagged1 y Jagged2. La vía canónica de Notch se inicia por la inducción de la proteólisis y remoción del dominio extracelular de Notch dependiente de proteasas ADAM inducida por el ligando. La liberación del dominio extracelular genera un sustrato para la γ -secretasa dependiente de presenelina que libera el dominio intracelular del receptor (NotchIC), permitiendo su traslocación a núcleo y la regulación de genes blanco mediante interacciones con el factor de transcripción RBPj (Recombining binding protein J κ) (revisado en [49]). La especificación del linaje T está mediado exclusivamente por Notch1 expresado en timocitos y su ligando Delta1 expresado en células epiteliales del timo, induciendo señales que llevan a la activación de E2A y la expresión de un programa de genes específicos del linaje T [50, 51]. La generación y mantenimiento de los precursores tempranos del linfocito T y su diferenciación hasta el estadio DN3 también es dependiente de Notch; es importante mencionar que el control de la señal de Notch es determinante en el resultado final inducido en la célula y en consecuencia, las señales para inhibir la diferenciación al linaje B requieren un umbral de activación de Notch menor al de una inhibición de NKT y diferenciación al linaje T [52, 53]. Adicionalmente, la vía de Notch es necesaria para la inducción de respuestas funcionales en la selección β [54] y se ha visto involucrada en la elección del linaje T $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$ [55–57].

Linaje $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$

Por años se han estudiado los mecanismos involucrados en el compromiso al linaje $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$; actualmente se cuenta con dos modelos basados en las señales provenientes del TCR, uno instructivo en el que la naturaleza del receptor determina el linaje y otro en el que el TCR tendría un papel reforzando un evento de compromiso previo (revisado en [58]). Tanto el linaje $\alpha\beta$ como el $\gamma\delta$ provienen de un mismo precursor común DN [59], la divergencia del linaje empieza en el estadio DN2 y culmina en el estadio subsecuente DN3 [56]. Recientemente se ha descrito que la intensidad de la señal del TCR puede determinar el linaje al cual los timocitos se comprometen, el pre-TCR se ha asociado a señales débiles debido a su señal autónoma y el TCR $\gamma\delta$ lleva a señales cuantitativamente mayores por su unión al ligando [60]. Dentro de las señales adicionales a las del receptor que intervienen en la elección del linaje se han descrito las señales de Notch, E2A e IL-7 controlando y promoviendo recombinación de *Tcrd* y *Tcrg* al igual que sobrevivencia de precursores $\gamma\delta$ [61–63]. Otro proceso involucrado en la elección del linaje depende de los mecanismos de recombinación de genes del TCR, la expresión del receptor $\delta\gamma$ se inhibe en precursores DP del linaje $\alpha\beta$ a través de la delección del locus *Tcrd* como consecuencia del rearreglo de *Tcra* [64].

Señales inducidas por el pre-TCR

El receptor inmaduro de timocitos o pre-TCR, es un complejo multimérico compuesto por la cadena TCR β rearreglada, una cadena invariante pre-TCR α y moléculas del complejo CD3 (CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ y CD3 ζ) (revisado en [31]); la expresión de dicho receptor permite a los timocitos continuar su maduración del estadio DN hacia el estadio DP en un proceso conocido como Selección β . Las señales inducidas por el pre-TCR incluyen sobrevivencia, proliferación, expresión de CD4 y CD8, rearreglo de TCR α y

exclusión alélica de TCR β [65–67] (revisado en [68, 69]); todas estas respuestas dependen de moléculas como CD3 ϵ , cinasas de la familia Src como Fyn y Lck, cinasas de la familia de ZAP-70 y Syk y proteínas adaptadoras como LAT y SLP-76 [70-76]. A pesar de la homología que presenta con el TCR, el pre-TCR no requiere de la expresión de un ligando por moléculas del MHC [77, 78]; ésta señalización independiente del ligando lleva a un nivel bajo de expresión del receptor en superficie y a su internalización y degradación constitutiva [79, 80].

Señales inducidas por el TCR

El receptor de células T está formado por las cadenas TCR α y TCR β rearregladas. Estas cadenas son altamente polimórficas sin embargo, el acoplamiento del receptor al complejo CD3 es el que permite la señalización intracelular inducida tras el reconocimiento del ligando presentado en el MHC. La señal inicialmente lleva a una activación de cinasas de tirosina (PTK: Protein Tyrosine Kinase) pertenecientes a la familia de Src, como Lck y Fyn. Estas fosforilan secuencias de tirosina contenidas dentro de las cadenas del complejo CD3 conocidas como ITAM (“Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif”) generando sitios de anclaje para la proteína ZAP-70 a través de sus dominios SH2 [81, 82]. El reclutamiento de ZAP-70 al complejo CD3 permite la amplificación de la señal al fosforilar componentes río abajo como LAT (Linker for Activated T cells); la fosforilación de LAT promueve el reclutamiento de PLC γ -1 (Phospholipase C γ 1), ITK (IL-2-inducible T-cell Kinase) y PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) [83]. LAT también contiene sitios de unión para GADS permitiendo el reclutamiento de SLP-76, requerido para una activación eficiente de PLC γ -1 [84, 85]. La activación de PLC γ 1 resulta en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato generando IP3 (Inositol 3,4,5 trifosfato) y DAG

(Diacilglicerol); IP3 lleva a un incremento en la liberación de calcio intracelular mientras que DAG puede activar a PKC θ (Protein kinase C θ) y RasGRP (Ras guanyl nucleotide-releasing protein) iniciando la vía de las MAPK. SLP-76 se asocia con el GEF (Guanine nucleotide Exchange factor) VAV y la proteína adaptadora Nck que une a PAK (p21 Associated Kinase 1) regulando el rearrreglo del citoesqueleto de actina [86-90]. Dentro de los reguladores negativos de la señal del TCR se han descrito la fosfatasa SHP-1, la PTK Csk, la ligasa de ubiquitina c-Cbl y la molécula adaptadora SLAP (Src-like adaptor Protein) [91-94].

Diferenciación CD4 vs CD8

Dentro de modelos que proponen el mecanismo de elección de linaje CD4 versus CD8 destacan el modelo instructivo y el estocástico [95]. El primero postula que el reconocimiento del ligando en el contexto de MHC (clase I ó II) por el TCR permite la agregación del correceptor CD4 ó CD8 y la inducción de la señal que “instruye” al timocito a disminuir la expresión del correceptor inapropiado. Alternativamente, el modelo estocástico o selectivo postula que, previo al reconocimiento TCR/MHC, los timocitos DP pueden azarosamente disminuir la expresión de uno de los correptores de manera que sólo los timocitos capaces de unir la molécula de MHC para la cual su TCR es específico reciben señales de sobrevivencia (concordancia entre la especificidad del TCR y el correceptor elegido). Otro modelo mas reciente es el de la intensidad de la señal, donde cada complejo de TCR/MHC llevaría a señales de sobrevivencia requeridas para el rescate del linaje CD4 ó CD8. Este modelo postula que señales más intensas o de mayor duración favorecen el compromiso hacia el linaje CD4, mientras que señales débiles o de corta duración conducen preferencialmente hacia el linaje CD8 [96, 97]. Este modelo se ha

reforzado con reportes donde se ha visto una mayor asociación de la cinasa Lck a la cola citoplásmica de CD4 respecto a la observada con CD8 [98].

Un nuevo modelo denominado de “reversión de correceptor” propuesto por el grupo de Singer y colaboradores sugiere una regulación negativa de la expresión de CD8 pre-programada en timocitos DP independiente de la restricción por MHC. Una vez que esta regulación negativa ocurre, aquellos timocitos que reciben señales de baja avidéz por un TCR restringido al reconocimiento de MHC I promueven la reversión del correceptor en respuesta a señales dependientes de IL-7. Por otro lado, señales de TCRs restringidos a MHC II incrementarían la expresión del correceptor CD4 que se había mantenido e ignorarían las señales de reversión del correceptor [99].

Interacciones con el estroma tímico

Diversos estudios han descrito la dependencia de señales derivadas de timocitos para la diferenciación y mantenimiento del compartimiento estromal [100, 101]. Esta intercomunicación se ha denominado comunicación cruzada tímica (“crosstalk”) y depende de la señalización de NFkB (Nuclear Factor kB) inducida por el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral α y linfotoxina β [43, 102]. Las subpoblaciones especializadas epiteliales del timo: cortical y medular, facilitan distintos procesos durante el desarrollo del linfocito T; las células epiteliales corticales proveen de las señales involucradas en el compromiso al linaje T, selección β y selección positiva; por otro lado las células epiteliales medulares, junto con células dendríticas, se han relacionado con el proceso de selección negativa [103-106]. Dentro de los numerosos factores solubles producidos por el estroma que regulan los procesos de maduración, destacan las citocinas IL-7 (Interleucina 7) y SCF (Stem Cell Factor) [107, 108] y las quimiocinas CCL25, CXCL12, CCL19 y CCL21 (revisado en [41]).

La diferenciación de los timocitos está relacionada con una migración coordinada a través de distintos microambientes dentro del timo; el reclutamiento de progenitores que entran al timo por vasos sanguíneos ubicados en la unión cortico-medular (CMJ: Cortical-Medullary Junction) es dependiente de la expresión del receptor de quimiocinas CCR9 por timocitos [45] y su ligando CCL25 expresado por células epiteliales corticales [109]. Recientemente se demostró que CCR7 también es un receptor importante para la entrada de progenitores linfoides al timo fetal en etapas previas a la vascularización del órgano [110]. Posteriormente, los timocitos migran a través de la corteza hacia la región externa subcortical en respuesta a CXCL12, CCL19 y CCL21, ligandos para los receptores CXCR4 y CCR7 [111-113]. Las señales dependientes de CCR7 también se han implicado en la migración de timocitos DP que han sido seleccionados positivamente de corteza a médula [114, 115]. Finalmente, los timocitos SP que salen del timo neonato dependen de interacciones CCL19-CCR7 [116], mientras que en timo adulto es dependiente del receptor 1 para esfingosina 1-fosfato (S1P) [117].

La migración de timocitos en respuesta a quimiocinas también involucra cambios en la expresión y estado de activación de integrinas (revisado en [118]); interacciones entre integrinas $\alpha 4$ y VCAM1 (Vascular Cell Adhesión Molecule 1) son esenciales para la migración de los timocitos, sugiriendo que el desarrollo de células T se da a través de una red de células estromales VCAM⁺ que soportan su maduración [119]. Otras moléculas involucradas en los procesos de migración y adhesión de los timocitos son la familia de receptores de cinasa de tirosina Eph y sus ligandos, las efrinas, cuya expresión diferencial en el timo parece estar regulando dichos procesos necesarios para la maduración, sobrevivencia y mantenimiento tanto del compartimiento estromal como el de timocitos [120].

Además de quimiocinas y citocinas se ha demostrado la influencia de otros factores solubles como factores de crecimiento y morfógenos; dentro de los cuales destaca la Superfamilia del Factor de crecimiento transformante β ó TGF- β . Numerosos estudios han descrito la influencia de esta superfamilia en la regulación y función de diversas respuestas inmunes en periferia como inducción de tolerancia, diferenciación de subtipos de células T CD4⁺, regulación de la inflamación y sobrevivencia entre otras (revisado en [121]); sin embargo, su papel durante los procesos de maduración del linfocito T no se ha caracterizado por completo.

En esta tesis nos centraremos principalmente en los mecanismos involucrados durante el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T en el timo, específicamente, aquellos regulados por Activinas e Inhibinas, miembros de la Superfamilia del TGF- β .

Superfamilia del TGF- β

TGF- β 1 fue el primer ligando descrito al promover junto con el factor de crecimiento epidermal (EGF), el crecimiento de células de riñón de rata [122]. Actualmente la superfamilia del TGF- β incluye una gran variedad de ligandos ubicuamente expresados que comparten el dominio bioactivo a nivel de aminoácidos y se conservan desde organismos como *Drosophila* hasta mamíferos (Tabla I). Estos factores pueden regular múltiples respuestas como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración, entre otras, dependiendo del tipo celular, estadio de maduración y combinación de citocinas presentes en el entorno [123-130]. La superfamilia del TGF- β se divide en tres subfamilias: TGF- β s, proteínas morfogenéticas de hueso ó BMPs (Bone morphogenetic proteins) y Activinas/Inhibinas. El mecanismo de señalización es conservado y depende de pares de receptores de membrana tipo I ó ALKs (Activin Like Kinase) y tipo II con actividad de

cinasa de serina/treonina, y de proteínas citoplásmicas que funcionan como factores de transcripción conocidas como Smads [131, 132] (revisado en [133]) (Figura 2). La relevancia de la superfamilia del TGF- β y variedad de mecanismos en los cuáles está involucrada, se ve reflejada en los fenotipos de ratones deficientes para los distintos componentes de la vía de señalización pertenecientes a la misma (revisado en [134, 135]).

Ligando	Receptor tipo I	Receptor tipo II	R-Smad, Co-Smad
TGF- β 1	T β R-I (ALK-5) TSR-I (ALK-1)	T β R-II	Smad2, Smad3, Smad4 Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
TGF- β 2			
TGF- β 3			
TGF- β 4 ^(C)	DAF-1	DAF-4	Sma2, Sma3, Sma4
Activina β A	ActR-IB (ALK-4)	ActR-II ActR-IIB	Smad2, Smad3, Smad4
Activina β B			
Activina β C			
Activina β E			
Inhibina α	?	ActR-II ActR-IIB	?
Dpp ^(D)	Tkv Sax	Punt	Mad, Medea
BMP-2	BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	BMPR-II	Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
BMP-4		ActR-II ActR-IIB	
BMP-7	ActR-I (ALK-2)		
GDF-1	ActR-IB (ALK-4) ALK-7	ActR-IIB	Smad2, Smad3, Smad4
GDF-5 (BMP-14)	BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	ActR-II ActR-IIB	
MIS/AMH	ActR-I (ALK-2) BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	AMHR-II	Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
Nodal	ActR-IB (ALK-4)	ActR-IIB	Smad2, Smad3, Smad4

Tabla I. Superfamilia del TGF- β . Los ligandos citados en esta tabla se han descrito en humanos o en ratón. Entre paréntesis se marcan los homólogos en *C.elegans*^(C) y *Drosophila*^(D). DAF: abnormal Dauer formation, Sma: small body size, Dpp: Decapentaplegic, Tkv: thickveins, Sax: Saxophone, Mad: mothers against Dpp, GDF: Growth Differentiation Factor, MIS/AMH: Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone.

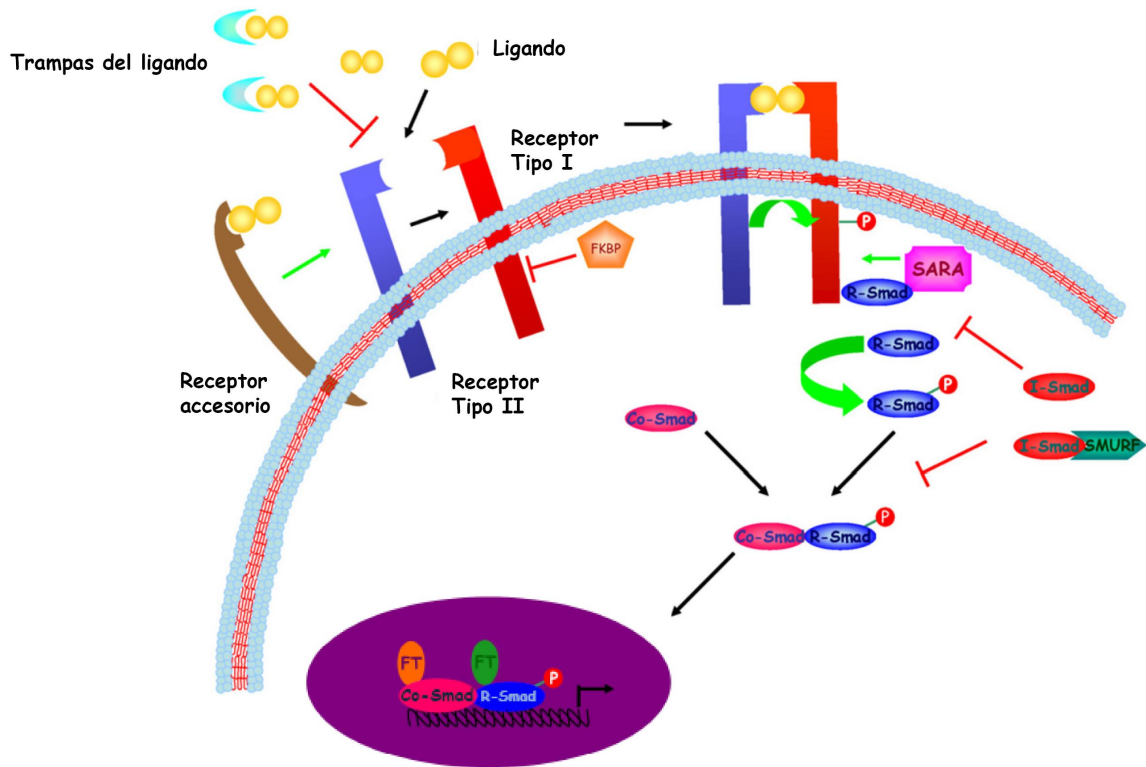


Figura 2. Señalización mediada por la superfamilia del TGF- β . Los miembros de la superfamilia del TGF- β señalizan a través de receptores transmembranales tipo I y II con actividad de cinasa de serina/treonina. El ligando se une a un receptor tipo II para luego reclutar un receptor tipo I, mismo que es fosforilado por el receptor tipo II. El receptor tipo I fosforila a proteínas Smad (R-Smads o Smads de receptor) para inducir respuestas celulares. Las R-Smads fosforiladas interactúan con la Smad común (Smad-4 o Co-Smad) permitiendo su traslocación a núcleo donde reconocen factores de transcripción (FT) regulando la expresión de genes. Las Smads inhibitorias (I-Smads), inhiben la señal inducida por los complejos R-Smad/Co-Smad interfiriendo con la unión de R-Smads al receptor tipo I o compitiendo por la Co-Smad. Adicionalmente, las I-Smads pueden llevar a degradación los complejos de Smad o receptores por su unión a SMURF. Otros mecanismos de inhibición incluyen la presencia de proteínas solubles o trampas de ligando que compiten con el ligando por su unión a los receptores. Receptores accesorios y proteínas de andamiaje como SARA al igual que la chaperona FKBP también pueden regular positiva o negativamente la señal inducida por miembros de la superfamilia del TGF- β .

Ligandos

La superfamilia del TGF- β está conformada por citocinas que conservan una secuencia de seis residuos de cisteína; en humanos se han descrito 42 marcos de lectura abiertos, 9 en *Drosophila* y 6 en *Caenorhabditis*. Los ligandos se secretan como moléculas precursoras que contienen un péptido señal en el dominio amino-terminal conocido como LAP (Latent associated peptide), misma que es cortada por proteasas como plasmina, trombina, transglutaminasas o endoglicosilasas para liberar el ligando bioactivo [136, 137].

El complejo latente del ligando contiene adicionalmente una glicoproteína secretoria conocida como LTBP (Latent TGF- β Binding Protein) unida por puentes disulfuro a LAP [138] que interviene en el almacenaje del ligando latente regulando su unión a matriz extracelular [139, 140]. La forma activa del ligando es un dímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas y un puente disulfuro entre subunidades; cada monómero de entre 12 y 20 kDa contiene cadenas β plegadas unidas por tres puentes disulfuro conservados que forman una estructura conocida como “cysteine knot” [141]. La forma dimérica del ligando sugiere la formación de un complejo con dos receptores tipo I y dos tipo II formando complejos de receptores heterotetraméricos.

Receptores

La familia de receptores con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina en vertebrados incluye siete receptores tipo I (Activin like kinase: ALK 1-7) y cinco tipo II [142]; en general se trata de glicoproteínas de membrana de 55 y 70 KDa formadas por polipéptidos de 500 y 570 aminoácidos respectivamente [143-147]. El dominio extracelular de unión al ligando abarca aproximadamente 150 aa del extremo amino-terminal, se encuentra N-glicosilado y presenta una estructura de tres dedos similar al de toxinas, cada uno de los cuales está formado por cadenas β plegadas antiparalelas [148-152]. La región transmembranal de los receptores no posee ninguna característica estructural y el dominio intracelular contiene al dominio de cinasa de serina y treonina. La fosforilación del receptor tipo II ocurre de manera ligando-independiente, mientras que el receptor tipo I es fosforilado en el dominio GS por el receptor tipo II al unirse el ligando [153, 154]. El dominio GS de los receptores tipo I se forma por una región altamente conservada de 30 aa que incluye la secuencia de serinas y treoninas SGSGSG [155, 156]. Seguido del dominio GS, los receptores tipo I contienen un motivo de leucina-prolina que sirve como sitio de

unión para la inmunofilina FKBP-12, que actúa como regulador negativo de la señal [157, 158]. El dominio de cinasa presenta la secuencia canónica del dominio de cinasa de serina y treonina [143, 159]. Los receptores tipo I fosforilan a las Smads en residuos de serina [160, 161] mientras que los tipo II se autofosforilan y fosforilan al receptor tipo I en residuos de serina y treonina [145, 154-156, 162, 163]. Se han propuesto dos modelos para describir la unión del ligando a los receptores; para el caso de Activinas y TGF- β s el ligando se une primero a un receptor tipo II para luego reclutar un receptor tipo I [159, 163-165]. En contraste, BMPs se unen a ambos receptores al mismo tiempo en forma cooperativa [166-169].

Smads

El nombre de Smad viene del miembro fundador MAD (Mothers against Dpp) descrito en *Drosophila* y sus ortólogos Sma (Small body size) en *Caenorhabditis* [170-172]. En vertebrados se han descrito 8 diferentes Smads (Smad 1-8) que se dividen de acuerdo a su función como Smads activados por receptor (R-Smads), mediador común (Co-Smad) e inhibitorias (I-Smads). Smad 1, 5 y 8 son las R-Smad propias de la vía de BMPs [173-178] mientras que Smad 2 y 3 se han visto involucradas en la vía de TGF- β y Activinas [174, 179-183]. Smad-4 es la Smad común que se comparte en la señal inducida por los diferentes ligandos [132, 160, 182, 184]. Por último, Smad 6 y 7 constituyen el grupo de Smads inhibitorias; Smad 6 inhibe preferencialmente señales dependientes de BMPs [185, 186] mientras que Smad 7 puede inhibir señales inducidas por TGF β s y Activinas [187, 188]. Las proteínas Smad comparten dominios conservados en los extremos amino y carboxilo-terminal conocidos como MH1 y MH2 (Mad-Homology Domain) unidos por una región rica en prolina, de secuencia y longitud variable, que en R-Smads contiene sitios de fosforilación por MAPKs que inhiben su translocación a núcleo [189]. El

dominio MH1 abarca aproximadamente 130 aa y es altamente conservado en R-Smads y Co-Smad pero no en I-Smads; en el estado basal los dominios MH1 y MH2 interaccionan inhibiendo mutuamente sus funciones de unión a DNA para el caso de MH1 y de transactivación para el caso de MH2 [190]. La fosforilación de R-Smads por receptores tipo I libera su autoinhibición y permite que el dominio MH1 pueda unirse al DNA en la secuencia 5'-AGAC-3' conocida como SBE (Smad Binding Element) [191-193]. El dominio MH2 contiene la secuencia de fosforilación SSXS en R-Smads [160, 161]; la secuencia canónica de MH2 abarca 200 aa y está involucrado en la formación de complejos homo y hetero-oligoméricos entre las diversas Smads [182, 186, 194, 195], con la unión al receptor tipo I en el caso de R-Smads [161], su interacción con la Smad común luego de la fosforilación [184] y con factores de unión a DNA [193, 196]. La fosforilación y reconocimiento de R-Smads por receptores tipo I es promovida por su unión a la proteína de andamiaje SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) [197] de la cual se disocian al ser fosforilados para interactuar con la Smad común (Co-Smad) ó Smad-4 permitiendo su traslocación a núcleo, donde interactúan con otros factores regulando la expresión de diversos genes blanco [182].

Finalmente las Smads inhibitorias previenen la activación de R-Smads compitiendo por la unión al receptor tipo I [185, 187, 188] o por su unión a la Co-Smad [186]. Adicionalmente, la interacción de I-Smads con ligasas de ubiquitina como Smurf1 y Smurf2 permite la degradación de los complejos de receptores y terminación de la señal [198, 199].

Reguladores positivos y negativos de la señal del TGF- β

Existen mecanismos de regulación positiva y negativa para la vía de señalización del TGF- β tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular. Dentro de los reguladores positivos se han descrito receptores accesorios que facilitan el reconocimiento del ligando por receptores tipo II como endoglina [200], Cripto [201] y el proteoglicano de membrana β -glicano [202]; éste último en forma soluble puede actuar como antagonista [203]. β -glicano también puede unir a Inhibinas facilitando su acceso a los receptores tipo II para Activinas y antagonizando así la señal mediada por dichos ligandos [204]. La proteína BAMBI (BMP and Activin receptor Membrane Bound Inhibitor) representa otro tipo de regulador negativo de activación compitiendo con el receptor tipo I por el ligando [205].

Los mecanismos de regulación a nivel extracelular también incluyen la presencia de proteínas solubles que funcionan como trampas de ligando secuestrándolo e impidiendo su unión a los receptores. Nogina fue el primer antagonista de este tipo identificado y junto con Cordina inhibe señales dependientes de BMP [206-208]. Folistatina inhibe señales dependientes de Activina [209, 210] aunque también podría actuar como antagonista de BMPs *in vivo* [211]. El antagonismo de Activinas mediado por Inhibinas es de vital importancia para el entendimiento de este proyecto por lo que se describirá en detalle a continuación.

Antagonismo de Activinas por Inhibinas

Inicialmente, las Activinas e Inhibinas fueron purificadas de fluidos gonadales y caracterizadas por su capacidad de activar o inhibir la producción y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) por gonadotropos pituitarios [212-214]. El antagonismo de Activinas por Inhibinas se ha descrito ampliamente en el eje reproductivo [215] y en otros sistemas [216, 217], aunque también hay ejemplos en los que Inhibina no antagoniza los efectos de Activina [218-220]. Las Activinas se forman por homodímeros de

subunidades de Activina β (β A, β B, β C y β E) mientras que las Inhibinas se forman por heterodímeros formados por una subunidad de Inhibina α y subunidades de Activina β (β A y β B); la nomenclatura de las isoformas del ligando está dado por el tipo de subunidad β presente en el dímero por lo que Activina A se forma por dos subunidades β A e Inhibina A por heterodímeros α/β y así sucesivamente [221-223]. El mecanismo de inhibición de Activinas mediado por Inhibinas es desconocido y a la fecha no se han identificado receptores ó genes blanco específicos de Inhibina, sin embargo existen cuatro modelos propuestos para explicar dicho antagonismo mediado por Inhibinas (Figura 3):

1. Ensamblaje del ligando

El primer modelo está basado en el un antagonismo al nivel de la producción del ligando. La generación de dímeros de ligando, tanto en Activinas como en Inhibinas, depende de subunidades β comunes por lo que la producción de Inhibinas dependerá de la disponibilidad de subunidades α . En las gónadas, la expresión de la subunidad α es mucho mayor que la de subunidades β y la producción de dímeros de Inhibina excede a la de Activinas simplemente por un menor ensamblaje de dímeros de Activina [224, 225].

2. Formación de complejos con receptores

Las Inhibinas se pueden unir con menor afinidad que las Activinas, a receptores tipo II a través de la subunidad β conservada [143, 226] sin estimular el reclutamiento y fosforilación del receptor tipo I [227, 228]. Cuando la concentración de Inhibina es mayor a la de Activina, puede darse un antagonismo funcional de señales de Activina por ocupación del receptor tipo II e interferencia en la formación del complejo de receptores [229].

3. Co-receptores de unión a Inhibina

La ausencia de antagonismo aún en exceso de Inhibinas descrita en algunos sistemas [227, 230-232], ha llevado a postular la existencia de receptores para Inhibina presentes en los tejidos en los que se ha reportado dicho antagonismo. La búsqueda de la proteína involucrada llevó al descubrimiento de β -glicano como receptor de unión a Inhibina A [204]. La sola expresión de β -glicano confiere sensibilidad a Inhibinas en células que no eran capaces de responder al ligando y puede antagonizar señales inducidas por Activinas. La Inhibina unida a β -glicano podría por un lado interactuar con receptores tipo II evitando la unión de Activinas o por el otro, prevenir la formación de complejos de receptores inducidos por Activina; su función dependerá de la forma expresada de receptor tipo II y la isoforma de Inhibina presente [233, 234]. Evidencias adicionales a este modelo incluyen el descubrimiento de InhBP/p120 (Inhibin Binding Protein), una proteína accesoria purificada de glándula pituitaria que permite el antagonismo de Activina por Inhibina B [235, 236].

4. Receptor independiente para Inhibina

Este modelo postula que Inhibina podría unirse a un receptor, transducir una señal y dirigir respuestas celulares. La hipótesis anterior se sustenta en que la acción de Inhibina no siempre antagoniza a la acción de Activina y la Inhibina puede llevar a respuestas específicas en diversos tipos celulares [237-241]. Adicionalmente, parece haber tejidos blanco de la acción de Inhibinas que no responden o responden poco a Activinas [242, 243]. Un receptor independiente para Inhibinas podría inhibir la transducción de señales por Activinas al nivel de proteínas Smad, ya sea inhibiendo la activación de R-Smads o promoviendo la expresión de I-Smads. Alternativamente, las señales por Inhibina podrían inducir la internalización y degradación de los receptores y Smads involucrados en la señal por Activinas.

En resumen, no se ha descrito a la fecha un receptor verdadero para Inhibina que pueda explicar la regulación de procesos celulares por estos ligandos. La búsqueda de proteínas que interaccionan con Inhibinas continúa y será necesaria para poder explicar la gran variedad de respuestas inducidas tanto independientes como antagónicas a Activinas.

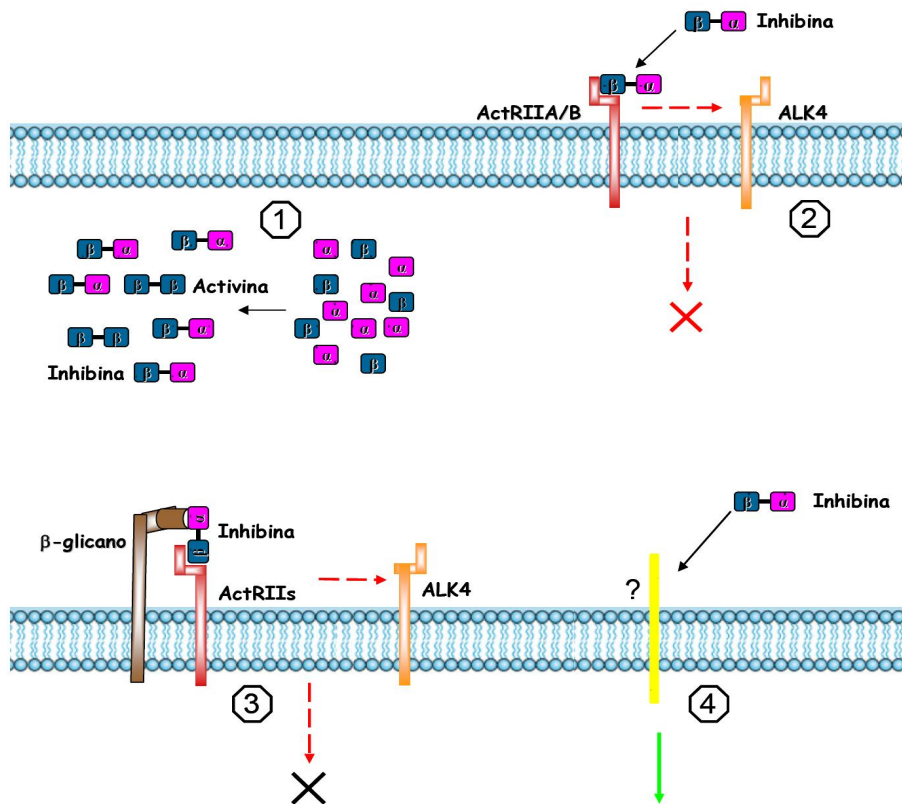


Figura 3. Posibles mecanismos de Inhibición de señales de Activina por Inhibina. Los modelos propuestos a la fecha para explicar el antagonismo de Activinas por Inhibinas incluyen: **1) Ensamblaje del ligando:** síntesis de Inhibinas y no Activinas en presencia mayoritaria de subunidades α , **2) Formación de complejos con receptores:** unión de Inhibinas a receptores tipo II por medio de la subunidad β compartida impidiendo la interacción de receptores con Activinas, **3) Co-receptor de unión a Inhibina:** estabilización del reclutamiento de receptores tipo II por Inhibinas gracias a su unión a β -glicano e impedimento de señales por Activinas y **4) Receptor independiente para Inhibinas:** señales dependientes de Inhibina por la unión a un receptor desconocido que pudiera llevar a señales antagónicas a las de Activina.

La superfamilia del TGF- β en el desarrollo del linfocito T

TGF- β s

Numerosos reportes han implicado a miembros de la superfamilia del TGF- β en el control y regulación de la diferenciación de células T. La primera evidencia de TGF- β como regulador de funciones en células T demostró su efecto antiproliferativo en respuesta a señales dependientes de IL-2 en linfocitos humanos mediante una desregulación del receptor IL-2R [244]. Este estudio también reveló una expresión regulada del receptor para TGF- β y del mismo ligando en células en reposo comparadas con células estimuladas con mitógenos demostrando el papel inmunomodulador de este factor. Posteriormente, otros reportes en ratón confirmaron un papel antiproliferativo de TGF- β en timocitos estimulados con diversas citocinas como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 y TNF- α [245-248].

Un estudio *in vitro* realizado en precursores tímicos (CD25⁺), para buscar citocinas capaces de sinergizar con IL-7 en la inducción de la expresión de CD8, definió al TGF- β 1 como un potente inductor de CD8 en timocitos CD3⁻ provenientes de timo fetal y timo adulto [249]. Esta expresión de CD8 en timocitos inmaduros se ha reportado en ratones normales y ocurre previa a la expresión de CD4 en el paso hacia DP (CD4⁺CD8⁺) [250-252]. Esta capacidad de inducir la población CD3⁻CD8⁺ *in vitro* en cultivos de órgano de timo fetal (FTOC: Fetal Thymic Organ culture), arrojó la primera evidencia para señalar al TGF- β 1 como potencial regulador del desarrollo de timocitos [253, 254]. La expresión de los ligandos TGF- β 1 y TGF- β 2 en células epiteliales corticales de timo fetal y adulto fue demostrada por Takahama et al., quienes propusieron una regulación parácrina en la progresión del ciclo celular de precursores tímicos, e identificaron un complejo asociado al ligando que sugería la expresión de β -glicano en timocitos [254]. Estudios iniciales evaluando los patrones de expresión de las isoformas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) en timo, implicaban que los precursores de timocitos estaban sujetos a la acción de

TGF- β 1 pero no del TGF- β 2 o TGF- β 3 [255]. Sin embargo, reportes posteriores demostraron la expresión de la isoforma biológicamente activa de TGF- β 2 en células epiteliales tímicas. Contrario a lo observado en ratón, la regulación de la diferenciación de timocitos por TGF- β 1 en humano parece funcionar de manera autócrina; los timocitos DN expresan una forma latente del ligando que es activado por timocitos maduros CD8⁺ promoviendo la inhibición de la proliferación de DN y regulando negativamente la maduración de timocitos. Sin embargo, los autores no descartaron la posibilidad de que la expresión de la forma latente también se diera por parte del compartimiento estromal [256]. La capacidad de respuesta al TGF- β en humanos no está restringida a timocitos y hay evidencias de una regulación de la expresión de citocinas en células epiteliales corticales por los TGF- β 1 y TGF- β 3, afectando directamente el desarrollo del linfocito T [257].

Estudios en el ratón deficiente de la isoforma TGF- β 1, con más del 50% de mortalidad intrauterina, demostraron un papel imprescindible del ligando para un desarrollo normal. El fenotipo de estos ratones incluía infiltrados inflamatorios en diversos órganos, revelando la actividad inmunosupresora de TGF- β 1 y su requerimiento para una respuesta inmune regulada. A pesar del fenotipo observado, los autores no reportaron lesiones a nivel histológico en el timo [258]. Sin embargo, un reporte posterior demostró que el desarrollo del linfocito T podría estar afectado en ausencia de TGF- β 1, puesto que observaron una celularidad total del timo reducida, con hiperplasia de la médula y reducción de la corteza tímica [259]. El fenotipo hiperproliferativo de linfocitos T observado en el ratón deficiente de TGF- β 1 no se mantuvo en condiciones *in vitro*, en respuesta a una estimulación con mitógenos (Concanavalina A), debido a una disminución en la expresión y secreción de IL-2, misma que podía revertirse por la adición exógena de

la citocina. El análisis de ratones adultos deficientes de TGF- β 1 demostró un defecto en los procesos de selección y maduración de los timocitos, con una reducción en poblaciones DP y un aumento en DN y CD4⁺ [260]. Las respuestas funcionales inducidas a través del TCR también fueron evaluadas en precursores tempranos de ratones jóvenes, mientras que en condiciones normales la estimulación a través del TCR lleva a una inducción de apoptosis en timocitos inmaduros DP [261, 262]; los timocitos DP y CD4 deficientes para TGF- β 1 son hiperresponsivos a estímulos mitogénicos y fisiológicos mediados por CD3 y CD28. Los niveles de [Ca²⁺]_i son mayores en timocitos CD4⁺ deficientes en TGF β 1, sugiriendo un papel para el TGF- β 1 en la inhibición de la expansión aberrante de células T, manteniendo bajos niveles de [Ca²⁺]_i en las poblaciones SP; esta evidencia podría explicar la proliferación incrementada de los linfocitos observada en los ratones deficientes que llevan al fenotipo autoinmune reportado [263]. Adicionalmente, un desequilibrio en los procesos de inducción de tolerancia dependientes de células T reguladoras, podría también estar involucrado en el desarrollo del fenotipo autoinmune en ratones deficientes para TGF- β ; pues se ha demostrado un requerimiento de dicho ligando para el mantenimiento e inducción de una supresión por estas células en periferia [264].

Evidencias iniciales de la influencia de TGF- β en señales específicas durante la maduración de células T se basaron en la adición exógena de TGF- β 1 ó TGF- β 2 en cultivos de órgano de timo fetal; ambas isoformas inhiben el crecimiento de timocitos de forma dependiente de la dosis, reduciendo el número total de células hasta en un 95% comparado con el control [265]. La diferenciación de timocitos resultó afectada en la generación de subpoblaciones DN, DP y CD4⁺, pero no CD8⁺. Dentro de las subpoblaciones DN, la adición de los ligandos inducía un bloqueo inicial en el estadio DN1; por otro lado, la

caracterización fenotípica de las poblaciones CD8⁺ generadas en presencia de TGF-β1, demostraron que se trataban de células SP maduras expresando CD8 αβ, TCRαβ y CD3, mas no precursores inmaduros intermedios como se había reportado anteriormente [249, 253]. El análisis del ciclo celular en estos cultivos, sugería que el incremento en células CD8⁺ no era debido a una proliferación incrementada de esta subpoblación, y proponía un papel para el TGF-β1 en la elección del linaje CD8⁺ ó alternativamente, una inhibición de la diferenciación hacia el linaje CD4⁺, como lo sugería el fenotipo observado en el ratón deficiente [259, 265]. A pesar de todas las evidencias acumuladas, no se habían reportado estudios donde se demostrara la activación de la vía canónica del TGF-β en células T, hasta que en el 2000 Mamura et al. reportaron el aumento de pSmad2 en linfocitos T periféricos humanos. Dicho estudio demostró que la activación del TCR llevaba a una fosforilación de Smad2 en linfocitos, sugiriendo una comunicación cruzada de la vía del TGF-β con las respuestas mediadas por el TCR [266]. Adicionalmente, reportes recientes analizando la expresión de receptores para TGF-β en timocitos, demostraron una expresión preferencial del receptor tipo I ALK5, y el aumento de pSmad2 en subpoblaciones SP [267].

Los ratones deficientes para las isoformas TGF-β2 ó TGF-β3 presentan un fenotipo letal en etapas embrionarias ó perinatales, y sugieren que estos ligandos tienen papeles no-redundantes durante el desarrollo [268-270]. Dada la dificultad de evaluar las implicaciones de la ausencia de TGF-β2 y TGF-β3 en ratones adultos, nuevas estrategias han surgido utilizando la forma dominante negativa para el receptor tipo II (TβRII) en modelos de ratones deficientes condicionales [271-273]. La expresión de la forma dominante negativa del TβRII restringido a células T bajo el promotor de CD4, reproduce el fenotipo observado en el ratón deficiente para TGF-β1, demostrando la importancia de las señales del TGF-β1

en el mantenimiento de la homeostasis celular T. El estudio no mostró deficiencias aparentes en el desarrollo del linfocito T, sin embargo los autores no evaluaron el repertorio de células T seleccionado en el ratón transgénico, mismo que podría contribuir al fenotipo autoinmune observado [273].

Estudios utilizando un modelo inducible Cre/lox para eliminar la expresión de T β RII en células hematopoyéticas, las cuales fueron utilizadas en ensayos de trasplante de médula ósea concluyó, contrario a lo que se había reportado [265], que TGF- β es dispensable para el desarrollo de timocitos y para la inducción de apoptosis en respuesta a CD3, sin embargo es requerido para la inhibición de la proliferación de linfocitos CD8⁺ SP *in vivo* [274].

La utilización de ratones transgénicos y deficientes para moléculas involucradas en la señalización mediada por TGF- β , aportó información adicional en cuanto al papel de esta superfamilia durante el desarrollo del linfocito T. El ratón deficiente para FKBP-12 demostró que esta molécula no está regulando las señales de inhibición del TGF- β en la proliferación de timocitos fetales [275]. El estudio de ratones deficientes para Smad3, indicó que existen mecanismos dependientes e independientes de Smad3 que están regulando el efecto antiproliferativo de TGF- β 1 en esplenocitos murinos [276]. Ratones transgénicos sobreexpresando la Smad inhibitoria Smad 7 bajo el promotor de queratina 5 (K5), restringido a células epiteliales del timo, mostraron atrofia tímica como consecuencia de una apoptosis masiva de timocitos [277]. El número total de timocitos se redujo 50 veces y el análisis de subpoblaciones reveló una eliminación de precursores DP, sugiriendo que la señalización del TGF- β en el compartimiento estromal tímico es necesaria para el mantenimiento de los precursores de células T. Adicionalmente, la sobreexpresión de

Smad7 podría afectar el desarrollo y diferenciación de células epiteliales, modificando así el microambiente requerido para la sobrevivencia y maduración de los timocitos. El fenotipo observado en estos ratones, comparado con el de TGF- β 1 ó Smad 3, podría deberse a una deficiencia combinada de señales dependientes de TGF- β , BMP y Activina [277]. La evidencia conjunta de señales dependientes del TGF- β en el desarrollo de timocitos está esquematizada en la Figura 4.

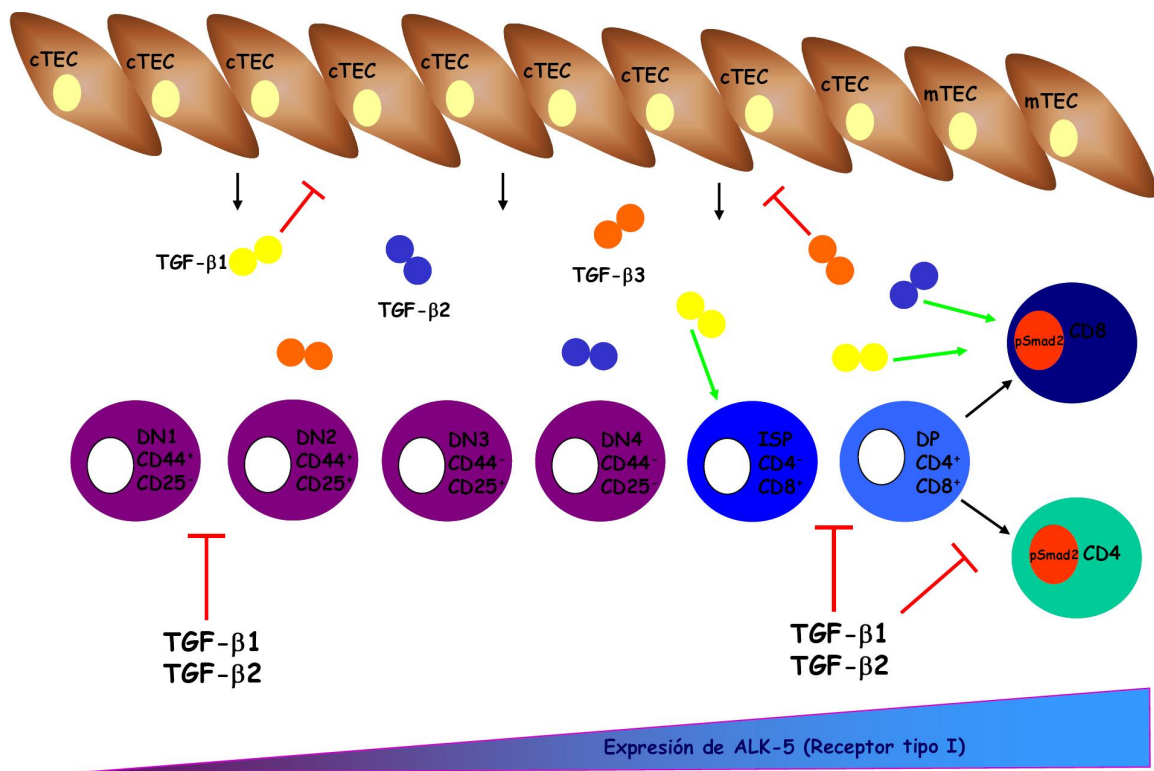


Figura 4. TGF- β durante el desarrollo del linfocito T. Las tres isoformas del TGF- β se expresan en el timo, estudios *in vitro* han demostrado la inhibición en el paso del estadio DN1 al estadio DN2 y de DN a DP por TGF- β 1 y TGF- β 2. El paso a CD4 SP se inhibe por TGF- β s, aunque estos ligandos promueven el paso al estadio CD8 ISP y SP. La expresión del receptor tipo I ALK-5 se da mayoritariamente por precursores SP, mismos en los que se ha descrito la inducción de fosforilación de Smad2 en respuesta al ligando.

BMPs

Una evidencia indirecta que sugería la participación de BMPs en los procesos de maduración del linfocito T fue el fenotipo del ratón deficiente para Schnurri-2 (Shn-2).

Shn-2 es un factor de transcripción que en *Drosophila* regula positivamente señales dependientes de Dpp (“Decapentaplegic”) [278-282], cuyos homólogos en ratón son BMP-2/4 [283, 284]. El análisis del timo de estos ratones demostró una disminución significativa en la generación de timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺. La deficiencia de Shn-2 en timocitos; y no en células estromales, es la responsable del fenotipo observado y provee de la primera evidencia involucrando a miembros de la superfamilia del TGF- β en la selección positiva de precursores de linfocitos T. Aunque los ligandos sugeridos para modular las señales de Shn-2 son BMP-2/4, los autores no descartan la posibilidad de que otros miembros de la superfamilia como Activinas y TGF- β s, puedan regular dicho proceso de selección de timocitos en vertebrados [285].

Contrario a lo descrito para TGF- β s, existen pocas evidencias en cuanto al papel de BMPs durante el desarrollo del linfocito T. Inicialmente se reportó la expresión de receptores tipo I para BMPs en timo [286]. Estudios posteriores demostraron la expresión del ligando BMP-4 [287] y de otros mediadores de la señal como Smads y Cordina [288-290]. La búsqueda de marcadores específicos en subpoblaciones de timocitos reveló un papel potencial para Twisted Gastrulation (Tsg) en la maduración de células T [291, 292]. Tsg es un regulador de señales dependientes de BMP [293-298] y basados en el reporte del ratón deficiente para Shn-2 [285], Graf et al. realizaron estudios para investigar el papel de las señales de BMP reguladas por Tsg durante el desarrollo del linfocito T [299]. En este estudio, los autores analizaron los patrones de expresión de BMPs, Tsg y Cordina en el timo. Tsg y BMP7 se expresan tanto en timocitos como en el estroma y la expresión de Tsg parece estar regulada por señales dependientes del TCR; por otro lado, la expresión de Cordina y de los ligandos BMP2 y BMP4 está restringida al compartimiento estromal. La función de BMPs en el desarrollo se evaluó en FTOC tratados con los diferentes ligandos;

el tratamiento con BMP2 y BMP4 pero no BMP7, disminuyó la progresión de timocitos del estadio DN al estadio DP y redujo el porcentaje de timocitos en la fase G2/M del ciclo celular. Como se esperaba, el tratamiento con el antagonista Cordina tuvo efectos opuestos a los observados con BMPs. La adición de Tsg no fue capaz de revertir el arresto en DN inducido por BMPs y su función antagónica se observaba únicamente en presencia de Cordina. Un hallazgo interesante fue la inducción de la expresión de Tsg en timocitos luego de la estimulación por entrecruzamiento del pre-TCR ó TCR, proponiendo un modelo en el cual las señales de arresto en DN mediadas por BMPs, se abaten temporalmente en precursores DN3 donde las señales del pre-TCR inducen la expresión del antagonista, permitiendo el paso al estadio DP. Los autores sugieren que un mecanismo similar podría estar actuando en precursores DP, donde las señales del TCR podrían promover el paso a SP. Sin embargo, a la fecha no hay evidencias que apoyen esta posibilidad. Un reporte muy similar, confirmó la expresión de BMP-2, BMP-4, Cordina y Tsg en el timo; adicionalmente demostró por primera vez la expresión del antagonista Nogina [300]. La expresión de BMP-4 está restringida a las zonas subcapsular y cortical del timo, donde los precursores DN están localizados. La expresión de los receptores tipo I: BMPRI-A y BMPRI-B, tipo II: BMPRII, así como de Smad1, Smad4, Smad5 y Smad8 en precursores DN (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), demostró que los precursores tempranos de timocitos expresan las moléculas necesarias para responder a BMPs. La adición de BMP-4 en FTOC indujo un bloqueo en el estadio DN1, aumentó la sobrevivencia de precursores DN1 y disminuyó el porcentaje de células apoptóticas; por otro lado como se había demostrado anteriormente, BMP-4 también indujo una inhibición en la proliferación de timocitos; sin embargo, no hubo diferencias en el número total de células obtenidas después del tratamiento con el ligando. El antagonista Nogina incrementó las poblaciones de timocitos DN4 y DP al igual

que el número total de células en cultivo; a pesar del incremento observado, la proliferación de timocitos no se vio afectada y sorprendentemente Nogina parecía también disminuir el porcentaje de células apoptóticas. Finalmente, un reporte reciente confirmó el arresto en DN1 mediado por BMP-4 [301].

Estudios *in vivo* con ratones deficientes para Tsg, demostraron que los niveles de Smad1 fosforilado aumentan en timocitos de ratones Tsg^{-/-}, apoyando el modelo que postulaba un requerimiento de Tsg para antagonizar señales dependientes de BMP en el timo. La ausencia de Tsg resultó en una reducción en la celularidad del timo posiblemente debido a un aumento en la apoptosis de los timocitos [302]. El análisis de subpoblaciones mostró un aumento en poblaciones SP y una disminución en DP; sin embargo los autores no discuten la relevancia de estos hallazgos ni evalúan el efecto de la ausencia de Tsg en precursores DN, los cuáles parecían responder a señales de BMP según estudios previos *in vitro*. Por otro lado, la generación de un ratón transgénico para Nogina expresado en células epiteliales del timo, demostró la importancia de señales de BMP en otros procesos durante la embriogénesis, como la inducción del descenso del primordio tímico al mediastino [303]. Aunque los porcentajes de timocitos parecen normales en este ratón, es evidente una disminución en la celularidad total del timo. Los autores no hacen mayor análisis en los procesos de selección de los timocitos y concluyen que el estroma tímico es el que depende de señales de BMP.

Las evidencias anteriores apoyan el papel regulador de los BMPs en el desarrollo del linfocito T. El modelo actual se resume en la Figura 5 y sugiere que las señales de BMP tienen que ser reguladas negativamente para que una maduración completa del timocito ocurra.

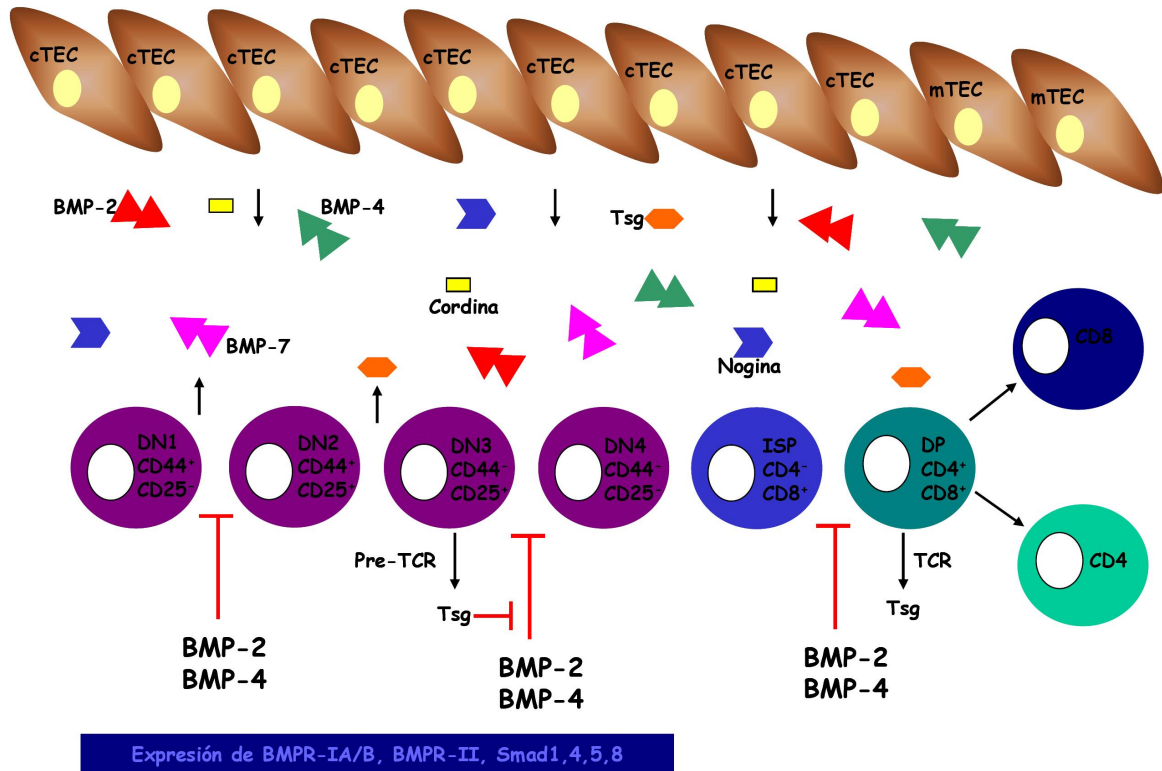


Figura 5. BMPs durante el desarrollo del linfocito T. BMP-2, 4 y 7 al igual que los antagonistas Cordinin, Noggin y Tsg se expresan en el timo. Los ligandos BMP-2 y 4 inhiben el paso del estadio DN1 al estadio DN2, de DN3 a DN4 y de DP a CD4. Las señales a través del pre-TCR y TCR llevan a la expresión de Tsg promoviendo la maduración de timocitos del estadio DN3 al estadio DN4 y al estadio DP al antagonizar las señales de BMPs. La expresión de receptores tipo I y tipo II para BMPs se ha reportado en el timo, sin embargo no se ha caracterizado a nivel de subpoblaciones de timocitos.

Activinas

Las Activinas son los ligandos que menos se han estudiado durante el desarrollo de los timocitos. Estudios iniciales *in vitro* demostraban un efecto antiproliferativo de Activina A en respuesta a mitógenos en timocitos de rata [217], mismo que era opuesto al de Inhibina A. El antagonismo de Activinas e Inhibinas se ha descrito en una gran variedad de tipos celulares y respuestas funcionales [212, 213, 304-307]. Específicamente en linfocitos T humanos, Activina puede antagonizar la inducción de interferon- γ en respuesta a Inhibina [308]. Otros reportes han demostrado que la inhibición del crecimiento de timocitos puede

ser debida en parte, a la inhibición de la producción de IL-6, sin embargo la adición exógena de IL-6 parece revertir los efectos de Activina induciendo una mayor proliferación y sugiriendo el papel dual de Activina en la regulación de la respuesta proliferativa de linfocitos dependiendo de la combinación de citocinas presentes en el entorno [309]. Estudios más detallados demostraron la inducción de apoptosis por Activina A en poblaciones de linfocitos humanos dependiente de la inducción de la fosfatasa de inositol SHIP [310]. Ninguno de estos estudios evaluó el papel de Activinas durante el desarrollo del linfocito y sólo existe un reporte reciente en el que se demuestra la expresión de éstos ligandos y de algunas moléculas involucradas en la señalización por Activinas en el timo [267]. El análisis de la vía de activación por Activinas en subpoblaciones de timocitos, demostró la inducción de la fosforilación de Smad 2 en precursores DN, donde la expresión del receptor tipo I (ALK-4) fue mayor comparada con otras subpoblaciones de timocitos. Este estudio también demostró la expresión de uno de los receptores tipo II para Activina: ActRIIA y de las subunidades del ligando Activina β A, β B, β C y β E; sin embargo el análisis cuantitativo de la expresión de estas moléculas a nivel de subpoblaciones tímicas y la relevancia de ésta expresión en los procesos de maduración y diferenciación del linfocito no se ha demostrado experimentalmente.

Justificación

El papel de la superfamilia del TGF- β durante el desarrollo del linfocito T ha sido ampliamente estudiado para el caso de las subfamilias de TGF- β s y BMPs, mismas que parecen regular la transición de timocitos del estadio DN al estadio DP. Los datos obtenidos hasta el momento aportan nuevas evidencias de la participación de este tipo de factores de crecimiento en los procesos de selección y diferenciación en timo. Sin embargo, la participación de miembros de esta superfamilia en procesos tan importantes como la selección positiva y negativa de los timocitos, implicado por el fenotipo del ratón deficiente para Shn-2 y TGF- β 1 respectivamente, aún queda por definirse.

Estudios recientes sugieren que la subfamilia de las Activinas e Inhibinas también podría estar involucrada en los procesos de desarrollo del linfocito T. Lo anterior viene sustentado por la detección de receptores para Activina en subpoblaciones de timocitos DN, capaces de responder a estímulos mediados por el ligando como sería la inducción de la fosforilación de Smad2. La expresión diferencial de receptores para Activina podría conferir al timocito señales estadio-dependientes que pudieran regular los procesos de selección en timo, sin embargo el papel de Activinas e Inhibinas en el desarrollo tímico no ha sido caracterizado.

El estudio de los patrones de expresión de Activinas e Inhibinas, sus receptores y de moléculas involucradas en la vía de señalización en distintas subpoblaciones tímicas; así como el papel de estos ligandos mediante estudios funcionales *in vitro*, nos permitirá evaluar su participación en los procesos de diferenciación del linfocito T.

Hipótesis

La señalización mediada por las Activinas e Inhibinas participa en los procesos de selección y maduración de los timocitos.

Objetivos

-Determinar y caracterizar la expresión de Activinas $\beta A/\beta B$, Inhibina α , receptores tipo I (ALK-4), tipo II (ActRIIA/ActRIIB) y Smads en diferentes estadios de maduración en el estadio fetal, así como en las subpoblaciones tímicas del ratón adulto.

-Evaluar y determinar las respuestas funcionales inducidas por Activina A e Inhibinas A y B durante el desarrollo del linfocito T.

-Evaluar el fenotipo del timo en ratones deficientes para Inhibina α tanto en ratones adultos como en etapas fetales.

-Analizar y caracterizar la activación de la vía canónica dependiente de Smads inducida por Activinas e Inhibinas en timocitos.

Materiales y métodos

Ratones

Para los ensayos de expresión utilizamos ratones híbridos B6/D2 F1, adultos de cuatro a seis semanas y fetos (E14/E16) obtenidos de cruzas de hembras C57/BL6 y machos DBA-2 (Jackson Laboratories).

Los cultivos de timo fetal se realizaron a partir de timos fetales E14 provenientes de cruzas de ratones C57/BL6.

Los ratones deficientes para Inhibina α fueron generados [311] y donados por el Dr Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston TX).

Todas las cepas de ratón fueron crecidas y mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo las normas éticas y de sanidad correspondientes.

Líneas celulares

Las líneas celulares HepG2 y Jurkat E6-1 (ATCC: HB-8065 y TIB-152 respectivamente) se mantuvieron en una incubadora a 37°C en atmósfera humificada con 5% CO₂. Las células Jurkat fueron mantenidas en medio RPMI (GIBCO 31800-022) suplementado con 10% SFB, 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomycin y 1% de glutamina (GIBCO 10378-016) hasta su utilización para los ensayos de fosforilación en la fase exponencial de crecimiento. Las células HepG2 fueron crecidas en medio DMEM (GIBCO 12800-017) suplementado con 10% SFB, 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomycin y 1% de glutamina. La línea HepG2 se despegó con una solución de Tripsina 0.25% en PBS durante 2 min, se lavó y dividió cada tercer día a una dilución 1:3. Previo a las estimulaciones, las células se mantuvieron en medio DMEM al 0.5 % de SFB.

Subpoblaciones tímicas

Para los estudios de expresión de mRNA, se utilizaron timocitos totales de ratón adulto (4 a 6 semanas) y fetales (día de gestación E14–16), así como subpoblaciones de timocitos purificados y estroma de timo fetal del día E15. Como control positivo de expresión de Activinas se utilizó testículo [312]. La purificación de poblaciones de timocitos se realizó a partir de timos de ratones B6/D2 de cuatro a seis semanas, teñidos con los anticuerpos acoplados a fluorocromos CD4-PE y CD8-Cy (BD Biosciences, (GK1.5) 553730 y (53-6.7) 553034). Las subpoblaciones de timocitos CD4, CD8, DP, y DN fueron separadas con una pureza \geq a 95% utilizando el citómetro FACS Aria (BD Biosciences). La purificación del estroma se hizo tratando timos fetales del día 15 de gestación en cultivo con medio DMEM al 10% FCS por 5 días suplementado con 1.35 mM deoxiguanosina (Sigma Chemicals D-0901) en 5% CO₂ a 37°C.

RNA y oligonucleótidos

El RNA total fue aislado utilizando el reactivo RNA-60 (Tel-Test Inc) de acuerdo al protocolo del fabricante. El DNA fue removido usando el reactivo “DNA-free” de Ambion Inc. El cDNA se sintetizó a partir de RNA libre de DNA, utilizando la transcriptasa reversa Superscript II (18064-022, Invitrogen) y oligo dT (814270, Roche). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Invitrogen y las secuencias se presentan a continuación:

Smad-2 sentido: 5'-ATGTCGTCCATCTTGCCATT- 3'

antisentido: 5'-GTCCCCAAATTTTCAGAGCAA- 3';

Smad-3 sentido: 5'-CACAGCCACCATGAATTACG- 3'

antisentido: 5'-GAATATTGCTCTGGGGCTCA- 3';

Smad-4 sentido: 5'-GAC-AAGGTGGGGAAAGTGAA-3'

antisentido: 5'-CTCCACAGACGGGCATAGAT-3';

Activina β A sentido: 5'-TGCTTTGGCTGAGAGGATTT- 3'

antisentido: 5'-CGGGTCTCTTCTTCAAGTGC-3';

Activina β B sentido: 5'-TCCGCCTGTA CTTCTTCGTC- 3'

antisentido: 5'-AGCTGTCACACTGCACATCC- 3';

Inhibina α sentido: 5'-CCATCGAGCTGCTCTCAATA- 3'

antisentido: 5'-ACCTCCATCTGAGGTGGTTC- 3';

ActRIIA sentido: 5'-CGTTCGCCGTCTTTCTTATC-3'

antisentido: 5'-GCCCTCACAGCAACAAAAGT- 3';

ActRIIB sentido: 5'-GATACCCATGGACAGGTTGG- 3'

antisentido: 5'-TAATCGTGGGCCTCATCTTC-3';

Alk-4 sentido: 5'-TTCTTCCCCCTTGTTGTCCT- 3'

antisentido: 5'-AGGCAGTAGAAGGGCTTTCC- 3'.

Análisis de la expresión de mRNA mediante PCR cuantitativa

La PCR tiempo real se realizó amplificando 1 μ l de cDNA (1/40 del cDNA total obtenido de 1–3 μ g de mRNA inicial) con el kit SYBR Green PCR Core (Applied Biosystems) en un sistema de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación para Activina β B, Inhibina α , ActRIIA, ActRIIB, Smad-2, Smad-3, y Smad-4, fueron 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 s, 55°C por 1 min, y 72°C por 1 min. Las condiciones de amplificación para Activina β A y Alk-4 fueron 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 94°C por 15 s, 58°C por 45 s, y 60°C por 1 min. Después de la amplificación, se determinó el punto de fusión para crear los perfiles de “melting” para cada reacción. El número de ciclos de PCR requeridos para una

fluorescencia de SYBR Green que cruce el umbral de detección donde haya un incremento significativo en el cambio de fluorescencia (CT threshold cycle) se obtuvo utilizando el Software ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. La cantidad inicial de cDNA se normalizó de acuerdo a la expresión de β -Actina murina medida en reacciones de PCR en paralelo.

Para el análisis estadístico de muestras de RT-PCR se utilizó el programa Qgene [313]. La media de la expresión normalizada se calculó promediando los valores de CT (muestras blanco y de referencia por triplicado), los valores de media normalizada y error estándar se obtuvieron con las ecuaciones 3 y 4, respectivamente, de acuerdo a lo descrito por Muller et al., 2002. La expresión normalizada se obtuvo a partir de los valores de la eficiencia de amplificación calculados para cada gen y se utilizaron para calcular la cantidad relativa de cada mRNA presente en timo fetal y entre poblaciones de timocitos separados por FACs (sorting) o células estromales del día 15 con respecto a la expresión en timo adulto. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de Student de dos colas para datos no apareados. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

Para elaborar las gráficas de abundancia relativa de los diferentes mRNAs en un mismo tejido, realizamos curvas estándar con cantidades conocidas de los productos amplificados obtenidos del mismo cDNA para extrapolar nuestros datos experimentales normalizados con respecto a la expresión del control endógeno, β -Actina.

Con la finalidad de confirmar la pureza y el tamaño del producto de PCR; las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 2% (peso/volumen).

Inmunohistoquímica. Timos de ratones fetales y adulto fueron fijados, deshidratados y embebidos en parafina. A cada órgano se le hicieron cortes seriados de 5 µm de grosor con un microtomo, y las secciones fueron rehidratadas con soluciones a diferente concentración decreciente de etanol (de 100 a 50%). La actividad de peroxidasa endógena se eliminó incubando con una solución al 3% de H₂O₂ durante 10 min, los epitopos se expusieron con un amortiguador de citrato en condiciones de presión alta durante 1 min. Para bloquear se utilizó el reactivo Super block por 6 min (Sensitek HRP, Scy Tek Laboratories), las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Los anticuerpos Anti-Alk-4 (yT-17), anti-Activina-βA (C-18), y anti-Citoqueratina 5/8 (RCK102) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti Alk-4 y anti-Activina βA fueron biotinilados siguiendo un protocolo adaptado de [314]; el anticuerpo policlonal de conejo Anti-Inhibina α fue generado [315] y donado por el Dr. Wylie Vale (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA). Finalmente el anticuerpo Anti-MHC Clase II (biotina anti-ratón I-A/I-E, 2G9), fue obtenido de BD Biosciences. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron 4 veces con PBS y se incubó con el agente secundario estreptavidina-HRP (Sensitek HRP, Scy Tek Laboratories), anti-ratón-HRP de oveja ó anti-conejo-HRP de cabra (NA931 y NA934V Amersham Biosciences) por 20 min a 37°C. Como control negativo, utilizamos suero normal de conejo o agente secundario después del bloqueo inicial. Las secciones se revelaron por 5–20 min en una solución del sustrato diaminobenzidina (Sensitek-HRP, Scy Tek Laboratories) y se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio Nikon Optiphot-2 equipado con una cámara Nikon Coolpix 4300 (Nikon Inc).

Cultivos de timo de órgano fetal (FTOC)

El cultivo de órgano de timo fetal es un modelo de diferenciación de linfocito T in vitro en el cual se parte de precursores tempranos DN, conforme avanza el cultivo los timocitos DN avanzan al estadio DP y al cabo de varios días de cultivo se llega a poblaciones maduras SP, comparables a las observadas en timo adulto. Timos de ratones de 14 días de gestación obtenidos a partir de cruces de ratones C57/BL6 o de ratones Inhibina α ($^{+/-}$), enriquecidos en precursores DN, fueron aislados y puestos en cultivo durante 3 ó 7 días en placas de 6 pozos sobre membranas permeables Millicell-CM (PICM03050, Millipore). Como control, uno de los dos lóbulos se mantuvo en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 1% de aminoácidos no esenciales (11360-070, GIBCO), 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomycin y 1% de glutamina (GIBCO 10378-016); el lóbulo par fue tratado con 500 ng/ml de Activina A (120-14, Preprotech), Inhibina A ó Inhibina B (DSL-R05140 y DSL-R05141, Diagnostic Systems Laboratories). Para los cultivos realizados a partir de timos de ratones deficientes, los fetos se tiparon por PCR a partir de DNA de cola con oligonucleótidos donados por el Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston, TX); tomamos uno de los lóbulos como control al día cero de cultivo y el lóbulo par se mantuvo en cultivo con medio DMEM suplementado. Las subpoblaciones de timocitos fueron analizadas por citometría de Flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando los anticuerpos contra marcadores de superficie acoplados a fluorocromos anti CD25-FITC (7D4, 553071), CD44-PE (01225A), CD8-Cy (53-6.7, 553034), CD4-APC (RM4-5, 553051), y CD24-FITC (M1169, 553261), adicionalmente utilizamos un anticuerpo biotinilado anti-TCR β (H57-597, 553169) seguido de Estreptavidina-PE (554061) todos obtenidos de BD Biosciences. Para el análisis de

apoptosis en cultivo, utilizamos Anexina V-FITC (51-65874X, BD Biosciences) y 7AAD (Sigma Aldrich). Se realizó un conteo final del número total de timocitos obtenidos en los cultivos en cámaras de Neubauer. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de Student de dos colas para datos apareados. $P \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

Tinción intracelular por FACS

Cinco a diez millones de timocitos de ratones C57/BL6 de cuatro a seis semanas ó células Jurkat E6-1 fueron aislados y mantenidos en RPMI suplementado con 0.5 % SFB, 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomicina y 1% de glutamina. Los timocitos fueron teñidos con anticuerpos anti CD8-Cy y anti CD4-APC previos a la estimulación. Las condiciones de estimulación se realizaron en 100 μ l de RPMI al 0.5% SFB con 500 ng/ml de Activina A, Inhibina A ó Inhibina B, ó 10 ng/ml de TGF- β durante 30 min a 37°C; como control positivo estimulamos con 100 μ M de O-Vanadato durante 3 min a 37°C. Las células se fijaron durante 10 min con tres volúmenes del amortiguador LyseFix 5X (558049, BD Biosciences) diluido en H₂O a 37 °C y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS 5% SFB y 0.02% Azida de Sodio. La permeabilización se realizó a 4 °C con un volumen de Perm buffer II (558052, BD Biosciences) durante 20 min en oscuridad seguida de dos lavados con 1 ml de PBS 5% SFB y 0.02% Azida de sodio. El pegado inespecífico del anticuerpo secundario se redujo incubando las células con 200 μ l de una solución γ -globulina humana (16.5 mg/ml diluido 1/100) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 1 μ l de anti-pSmad (1 μ g, AB3849, Chemicon International) durante 30 min a 4 °C. Se lavaron dos veces y se resuspendieron en 50 μ l del anticuerpo anti-conejo acoplado a FITC (81-6111, Zymed) diluido 1/200 durante 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados finales y se resuspendieron en PBS para el análisis por FACS.

Inmunodetección de proteína por Western blot

Para la detección de proteínas por Western blot realizamos lisados de 5 a 10 millones de células Jurkat ó HepG2, previamente estimuladas con 500 ng/ml Activina A, Inhibina A e Inhibina B ó 10 ng/ml TGF- β durante 30 min a 37 °C. La estimulación se detuvo agregando tres volúmenes de buffer de stop (PBS, 20 mM NaF, 1mM Na₃VO₄). La lisis se realizó en 100 μ l de un amortiguador de lisis (1% Tritón, 0.02M Tris pH 8.0, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.02M NaF, 0.002M Na₃VO₄, 0.02M Na₄P₂O₇, 0.3mM PMSF, 0.001M DTT y 1 μ g/ml de los inhibidores de proteasas Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina) durante 10 min a 4 °C. Las muestras fueron separadas mediante electroforesis, en geles al 7.5% de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nylon Immobilon-P (IPVH00010, Millipore), en cámaras de transferencia semi-seca (Owl Scientific) con un buffer conteniendo 0.02 M tris, 0.2 M glicina y 20% metanol durante 1 hora a 0.85 Amp. Las membranas fueron bloqueadas con TBS con 0.05% Tween-20 y 5% de leche desnatada toda la noche en agitación a 4°C. Las membranas se incubaron durante 2 horas con 1 μ g/ml del anticuerpo anti-Smad2 (51-1300 Zymed) a temperatura ambiente en TBS con 0.05% Tween-20 al 1% de leche. Se lavaron tres veces durante 10, 5 y 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (NA934V, Amersham) diluído 1/2000 en TBS con 1% de leche durante 30 min a temperatura ambiente. Se hicieron cuatro lavados de 10, 5, 5 y 5 min y las bandas fueron inmunodetectadas por medio de quimioluminiscencia con el kit Supersignal WestPico Chemiluminescent Substrate (34080, Pierce) utilizando placas Biomax MR (895 2855, Kodak). Las membranas se trataron con buffer de Stripping (0.1M glicina, 0.5% SDS pH 2.5) por 30 min a 65°C. Se bloquearon toda la noche y se incubaron con 1 μ g/ml del

anticuerpo anti-pSmad (AB3849, Chemicon International) en TBS, 0.05% Tween-20 y 1% de leche durante 4 horas a temperatura ambiente. La detección de pSmad se realizó utilizando un anticuerpo acoplado a HRP y el kit de quimioluminiscencia como se describió anteriormente.

El análisis por densitometría se realizó con el programa Quantity One, a cada valor se le restó el valor de fondo (background) de cada membrana. Las gráficas representan el incremento relativo en la fosforilación de Smad con respecto al nivel basal, previamente normalizado con los valores de proteína total.

Inmunoprecipitación de proteínas

Para los ensayos de inmunoprecipitación, los lisados de células estimuladas se incubaron toda la noche con 60 μ l de proteína G agarosa (15920-010, Invitrogen) diluída 1:5 en buffer de lisis, 400 ng/IP de anti-Smad2 (51-1300, Zymed) y 300 μ l de buffer de lisis en agitación a 4°C. Las muestras se lavaron con buffer de lisis y se resolvieron en geles al 7.5% de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras. La transferencia e inmunodetección se realizaron como se describió anteriormente.

Inhibición de la actividad del receptor tipo I para TGF- β y Activinas

El tratamiento con la droga inhibitoria SB 431542 (1614, Tocris Bioscience) se realizó a una concentración de 10 μ M en RPMI 0.5% durante 30 min previo a la estimulación con los ligandos recombinantes. Las muestras fueron analizadas por citometría o por Western blot como se describió anteriormente.

Resultados

Expresión de los mRNAs de Activinas, Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smad en Timo fetal y timo adulto

Para determinar la expresión de los ligandos y moléculas de señalización involucradas en la vía de Activinas durante el desarrollo de linfocito T, realizamos ensayos de RT-PCR a partir de mRNA total de timos fetales E14-E16 y timo adulto. Utilizamos oligonucleótidos específicos para Activina β A, Activina β B, Inhibina α , Alk-4, Act-RIIA, Act-RIIB, Smad-2, Smad-3 y Smad-4. La expresión de las subunidades para los ligandos y los receptores tipo II es significativamente mayor en estadios tempranos del desarrollo E14 comparado con los estadios posteriores E15, E16 y adulto (Figura 6a-c). La expresión del receptor tipo I Alk-4, también disminuye en etapas fetales E15 y E16 comparadas con E14, aunque vuelve a aumentar en timo adulto (Figura 6d). Los receptores tipo II disminuyen conforme avanza el desarrollo del timo (Figuras 6e-f). Por otro lado, la expresión de proteínas Smad parece ser mayor en estadio E15, sin embargo el análisis estadístico no demostró diferencias significativas con respecto a los otros estadios de maduración, y su expresión se mantiene en todas las etapas de desarrollo evaluadas (Figuras 6g-i). En resumen, esto demuestra que todas las moléculas involucradas en la vía canónica activada por las Activinas están presentes en el timo murino fetal y adulto.

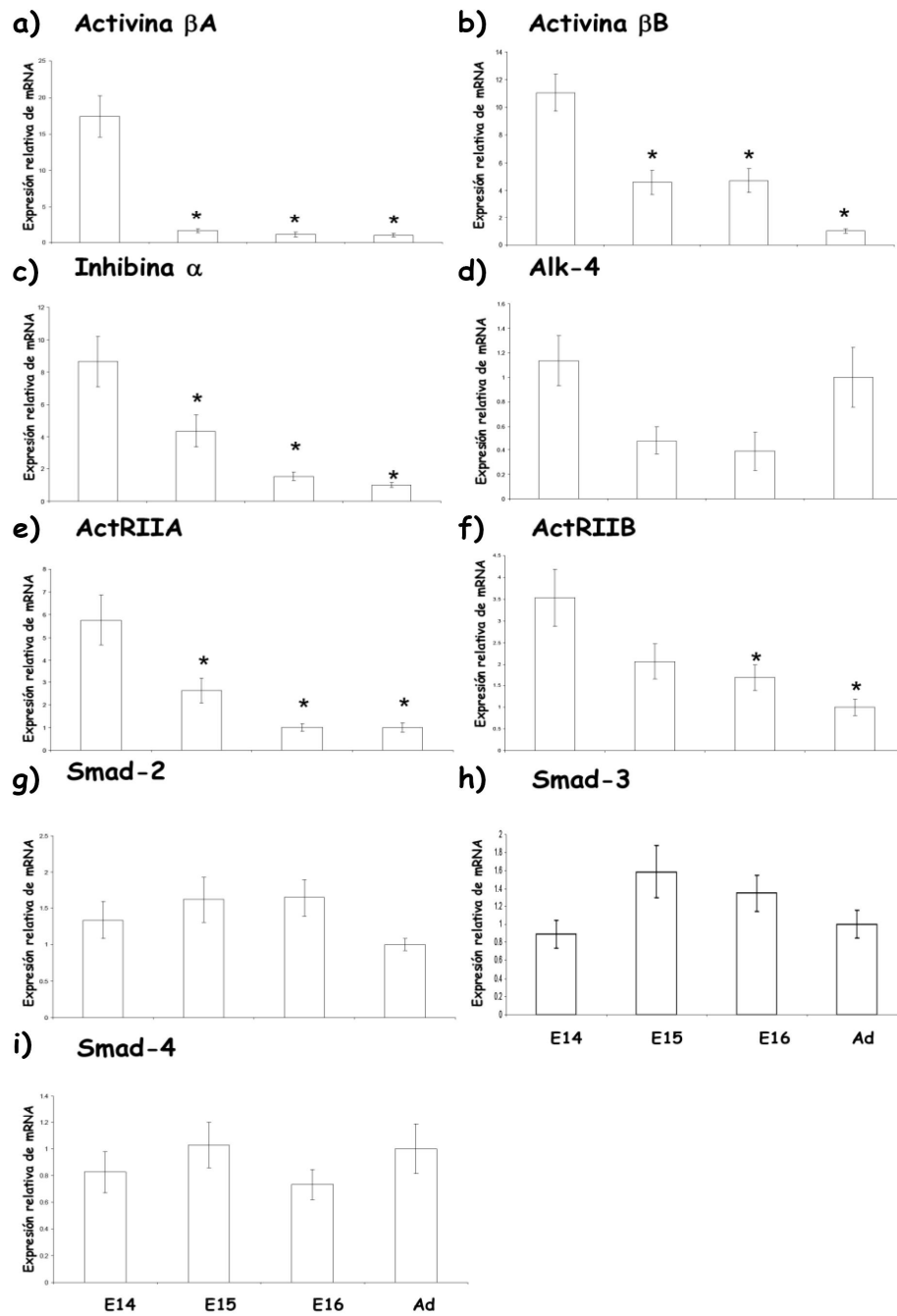


Figura 6. Expresión de mRNA de genes relacionados con Activina en el timo. La expresión de ligandos subunidades del ligando β A, β B y α (6a-c), receptores Alk-4, ActRIIA y ActRIIB(6d-f) y moléculas de señalización Smads 2, 3 y 4(6g-i) se evaluó en timos fetales de los días E14 al E16 de gestación y timo adulto (Ad). Resultados de un experimento representativo realizado en triplicado de un total de 4 independientes. Los datos representan la expresión relativa de mRNA para cada gen con respecto a la expresión en timo adulto. Cada reacción de PCR se normalizó con el control respectivo de β Actina. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con respecto a la expresión en E14.

Expresión de los mRNAs de Activinas, Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smad en timocitos y estroma

Dada la heterogeneidad observada en las subpoblaciones de timocitos, correspondientes a distintos estadios de diferenciación en los que se llevan a cabo procesos de señalización importantes, decidimos caracterizar la expresión de los ligandos y receptores en las distintas subpoblaciones timicas. Con la finalidad de realizar un estudio de expresión a nivel celular, purificamos las cuatro subpoblaciones principales de timocitos (DN, DP, CD4 y CD8) mediante separación celular (“sorting”) utilizando el citofluorometro de flujo FACSAria. Como fuente estromal utilizamos timos de día 15 de gestación (E15) tratados con deoxiguanosina durante 5 días, a partir de los cuales aislamos el mRNA y realizamos ensayos de RT-PCR. Los resultados demuestran que las subunidades del ligando Activina β A, Activina β B e Inhibina α , se expresan mayoritariamente en el compartimiento estromal; sin embargo, de manera interesante, las subunidades β A y α también se expresan en timocitos (Figuras 7a y 7c). Activina β A se expresa en todas la subpoblaciones de timocitos mientras que Inhibina α se expresa en DN, DP y CD4 mas no en CD8. Interesantemente la expresión de la subunidad β B parece estar restringida al estroma (Figura 7b). En cuanto a la expresión de receptores, los timocitos DN son la subpoblación con mayor expresión de receptores tipo I Alk-4 y tipo IIB, aunque observamos expresión de ambos receptores en todas las subpoblaciones evaluadas, tanto subpoblaciones de timocitos como en el estroma (Figura 7d y 7f). La expresión del receptor tipo II ActRIIA se observó preferencialmente en células del estroma sin embargo ActRIIB también se expreso en niveles comparables con los de timocitos DN en esta misma subpoblación (Figura 7e). En cuanto a la expresión de proteínas Smad, Smad 2, 3 y 4 se

expresan tanto en timocitos como en estroma y dentro de las subpoblaciones de timocitos, los precursores DN presentaron mayores niveles de expresión (Figura 7g-i).

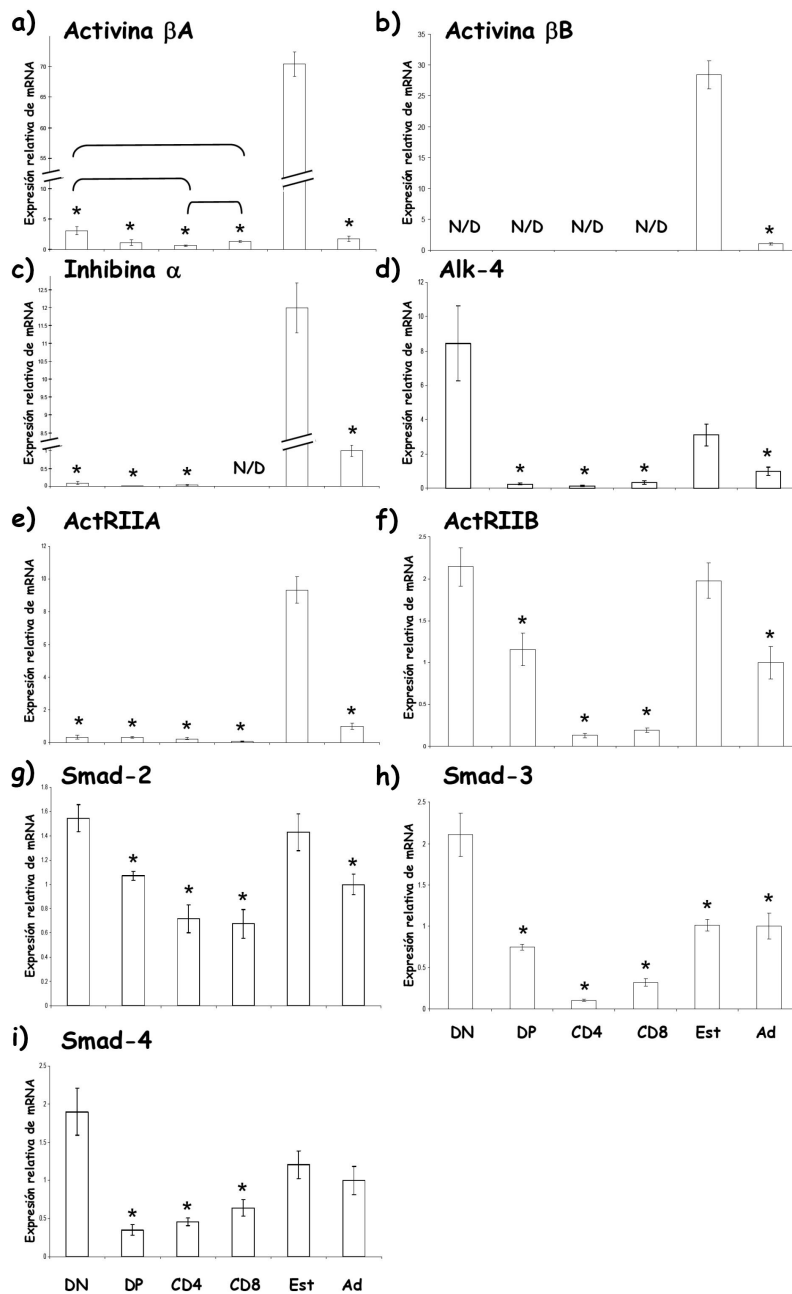


Figura 7. Expresión de mRNA de genes relacionados con Activina en subpoblaciones de timocitos y estroma tímico. La expresión de subunidades de ligando β A, β B y α (7a-c), receptores tipo I y II Alk-4, ActRIIA y ActRIIB(7d-f) y proteínas Smad 2, 3 y 4(7g-i) se evaluó en subpoblaciones aisladas de timocitos o células de estroma fetal. Resultados de un experimento representativo realizado en triplicado de un total de 4 independientes. Los datos representan la expresión relativa de mRNA para cada gen con respecto a la expresión en timo adulto (Ad). Cada reacción de PCR se normalizó con el control respectivo de β Actina. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con respecto a la expresión en estroma (Activinas β A, β B, Inhibina α y ActRIIA) o a los valores en DN (Alk-4, ActRIIB y Smads). Otras diferencias significativas se indican con corchetes. N/D: no detectado.

Análisis de la abundancia relativa de los genes relacionados con Activinas en timo fetal y adulto

Dado que el análisis por RT-PCR sólo nos permite determinar la expresión de un sólo gen en distintas subpoblaciones y estábamos interesados en comparar los niveles de expresión de varios genes en la misma etapa del desarrollo o subpoblación; realizamos un análisis de abundancia de mRNA para los genes del ligando, los receptores y proteínas Smad en una misma muestra experimental. Dicho análisis demostró que tanto en etapas fetales como en adulto, la expresión de la subunidad del ligando Inhibina α es mayor que la de subunidades βA ó βB , sugiriendo que el ligando mayoritario expresado en el timo son Inhibinas (dímeros α/β) y no Activinas (dímeros β/β). La expresión de la subunidad α fue de 2-4 veces mayor que la subunidad βA en la etapa más temprana de diferenciación evaluada E14, esta diferencia aumenta de 15 a 20 veces en timos de etapas fetales E15 y E16 y vuelve a disminuir en timo adulto donde se expresa a niveles comparables con los observados en E14. Por otro lado, la expresión de la subunidad βB fue de 15 a 20 veces menor comparada con la expresión de la subunidad α en todas las etapas de desarrollo analizadas (Figura 8, panel superior). La expresión del receptor tipo IIB para Activina es hasta 50 veces mayor que la del receptor tipo IIA en timo fetal del día 14 y varía de entre 5 y 13 veces en etapas E15, E16 y timo adulto. Con respecto al receptor tipo I, ActRIIB se expresa el doble en E14 y esta diferencia se incrementa de 3 a 5 veces en etapas E15 y E16 aunque disminuyen en timo adulto a niveles comparables con los observados en la etapa más temprana de desarrollo analizada E14 (Figura 8, panel central). Dentro de las Smads, Smad2 se expresa de 2-3 veces más que las Smads 3 y 4 en todos los estadios de maduración del timo estudiados (Figura 8, panel inferior).

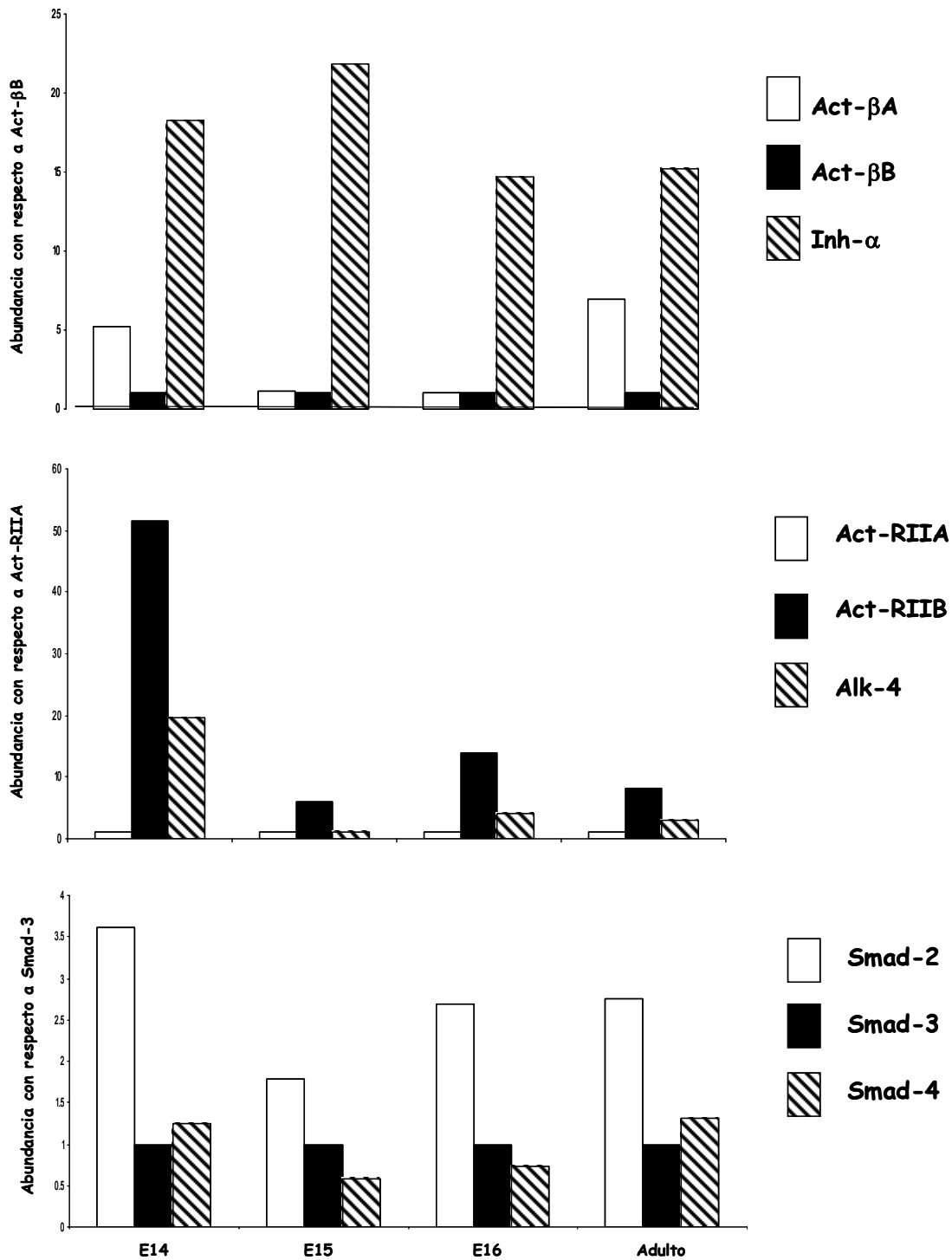


Figura 8. Abundancia relativa de mRNA de genes relacionados con Activina en el timo. Expresión de mRNA de subunidades de ligando (panel superior), receptores Tipo I y II (panel central) y proteínas de señalización Smad (panel inferior) en diferentes estadio del desarrollo fetal y adulto. Los datos representan la expresión con respecto al mRNA de menor expresión en la misma muestra basado en el número de amplicones iniciales a partir de cantidades equivalentes de cDNA ajustadas al control endógeno (β -Actina).

Análisis de la abundancia relativa de los genes relacionados con Activinas en subpoblaciones de timocitos y estroma

La expresión de subunidades del ligando en estroma (E15) y timocitos de ratón adulto, confirmó una mayor expresión de Inhibina α por células estromales de hasta 3 veces comparada con la subunidad βA . La expresión de la subunidad βB en estroma es mucho menor con niveles 5 y 17 veces menores comparados con lo de Activina βA e Inhibina α , respectivamente. Por otro lado, las subunidades βA y α expresadas por timocitos DN, DP y CD4 presentan niveles comparables de expresión entre ellas (Figura 9, panel superior). El receptor tipo IIA es el que menos se expresa en comparación con el receptor tipo I y el receptor tipo IIB en todas las subpoblaciones analizadas. La expresión del receptor tipo I Alk-4 varía con respecto al receptor tipo IIB dependiendo de la subpoblación de timocitos, siendo el doble en DN y CD8, mientras que en CD4 disminuye 3 veces y en timocitos DP se observa a niveles equivalentes (Figura 9, panel central). Finalmente en cuanto a la expresión de Smads, Smad2 se expresa en niveles 2 a 5 veces mayores que Smad3 y Smad4 tanto en timocitos como en estroma. La expresión de Smad3 y Smad4 es equivalente en timocitos DN y células estromales, sin embargo los niveles de expresión de Smad4 disminuyen en timocitos DP y aumentan en SP con respecto a Smad3 (Figura 9, panel inferior).

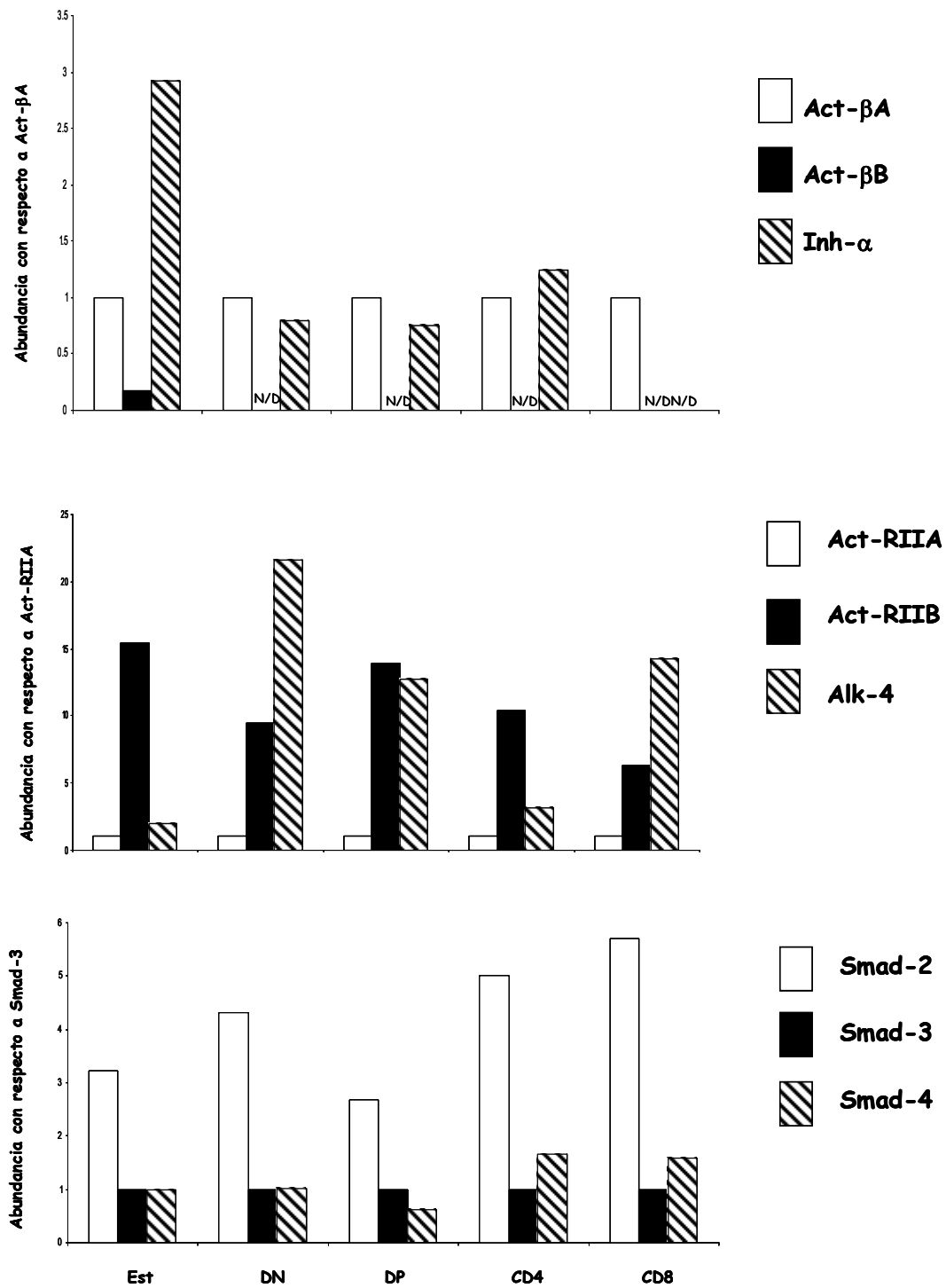


Figura 9. Abundancia relativa de mRNA de genes relacionados con Activina en subpoblaciones del timo. Expresión de mRNA de subunidades de ligando (panel superior), receptores Tipo I y II (panel central), y proteínas Smad (panel inferior) en distintas subpoblaciones tímicas. Los datos representan la expresión con respecto al mRNA de menor expresión en la misma muestra basado en número de amplicones iniciales a partir de cantidades equivalentes de cDNA ajustadas al control endógeno (β -Actina). Est: estroma, N/D: no detectado.

Expresión de las proteínas Alk-4, Activina β A e Inhibina α en el timo

Para confirmar nuestros resultados de expresión de mRNA a nivel de proteína, realizamos ensayos de inmunohistoquímica en cortes de timo fetal y timo adulto con anticuerpos dirigidos contra el receptor tipo I Alk-4 y las subunidades del ligando β A y α . Con esta técnica fue posible detectar la expresión de Activina β A, Inhibina α y Alk-4 en todas las etapas de desarrollo del timo analizadas tanto en timos fetales como en adulto (Figura 10). Para confirmar la expresión de Inhibina α por células del estroma tímico, se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la subunidad α del ligando generosamente donado por el Dr. Wylie Vale. Para identificar las subregiones anatómicas del timo (corteza y médula), se llevaron a cabo tinciones de cortes seriados de timo fetal y adulto utilizando anticuerpos anti queratina (K5 y K8), para identificar las células epiteliales de la corteza, y anti-MHC de clase II, para identificar las células dendríticas, que se encuentran preferencialmente en la médula. Como se observa en la Figura 11, la tinción para la subunidad α muestra un patrón de expresión muy parecido al obtenido con las tinciones con los anticuerpos que identifican el estroma cortical y medular, lo cual confirmaría que la expresión de Inhibina α se da mayoritariamente por células estromales, tanto en timo fetal como en timo adulto.

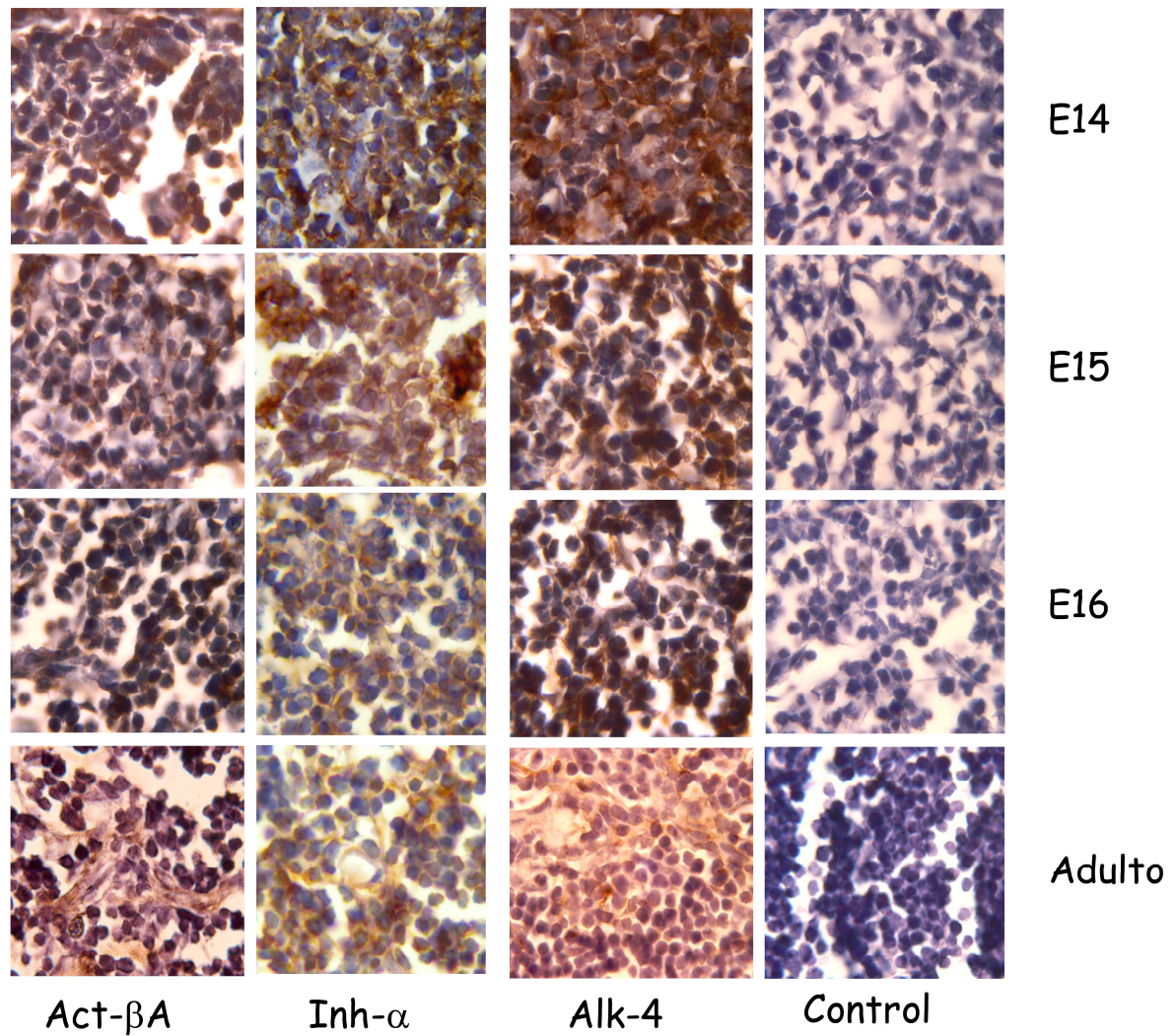


Figura 10. Expresión de Alk-4, Activina β A e Inhibina α en el timo. Secciones tímicas (5 μ m) de timo fetal (E14-E16) y adulto fueron teñidas con anticuerpos acoplados a biotina contra Activina β A, Inhibina α ó Alk-4, seguidos de Estreptavidina-HRP; como control se muestra la tinción con estreptavidina-HRP sola. Las células teñidas positivamente se visualizan en café (diaminobenzidina), las secciones se contratiñeron en azul (Hematoxilina de Harris). Imágenes mostradas a un aumento de 100X.

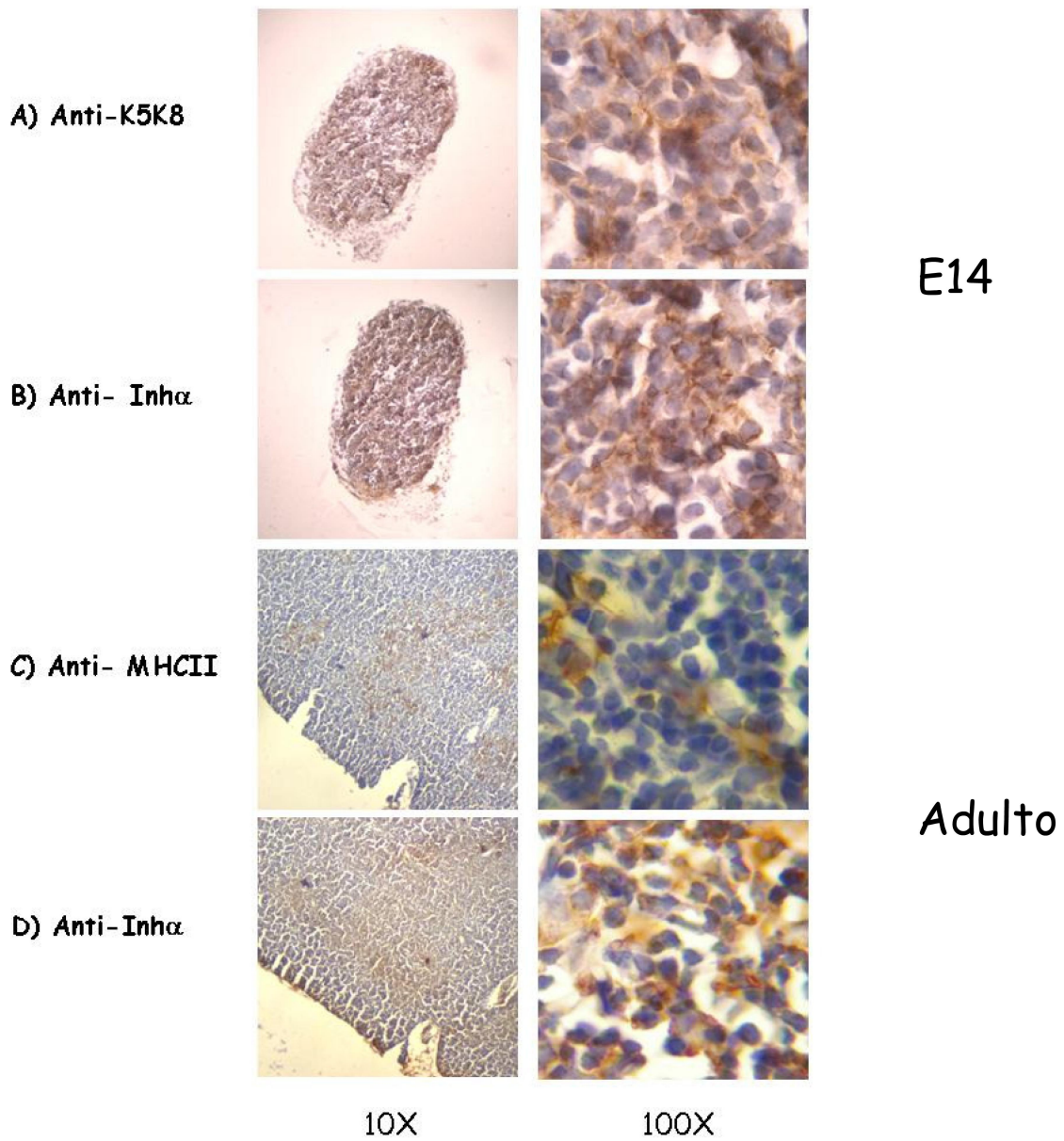


Figura 11. Colocalización de la expresión Inhibina α y marcadores de estroma en el timo. Secciones tímicas seriadas de 5 μm de timo fetal E14 (A y B) y timo adulto (C y D) fueron teñidas con anticuerpos acoplados a biotina contra Inhibina α (B y D), queratina 5/8 (A) y MHCII (C) seguidos de Estreptavidina-HRP. Las células teñidas positivamente se visualizan en café (diaminobenzidina), las secciones se contrañeron en azul (Hematoxilina de Harris). Imágenes mostradas a un aumento de 10 y 100X.

Papel de las Activinas e Inhibinas durante el desarrollo de precursores tempranos Dobles Negativos

Para determinar el papel de las Activinas e Inhibinas en los procesos de diferenciación de los timocitos, realizamos cultivos de órgano de timo fetal. El cultivo de órgano de timo fetal (FTOC: Fetal Thymic Organ Cultures) es un modelo de diferenciación de timocitos *in vitro* donde es posible analizar el efecto de moléculas de interés en los procesos de maduración del linfocito T. Los cultivos parten de timos fetales de día 14 de gestación (E14) donde la mayoría de los timocitos se encuentran en estadio DN; conforme avanza el cultivo aparecen las subpoblaciones de timocitos DP y SP para finalmente llegar a poblaciones equivalentes a las observadas en timo adulto (Figura 12). Uno de los lóbulos de cada timo fetal se cultivó en medio completo y funcionó como control; el otro lóbulo se trató con medio suplementado con 500 ng/ml de los ligandos recombinantes Activina A, Inhibina A ó Inhibina B, y después de tres días de cultivo analizamos y comparamos las subpoblaciones de timocitos obtenidas con o sin tratamiento. Inicialmente, utilizamos los marcadores de maduración CD44 y CD25 para determinar el efecto de los ligandos en precursores tempranos DN (DN1-DN4). Como se observa en la Figura 13, el tratamiento con Activina A e Inhibina A promovió el paso de DN3 a DN4, disminuyendo los porcentajes de precursores DN3 e incrementando los de DN4 a los tres días de cultivo. Por otro lado, los lóbulos tratados con Inhibina B presentaron un incremento en el porcentaje de precursores DN1 comparado con el lóbulo control.

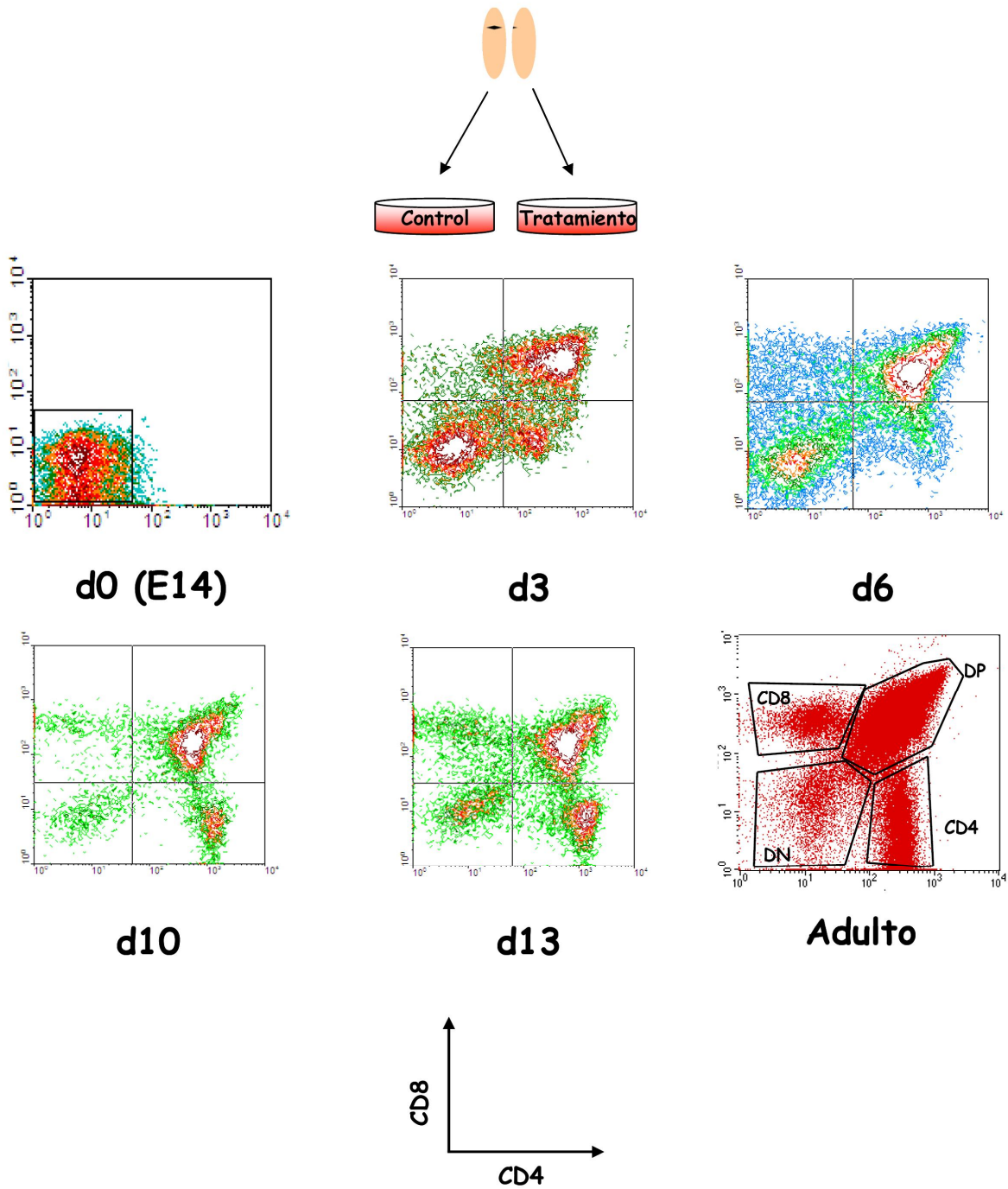


Figura 12. Cultivo de órgano de timo fetal FTOC (Fetal thymic organ culture). El cultivo parte de timos de estadio E14 de gestación enriquecido en precursores DN según el análisis por FACS con los marcadores superficiales CD4 y CD8. Uno de los lóbulos se mantiene en medio como control y al otro lóbulo se le realiza el tratamiento con los diferentes ligandos en estudio. Conforme avanza el cultivo los timocitos DN maduran al estadio DP y SP para finalmente contener las subpoblaciones de timocitos observados en un timo adulto.

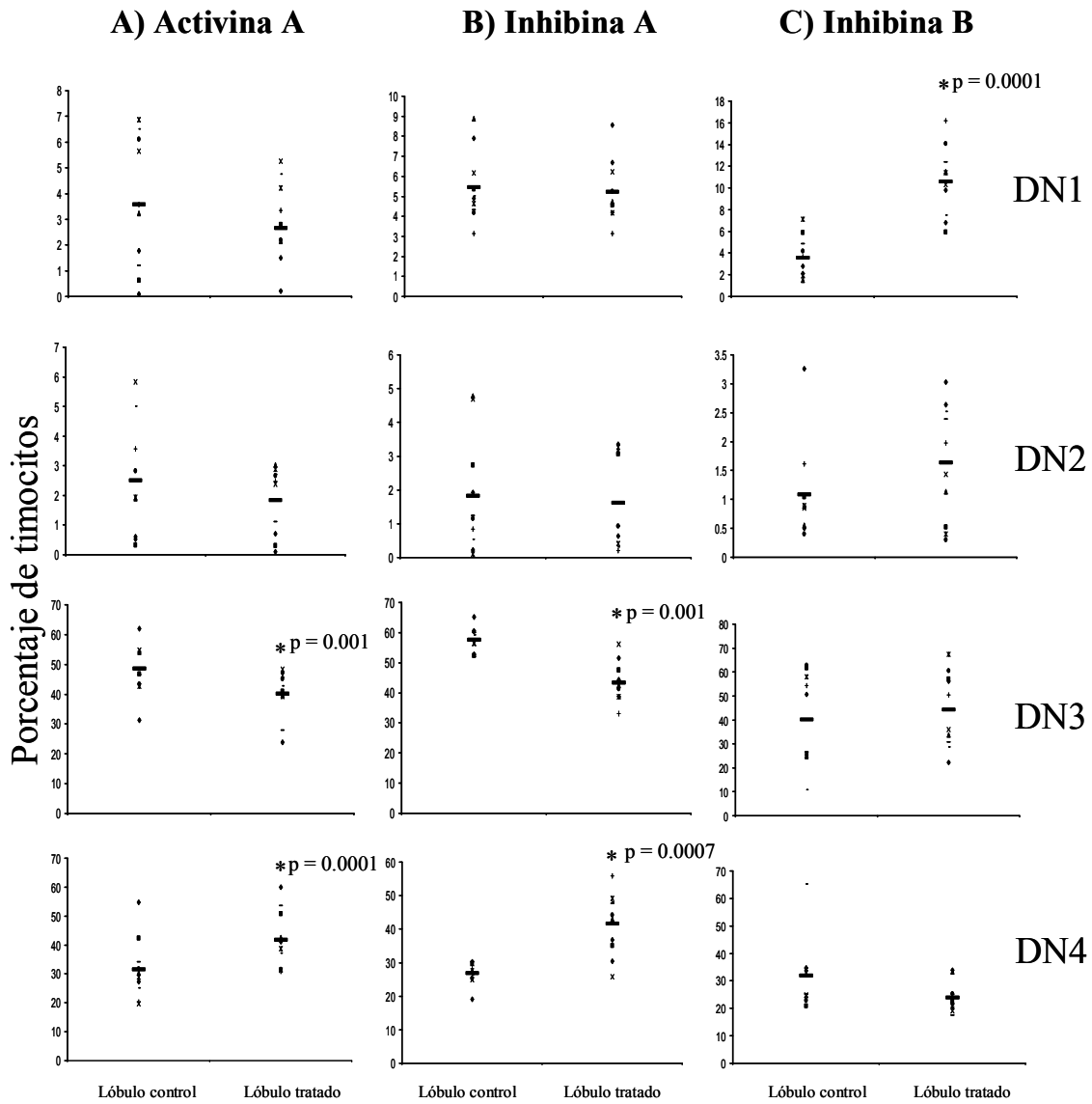


Figura 13. Análisis de precursores DN en cultivos de órgano de timo fetal tratados con Activina A, Inhibina A ó Inhibina B por tres días. Se realizaron cultivos de órgano de timo fetal durante tres días con 500 ng/ml de los ligandos recombinantes Activina A (A), Inhibina A (B) ó Inhibina B (C). Al final del cultivo los timocitos fueron analizados con base a la expresión de CD44 y CD25 por FACS para diferenciar entre subpoblaciones DN1-DN4. Los porcentajes de cada subpoblación obtenidos del lóbulo tratado se compararon con los obtenidos en el lóbulo control (sin tratamiento). En las gráficas se muestran 10 pares de lóbulos representativos de un mínimo total de 20 a partir de al menos tres experimentos independientes. El valor promedio (-) y los datos de significancia ≥ 0.05 fueron obtenidos con la prueba de T para datos pareados.

Papel de las Activinas e Inhibinas durante el desarrollo de timocitos DN, DP, CD4 y CD8

Una vez que determinamos el efecto de los ligandos recombinantes en los precursores tempranos, quisimos evaluar el efecto del tratamiento en la generación de precursores DP y SP utilizando los marcadores superficiales CD4 y CD8. El tratamiento con Activina A por tres días llevó a una disminución en precursores DN y a un incremento en CD8 (Figura 14A). Para determinar si la subpoblación CD8 incrementada por Activina A correspondía a la subpoblación ISP (Intermediate Single Positive) presente durante el desarrollo normal del timo precediendo a la subpoblación DP [250-252], o a la subpoblación madura CD8 SP; utilizamos los marcadores de maduración CD24 (HSA) y TCR β . CD24 es un marcador de maduración que está expresado en altos niveles en progenitores tempranos y disminuye después de la selección positiva de los timocitos [316], mientras que la expresión de TCR β en superficie identifica la expresión del pre-TCR y TCR en los timocitos, la cual incrementa después de la selección positiva y durante la diferenciación de los timocitos DP a SP. La tinción para dichos marcadores demostró que la subpoblación CD8 incrementada por Activina A corresponde a la de ISP con altos niveles de expresión de CD24 y baja o nula expresión de TCR β (Figura 15).

El tratamiento con Inhibina A promovió el paso de timocitos DN al estadio DP, disminuyendo el porcentaje de precursores DN e incrementando el de DP (Figura 14B). Por otro lado, Inhibina B presentó un efecto contrario al de Inhibina A, incrementando el porcentaje de precursores DN y disminuyendo el de DP (Figura 14C). Paralelamente al análisis de marcadores de maduración, realizamos un conteo final de células provenientes de lóbulos tratados y lóbulos control; el tratamiento con Activina A e Inhibina A no indujo

cambios significativos en el número total de células obtenidas luego de tres días de cultivo, sin embargo el tratamiento con Inhibina B disminuyó el número total de células hasta un 33% comparado con el control (Figura 16). Para determinar si dicha disminución era debida a un incremento en apoptosis en las subpoblaciones mayoritarias (DN y DP) observadas al día tres de cultivo; realizamos un ensayo con el marcador de apoptosis temprana Anexina V y con el marcador para DNA 7AAD en lóbulos tratados con Inhibina B. El análisis demostró que había una disminución significativa en los porcentajes de precursores DN y DP vivos, de un 8 y un 6 % respectivamente comparados con el control; por otro lado también encontramos un incremento de 2% en la apoptosis de precursores DP (Figura 17); sin embargo el tratamiento con Inhibina B disminuye el paso a DP, por lo que no creemos que dicho incremento en apoptosis sea suficiente para inducir la disminución en el número total de células de los lóbulos tratados con Inhibina B.

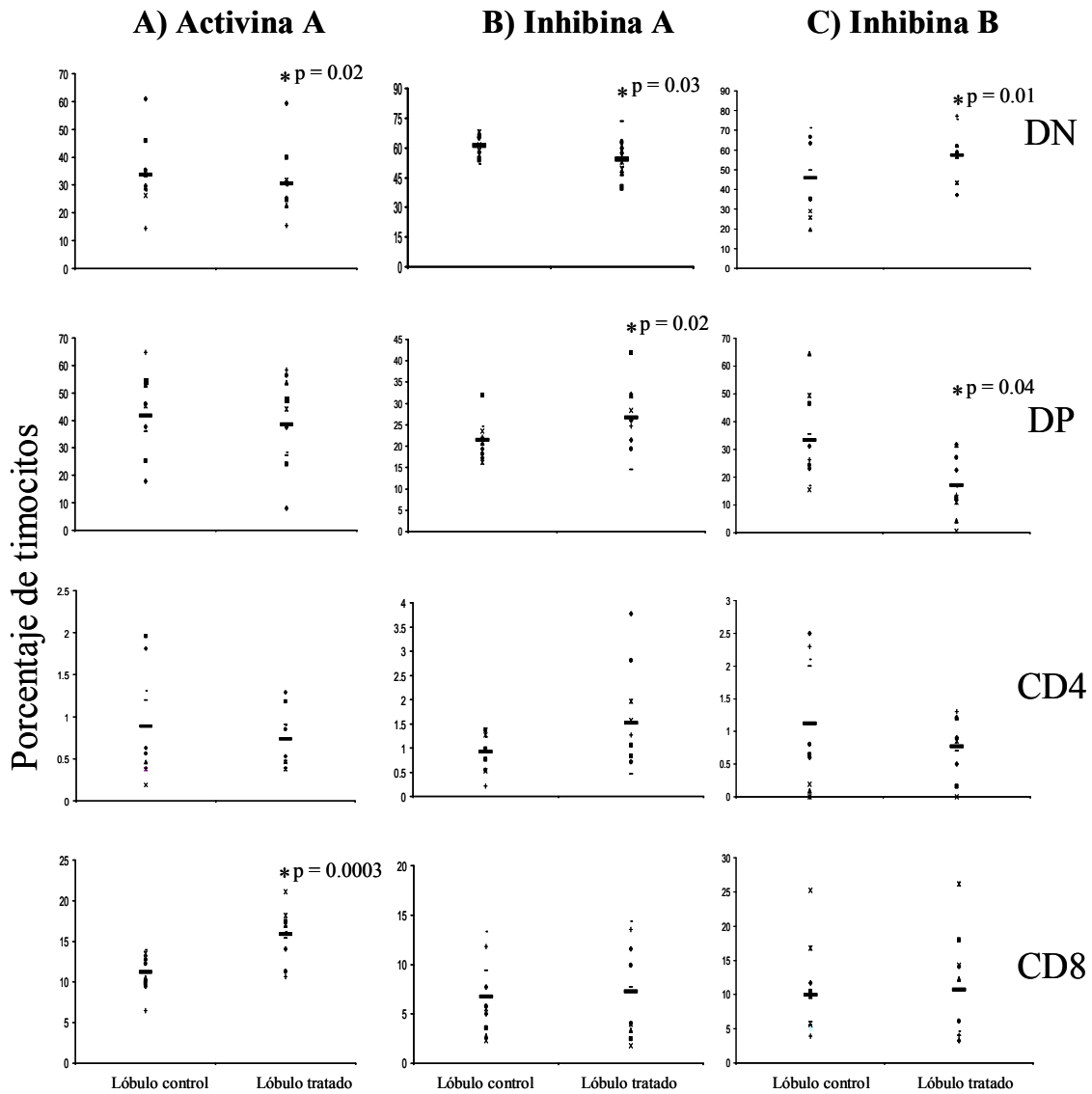


Figura 14. Análisis de precursores DN, DP, CD4 y CD8 en cultivos de órgano de timo fetal tratados con Activina A, Inhibina A ó Inhibina B por tres días. Se realizaron cultivos de órgano de timo fetal durante tres días con 500 ng/ml de los ligandos recombinantes Activina A (A), Inhibina A (B) ó Inhibina B (C). Al final del cultivo los timocitos fueron analizados con base a la expresión de CD4 y CD8 por FACS para diferenciar entre subpoblaciones DN, DP, CD4 y CD8. Los porcentajes de cada subpoblación obtenidos del lóbulo tratado se compararon con los obtenidos en el lóbulo control (sin tratamiento). En las gráficas se muestran 10 pares de lóbulos representativos de un mínimo total de 20 a partir de al menos tres experimentos independientes. El valor promedio (-) y los datos de significancia $p \leq 0.05$ fueron obtenidos con la prueba de T para datos pareados.

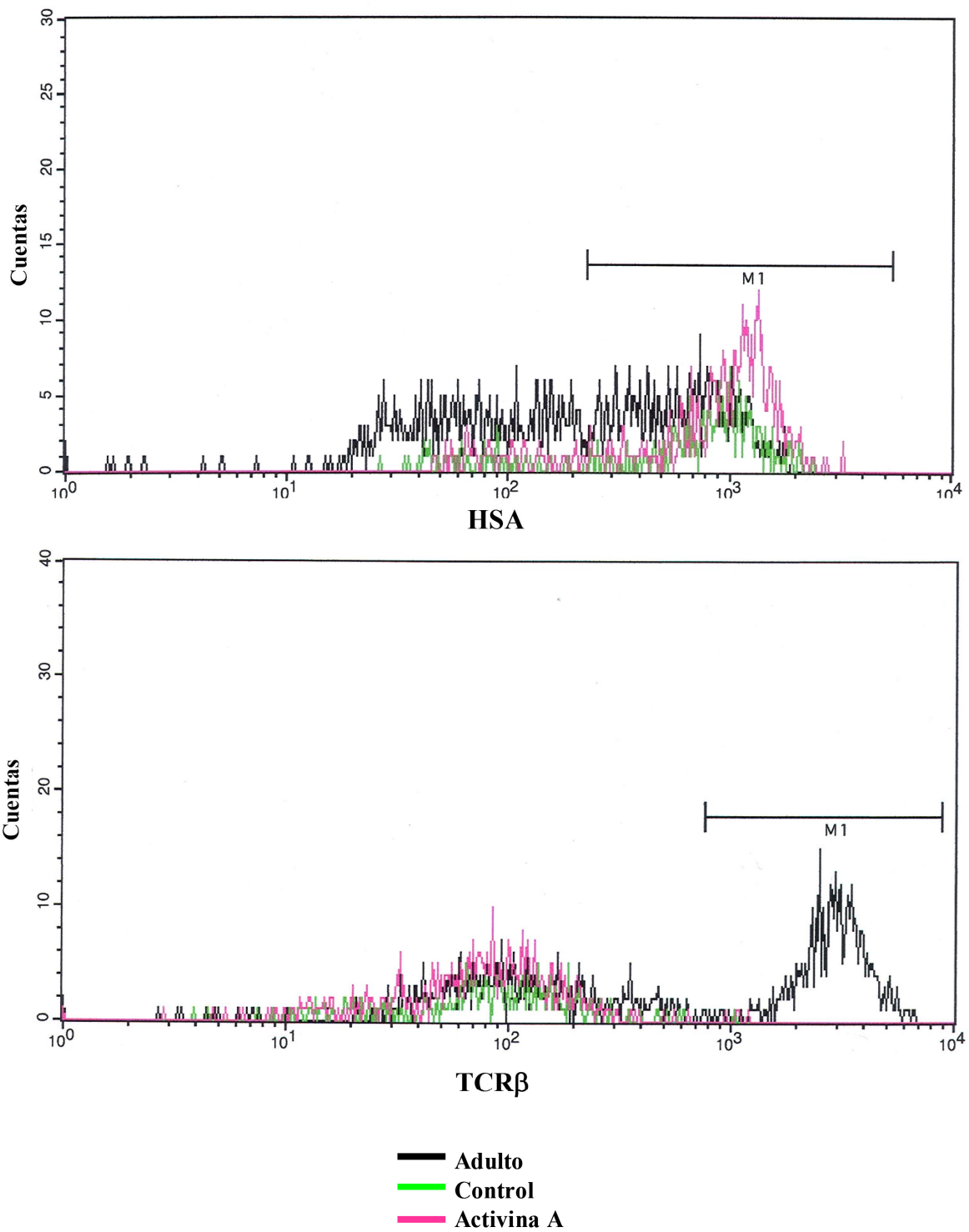


Figura 15. Expresión de HSA (CD24) y TCRβ en timocitos CD8 obtenidos al día tres de cultivo con Activina. Los precursores CD8 obtenidos de cultivos control sin tratamiento (verde) y tratados con 500 ng/ml de Activina (rosa) durante tres días fueron analizados cuanto a la expresión de los marcadores CD24 (HSA) y TCRβ y comparados con la expresión de timocitos CD8 de timo adulto (negro).

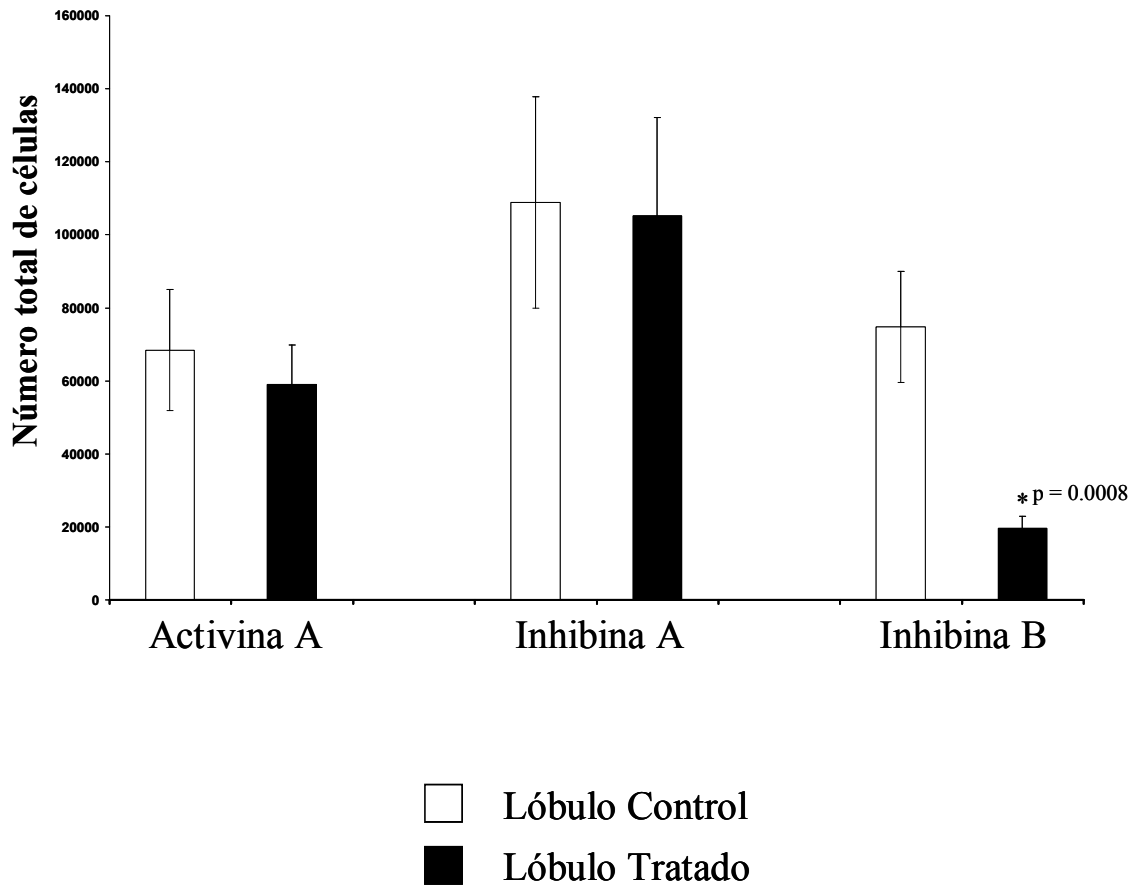


Figura 16. Población total de timocitos obtenidos de cultivos de órgano de timo fetal de tres días. El número total de timocitos en lóbulos de timo fetal en cultivo fue cuantificado en cámaras de Neubauer. Las gráficas muestran un promedio y error estándar de 20 lóbulos con o sin tratamiento al día tres de cultivo. La significancia fue calculada con la prueba de T para datos pareados ($p \leq 0.05$).

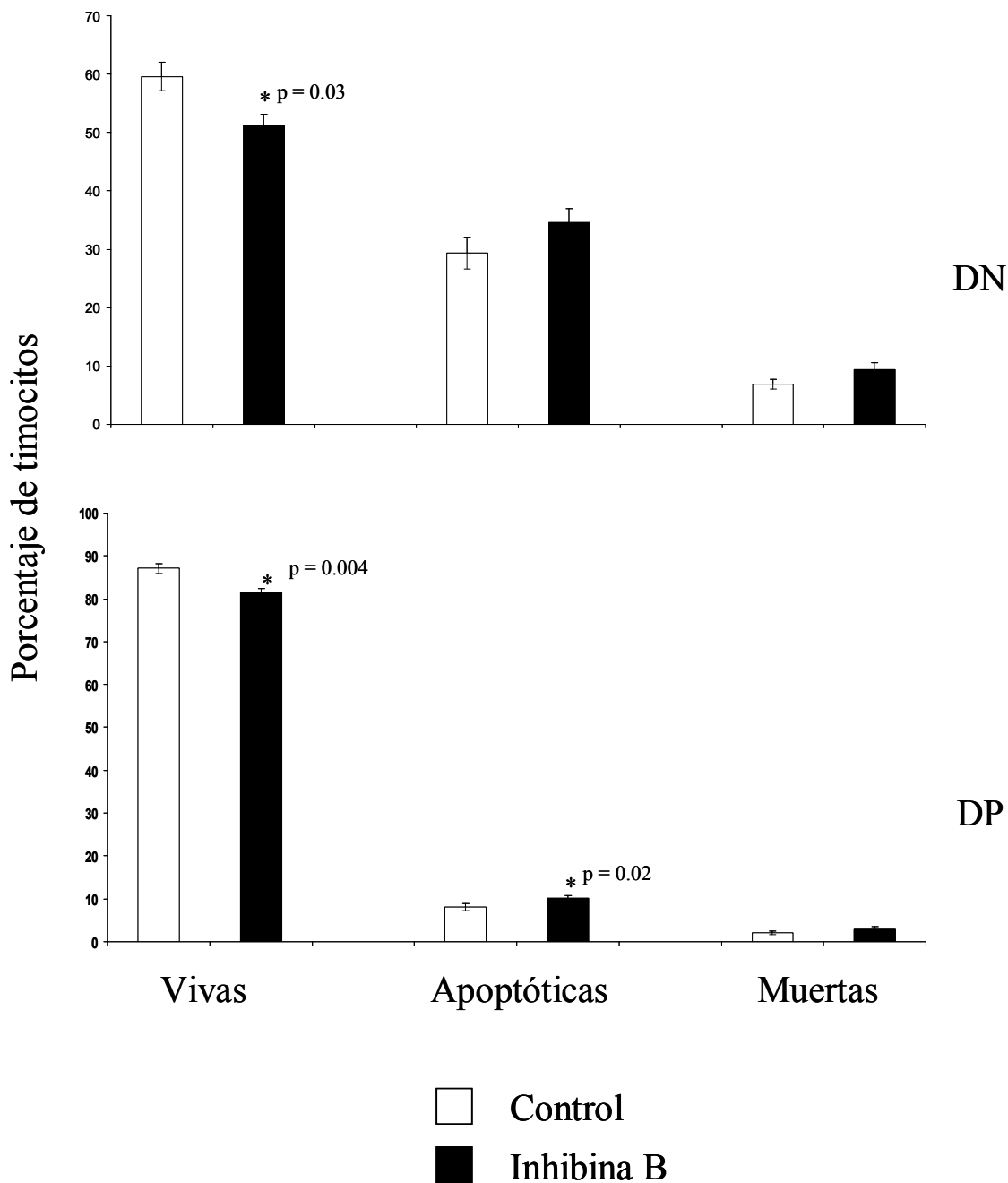


Figura 17. Análisis de apoptosis en timocitos DN y DP tratados con Inhibina B. Timocitos obtenidos de lóbulos control ó tratados con Inhibina B durante tres días en cultivo de órgano de timo fetal, fueron teñidos con anticuerpos contra los marcadores superficiales CD4 y CD8, junto con lo marcadores de apoptosis Anexina V y 7AAD. Las gráficas muestran el promedio y error estándar de los porcentajes de timocitos DN y DP vivos (Anexina V⁻, 7AAD⁻) en apoptosis (Anexina V⁺, 7AAD⁻) y muertos (Anexina V⁺, 7AAD⁺) de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de T para datos pareados, $p \leq 0.05$ fue tomado como significativo.

Debido a que los datos obtenidos en los cultivos de tres días estimulados con Activina A e Inhibina A sugerían una promoción de la maduración de timocitos, decidimos realizar cultivos a tiempos más largos para poder determinar si el incremento al día tres en precursores ISP ó DP respectivamente, se reflejaba en un incremento en precursores maduros SP al día siete de cultivo donde las subpoblaciones de timocitos maduros CD4 y CD8 se han diferenciado a partir de precursores DPs (ver Figura 12). El tratamiento con Activina A por siete días llevó a una disminución en precursores DP y CD4, mientras que los precursores CD8 SP aumentaron. Por otro lado, el tratamiento con Inhibina A sólo llevó a un incremento en la subpoblación CD8 y no observamos cambios significativos en las subpoblaciones de timocitos DP ó CD4 (Figura 18). Estos datos indican que la Activina A podría estar promoviendo el compromiso hacia el linaje CD8 a expensas de la subpoblación CD4, mientras que Inhibina A no parece tan claramente influir en la elección de linaje.

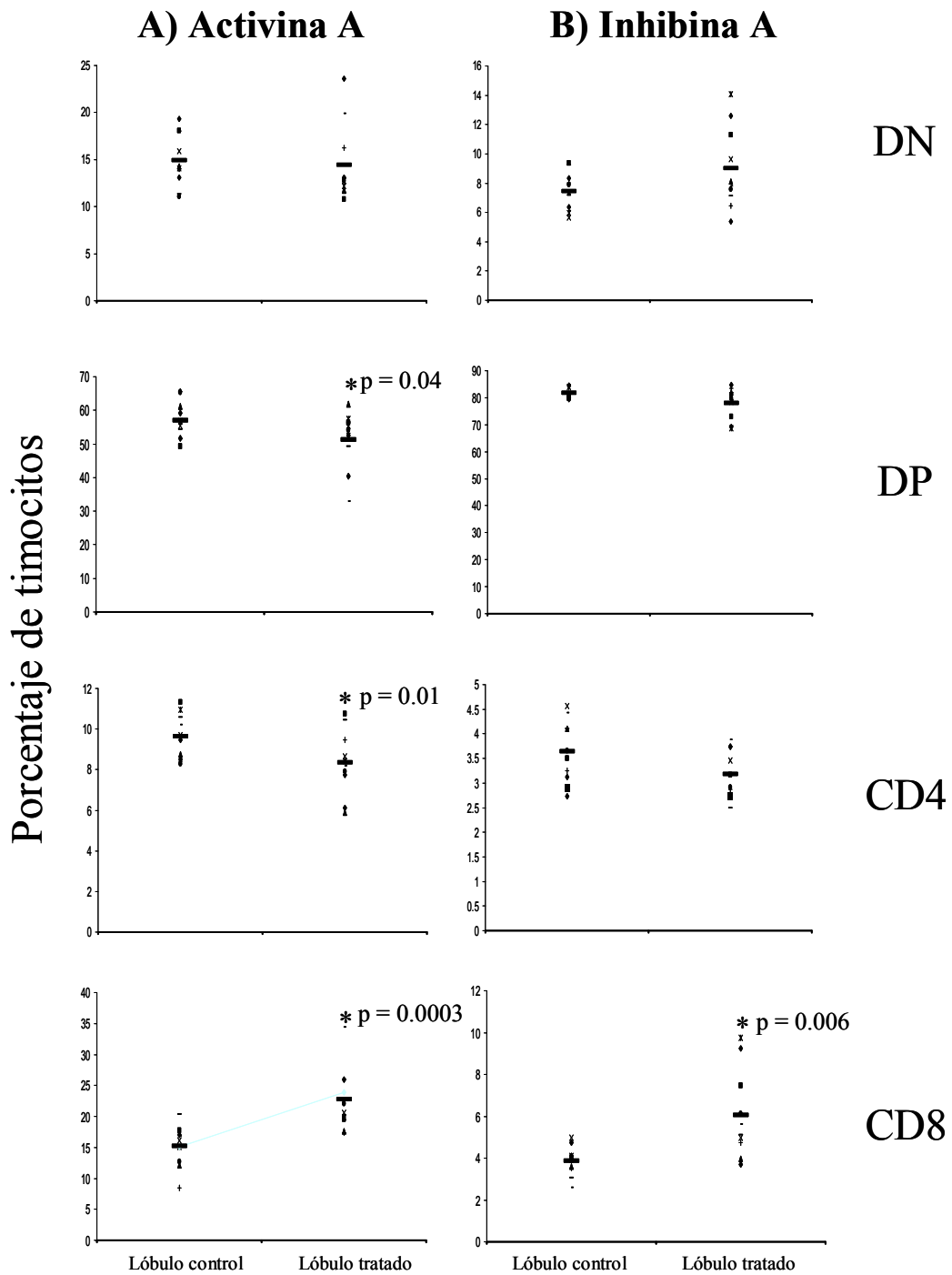


Figura 18. Análisis de precursores DN, DP, CD4 y CD8 en cultivos de órgano de timo fetal tratados con Activina A o Inhibina A por siete días. Se realizaron cultivos de órgano de timo fetal durante siete días con 500 ng/ml Activina A (A) ó Inhibina A (B). Al final del cultivo los timocitos fueron analizados con base a la expresión de CD4 y CD8 por FACS para diferenciar entre subpoblaciones DN, DP, CD4 y CD8. Los porcentajes de cada subpoblación obtenidos del lóbulo tratado se compararon con los obtenidos en el lóbulo control sin tratamiento. En las gráficas se muestran 10 pares de lóbulos representativos de un mínimo total de 20 a partir de al menos tres experimentos independientes. El valor promedio (-) y los datos de significancia $p \leq 0.05$ fueron obtenidos con la prueba de T para datos pareados.

Caracterización de las subpoblaciones de timocitos en ratones deficientes para Inhibina

Para confirmar el papel de Inhibinas durante el desarrollo del linfocito T en un modelo *in vivo*, decidimos analizar el fenotipo del timo en ratones deficientes para Inhibinas. La ausencia de Inhibinas en timo adulto no afecta ni los porcentajes de subpoblaciones de timocitos, ni el número total de células obtenidas comparados con un timo de ratón normal (Figura 19). Sin embargo, debido a nuestros hallazgos sobre la expresión de Inhibinas y sus receptores en etapas tempranas de la ontogenia del linfocito T, consideramos necesario analizar el efecto de la ausencia de las Inhibinas durante los estadios fetales. Para poder analizar el efecto de la ausencia de Inhibina en timo fetal fue necesario partir de cruces de hembras y machos heterocigotos (Inh^{+/-}) debido al fenotipo de esterilidad observado en los ratones homocigotos deficientes [311]. Por otro lado, debido a que la expresión del ligando reportada en placenta podría compensar la ausencia de Inhibina en los fetos homocigotos deficientes (-/-) decidimos llevar a cabo cultivos de órgano de timo fetal a partir de timos de ratones deficientes para Inhibinas y los comparamos con las poblaciones obtenidas en timos silvestres después de siete días de cultivo. Como se observa en la Figura 20 (panel central), el análisis de subpoblaciones de timocitos antes del cultivo (día cero) que corresponde al estadio embrionario E14, no mostró diferencias significativas en precursores DN, DP, CD4 y CD8 en timos deficientes para Inhibinas comparados con timos de ratones silvestres. Sin embargo, el análisis en subpoblaciones de timocitos DN demostró un incremento significativo en precursores tempranos DN2 en los timos de ratones deficientes (Figura 20, panel superior). El número total de timocitos no fue significativamente distinto en ratones deficientes comparados con timos de ratones normales (Figura 20, panel inferior). Luego de siete días de cultivo, el

porcentaje de timocitos en estadio DN2 continúa siendo mayor en timos de ratones deficientes, también observamos una disminución de precursores CD4 en ratones deficientes para Inhibinas comparados con timos de ratones silvestres. El número total de células en timos de ratones deficientes obtenidos de cultivos de siete días no fue significativamente distinto al de timos controles (Figura 21).

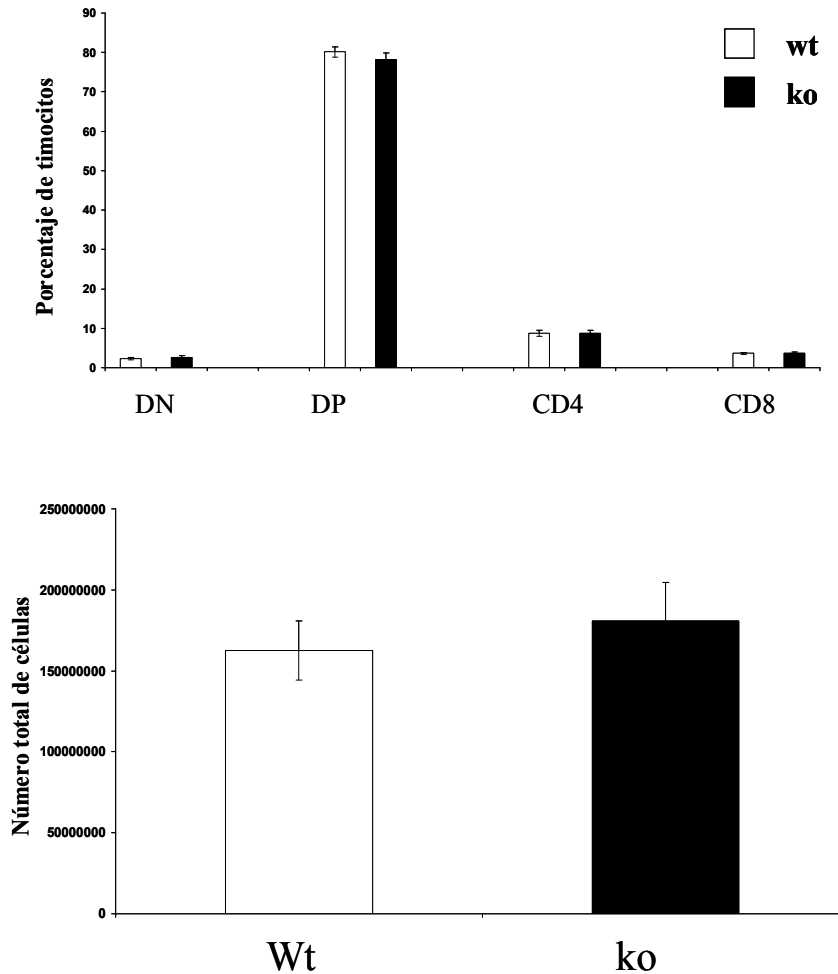


Figura 19. Análisis de subpoblaciones de timocitos en ratones adulto deficientes de Inhibina α . Los timocitos de ratones deficientes para Inhibina α fueron contados y teñidos con los marcadores de superficie CD4 y CD8 para su análisis por FACS. Las gráficas muestran el promedio y error estándar en los porcentajes de timocitos DN, DP, CD4 y CD8 y la cuantificación del número total de células en timos de ratones adulto deficientes para Inhibina α comparados con timos de ratones silvestres (C57/BL6). Datos de 12 experimentos independientes.

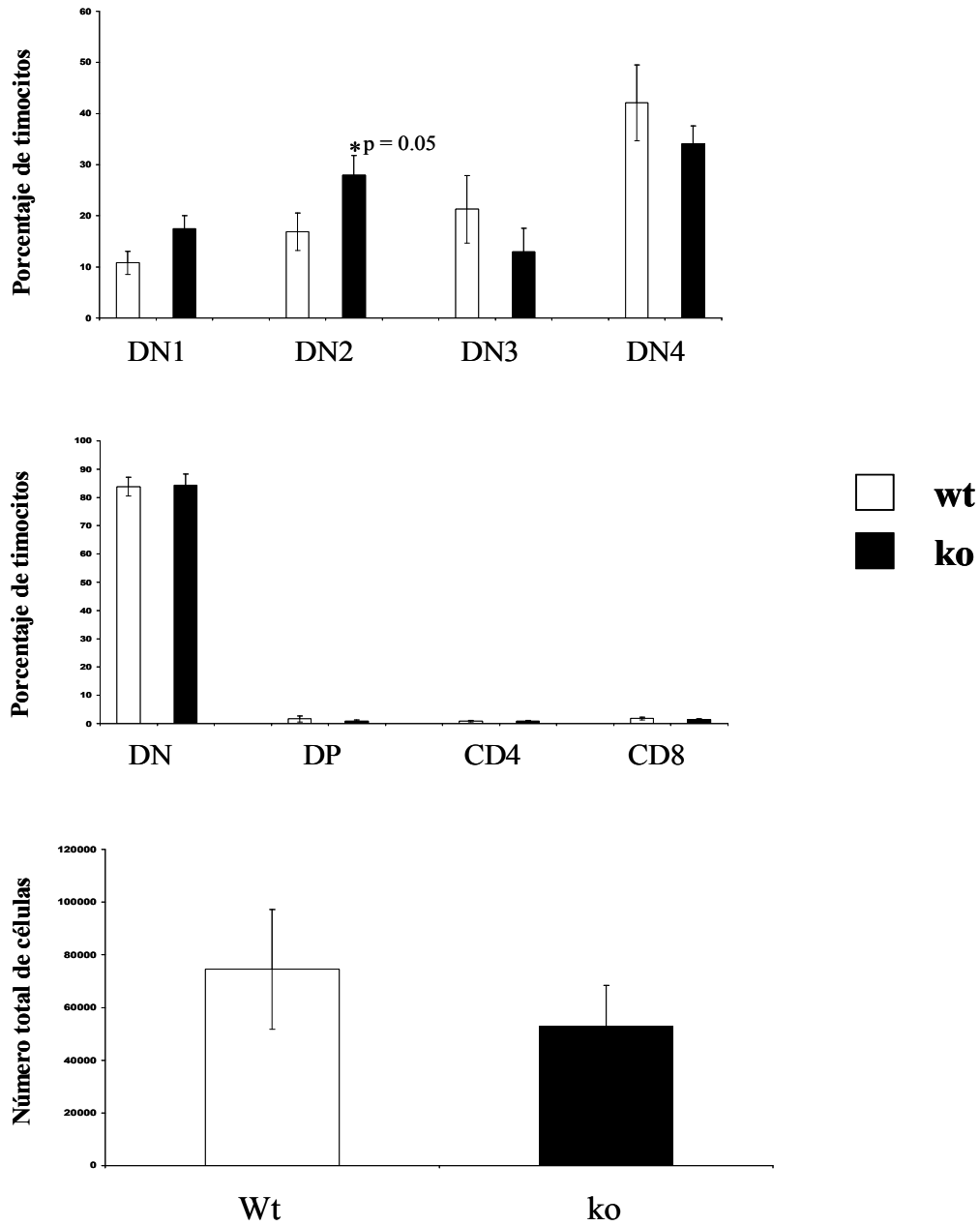


Figura 20. Análisis de subpoblaciones de timocitos en timos de ratones E14 deficientes de Inhibina α . Lóbulos de timo fetal (E14) de ratones deficientes para Inhibina α fueron teñidos con los marcadores de superficie CD4, CD8, CD44 y CD25 para su análisis por FACS. La cuantificación se realizó con cámaras de Neubauer. Las gráficas muestran el promedio y error estándar en los porcentajes de timocitos DN1-DN4 (panel superior), DN, DP, CD4 y CD8 (panel central) y número total de células (panel inferior) en timos fetales de ratones deficientes para Inhibina α comparados con timos fetales de ratones silvestres (C57/BL6). Datos de 6 experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó con una prueba de T para datos no apareados, $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

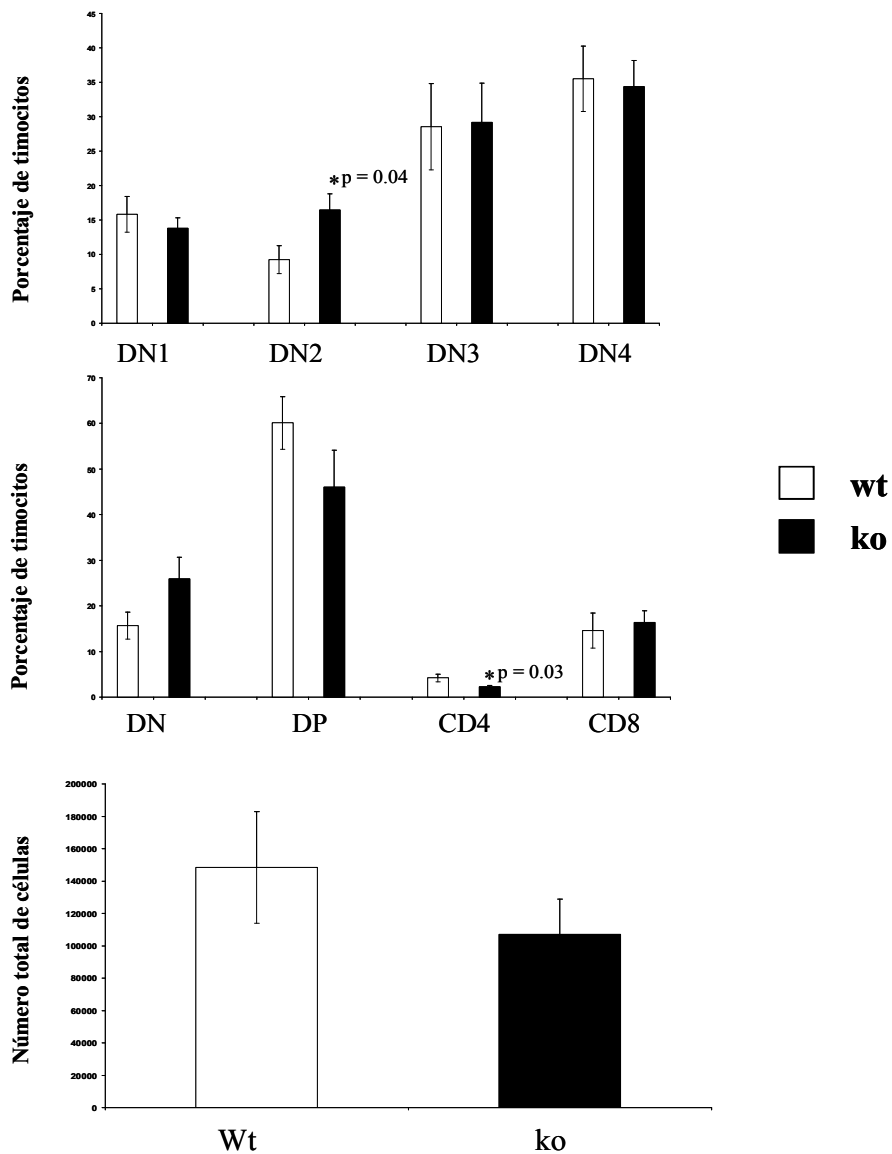


Figura 21. Análisis de subpoblaciones de timocitos de ratones deficientes de Inhibina α en FTOC. Lóbulos de timo fetal (E14) de ratones deficientes para Inhibina α y de ratones control fueron cultivados durante 7 días en cultivos de órgano de timo fetal. Los timocitos fueron teñidos con los marcadores de superficie CD4, CD8, CD44 y CD25 para su análisis por FACS. La cuantificación se realizó con cámaras de Neubauer. Las gráficas muestran el promedio y error estándar en los porcentajes de timocitos DN1-DN4 (panel superior), DN, DP, CD4 y CD8 (panel central) y número total de células (panel inferior) en timos fetales de ratones deficientes para Inhibina α comparados con timos fetales de ratones silvestres (C57/BL6) al día siete de cultivo. Datos de 6 experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó con una prueba de T para datos no apareados, $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

Activación de señales mediadas por Activinas en timocitos

Con la finalidad de estudiar la capacidad de respuesta a Activinas en subpoblaciones de timocitos, analizamos la inducción de la fosforilación de Smad2/3 en respuesta al ligando. Realizamos una tinción de superficie con anticuerpos contra CD4 y CD8 para diferenciar entre las subpoblaciones de timocitos, estimulamos durante 30 min con los ligandos recombinantes y utilizamos un anticuerpo específico de pSmad2/3 para una tinción intracelular evaluada por citometría de flujo. La estimulación con los agonistas clásicos Activina A y TGF- β indujo un incremento en los niveles de pSmad2 comparado con el nivel basal en todas las subpoblaciones de timocitos. Sorprendentemente y contrario a lo que se ha postulado, Inhibina A e Inhibina B también llevaron a una fosforilación de Smad2/3 en timocitos DN, DP, CD4 y CD8 (Figura 22). La inducción de pSmad por Inhibina A fue modesto comparado con Activina A y TGF- β 1, sin embargo, el nivel de pSmad inducido por Inhibina B fue incluso mayor que el observado con los agonistas clásicos de la vía (Figura 23). Para confirmar el hallazgo de fosforilación de Smad por Inhibinas en timocitos, estimulamos células de la línea Jurkat E6-1 con los diferentes ligandos y repetimos el análisis de tinción intracelular por citometría de flujo. Los resultados demuestran que la fosforilación de Smad2/3 inducida por Inhibinas es reproducible en células Jurkat (Figura 24).

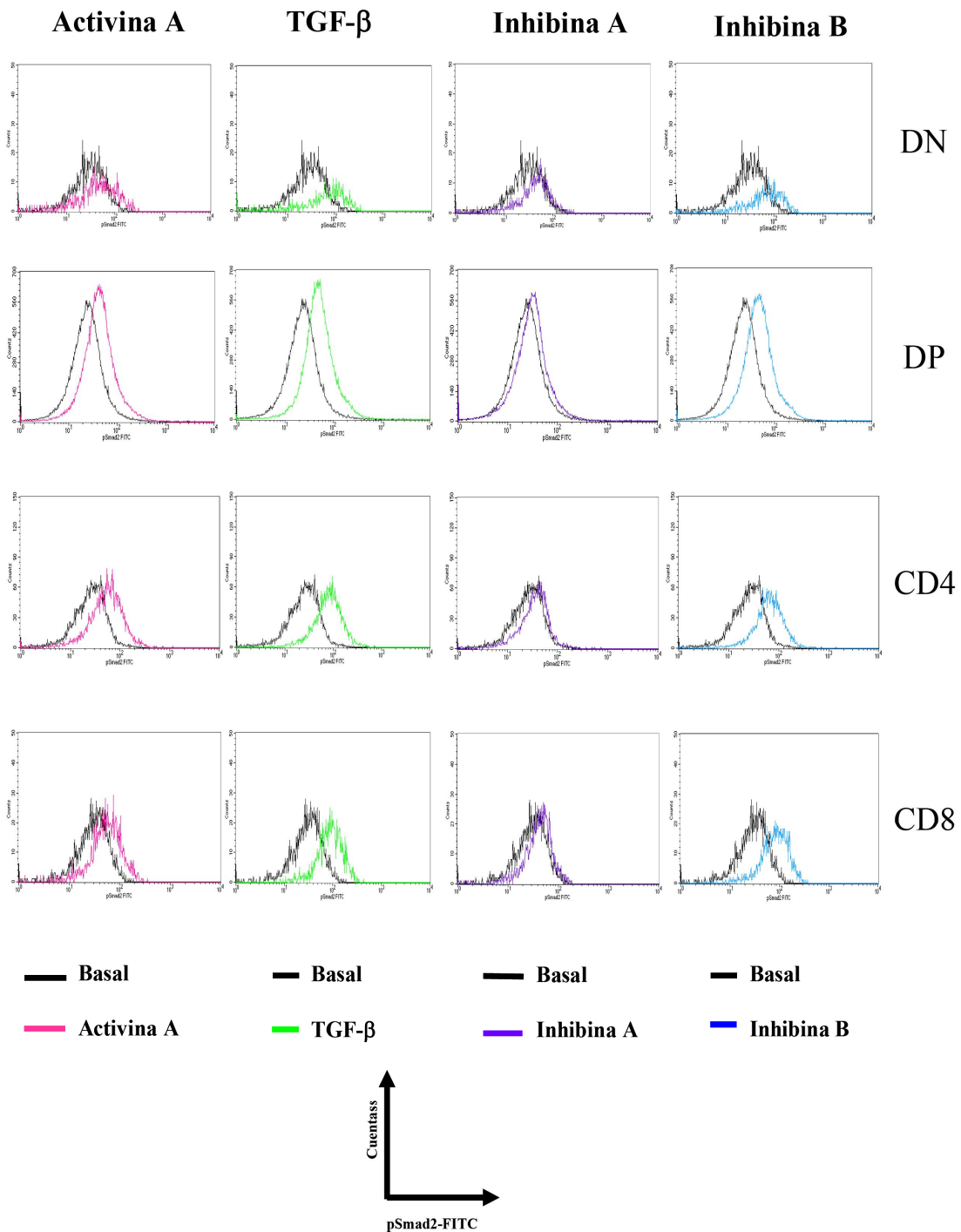


Figura 22. Fosforilación de Smad2 en timocitos. Timocitos de ratones C57/BL6 fueron estimulados durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A (rosa), Inhibina A (morado), Inhibina B (azul) ó 10 ng/ml de TGF- β (verde). La fosforilación de Smad se grafica con respecto al nivel basal (negro). Para diferenciar entre subpoblaciones de timocitos realizamos una tinción superficial con anticuerpos contra CD4 y CD8, para la detección de pSmad se utilizó un anticuerpo contra la forma bifosforilada de Smad2 seguido de un secundario anti-rab-FITC, las muestras fueron adquiridas y analizadas por FACS. Los datos muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

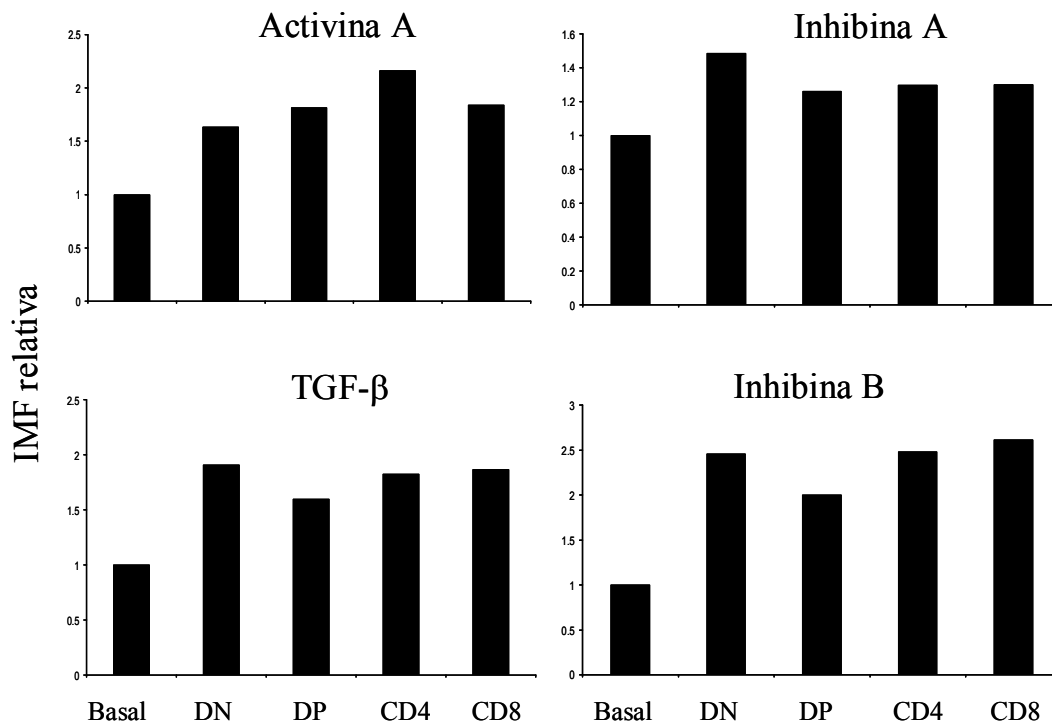


Figura 23. Cuantificación de la fosforilación de Smad2 en timocitos. Incremento en la intensidad media de fluorescencia de fosforilación de Smad2 con respecto al nivel basal. Análisis del experimento mostrado en la figura 21, el incremento relativo en la fosforilación de Smad2 con los diferentes ligandos se grafica en las diferentes subpoblaciones de timocitos. Los datos muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

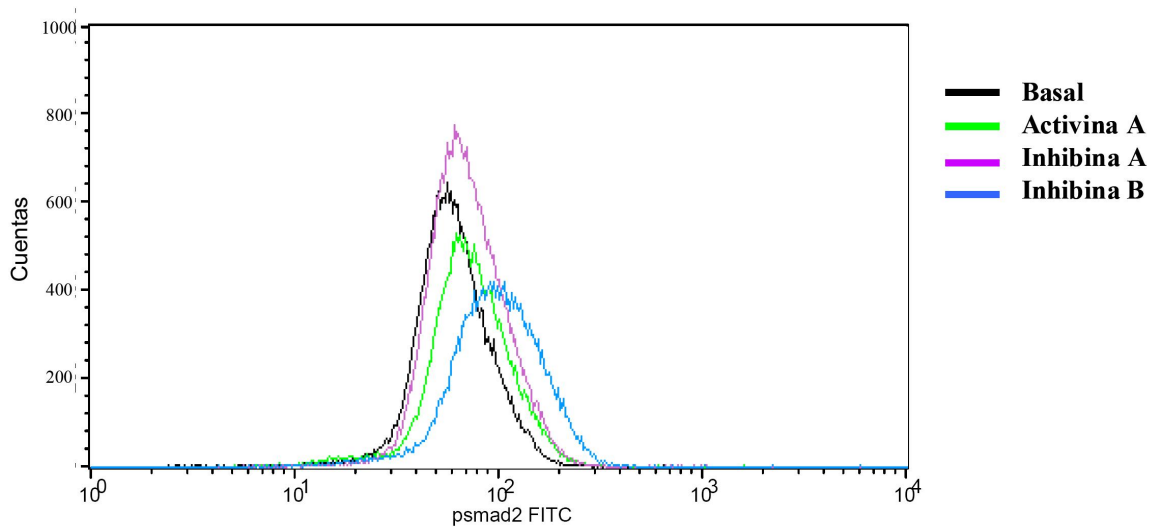


Figura 24. Fosforilación de Smad2 en células Jurkat por Activina/Inhibinas. Células Jurkat E6-1 fueron estimuladas durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A (verde), Inhibina A (morado) ó Inhibina B (azul). La fosforilación se comparó con respecto al nivel basal (negro). Para la detección de pSmad se utilizó un anticuerpo contra la forma bifosforilada de Smad2 seguido de un secundario anti-rab-FITC, las muestras se adquirieron y analizaron por FACS. Los datos muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

Dada la dificultad de trabajar con subpoblaciones aisladas de timocitos, decidimos utilizar la línea Jurkat E6-1 para los estudios posteriores de caracterización de la vía de señalización por Inhibinas. Para confirmar la fosforilación de Smads por Inhibinas y analizar posibles señales de antagonismo o sinergismo entre los diferentes ligandos, realizamos estimulaciones con Activina e Inhibinas A y B por separado o en conjunto a distintas proporciones; los resultados demuestran que no hay diferencias significativas en los niveles de pSmad cuando los ligandos se administran conjuntamente, sugiriendo que no hay antagonismo ni sinergismo en la inducción de fosforilación de Smad entre Activina e Inhibinas A y B (Figura 25).

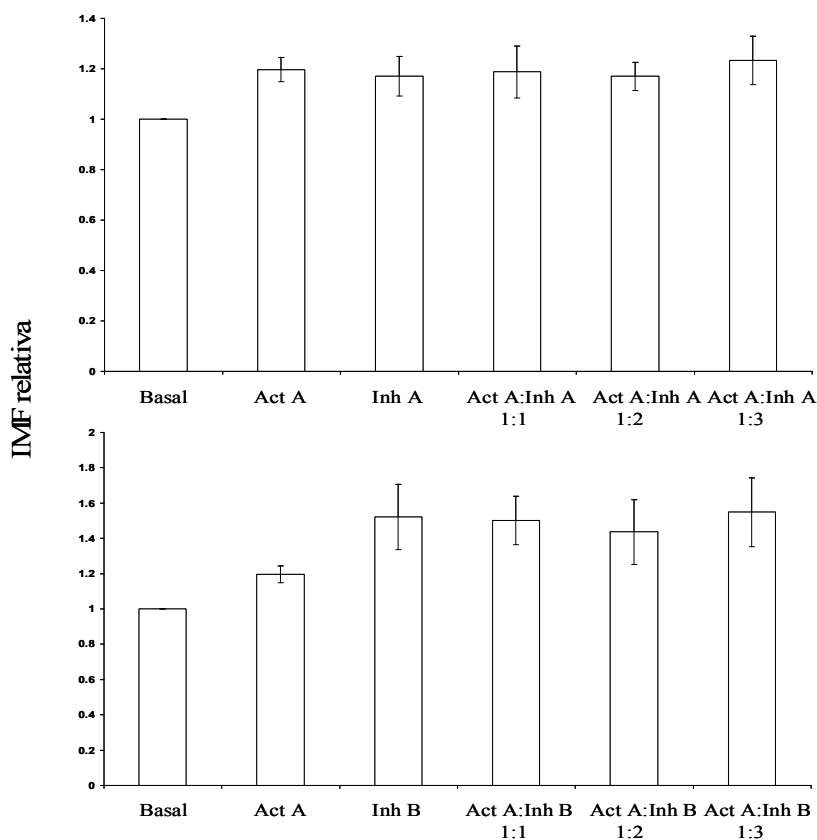


Figura 25. Análisis de pSmad en células Jurkat en condiciones de coestimulación. Células Jurkat E6-1 fueron coestimuladas durante 30 min con 200 ng/ml de Activina A junto con 200, 400 ó 600 ng/ml de Inhibina A ó Inhibina B. Las gráficas muestran el promedio y error estándar del incremento relativo en la intensidad media de fluorescencia de fosforilación de Smad2 con respecto al nivel basal analizado por FACS. Los valores de incremento relativo con Inhibinas A y B solas fueron obtenidos estimulando las células con 600 ng/ml. Datos de tres experimentos independientes.

Con la finalidad de validar nuestros datos por otro método de detección, se resolvieron los lisados de células Jurkat estimuladas con Activina A, TGF- β , Inhibina A ó Inhibina B en geles SDS-PAGE, seguido de la detección de pSmad2 por Western blot. La fosforilación de Smad2/3 por Activina A, TGF- β e Inhibina B se observó en lisados totales, sin embargo la fosforilación inducida por Inhibina A sólo se observó de manera significativa, cuando enriquecimos la proteína inmunoprecipitando previamente los lisados totales con un anticuerpo específico para Smad2 (comparar Figura 26a y 26b). La diferencia observada en el grado de fosforilación inducida por los distintos ligandos no fue debido a diferencias en carga de proteína como pudo confirmarse por Western Blot con un anticuerpo contra Smad2 total realizado en la misma membrana (Figura 26b, panel inferior). Para poder cuantificar la fosforilación de Smad 2, analizamos por densitometría los blots y la señal de pSmad fue normalizada con el nivel de Smad 2 total para obtener el incremento relativo de la fosforilación de Smad 2 con respecto al nivel de fosforilación basal (Figura 26c).

Posteriormente, para determinar si la fosforilación de Smad inducida por Inhibinas en timocitos y células Jurkat era específico del linaje T o podía detectarse en otros tipos celulares, estimulamos células de la línea humana HepG2 en paralelo con células Jurkat y se analizaron lisados totales para la detección de pSmad2/3 por Western Blot. Como puede observarse en la Figura 27, la fosforilación de Smad2/3 por Inhibinas no se restringe al linaje T y también se observa en el hepatoma HepG2; el análisis por densitometría confirmó a Inhibina B como el ligando con mayor capacidad de inducción de pSmad. La fosforilación de Smad en HepG2 se confirmó inmunoprecipitando con un anticuerpo contra Smad2 y realizando detección por Western Blot tanto para la forma fosforilada de Smad

como para la Smad total. Como en el caso de los linfocitos T, también se calculó la fosforilación relativa de Smad 2 (Figura 28).

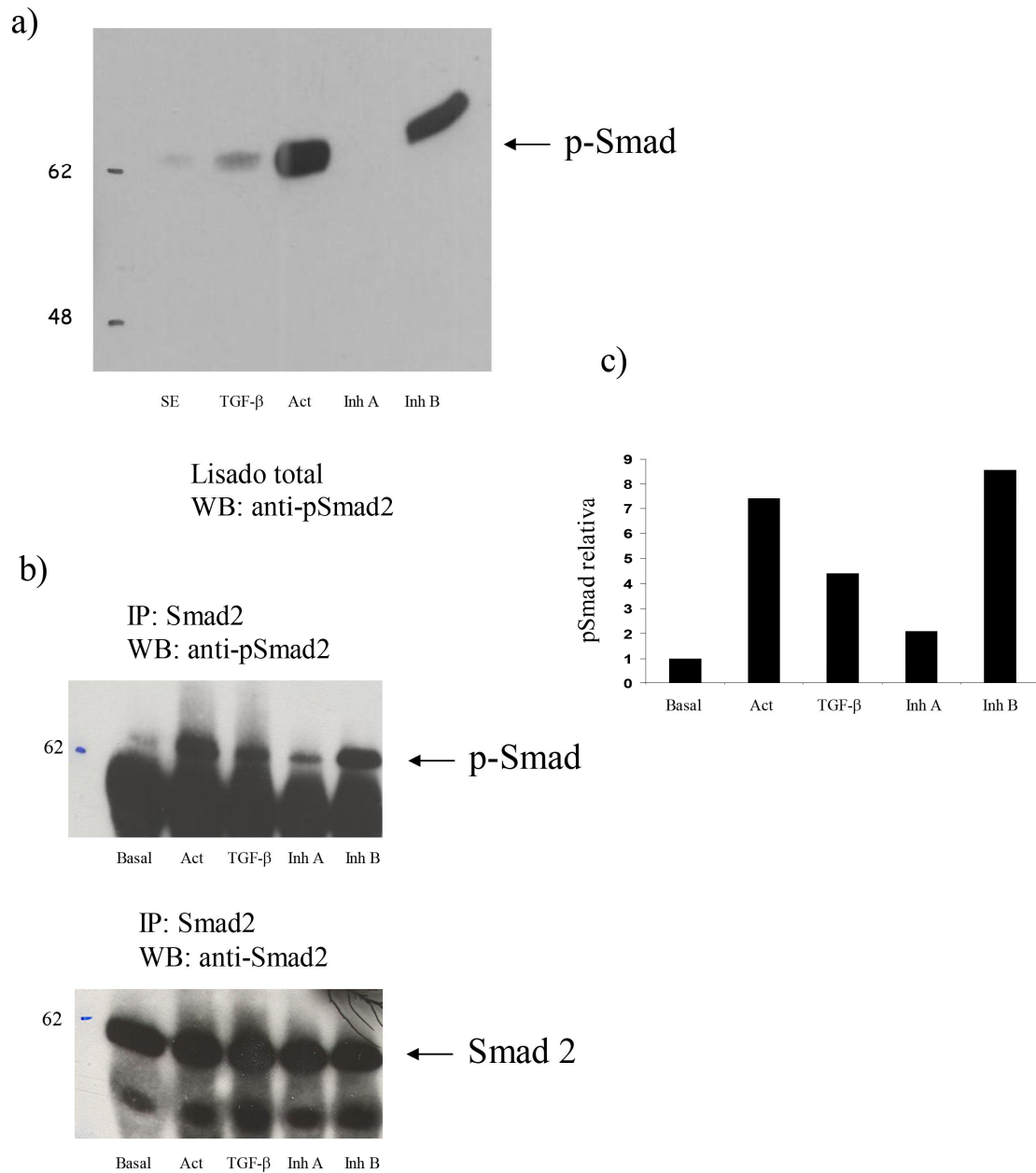
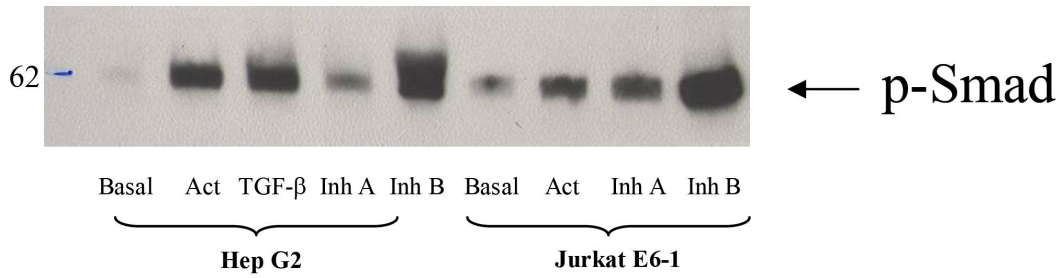


Figura 26. Inmunodetección de pSmad2 en células Jurkat E6-1. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en lisados totales de células Jurkat estimuladas durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A, Inhibina A, Inhibina B, ó 10 ng/ml de TGF-β (a). Inmunoprecipitaciones con un anticuerpo anti-Smad2 de lisados de células Jurkat estimuladas con los diferentes ligandos, el Western blot se realizo primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2 (b). (c) Cuantificación por densitometría del incremento relativo de pSmad inducido por los ligandos en las membranas mostradas en (b) normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación.

Lisado total
WB: anti-pSmad2



Lisado total
WB: anti-Smad2

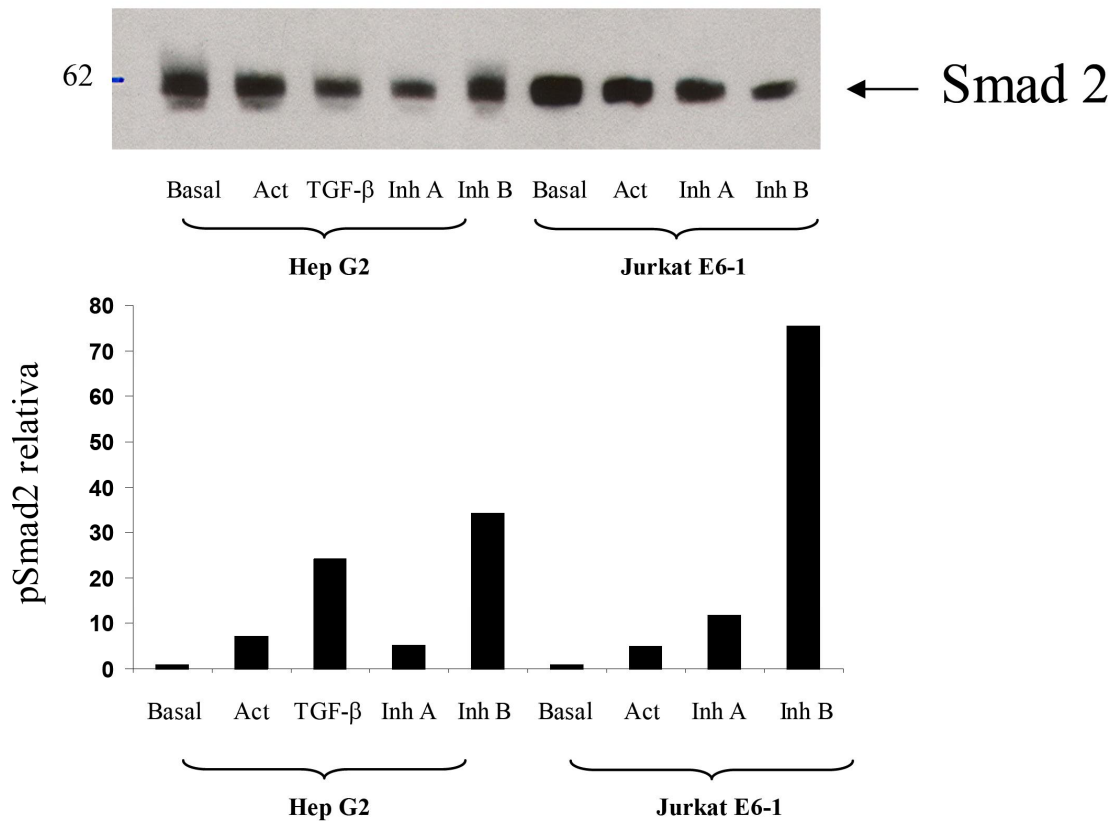
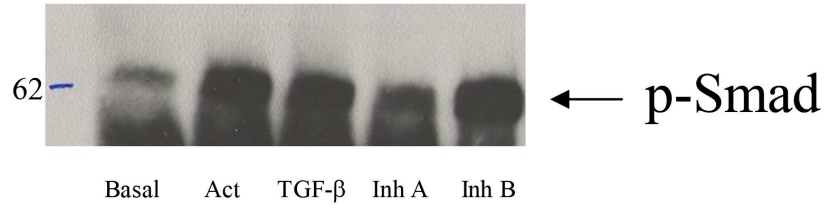


Figura 27. Inmunodetección de pSmad2 en células Jurkat E6-1 y HepG2. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en lisados totales de células Jurkat y HepG2 estimuladas durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A, Inhibina A, Inhibina B, ó 10 ng/ml de TGF-β. El Western blot se realizo primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2. La gráfica muestra el incremento relativo de pSmad inducido por los ligandos en células Jurkat y HepG2 normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación.

IP: Smad2
WB: anti-pSmad2



IP: Smad2
WB: anti-Smad2

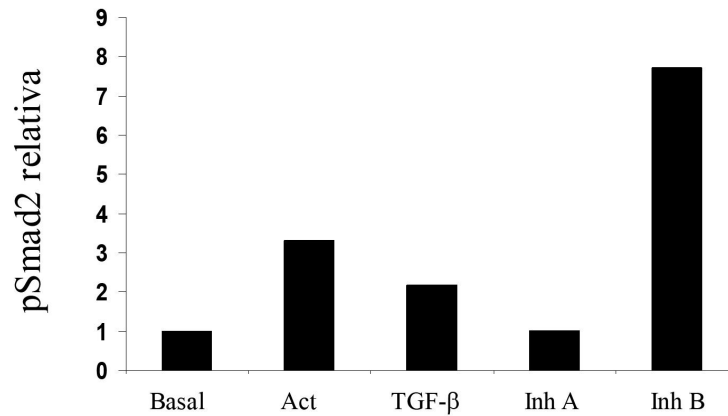
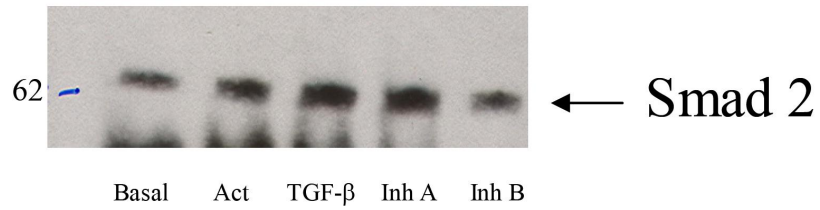


Figura 28. Inmunodetección de pSmad2 en inmunoprecipitados de células HepG2. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Smad2, a partir de lisados totales de células HepG2 estimuladas durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A, Inhibina A, Inhibina B, ó 10 ng/ml de TGF- β . El Western blot se realizó primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2. La gráfica muestra el incremento relativo de pSmad inducido por los ligandos en células HepG2 normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación.

Debido a que nuestro hallazgo de fosforilación de Smads por Inhibinas es el primer reporte de activación de la vía canónica de la superfamilia del TGF- β mediada por los supuestos antagonistas de Activinas; era necesario caracterizar la inducción de pSmad por Inhibinas. Realizamos curvas dosis-respuesta donde comparamos la inducción de fosforilación de Smad2/3 mediada por Inhibina B con la inducida por el agonista clásico Activina A. Nuestros datos demuestran que Inhibina B puede llevar a una fosforilación de Smad a una concentración mínima de 0.5 ng/ml, incluso menor que la requerida para inducir dicha fosforilación por Activina A (5 ng/ml) (comparar panel superior e inferior en Figura 29); nuestros datos demuestran que el nivel de inducción de pSmad con respecto a la fosforilación basal fue casi 10 veces mayor con Inhibina B que con Activina A. Por otro lado, las curvas curso-temporal demostraron que la activación de Smad por Inhibina B se da a partir de los 15 minutos de estimulación, (Figura 30, panel inferior) presentando una cinética similar a la observada por Activina A en células Jurkat (Figura 30, panel superior). La cuantificación por densitometría sugiere que el incremento con respecto al basal para el caso Activina fue mayor que el observado con Inhibina B, sin embargo la fosforilación basal de la cinética de Inhibina B fue mayor como puede observarse en el panel inferior de la figura 30.

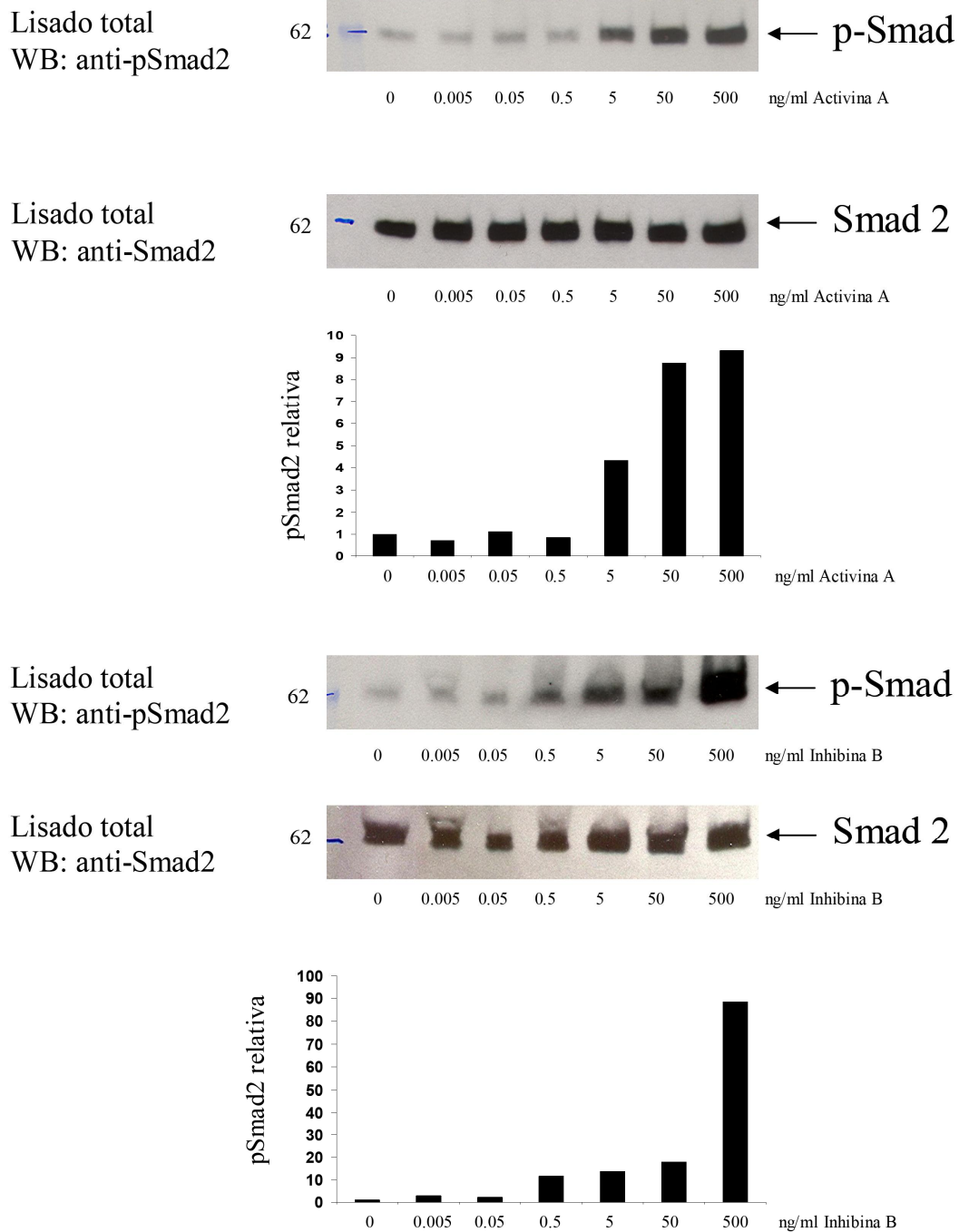
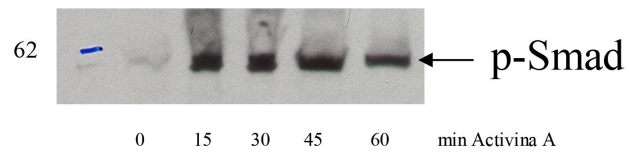
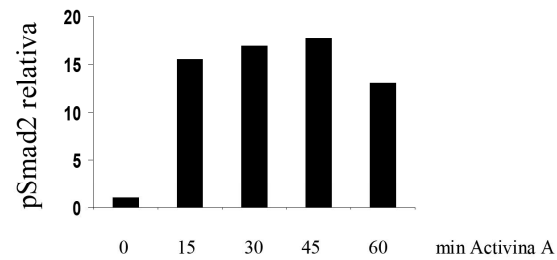
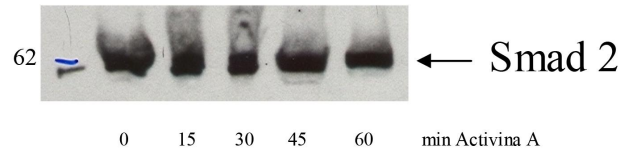


Figura 29. Curva dosis-respuesta de inducción de pSmad2 por Activina A e Inhibina B. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en lisados totales de células Jurkat estimuladas durante 30 min con concentraciones crecientes de Activina A ó Inhibina B. El Western blot se realizo primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2. La gráfica muestra el incremento relativo de pSmad inducido por las distintas concentraciones del ligando en células Jurkat normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación.

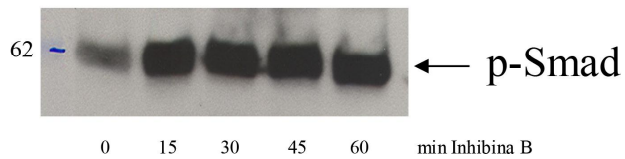
Lisado total
WB: anti-pSmad2



Lisado total
WB: anti-Smad2



Lisado total
WB: anti-pSmad2



Lisado total
WB: anti-Smad2

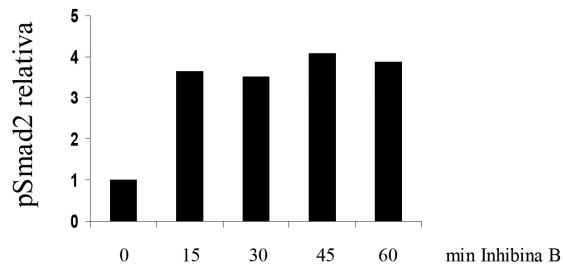
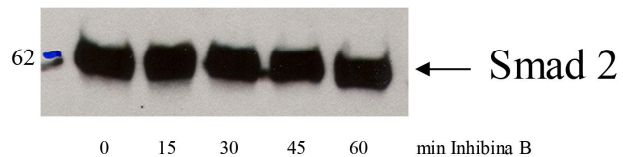


Figura 30. Cinética de activación de Smad2 por Activina A e Inhibina B. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en lisados totales de células Jurkat estimuladas con 500 ng/ml de Activina A ó Inhibina B a distintos tiempos. El Western blot se realizo primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2. La gráfica muestra el incremento relativo de pSmad inducido por las distintas concentraciones del ligando en células Jurkat normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación.

Las señales que llevan a la activación de Smads por miembros de la superfamilia del TGF- β requieren de la activación de un receptor tipo I, responsable de la fosforilación de Smads. Para determinar si la fosforilación de Smads inducida por Inhibinas era dependiente de un receptor tipo I, estimulamos células Jurkat con Activina A, Inhibina A ó Inhibina B en presencia de la droga inhibitoria de la actividad del dominio de cinasa de receptores tipo I (Alk4, Alk5 y Alk7) SB431542 [317-319]. Para estos ensayos redujimos la concentración del ligando a 250 ng/ml y analizamos la fosforilación de Smad tanto por citometría de flujo como por Western Blot. La inducción de fosforilación de Smad observado con los ligandos se abate en presencia de SB431542 como puede observarse en el análisis por FACS (Figura 31); sin embargo el tratamiento con el inhibidor aumento los niveles basales de fluorescencia analizados por citometría, por lo que no descartamos la posibilidad de que la droga afecte la permeabilidad celular. La fosforilación de Smad analizada por Western Blot, también disminuye en presencia del inhibidor, especialmente en los estímulos dependientes de Activina A e Inhibina B (Figura 32), el análisis por densitometría demostró que la inhibición de pSmad por la droga en respuesta a Activina fue de casi 10 veces, comparada con una disminución de 2 veces con Inhibina A y 4 veces con Inhibina B (gráfica Figura 32). Nuestros datos sugieren que la fosforilación de Smads inducido por Inhibinas depende de la activación de un receptor tipo I como se ha descrito para otros ligandos pertenecientes a la superfamilia del TGF- β .

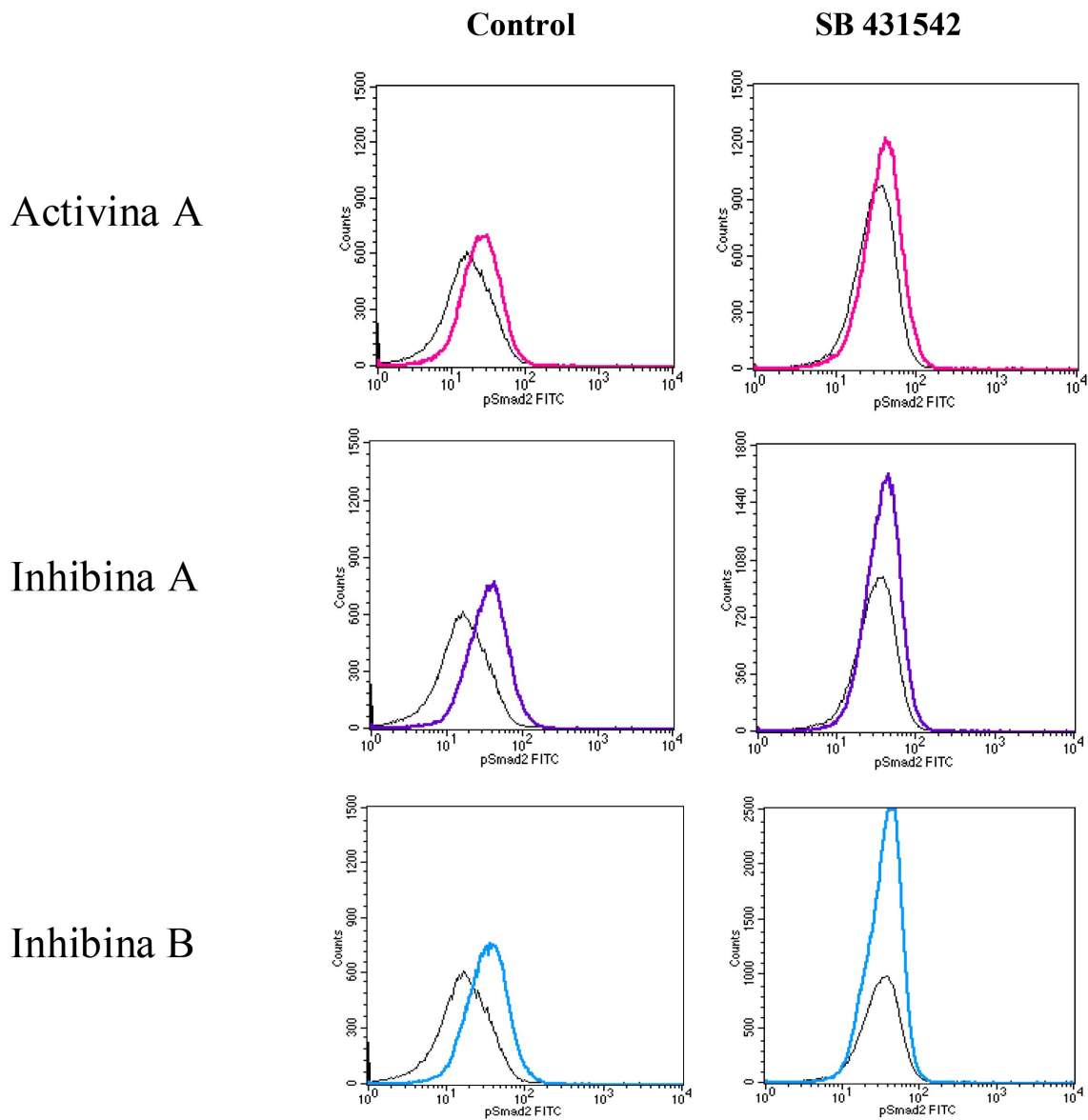


Figura 31. Fosforilación de Smad2 en células Jurkat por Activina/Inhibinas en presencia del inhibidor SB431542. Células Jurkat E6-1 fueron preincubadas durante 30 min con el inhibidor de receptores tipo I: SB431542 (10 μ M), previo a la estimulación durante 30 min con 500 ng/ml de Activina A (rosa), Inhibina A (morado) ó Inhibina B (azul). La fosforilación se comparó con respecto al nivel basal (negro). Para la detección de pSmad se utilizó un anticuerpo contra la forma bifosforilada de Smad2 seguido de un secundario anti rab-FITC, las muestras se adquirieron y analizaron por FACS. Los datos muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

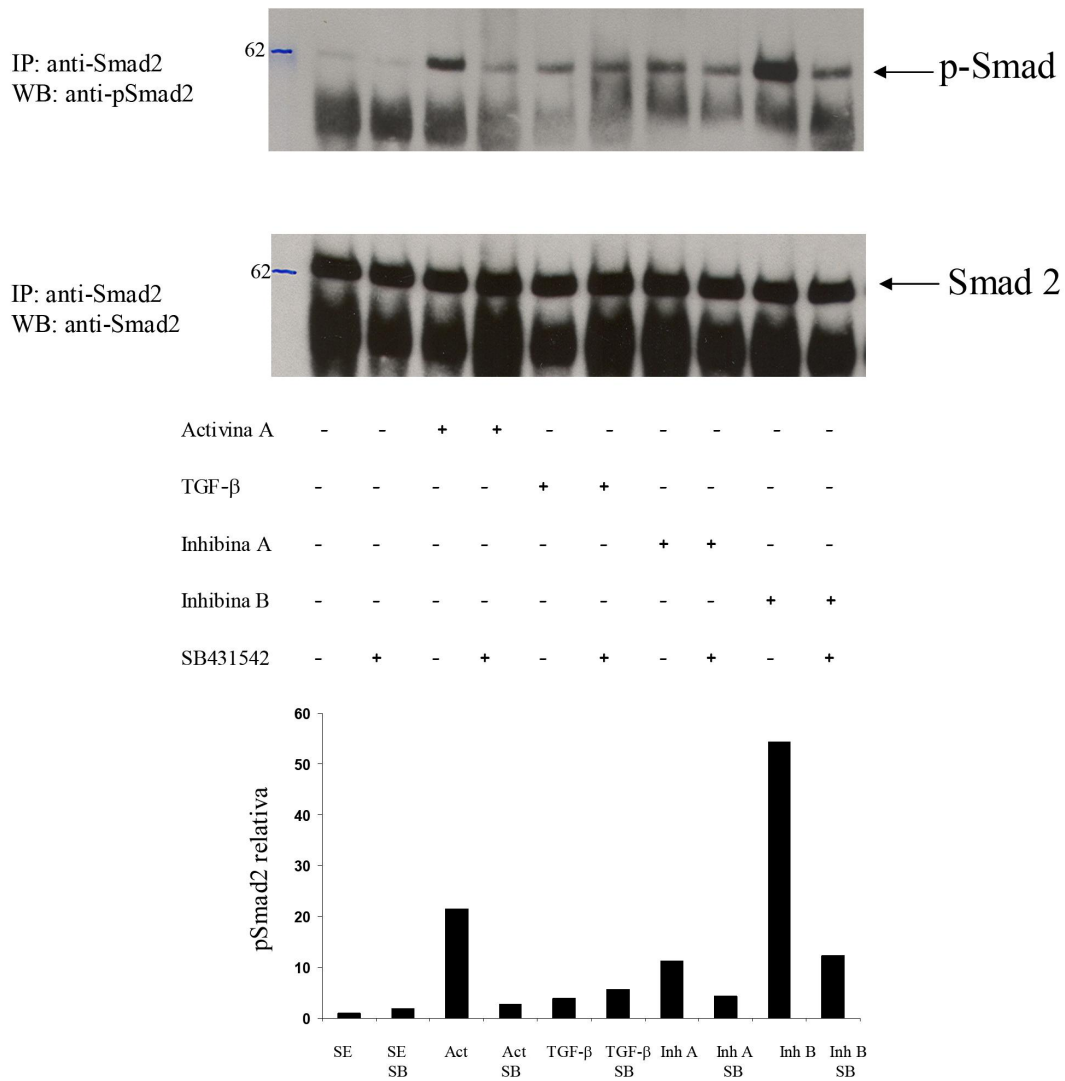


Figura 32. Inmunodetección de pSmad2 en inmunoprecipitados de células Jurkat en presencia del inhibidor SB 431542. Análisis de la fosforilación de Smad2 por Western blot en inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Smad2, a partir de lisados totales de células Jurkat preincubadas durante 30 min con el inhibidor de receptores tipo II SB431542 (10 μ M) previo a la estimulación con 500 ng/ml de Activina A, Inhibina A, Inhibina B, ó 10 ng/ml de TGF- β por 30 min. El Western blot se realizo primero con un anticuerpo contra Smad2 y la misma membrana se probó con un anticuerpo anti-pSmad2. La gráfica muestra el incremento relativo de pSmad inducido por los ligandos en células HepG2 normalizadas con respecto a la proteína total y graficada con respecto al nivel basal de fosforilación. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Discusión

El análisis de expresión de Activinas e Inhibinas permitió la caracterización de los patrones de expresión de ligandos, receptores y proteínas de señalización intracelular en el timo. La expresión de proteínas involucradas en la señalización por Activinas se detecta desde etapas tempranas en desarrollo en timos de E14-E16 por lo que esta vía podría regular diferenciación y organogénesis desde etapas fetales. El estudio se realizó analizando etapas de diferenciación de los timocitos correspondientes a importantes puntos de control durante su desarrollo: los timos E14 se encuentran enriquecidos en precursores DN1 y DN2, mientras que timos E15 contienen las cuatro subpoblaciones de timocitos DN (DN1-DN4). La elección de linaje T y la selección β ocurren entre las etapas fetales E14 y E15. Por otro lado en el estadio E16 aparecen los primeros timocitos con fenotipo DP. En timo adulto ya encontramos las cuatro subpoblaciones principales de timocitos DN, DP, CD4 y CD8 y tanto la selección positiva como la negativa han ocurrido y continúan teniendo lugar. Nosotros detectamos la expresión de los componentes de la vía de señalización pertenecientes a la subfamilia de Activinas en todos los estadios de maduración evaluados y correspondientes a los puntos de control importantes en la maduración de los timocitos. Nuestros datos de expresión de la subunidad α para el ligando es el primer reporte que demuestra la expresión de Inhibinas en el timo. El análisis de la expresión caracterizada a nivel de subpoblaciones indica que tanto las células del estroma como los timocitos son capaces de responder al estímulo dado por los ligandos de la subfamilia de Activinas. La expresión de las subunidades de los ligandos restringida mayoritariamente al compartimiento estromal, sugiere una regulación parácrina de la vía de las Activinas en los timocitos y podría explicar la disminución de la expresión en etapas fetales E15 y E16 comparada con la observada en E14, donde la proliferación de timocitos DN,

específicamente DN1 y DN2, podría disminuir la relación estroma/timocitos y diluir la señal de los ligandos. Cabe mencionar que el estroma utilizado en nuestro análisis de expresión corresponde a un estroma fetal, que sería mayoritariamente cortical. Aunque nuestras tinciones de inmunohistoquímica en timo adulto parecen detectar marca tanto en la corteza como en la medula, se requeriría una doble tinción de un marcador medular y cortical, respectivamente, para demostrar si el ligando se expresa diferencialmente en las poblaciones estromales. La expresión de la subunidad β B en timo total, pero ausente en las subpoblaciones purificadas de timocitos del ratón adulto, indica que esta expresión está dada por células estromales y contradice un estudio anterior en donde se reportaba dicha expresión en timocitos [267]. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que la expresión de subunidades del ligando β A y α a pesar de ser de menor magnitud que en el estroma, también ocurre en los timocitos y varía dependiendo del estadio de maduración: la subunidad β A se expresa en timocitos DN en niveles significativamente mayores que en las subpoblaciones DP, CD4 y CD8; dentro de las subpoblaciones SP, los timocitos CD8 tienen niveles de expresión mayores a los de CD4. La expresión de la subunidad β A en timocitos contradice un reporte previo en el que se describía la expresión de dicha subunidad por células del estroma, sin embargo ese estudio no se realizó en poblaciones purificadas y utilizó un método de detección de menor sensibilidad [267]. Por otro lado la expresión de la subunidad α no presenta variaciones importantes entre timocitos DN, DP y CD4, sin embargo los timocitos CD8 no la expresan, indicando una regulación de la expresión dependiente de la subunidad y del estadio de maduración del timocito. Finalmente, el análisis de abundancia relativa demostró que la subunidad α está expresada en niveles superiores a los de las subunidades β , por lo que la probabilidad de formar

dímeros α/β es mayor a la de formar dímeros β/β , por lo que postulamos una mayor expresión de Inhibinas que de Activinas en el timo.

La expresión del receptor tipo I no presenta diferencias significativas cuando analizamos timos completos, sin embargo, a nivel de subpoblaciones, la expresión es significativamente mayor en precursores DN, donde se había reportado una activación de señales dependientes de Activina [267]. La expresión de receptores tipo II sí presenta cambios en los estadios de maduración analizados, siendo siempre mayor en E14; cuando hicimos el análisis de subpoblaciones encontramos que el receptor tipo IIA está expresado mayoritariamente en células del estroma mientras que el receptor tipo IIB tiene niveles de expresión en el estroma comparables a los observados en precursores DN y DP. Nuestro análisis de abundancia relativa de receptores propone al par de receptores tipo I y tipo IIB como los responsables de mediar señales dependientes de Activina en el timo tanto en timocitos como en las células del estroma, sin embargo no podemos descartar una contribución del receptor tipo IIA particularmente en el estroma en donde observamos una expresión significativamente mayor a la observada en timocitos.

La expresión de proteínas Smad no presentó diferencias significativas entre timos de etapas fetales y adulto; a nivel de subpoblaciones nuevamente la subpoblación DN presenta niveles de expresión de Smad 2 y 3 mayores a los observados en timocitos DP, CD4, CD8 y células del estroma. La Smad común Smad4 se expresa en timocitos DN y el estroma a niveles comparables, sin embargo es menor en timocitos DP, CD4 y CD8. El análisis de abundancia relativa de Smads en las distintas poblaciones celulares del timo, demostró que Smad2 se expresa en proporciones mayores a las de Smad3 y 4 en todas las subpoblaciones analizadas, por lo que a pesar de haber diferencias en los niveles basales de expresión entre subpoblaciones, la expresión de Smad2 siempre es mayor al de las otras

Smads, independientemente de la subpoblación que se analice. En resumen, la expresión de receptores tipo I y II y de proteínas Smad en subpoblaciones de timocitos fue mayor en precursores DN, sin embargo no podemos descartar que la expresión de receptores y Smads en timocitos DP, CD4 y CD8 pueda conferir capacidad de respuesta al ligando en dichas subpoblaciones, como se demostró en nuestros ensayos funcionales de fosforilación de Smad. Los datos de expresión de Activinas, Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smad se esquematizan en la Figura 33.

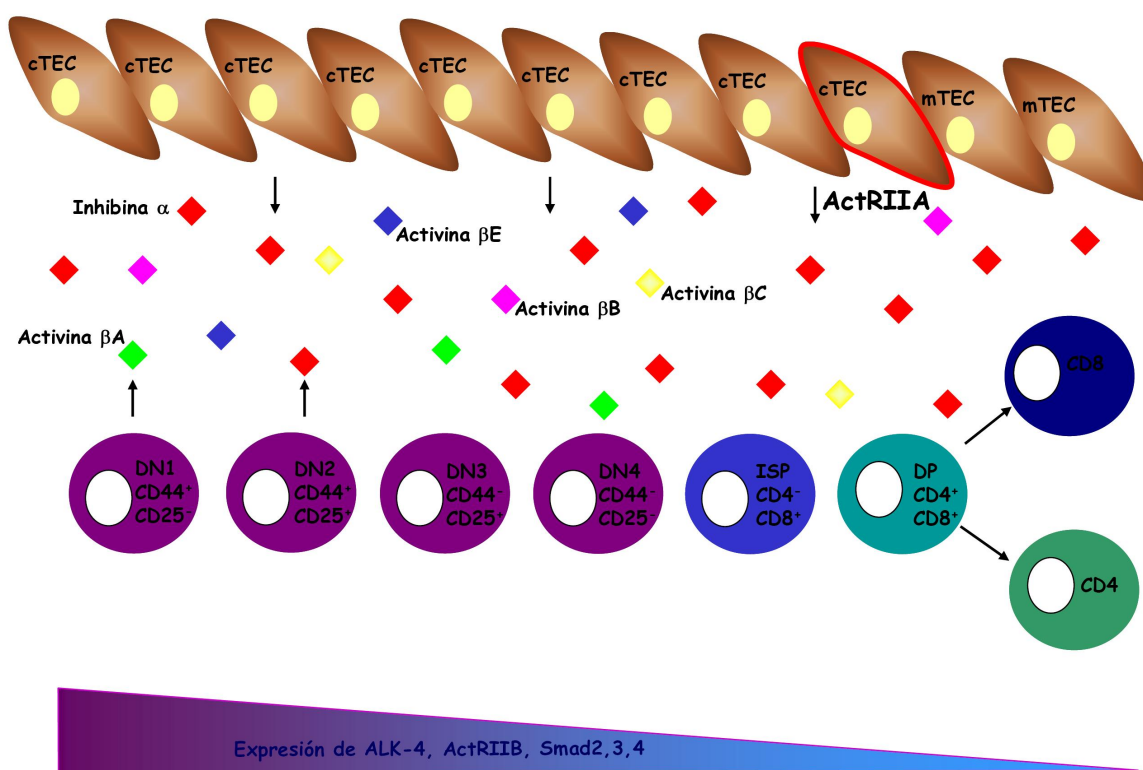


Figura 33. Expresión de Activinas/Inhibinas en el timo. Las subunidades del ligando Activina βA , βB e Inhibina α se expresan en el timo, mayoritariamente por células del estroma aunque las subunidades βA y α también se expresan en timocitos. La subunidad α se expresa en mayores niveles que las subunidades β , sugiriendo una expresión preferencial de Inhibinas en el timo. Los receptores tipo I y IIB al igual que Smads 2, 3 y 4 se expresan diferencialmente en precursores de timocitos, siendo mayor en poblaciones DN. La expresión del receptor tipo IIA se da primordialmente por células del estroma.

El papel de ligandos de la subfamilia de Activinas/Inhibinas en el desarrollo del linfocito T se evaluó en cultivos de órgano de timo fetal tratados con Activina A, Inhibina A ó Inhibina B. Dentro de las cuatro subpoblaciones DN, el tratamiento con Activina A e Inhibina A promovió la maduración de los timocitos del estadio DN3 al estadio DN4 al día tres de cultivo, este hallazgo es relevante dado que es el primer reporte de una regulación positiva mediado por miembros de la superfamilia del TGF- β durante el primer punto de control en el desarrollo ó la selección β ; interesantemente este efecto es contrario al previamente descrito para BMPs [299] apoyando el antagonismo de señales de Activinas y BMPs observado en otros modelos de diferenciación, como es la especificación del eje dorso ventral en *Xenopus* [320]. Por otro lado, Inhibina B tiene un efecto en precursores DN similar al reportado con otros ligandos de la superfamilia como los TGF- β s y los BMPs, inhibiendo el desarrollo de timocitos al arrestar la maduración de los mismos en el estadio DN1 [265, 299-301]. Sin embargo, la disminución en el número total de células en cultivos tratados con Inhibina B podría deberse a un arresto en ciclo celular como se vio con el tratamiento con TGF- β ó BMPs [265, 299] o bien a un incremento en apoptosis. Nuestros datos del análisis de la apoptosis temprana y tardía mediante Anexina V y yoduro de propidio, indico que existe un aumento de la apoptosis temprana en precursores DP, contrario a lo que se había postulado para BMPs, las cuales parecían promover sobrevivencia y disminuir el porcentaje de apoptosis en timocitos [300]. Sin embargo, el incremento en apoptosis fue de un 8 a un 10% en DP; población que al día 3 representa el 17% del total de timocitos en cultivo y que se encuentra disminuida en lóbulos tratados con este ligando, por lo que es poco probable que la apoptosis en esta subpoblación, explique totalmente la reducción significativa (75%) del número de timocitos en timos fetales tratados con Inhibina B al día 3 de cultivo. Adicionalmente, la disminución en los

porcentajes de células vivas en las subpoblaciones DN y DP de timos tratados con Inhibina B, sugieren su posible participación en la sobrevivencia de timocitos aunque tendrían que hacerse un análisis más detallados para comprobarlo.

El decremento en la subpoblación DN y el incremento en la subpoblación CD8 ISP por Activina A al día tres de cultivo, apoya una regulación positiva en la maduración promoviendo el paso de DN a ISP CD8⁺, lo cual está determinado por los niveles de expresión de CD24 y TCRβ. En contraste, el tratamiento con Inhibina A promueve la maduración de los timocitos a un estadio de diferenciación posterior al inducido por Activina A, incrementando el porcentaje de precursores DP, por lo que actuaría promoviendo el paso de DN a DP. Cabe señalar que Activina A e Inhibina A no parecen tener funciones antagónicas en la regulación del desarrollo y la diferenciación de los timocitos como se ha descrito para otros modelos [215-217], apoyando datos previos donde se demuestra que el antagonismo observado por estos ligandos depende del tipo celular y no necesariamente ocurre en todo tejido que los coexpresa [218-220]. Inhibina B por su parte, induce un incremento en precursores DN y un decremento en DP, el efecto podría explicarse por el arresto observado en DN1, que llevaría a un incremento en la subpoblación total DN. Un dato importante obtenido con este análisis fue el efecto antagónico de Inhibina A e Inhibina B, evaluado en cuanto a los porcentajes de DN y DP obtenidos posterior al tratamiento; mientras Inhibina A incrementa el porcentaje de DPs, es decir parece promover maduración, la Inhibina B incrementa el porcentaje de DNs, y por lo tanto parece frenar la maduración. Habría que analizar si dicho antagonismo también se observa en las respuestas celulares inducidas en timocitos, que en el caso de Inhibina B fue una inducción de apoptosis y posiblemente, para el caso de Inhibina A, pudiera ser lo contrario, como sería un incremento en la sobrevivencia o proliferación. Sin embargo,

nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el número total de timocitos obtenidos luego del tratamiento con Inhibina A y se requeriría un análisis más detallado del ciclo celular en cada una de las subpoblaciones tímicas, así como un análisis de la proliferación in vitro mediante incorporación de BrdU, para así poder concluir si existe un efecto de estos ligandos sobre el ciclo celular.

Los resultados obtenidos al día tres sugerían que tanto Activina A como Inhibina A podrían promover la maduración de los timocitos, por lo que quisimos evaluar si el incremento en ISP ó DP llevaba a un mayor porcentaje de precursores tardíos SP al día siete de cultivo. Los resultados obtenidos demostraron que Activina A al igual que lo que se había reportado para TGF- β [265], induce la diferenciación hacia el linaje CD8⁺ disminuyendo el porcentaje de timocitos DP y CD4 e incrementando el de CD8. Los timocitos CD8 generados por el tratamiento con Activina A durante siete días presentan bajos niveles de expresión de CD24 y altos de TCR β por lo que se trata de timocitos CD8⁺ SP. Inhibina A también indujo un incremento en precursores CD8 y considerando que el tratamiento con el mismo ligando al día tres de cultivo inducía un incremento en DP, éstos CD8 son probablemente SP; sin embargo los porcentajes de timocitos DP y CD4 obtenidos de lóbulos tratados con Inhibina A no muestran diferencias significativas con respecto al lóbulo control por lo que no podemos concluir que Inhibina A promueva la diferenciación hacia el linaje CD8. Finalmente, habría que considerar las limitantes de utilizar FTOC como modelo de diferenciación, dentro de las que podemos mencionar una menor diferenciación de precursores CD4, especialmente en cultivos de corta duración; por lo que para descartar o demostrar el efecto de Activinas/Inhibinas en los procesos de selección negativa, positiva y elección de linaje sería necesario realizar cultivos a días posteriores, donde las subpoblaciones de timocitos sean equivalentes a las observadas en timo adulto.

Nuestros datos de participación de Activinas e Inhibinas durante el desarrollo del linfocito T se resumen en la Figura 34.

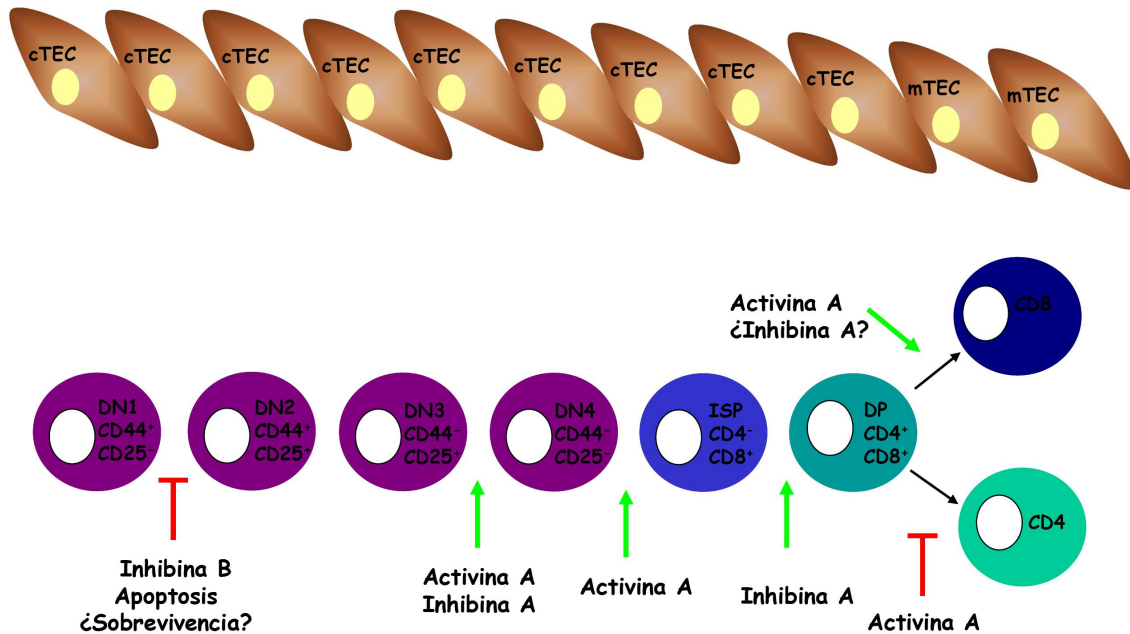


Figura 34. Regulación del desarrollo de timocitos por Activinas/Inhibinas. Nuestros ensayos *in vitro* demostraron que Activina A e Inhibina A promueven el paso de DN3 a DN4 y de DN a ISP ó a DP respectivamente. Inhibina B frena el desarrollo de timocitos en el estadio DN1 y promueve la apoptosis de timocitos aunque también podría estar regulando la sobrevivencia de los mismos. Activina A promueve el paso a CD8 SP e inhibe el desarrollo de linfocitos CD4 SP. El efecto de Inhibina A en precursores maduros no es claro aunque también podría promover el paso a CD8 SP.

El análisis de los ratones adultos deficientes para la subunidad α de Inhibina y por lo tanto deficientes en la expresión de Inhibinas, no mostró diferencias en los porcentajes de subpoblaciones de timocitos ni en el número total de células con respecto a un ratón silvestre; sin embargo nuestros hallazgos de expresión de Inhibinas en desarrollo sugerían su papel potencial en etapas de diferenciación temprana en donde era necesario analizar su deficiencia. El requerimiento de cruza de heterocigotos para la generación de ratones deficientes para Inhibina dado su fenotipo de esterilidad, podría compensar la ausencia de ligando en los fetos deficientes en Inhibinas por la expresión del ligando en placenta, por lo

que la fuente materna proveería de Inhibinas durante el desarrollo. Para asegurar una deficiencia real del ligando en desarrollo, aislamos timos fetales E14 de cruces heterocigotas (los cuales fueron tipados genóticamente mediante PCR, para identificar los fetos silvestres, heterocigotos u homocigotos) mismos que fueron utilizados en FTOC. El análisis de subpoblaciones de timocitos al día cero mostró un incremento significativo de precursores tempranos DN2 en timos de fetos deficientes con respecto a timos de fetos silvestres; al día siete de cultivo continúa el incremento en DN2 en timos de ratones deficientes y adicionalmente encontramos un decremento en precursores CD4, sin embargo este incremento en poblaciones SP, especialmente CD4 tendría que evaluarse en días posteriores de cultivo, dada la naturaleza del modelo utilizado en este estudio. Adicionalmente, el análisis de las subpoblaciones de timocitos de ratones deficientes de Inhibina al día siete de cultivo fetal, mostró una tendencia de incremento en la población DN y un decremento en DP, sugiriendo un posible retraso en el desarrollo, mismo que tendría que analizarse más detalladamente. Por otro lado, al analizar el número total de timocitos al cabo de 7 días de cultivo encontramos una tendencia que indica una disminución del número total de timocitos provenientes de fetos deficientes de Inhibinas, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto a los timos de los fetos silvestres. El fenotipo de aparente retraso en el desarrollo, confirmaría un papel para Inhibina A para promover el desarrollo de los timocitos, como observamos en nuestros ensayos *in vitro*. La ausencia de un fenotipo relacionado con la deficiencia de Inhibina B podría deberse a la menor expresión de este ligando en el timo, puesto que la subunidad β B se expresa en menor cantidad que la β A, y dentro de los ligandos de Inhibina, Inhibina A sería el ligando mayoritario expresado en el timo.

Por otro lado, puesto que previamente habíamos demostrado que todos los componentes de la vía canónica de señalización por Activinas se encuentran presentes a lo largo del desarrollo de los timocitos [321], quisimos demostrar la activación de esta vía mediante el análisis de la fosforilación de Smad2/3. El análisis por subpoblaciones demostró la fosforilación de Smad2 en precursores DN, que ya se había reportado anteriormente [267], sin embargo contrario a lo que se había propuesto, la fosforilación de Smads por Activina A, no está restringida a precursores DN, y los timocitos DP, CD4 y CD8 también pueden responder al estímulo incrementando los niveles de fosforilación de Smad2/3. Lo anterior sugiere que, a pesar de haber mayor expresión de receptores en timocitos DN, los timocitos DP, CD4 y CD8 también pueden activar la vía señalización de las Smads en respuesta a Activinas. De manera similar, las señales inducidas por TGF- β no se restringieron a los precursores SP como se había propuesto, dada la mayor expresión del receptor tipo I para TGF- β , Alk-5, en dichos precursores, pues en nuestros ensayos también observamos una fosforilación de Smad2/3 en respuesta a TGF- β en timocitos DN y DP. Sin embargo, tenemos que considerar el hecho de que el anticuerpo utilizado podría estar reconociendo Smad 2 y 3, por lo que no podemos descartar que exista una activación diferencial de dichas vías, dependiendo del estadio de diferenciación del timocito.

En nuestros estudios iniciales sobre la función de las Activinas utilizamos a las Inhibinas, esperando que éstas actuarían como antagonistas de la señal de las Activinas, y por lo tanto, inhibirían las señales de activación dependientes de Smads inducidas por Activina. Sorprendentemente, Inhibina A e Inhibina B no inhibieron la fosforilación de Smads inducida por Activina y contrario a lo que se esperaba, también fueron capaces de inducir una señal de activación fosforilando Smad2/3 en todas las poblaciones de timocitos analizadas. El efecto en la activación de Smads depende del ligando; Inhibina A induce una

fosforilación menor a la observada con los agonistas clásicos, sin embargo Inhibina B llevó a niveles de fosforilación incluso mayores a los inducidos por Activina A y TGF- β 1, evaluado como el incremento en la intensidad media de fluorescencia por ensayos de tinción intracelular y análisis por FACs. Nuestros datos proveen de la primer evidencia que demuestra una señal de activación y fosforilación de Smads por Inhibinas.

Los ensayos realizados en células Jurkat nos permitieron caracterizar en detalle la vía de fosforilación de Smads por Inhibinas. En esta línea celular de linfocitos T maduros confirmamos que las Inhibinas podían llevar a la activación de Smad2/3 mediante el análisis por FACs, y este dato fue reproducible al analizarse por Western blot. La débil inducción de fosforilación de Smads por Inhibina A se detectó únicamente previa inmunoprecipitación de Smad2 total, seguido de western blot con anticuerpo anti-pSmad 2. Con los ensayos de inmunoprecipitación podemos asegurar que la Smad fosforilada por Inhibinas es Smad2, sin embargo la fosforilación de Smad detectada en los ensayos de western blot a partir de lisados totales, podría incluir Smad 3 pues también es reconocida por el anticuerpo contra pSmad, por lo que no podemos descartar que Smad3 también se fosforile en respuesta a Inhibinas.

Adicionalmente, la fosforilación de Smads inducida por Inhibinas también fue reproducible en la línea HepG2 tanto en lisados totales como en ensayos de inmunoprecipitación y Western Blot, demuestra que nuestro hallazgo no es un fenómeno dependiente del tipo celular y podría estar ocurriendo en otros tejidos blanco para este ligando.

Mediante una curva dosis-respuesta de activación de Smads por Inhibina B pudimos determinar la concentración mínima necesaria para inducir la fosforilación de Smad, que resultó ser 10 veces menor de la requerida para inducir una fosforilación detectable por

Activina A. Adicionalmente, Inhibina B llevó a niveles de pSmad casi dos ordenes de magnitud mayores que los observados en estado basal, siendo mayor incluso comparado con la inducción por el agonista clásico Activina A. Por otro lado, la cinética de fosforilación de Smads por Inhibina B es similar a la observada con Activina A induciendo una activación de Smads desde los 15 min de estimulación, misma que se mantiene prácticamente igual hasta los 60 min.

Finalmente, en un intento por dilucidar el posible mecanismo de acción de las Inhibinas, utilizamos una droga que inhibe la activación de los receptores tipo I. Nuestros datos demuestran que la fosforilación de Smads por Inhibinas depende de alguno de los receptores tipo I para Activina o TGF- β , ya sea Alk4, Alk5 o Alk7, en base a la disminución de la fosforilación de Smad en presencia de la droga SB431542. Se ha postulado que la estimulación mediada por TGF- β lleva a una mayor fosforilación de Smad3 que de Smad2 [132, 183], posiblemente por esta razón no pudimos observar una disminución en la fosforilación de Smad2 en los ensayos de inhibición con SB431542 cuando se analizó la respuesta inducida por TGF- β en inmunoprecipitados de Smad2 en células Jurkat. En cuanto a la dependencia de algún receptor tipo I para la señal por Inhibinas, existen dos reportes donde se demostró que las Inhibinas son incapaces de unirse al receptor tipo I Alk4 [227, 228] por lo que este receptor podría descartarse inicialmente; sin embargo no hay reportes a la fecha que investiguen la capacidad de las Inhibinas de poder unirse a algún otro receptor tipo I. Alk5 también se expresa en el timo [267] y estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio sugieren la expresión de Alk7 en timocitos y células Jurkat por lo que cabe la posibilidad de que alguno de ellos esté funcionando en la vía de fosforilación de Smads inducida por Inhibinas en el timo. Un dato interesante es que la línea HepG2, a pesar de responder a Inhibinas, no expresa el receptor

Alk7, sugiriendo que la señal por Inhibinas al menos en este hepatoma, no depende de este receptor tipo I. Por otro lado, también hay reportes en los que se ha postulado la participación de β -glicano en las señales mediadas por Inhibinas [233-236]. El β -glicano funcionaría como un receptor para Inhibinas y podría facilitar el reconocimiento del ligando por el receptor tipo I. La expresión de ésta molécula en el timo fue sugerida por el grupo de Takahama en 1994 [254] y en nuestro laboratorio actualmente estamos realizando experimentos que nos puedan confirmar esta expresión en timocitos.

Alternativamente, y dada la relevancia de nuestro hallazgo, es importante determinar si esta inducción de Smads por Inhibinas no es debida a una inducción en la secreción de agonistas clásicos como serían TGF- β ó Activina; sin embargo dadas las características cualitativas y cuantitativas de esta inducción y los cortos tiempos requeridos para una fosforilación de Smads por Inhibinas, creemos que esta posibilidad sería poco probable y las señales inducidas por Inhibinas son directamente por su unión y activación de alguno de los receptores tipo I que llevarían a la fosforilación de Smads.

Sorprendentemente y contrario a lo que se ha postulado como posibles mecanismos de antagonismo entre Activinas e Inhibinas; nuestros datos representan el primer reporte en el que las Inhibinas poseen un mecanismo de señalización propio que se comparte con Activinas y depende de receptores tipo I y proteínas Smad (Figura 35). Finalmente, habría que determinar si la fosforilación de Smads por Inhibinas lleva a la activación de genes blanco dependientes de Smad.

En el futuro será de vital importancia identificar y caracterizar los componentes involucrados en la vía de señalización inducida por Inhibinas en timocitos para establecer el mecanismo molecular responsable de la inducción de señales por estos ligandos, mismo que a la fecha se desconoce.

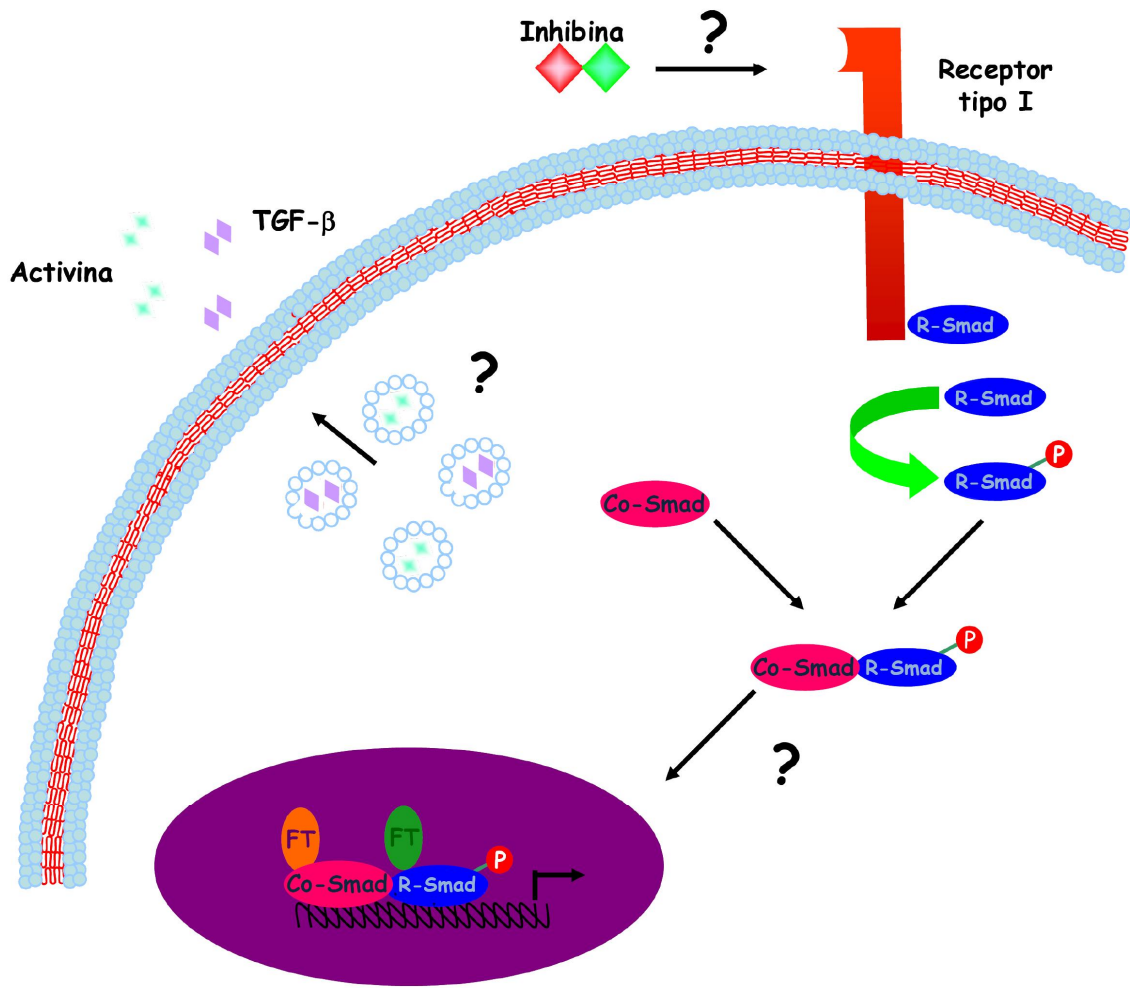


Figura 35. Modelo de activación de Smad por Inhibinas. Nuestros datos sugieren un mecanismo de señalización por Inhibinas que involucran la activación de algún receptor tipo I, mismo que lleva a la fosforilación de proteínas R-Smad. Es importante determinar si la fosforilación de Smads por Inhibinas llevan a la regulación de genes blanco en núcleo y descartar que la inducción de ésta fosforilación no sea debida a la inducción de la secreción de los agonistas clásicos de la vía como Activina y TGF- β en respuesta a Inhibinas. De cualquier forma, nuestros resultados proveen de la primer evidencia en la que Inhibinas inducen la activación de una vía de señalización intracelular que, interesantemente y contrario a lo postulado por años involucra la fosforilación de proteínas Smad.

Conclusiones

Las Activinas e Inhibinas, receptores tipo I, tipo II y proteínas Smads se expresan en el timo desde etapas tempranas en desarrollo. Las subunidades de los ligandos se expresan mayoritariamente en células del estroma y los ligandos más expresados son las Inhibinas. Dentro de los precursores de timocitos, la subpoblación DN presenta mayores niveles de expresión de los receptores, sin embargo la expresión observada en los timocitos DP y SP es suficiente para activar la vía de señalización dependiente de Activinas medido como la fosforilación de Smad.

Activina A e Inhibina A no antagonizan durante el desarrollo temprano del linfocito T, pues ambos ligandos promueven la maduración de los timocitos. Por otro lado, la Inhibina B, al igual que otros ligandos descritos como TGF- β s y BMPs, inhibe el desarrollo de los timocitos y reduce el número total de células posiblemente debido a un arresto en el ciclo celular. El análisis de las subpoblaciones de timocitos en ratones deficientes de Inhibinas demostró que la ausencia del ligando induce un retraso en desarrollo durante las etapas fetales de maduración de los timocitos.

Las Inhibinas, al igual que las Activinas, pueden activar la vía de señalización dependiente de un receptor tipo I y llevar a una fosforilación de proteínas Smads en distintos tipos celulares.

Perspectivas

- Analizar el papel de Activinas/Inhibinas en la regulación del ciclo celular y proliferación de los timocitos
- Realizar análisis de apoptosis, ciclo celular y proliferación en cultivos de timo fetal de ratones deficientes de Inhibinas para determinar si la tendencia en la disminución del número de células es significativo y se relaciona con alguna de estas respuestas funcionales
- Completar la caracterización de señales por Inhibinas en timocitos analizando la fosforilación de Smads en precursores DN1-DN4
- Identificar al receptor tipo I y componentes de señalización como serían receptores accesorios responsables de la fosforilación de Smads por Inhibinas A y B
- Analizar si la activación de Smads por Inhibinas lleva a la expresión de genes blanco clásicos de Smads como sería Smad 7
- Descartar que las señales por Inhibinas no son debidas a la inducción de secreción de agonistas clásicos de la vía como TGF- β y Activina

Bibliografia

1. Pennington, D.J., B. Silva-Santos, and A.C. Hayday, *Gammadelta T cell development--having the strength to get there*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(2): p. 108-15.
2. Doyle, C. and J.L. Strominger, *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. *Nature*, 1987. **330**(6145): p. 256-9.
3. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. *Nature*, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
4. Teh, H.S., et al., *Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells*. *Nature*, 1988. **335**(6187): p. 229-33.
5. Brodsky, F.M. and L.E. Guagliardi, *The cell biology of antigen processing and presentation*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 707-44.
6. Townsend, A. and H. Bodmer, *Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 601-24.
7. Garcia, K.C., L. Teyton, and I.A. Wilson, *Structural basis of T cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 369-97.
8. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 287-99.
9. Wang, J.H. and E.L. Reinherz, *Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules*. *Mol Immunol*, 2002. **38**(14): p. 1039-49.
10. Zamoyska, R., *CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses?* *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(1): p. 82-7.
11. Mackay, C.R., *Homing of naive, memory and effector lymphocytes*. *Curr Opin Immunol*, 1993. **5**(3): p. 423-7.
12. Crabtree, G.R., *Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation*. *Science*, 1989. **243**(4889): p. 355-61.
13. June, C.H., et al., *Role of the CD28 receptor in T-cell activation*. *Immunol Today*, 1990. **11**(6): p. 211-6.
14. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 305-34.
15. Sharpe, A.H., et al., *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(3): p. 239-45.
16. Khoury, S.J. and M.H. Sayegh, *The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 529-38.
17. Bour-Jordan, H. and J.A. Blueston, *CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals*. *J Clin Immunol*, 2002. **22**(1): p. 1-7.
18. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 621-67.
19. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(9): p. 835-42.
20. Miller, J.F., *Immunological function of the thymus*. *Lancet*, 1961. **2**: p. 748-9.
21. Scollay, R. and D.I. Godfrey, *Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips?* *Immunol Today*, 1995. **16**(6): p. 268-73; discussion 273-4.
22. Manley, N.R., *Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(5): p. 421-8.
23. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(1): p. 31-40.

24. Blackburn, C.C. and N.R. Manley, *Developing a new paradigm for thymus organogenesis*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 278-89.
25. Bockman, D.E. and M.L. Kirby, *Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest*. Science, 1984. **223**(4635): p. 498-500.
26. Lind, E.F., et al., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
27. Lesley, J., J. Trotter, and R. Hyman, *The Pgp-1 antigen is expressed on early fetal thymocytes*. Immunogenetics, 1985. **22**(2): p. 149-57.
28. Ceredig, R., et al., *Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 98-100.
29. Ceredig, R. and T. Rolink, *A positive look at double-negative thymocytes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 888-97.
30. Groettrup, M., et al., *A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein*. Cell, 1993. **75**(2): p. 283-94.
31. Wiest, D.L., M.A. Berger, and M. Carleton, *Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: A receptor without a ligand?* Semin Immunol, 1999. **11**(4): p. 251-62.
32. Shortman, K., et al., *The generation and fate of thymocytes*. Semin Immunol, 1990. **2**(1): p. 3-12.
33. Strasser, A., *Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 228-34.
34. Anderson, G., et al., *Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1838-42.
35. Anderson, G., K.J. Hare, and E.J. Jenkinson, *Positive selection of thymocytes: the long and winding road*. Immunol Today, 1999. **20**(10): p. 463-8.
36. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1720-3.
37. Baldwin, K.K., et al., *Negative selection of T cells occurs throughout thymic development*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 689-98.
38. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
39. Gabor, M.J., D.I. Godfrey, and R. Scollay, *Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2010-5.
40. Savino, W., et al., *Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 305-13.
41. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
42. Anderson, G., et al., *Establishment and functioning of intrathymic microenvironments*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 10-27.
43. van Ewijk, W., E.W. Shores, and A. Singer, *Crosstalk in the mouse thymus*. Immunol Today, 1994. **15**(5): p. 214-7.
44. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 463-493.

45. Benz, C. and C.C. Bleul, *A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 21-31.
46. Matsuzaki, Y., et al., *Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1283-92.
47. Wu, L., C.L. Li, and K. Shortman, *Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 903-11.
48. Sambandam, A., et al., *Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors*. Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 663-70.
49. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
50. Harman, B.C., E.J. Jenkinson, and G. Anderson, *Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1299-303.
51. Ikawa, T., et al., *E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1329-42.
52. Tan, J.B., et al., *Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development*. Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 671-9.
53. Schmitt, T.M., et al., *Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 469-79.
54. Ciofani, M., et al., *Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5230-9.
55. Lehar, S.M., et al., *Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1440-7.
56. Ciofani, M., et al., *Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 105-16.
57. Garbe, A.I., et al., *Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines alphabeta versus gammadelta lineage fate*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1579-90.
58. Hayday, A.C., et al., *Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment*. Semin Immunol, 1999. **11**(4): p. 239-49.
59. Dudley, E.C., et al., *Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor*. Curr Biol, 1995. **5**(6): p. 659-69.
60. Hayes, S.M., L. Li, and P.E. Love, *TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 583-93.
61. Washburn, T., et al., *Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision*. Cell, 1997. **88**(6): p. 833-43.
62. Bain, G., et al., *Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 289-300.
63. Durum, S.K., et al., *Interleukin 7 receptor control of T cell receptor gamma gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2233-41.
64. Chien, Y.H., et al., *A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation*. Nature, 1987. **327**(6124): p. 677-82.

65. Haks, M.C., et al., *Pre-TCR signaling and inactivation of p53 induces crucial cell survival pathways in pre-T cells*. *Immunity*, 1999. **11**(1): p. 91-101.
66. Aifantis, I., et al., *Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus*. *Immunity*, 1997. **7**(5): p. 601-7.
67. Newton, K., A.W. Harris, and A. Strasser, *FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor*. *EMBO J*, 2000. **19**(5): p. 931-41.
68. Kruisbeek, A.M., et al., *Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions*. *Immunol Today*, 2000. **21**(12): p. 637-44.
69. Aifantis, I., et al., *Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor*. *Immunol Rev*, 2006. **209**: p. 159-69.
70. Malissen, M., et al., *Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene*. *EMBO J*, 1995. **14**(19): p. 4641-53.
71. Groves, T., et al., *Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development*. *Immunity*, 1996. **5**(5): p. 417-28.
72. Cheng, A.M., et al., *The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(18): p. 9797-801.
73. Zhang, W., et al., *Essential role of LAT in T cell development*. *Immunity*, 1999. **10**(3): p. 323-32.
74. Clements, J.L., et al., *Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development*. *Science*, 1998. **281**(5375): p. 416-9.
75. Pivniouk, V., et al., *Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76*. *Cell*, 1998. **94**(2): p. 229-38.
76. von Boehmer, H., *Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(7): p. 571-7.
77. Grusby, M.J. and L.H. Glimcher, *Immune responses in MHC class II-deficient mice*. *Annu Rev Immunol*, 1995. **13**: p. 417-35.
78. Koller, B.H., et al., *Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells*. *Science*, 1990. **248**(4960): p. 1227-30.
79. Panigada, M., et al., *Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor*. *J Exp Med*, 2002. **195**(12): p. 1585-97.
80. Yamasaki, S., et al., *Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(1): p. 67-75.
81. Korade-Mirnic, Z. and S.J. Corey, *Src kinase-mediated signaling in leukocytes*. *J Leukoc Biol*, 2000. **68**(5): p. 603-13.
82. Chu, D.H., C.T. Morita, and A. Weiss, *The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development*. *Immunol Rev*, 1998. **165**: p. 167-80.
83. Zhang, W., et al., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation*. *Cell*, 1998. **92**(1): p. 83-92.
84. Liu, S.K., et al., *The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors*. *Curr Biol*, 1999. **9**(2): p. 67-75.
85. Yablonski, D., T. Kadlec, and A. Weiss, *Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell*

- receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4208-18.
86. Fischer, K.D., K. Tedford, and J.M. Penninger, *Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton*. Semin Immunol, 1998. **10**(4): p. 317-27.
 87. Bubeck-Wardenburg, J., et al., *Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 607-16.
 88. Bokoch, G.M., et al., *Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1)*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 25746-9.
 89. Dower, N.A., et al., *RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 317-21.
 90. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3199-203.
 91. Su, M.W., et al., *Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3975-82.
 92. Vang, T., et al., *Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 497-507.
 93. Bachmaier, K., et al., *Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 211-6.
 94. Sosinowski, T., et al., *Src-like adaptor protein (SLAP) is a negative regulator of T cell receptor signaling*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 463-74.
 95. Davis, C.B. and D.R. Littman, *Thymocyte lineage commitment: is it instructed or stochastic?* Curr Opin Immunol, 1994. **6**(2): p. 266-72.
 96. Hernandez-Hoyos, G., et al., *Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment*. Immunity, 2000. **12**(3): p. 313-22.
 97. Yasutomo, K., et al., *The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 506-10.
 98. Wiest, D.L., et al., *Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both correceptor molecules*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1701-12.
 99. Brugnera, E., et al., *Correceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 59-71.
 100. Anderson, G., et al., *Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3349-54.
 101. Klug, D.B., et al., *Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2842-5.
 102. Derbinski, J. and B. Kyewski, *Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 503-6.
 103. Anderson, G., et al., *MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 70-3.

104. Anderson, G., et al., *Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 2027-31.
105. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
106. Gallegos, A.M. and M.J. Bevan, *Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1039-49.
107. Rodewald, H.R., et al., *Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo*. Immunity, 1995. **3**(3): p. 313-9.
108. Sudo, T., et al., *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9125-9.
109. Wurbel, M.A., et al., *The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9*. Eur J Immunol, 2000. **30**(1): p. 262-71.
110. Liu, C., et al., *Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2531-9.
111. Ara, T., et al., *A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4649-55.
112. Plotkin, J., et al., *Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4521-7.
113. Misslitz, A., et al., *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 481-91.
114. Kwan, J. and N. Killeen, *CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3999-4007.
115. Ueno, T., et al., *CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 493-505.
116. Ueno, T., et al., *Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 205-18.
117. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
118. Petrie, H.T., *Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 859-66.
119. Prockop, S.E., et al., *Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4354-61.
120. Munoz, J.J., et al., *Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 177-84.
121. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
122. Roberts, A.B., et al., *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5339-43.
123. Alliston, T., et al., *TGF-beta-induced repression of Cbfa1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation*. Embo J, 2001. **20**(9): p. 2254-72.

124. Chen, H., et al., *Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1*. *Circ Res*, 2001. **89**(12): p. 1155-60.
125. Chen, H., et al., *TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(3): p. H1035-9.
126. Chen, S., et al., *Transforming growth factor-alpha promotes mouse blastocyst outgrowth and secretion of matrix metalloproteinases*. *Chin Med J (Engl)*, 2001. **114**(12): p. 1300-4.
127. Chen, W., et al., *TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu*. *Immunity*, 2001. **14**(6): p. 715-25.
128. Choy, L. and R. Derynck, *Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9609-19.
129. Zavadil, J., et al., *Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6686-91.
130. Cottrez, F. and H. Groux, *Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10*. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 773-8.
131. Wrana, J.L., et al., *TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex*. *Cell*, 1992. **71**(6): p. 1003-14.
132. Zhang, Y., et al., *Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response*. *Nature*, 1996. **383**(6596): p. 168-72.
133. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 753-91.
134. Goumans, M.J. and C. Mummery, *Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice*. *Int J Dev Biol*, 2000. **44**(3): p. 253-65.
135. Chang, H., A.L. Lau, and M.M. Matzuk, *Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **180**(1-2): p. 39-46.
136. Derynck, R., et al., *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. *Nature*, 1985. **316**(6030): p. 701-5.
137. Gentry, L.E., et al., *Molecular events in the processing of recombinant type I pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(10): p. 4162-8.
138. Miyazono, K., H. Ichijo, and C.H. Heldin, *Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors*. *Growth Factors*, 1993. **8**(1): p. 11-22.
139. Nunes, I., et al., *Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(5): p. 1151-63.
140. Taipale, J., et al., *Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein*. *J Cell Biol*, 1994. **124**(1-2): p. 171-81.

141. Sun, P.D. and D.R. Davies, *The cystine-knot growth-factor superfamily*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1995. **24**: p. 269-91.
142. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
143. Mathews, L.S. and W.W. Vale, *Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase*. Cell, 1991. **65**(6): p. 973-82.
144. ten Dijke, P., et al., *Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity*. Oncogene, 1993. **8**(10): p. 2879-87.
145. Lin, H.Y., et al., *Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase*. Cell, 1992. **68**(4): p. 775-85.
146. Attisano, L., et al., *Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors*. Cell, 1992. **68**(1): p. 97-108.
147. Ebner, R., et al., *Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1344-8.
148. Cheifetz, S., J.L. Andres, and J. Massague, *The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor*. J Biol Chem, 1988. **263**(32): p. 16984-91.
149. Wells, R.G., et al., *Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11444-51.
150. Kirsch, T., W. Sebald, and M.K. Dreyer, *Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(6): p. 492-6.
151. Greenwald, J., et al., *Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 18-22.
152. Boesen, C.C., et al., *The I.1 A crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain*. Structure, 2002. **10**(7): p. 913-9.
153. Luo, K. and H.F. Lodish, *Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1970-81.
154. Souhelnytskyi, S., et al., *Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses*. Embo J, 1996. **15**(22): p. 6231-40.
155. Wrana, J.L., et al., *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 341-7.
156. Wieser, R., J.L. Wrana, and J. Massague, *GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex*. Embo J, 1995. **14**(10): p. 2199-208.
157. Charng, M.J., et al., *FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I transforming growth factor-beta receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 22941-4.
158. Chen, Y.G., F. Liu, and J. Massague, *Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12*. Embo J, 1997. **16**(13): p. 3866-76.
159. Franzen, P., et al., *Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor*. Cell, 1993. **75**(4): p. 681-92.

160. Kretzschmar, M., et al., *The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 984-95.
161. Macias-Silva, M., et al., *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1215-24.
162. Mathews, L.S. and W.W. Vale, *Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 19013-8.
163. Bassing, C.H., et al., *A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression*. Science, 1994. **263**(5143): p. 87-9.
164. Mahony, D. and J.B. Gurdon, *A type I serine/threonine kinase receptor that can dorsalize mesoderm in Xenopus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6474-8.
165. Ebner, R., et al., *Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin*. Science, 1993. **262**(5135): p. 900-2.
166. Liu, F., et al., *Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3479-86.
167. Rosenzweig, B.L., et al., *Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7632-6.
168. Nohno, T., et al., *Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22522-6.
169. Nishitoh, H., et al., *Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21345-52.
170. Sekelsky, J.J., et al., *Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1995. **139**(3): p. 1347-58.
171. Raftery, L.A., et al., *Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila*. Genetics, 1995. **139**(1): p. 241-54.
172. Savage, C., et al., *Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 790-4.
173. Hoodless, P.A., et al., *MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways*. Cell, 1996. **85**(4): p. 489-500.
174. Graff, J.M., A. Bansal, and D.A. Melton, *Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily*. Cell, 1996. **85**(4): p. 479-87.
175. Liu, F., et al., *A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 620-3.
176. Thomsen, G.H., *Xenopus mothers against decapentaplegic is an embryonic ventralizing agent that acts downstream of the BMP-2/4 receptor*. Development, 1996. **122**(8): p. 2359-66.
177. Suzuki, A., et al., *Smad5 induces ventral fates in Xenopus embryo*. Dev Biol, 1997. **184**(2): p. 402-5.

178. Chen, Y., A. Bhushan, and W. Vale, *Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12938-43.
179. Eppert, K., et al., *MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma*. Cell, 1996. **86**(4): p. 543-52.
180. Chen, Y., J.J. Lebrun, and W. Vale, *Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12992-7.
181. Baker, J.C. and R.M. Harland, *A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway*. Genes Dev, 1996. **10**(15): p. 1880-9.
182. Lagna, G., et al., *Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 832-6.
183. Nakao, A., et al., *TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4*. Embo J, 1997. **16**(17): p. 5353-62.
184. Hata, A., et al., *Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4*. Nature, 1997. **388**(6637): p. 82-7.
185. Imamura, T., et al., *Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 622-6.
186. Hata, A., et al., *Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 186-97.
187. Nakao, A., et al., *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
188. Hayashi, H., et al., *The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1165-73.
189. Kretzschmar, M., J. Doody, and J. Massague, *Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 618-22.
190. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
191. Shi, Y., et al., *Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling*. Cell, 1998. **94**(5): p. 585-94.
192. Kim, J., et al., *Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 304-8.
193. Liu, F., C. Poupponnot, and J. Massague, *Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes*. Genes Dev, 1997. **11**(23): p. 3157-67.
194. Wu, R.Y., et al., *Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2521-8.
195. Shi, Y., et al., *A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4*. Nature, 1997. **388**(6637): p. 87-93.
196. Chen, X., et al., *Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 85-9.
197. Tsukazaki, T., et al., *SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor*. Cell, 1998. **95**(6): p. 779-91.

198. Kavsak, P., et al., *Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1365-75.
199. Ebisawa, T., et al., *Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12477-80.
200. Yamashita, H., et al., *Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1995-2001.
201. Cheng, S.K., et al., *EGF-CFC proteins are essential correceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 31-6.
202. Brown, C.B., et al., *Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2080-2.
203. Lopez-Casillas, F., et al., *Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 557-68.
204. Lewis, K.A., et al., *Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 411-4.
205. Onichtchouk, D., et al., *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 480-5.
206. Smith, W.C. and R.M. Harland, *Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos*. Cell, 1992. **70**(5): p. 829-40.
207. Zimmerman, L.B., J.M. De Jesus-Escobar, and R.M. Harland, *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4*. Cell, 1996. **86**(4): p. 599-606.
208. Piccolo, S., et al., *Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4*. Cell, 1996. **86**(4): p. 589-98.
209. Nakamura, T., et al., *Activin-binding protein from rat ovary is follistatin*. Science, 1990. **247**(4944): p. 836-8.
210. de Winter, J.P., et al., *Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors*. Mol Cell Endocrinol, 1996. **116**(1): p. 105-14.
211. Hemmati-Brivanlou, A., O.G. Kelly, and D.A. Melton, *Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity*. Cell, 1994. **77**(2): p. 283-95.
212. McLachlan, R.I., et al., *Inhibin--a non-steroidal regulator of pituitary follicle stimulating hormone*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1987. **1**(1): p. 89-112.
213. Ling, N., et al., *Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin*. Nature, 1986. **321**(6072): p. 779-82.
214. Vale, W., et al., *Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid*. Nature, 1986. **321**(6072): p. 776-9.
215. Woodruff, T.K. and J.P. Mather, *Inhibin, activin and the female reproductive axis*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 219-44.
216. Chen, P., Y.M. Yu, and A.H. Reddi, *Chondrogenesis in chick limb bud mesodermal cells: reciprocal modulation by activin and inhibin*. Exp Cell Res, 1993. **206**(1): p. 119-27.
217. Hedger, M.P., et al., *Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro*. Mol Cell Endocrinol, 1989. **61**(1): p. 133-8.

218. Levin, M., et al., *Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo*. Dev Biol, 1997. **189**(1): p. 57-67.
219. Merino, R., et al., *Control of digit formation by activin signalling*. Development, 1999. **126**(10): p. 2161-70.
220. Schubert, D., et al., *Activin is a nerve cell survival molecule*. Nature, 1990. **344**(6269): p. 868-70.
221. Ling, N., et al., *Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7217-21.
222. Forage, R.G., et al., *Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3091-5.
223. Robertson, D.M., et al., *Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid*. Mol Cell Endocrinol, 1986. **44**(3): p. 271-7.
224. Woodruff, T.K., et al., *Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle*. Science, 1988. **239**(4845): p. 1296-9.
225. Magoffin, D.A. and A.J. Jakimiuk, *Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women*. Hum Reprod, 1997. **12**(8): p. 1714-9.
226. Xu, J., et al., *Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6308-13.
227. Lebrun, J.J. and W.W. Vale, *Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1682-91.
228. Martens, J.W., et al., *Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2928-36.
229. Dyson, S. and J.B. Gurdon, *The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors*. Cell, 1998. **93**(4): p. 557-68.
230. Phillips, D.J., et al., *A sensitive and specific in vitro bioassay for activin using a mouse plasmacytoma cell line, MPC-11*. J Endocrinol, 1999. **162**(1): p. 111-6.
231. Schwall, R.H., et al., *Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro*. Hepatology, 1993. **18**(2): p. 347-56.
232. Bilezikjian, L.M., et al., *Activin-A inhibits proopiomelanocortin messenger RNA accumulation and adrenocorticotropin secretion of AtT20 cells*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(10): p. 1389-95.
233. Esparza-Lopez, J., et al., *Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14588-96.
234. Chapman, S.C., et al., *Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **196**(1-2): p. 79-93.
235. Chong, H., et al., *Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2600-7.
236. Chapman, S.C. and T.K. Woodruff, *Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (INhBP)*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(4): p. 668-79.

237. Lin, T., et al., *Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin*. *Endocrinology*, 1989. **125**(4): p. 2134-40.
238. Hillier, S.G., et al., *Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. **75**(2): p. R1-6.
239. Miro, F. and S.G. Hillier, *Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. **75**(6): p. 1556-61.
240. Alak, B.M., et al., *Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A*. *Fertil Steril*, 1996. **66**(4): p. 646-53.
241. Lejeune, H., et al., *Stimulating effect of both human recombinant inhibin A and activin A on immature porcine Leydig cell functions in vitro*. *Endocrinology*, 1997. **138**(11): p. 4783-91.
242. Krummen, L.A., et al., *Localization of inhibin and activin binding sites in the testis during development by in situ ligand binding*. *Biol Reprod*, 1994. **50**(4): p. 734-44.
243. Woodruff, T.K., et al., *Pharmacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin A and activin A in the immature rat. II. Tissue distribution of [125I]rh-inhibin A and [125I]rh-activin A in immature female and male rats*. *Endocrinology*, 1993. **132**(2): p. 725-34.
244. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. *J Exp Med*, 1986. **163**(5): p. 1037-50.
245. Ellingsworth, L.R., et al., *Transforming growth factor-beta s are equipotent growth inhibitors of interleukin-1-induced thymocyte proliferation*. *Cell Immunol*, 1988. **114**(1): p. 41-54.
246. Wahl, S.M., et al., *Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation*. *J Immunol*, 1988. **140**(9): p. 3026-32.
247. Chantry, D., M. Turner, and M. Feldmann, *Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta*. *Eur J Immunol*, 1989. **19**(4): p. 783-6.
248. Kim, K.J., et al., *Role of endogenously produced interleukin-6 as a second signal in murine thymocyte proliferation induced by multiple cytokines: regulatory effects of transforming growth factor-beta*. *Cell Immunol*, 1990. **131**(2): p. 261-71.
249. Suda, T. and A. Zlotnik, *In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha induce CD8 expression on CD8- thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8- pre-T cell subset*. *J Immunol*, 1992. **148**(6): p. 1737-45.
250. Paterson, D.J. and A.F. Williams, *An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen*. *J Exp Med*, 1987. **166**(5): p. 1603-8.
251. MacDonald, H.R., R.C. Budd, and R.C. Howe, *A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells*. *Eur J Immunol*, 1988. **18**(4): p. 519-23.
252. Shortman, K., et al., *Immature CD4- CD8+ murine thymocytes*. *Cell Immunol*, 1988. **113**(2): p. 462-79.

253. Suda, T. and A. Zlotnik, *In vitro* induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3-CD4-CD8 alpha + cells generated in vitro by culturing CD25+CD3-CD4-CD8- thymocytes with T cell growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 1992. **149**(1): p. 71-6.
254. Takahama, Y., et al., *Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 1994. **179**(5): p. 1495-506.
255. Schmid, P., et al., *Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis*. *Development*, 1991. **111**(1): p. 117-30.
256. Mossalayi, M.D., et al., *Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor-beta 1 mechanism*. *Blood*, 1995. **85**(12): p. 3594-601.
257. Schluns, K.S., J.E. Cook, and P.T. Le, *TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells*. *J Immunol*, 1997. **158**(6): p. 2704-12.
258. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(2): p. 770-4.
259. Christ, M., et al., *Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice*. *J Immunol*, 1994. **153**(5): p. 1936-46.
260. Boivin, G.P., et al., *Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 276-88.
261. Smith, C.A., et al., *Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures*. *Nature*, 1989. **337**(6203): p. 181-4.
262. McConkey, D.J., et al., *Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex*. *J Immunol*, 1989. **143**(6): p. 1801-6.
263. Bommireddy, R., et al., *TGF beta 1 inhibits Ca²⁺-calcineurin-mediated activation in thymocytes*. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3645-52.
264. Marie, J.C., et al., *TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(7): p. 1061-7.
265. Plum, J., et al., *Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture*. *J Immunol*, 1995. **154**(11): p. 5789-98.
266. Mamura, M., et al., *Ligation of the T cell receptor complex results in phosphorylation of Smad2 in T lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **268**(1): p. 124-7.
267. Rosendahl, A., et al., *Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis*. *Int Immunol*, 2003. **15**(12): p. 1401-14.
268. Sanford, L.P., et al., *TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes*. *Development*, 1997. **124**(13): p. 2659-70.
269. Proetzel, G., et al., *Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion*. *Nat Genet*, 1995. **11**(4): p. 409-14.

270. Kaartinen, V., et al., *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 415-21.
271. Bottinger, E.P., et al., *Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene*. Cancer Res, 1997. **57**(24): p. 5564-70.
272. Wang, X.J., et al., *Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF-beta-mediated growth inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2386-91.
273. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 171-81.
274. Leveen, P., et al., *TGF-beta type II receptor-deficient thymocytes develop normally but demonstrate increased CD8+ proliferation in vivo*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4234-40.
275. Bassing, C.H., et al., *FKBP12 is not required for the modulation of transforming growth factor beta receptor I signaling activity in embryonic fibroblasts and thymocytes*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(3): p. 223-8.
276. Datto, M.B., et al., *Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2495-504.
277. He, W., et al., *Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues*. Embo J, 2002. **21**(11): p. 2580-90.
278. Arora, K., et al., *The Drosophila schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family*. Cell, 1995. **81**(5): p. 781-90.
279. Grieder, N.C., et al., *Schnurri is required for Drosophila Dpp signaling and encodes a zinc finger protein similar to the mammalian transcription factor PRDII-BF1*. Cell, 1995. **81**(5): p. 791-800.
280. Marty, T., et al., *Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 745-9.
281. Dai, H., et al., *The zinc finger protein schnurri acts as a Smad partner in mediating the transcriptional response to decapentaplegic*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 373-87.
282. Udagawa, Y., et al., *Schnurri interacts with Mad in a Dpp-dependent manner*. Genes Cells, 2000. **5**(5): p. 359-69.
283. Harland, R.M., *The transforming growth factor beta family and induction of the vertebrate mesoderm: bone morphogenetic proteins are ventral inducers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10243-6.
284. Hogan, B.L., *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1580-94.
285. Takagi, T., J. Harada, and S. Ishii, *Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1048-53.
286. Dewulf, N., et al., *Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis*. Endocrinology, 1995. **136**(6): p. 2652-63.

287. Outram, S.V., et al., *Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte*. Immunity, 2000. **13**(2): p. 187-97.
288. Dick, A., W. Risau, and H. Drexler, *Expression of Smad1 and Smad2 during embryogenesis suggests a role in organ development*. Dev Dyn, 1998. **211**(4): p. 293-305.
289. Flanders, K.C., E.S. Kim, and A.B. Roberts, *Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas*. Dev Dyn, 2001. **220**(2): p. 141-54.
290. Scott, I.C., et al., *Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain*. Dev Dyn, 2000. **217**(4): p. 449-56.
291. Graf, D., A.G. Fisher, and M. Merckenschlager, *Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR)*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(11): p. 2239-40.
292. Graf, D., et al., *Evolutionary conservation, developmental expression, and genomic mapping of mammalian Twisted gastrulation*. Mamm Genome, 2001. **12**(7): p. 554-60.
293. Oelgeschlager, M., et al., *The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 757-63.
294. Yu, K., et al., *Processing of the Drosophila Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity*. Development, 2000. **127**(10): p. 2143-54.
295. Scott, I.C., et al., *Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling*. Nature, 2001. **410**(6827): p. 475-8.
296. Chang, C., et al., *Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist*. Nature, 2001. **410**(6827): p. 483-7.
297. Ross, J.J., et al., *Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist*. Nature, 2001. **410**(6827): p. 479-83.
298. Larrain, J., et al., *Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling*. Development, 2001. **128**(22): p. 4439-47.
299. Graf, D., et al., *The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 163-71.
300. Hager-Theodorides, A.L., et al., *Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5496-504.
301. Tsai, P.T., R.A. Lee, and H. Wu, *BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis*. Blood, 2003. **102**(12): p. 3947-53.
302. Nosaka, T., et al., *Mammalian twisted gastrulation is essential for skeletolymphogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2969-80.
303. Bleul, C.C. and T. Boehm, *BMP signaling is required for normal thymus development*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5213-21.
304. Ling, N., et al., *A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **138**(3): p. 1129-37.
305. Hsueh, A.J., et al., *Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5082-6.

306. Hutchinson, L.A., et al., *Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **146**(3): p. 1405-12.
307. Yu, J., et al., *Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation*. Nature, 1987. **330**(6150): p. 765-7.
308. Petraglia, F., et al., *Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **72**(2): p. 496-502.
309. Hedger, M.P., D.J. Phillips, and D.M. de Kretser, *Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 595-602.
310. Valderrama-Carvajal, H., et al., *Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 963-9.
311. Matzuk, M.M., et al., *Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 313-9.
312. Meunier, H., et al., *Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 247-51.
313. Muller, P.Y., et al., *Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR*. Biotechniques, 2002. **32**(6): p. 1372-4, 1376, 1378-9.
314. Guesdon, J.L., T. Ternynck, and S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(8): p. 1131-9.
315. Vaughan, J.M., et al., *Detection and purification of inhibin using antisera generated against synthetic peptide fragments*. Methods Enzymol, 1989. **168**: p. 588-617.
316. Hough, M.R., et al., *Defective development of thymocytes overexpressing the costimulatory molecule, heat-stable antigen*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 177-84.
317. Callahan, J.F., et al., *Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type I receptor (ALK5)*. J Med Chem, 2002. **45**(5): p. 999-1001.
318. Laping, N.J., et al., *Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 58-64.
319. Inman, G.J., et al., *SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 65-74.
320. Candia, A.F., et al., *Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads*. Development, 1997. **124**(22): p. 4467-80.
321. Licona, P., J. Chimal-Monroy, and G. Soldevila, *Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development*. Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1124-32.

Inhibins are the Major Activin Ligands Expressed During Early Thymocyte Development

Paula Licona,¹ Jesús Chimal-Monroy,² and Gloria Soldevila^{1*}

Activins are members of the transforming growth factor-beta (TGF β) superfamily, which regulate cell differentiation processes. Here we report the first quantitative analysis of the expression of Activin/Inhibin ligands, type I and II receptors, as well as Smad proteins in fetal (E14–E16) and adult thymic subpopulations. Our data showed that Alk4, ActRIIA, ActRIIB, and Smads 2, 3, and 4, are expressed in fetal thymus (E14 > E15 > E16) and in thymocytes from adult mice (mostly in the double negative [DN] subpopulation). Ligand expression analysis showed that β A, β B, and α subunits were mainly detected in thymic stromal cells. Interestingly, α subunits were expressed at much higher levels compared to β A and β B subunits, demonstrating for the first time the potential role of Inhibins as important mediators during early T cell development. Our data indicate that Activin/Inhibin signaling could regulate the process of thymus organogenesis and early thymocyte differentiation, as it has been demonstrated for other members of the TGF- β superfamily. *Developmental Dynamics* 235:1124–1132, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: activins; inhibins; Alk 4; ActRIIA; ActRIIB; thymocyte; thymocyte development; stroma; Smads

Accepted 4 January 2006

INTRODUCTION

T cell differentiation is a highly regulated process that takes place in the thymus. During fetal life, the first wave of lymphoid precursors arrive from the fetal liver to the thymic rudiment (Manley, 2000; Anderson and Jenkinson, 2001; Blackburn and Manley, 2004) around day 11 of gestation. Around 12.5 days of gestation, patterning and differentiation begin, a process that is highly dependent on interactions between epithelial cells and early thymocyte precursors. From day 14 until birth, thymocyte maturation takes place and thymic organogenesis is completed. After birth, bone

marrow lymphoid progenitors will continue to seed the thymus throughout life.

The stages of T cell development can be identified by examining the surface expression of coreceptors CD4 and CD8 on thymocytes. The earliest thymocyte subset, double negative (DN, CD4⁻CD8⁻), can be further subdivided into four populations based on the expression of CD44 and CD25 (DN1: CD44⁺CD25⁻; DN2: CD44⁺CD25⁺; DN3: CD44⁻CD25⁺; DN4: CD44⁻CD25⁻) (Ceredig and Rolink, 2002). At stage DN3, thymocytes express an immature receptor known as pre-TCR (pre-T Cell Receptor), which

induces a signal (β selection) that allows initiation of TCR α chain rearrangement and maturation to the second developmental stage, CD4⁺CD8⁺ or double positive (DP) stage (von Boehmer et al., 1999). DP thymocytes then express a mature $\alpha\beta$ T Cell Receptor (TCR), which allows thymocytes to recognize endogenous peptides expressed on MHC-bearing stromal cells and to undergo positive and negative selection. Positive selection allows maturation to the final developmental stage of mature CD4⁺ or CD8⁺ single positive thymocytes (SP), while negative selection eliminates the majority of potentially autoreactive T lympho-

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

²Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México
Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Grant numbers: 42797-Q and 42568-Q; Grant sponsor: Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA); Grant number: IN200205.

*Correspondence to: Dr. Gloria Soldevila, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, México DF-04510. E-mail: soldevi@servidor.unam.mx

DOI 10.1002/dvdy.20707

Published online 13 February 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

cytes (Starr et al., 2003). Once mature thymocytes express a single coreceptor, they migrate to secondary lymphoid organs where they can be activated and become CD4⁺ helper or CD8⁺ cytotoxic effector T cells.

Thymocyte differentiation depends on interactions between thymocytes and stromal cells as well as on the presence of cytokines and chemokines in the microenvironment of developing thymocytes. Transforming growth factor β (TGF- β) superfamily comprises a group of ubiquitous growth factors widely expressed and capable of inducing a variety of responses, depending not only on the cell type and its differentiation state, but also on the milieu of cytokines present (Cottrez and Groux, 2001; reviewed in Massague, 1998). This superfamily is divided into three different subfamilies: TGF- β s, BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) and Activins. TGF- β superfamily members transduce signals through a couple of transmembrane receptors with serine/threonine kinase activity, known as type I Activin like kinases (ALKs) (ten Dijke et al., 1994a,b) and type II receptors (Heldin et al., 1997). Briefly, the ligand (TGF- β or Activin) binds to a type II receptor, to further recruit a type I receptor. Type II receptor phosphorylates type I receptor, which, in turn, phosphorylates particular members of cytoplasmic proteins named Smads (R-Smads or receptor-regulated Smads) to induce cellular responses (Wrana et al., 1994). Once the R-Smads are phosphorylated, they interact with Smad-4 or Co-Smad ("common-mediator-Smad" or "collaborating-Smad") (Zhang et al., 1997; reviewed in Shi and Massague, 2003) and translocate to the nucleus, where they interact with other transcription factors and regulate gene expression (Abdollah et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1997; reviewed in Derynck et al., 1998). On the other hand, I-Smads ("Inhibitory-Smads") inhibit the signal induced by R-Smads/Co-Smads complexes, by interfering with R-smad binding to type I receptors or by competing for the Co-smad. Other mechanisms known to inhibit the signal include the presence of soluble proteins such as Noggin and Chordin for BMPs (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996), Betaglycan for TGF- β s

(Lopez-Casillas et al., 1994) and Follistatin (de Winter et al., 1996) and Inhibins (reviewed in Bernard et al., 2001) for Activins, among others (reviewed in Massague, 1998).

While TGF- β superfamily members are known to regulate proliferation, migration, differentiation, and many other responses in different tissues (reviewed in Massague, 1998), their possible role in lymphoid development has not yet been extensively characterized. Recently, knock-out mice for a transcription factor, Schnurri-2 (Shn-2) (Takagi et al., 2001), which in *Drosophila* mediates Dpp ("Decapentaplegic") signaling pathway and has BMP-4 as its murine homologue, showed absence of thymocyte-positive selection, indicating that BMPs and/or other TGF- β superfamily members, including Activins, may have a role during thymocyte differentiation and selection. In this context, the expression and function of BMPs has been recently described and it was found that these molecules regulate the DN1 to DN2 and DN4 to DP transitions during thymocyte development (Graf et al., 2002; Hager-Theodorides et al., 2002; Varas et al., 2003). On the other hand, TGF- β (reviewed in Letterio and Roberts, 1998) was shown to regulate the DN to DP transition (Plum et al., 1995), and the *in vitro* induction of CD8 expression on pre-T cells during thymocyte development in fetal thymic organ cultures (Suda and Zlotnik, 1992a,b).

Activins were first described by their role to regulate follicle-stimulating hormone (FSH) secretion from the anterior pituitary, and as important regulators of gonadal functions. However, Activins are also involved in many other processes during embryogenesis, such as left-right asymmetry (Levin et al., 1997) and digit development (Merino et al., 1999). During thymocyte differentiation, Activins were also shown to inhibit proliferation of rat thymocytes (Hedger et al., 1989, 2000) and more recently the expression of Activin type I (Alk-4) and type II receptors in thymic subpopulations (DN and SP) as well as Smad-2 phosphorylation (Rosendahl et al., 2003) has been demonstrated. However, the expression pattern of members of the Activin signaling pathway during fetal thymic development has not been studied. Therefore, in the

present study we analyzed the expression of Activins and Activin receptors at different developmental stages of mouse embryo. Our results surprisingly showed that Inhibins may be the major ligands of the Activin family expressed during thymus organogenesis and early thymocyte differentiation.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to determine the presence of members of the Activin family and their receptors during thymocyte differentiation, we performed real time RT-PCR analysis, in fetal and adult thymus using primers specific for the three ligand subunits (Activin β A, Activin β B, and Inhibin α), type I receptor Alk-4 and type II receptors ActRIIA and ActRIIB as well as Smads 2, 3, and 4. Whole fetal thymi were analyzed at different developmental stages corresponding to important checkpoints occurring during early T cell development. In order to compare thymocyte before and after pre-TCR signaling (β selection), we used E14 and E15 thymi, respectively: E14 fetal thymus is enriched in DN1 and DN2 stage subpopulations while E15 fetal thymus already contains DN1 to DN4 subpopulations. We also used E16 thymi since this developmental stage correlates with the generation of the first DP thymocytes (Baird et al., 2000). Finally, whole adult thymi was also analyzed, where DN, DP, and SP thymic subpopulations are represented, and positive and negative selection processes are also taking place. As shown in Figure 1, expression of β A, β B, and α subunits (Activins/Inhibins A and B), as well as type I and type II receptors, decreases during fetal development: Activin β A is much more abundant at day E14 and significantly decreases at days E15 and E16 of gestation, as well as in adult thymus (Fig. 1A). Activin β B and Inhibin α subunits also showed significantly higher expression levels at day E14 compared to day E15, E16, and adult thymus (Fig. 1B and C). It is worth mentioning that expression of α subunits had never been previously reported in murine thymus. Interestingly, expression of type II (ActRIIA and ActRIIB) receptors (Fig. 1E,F) showed the same expression pattern as the ligands described above

(E14>E15>E16), while type I receptor Alk-4 showed no significant differences between developmental stages (Fig. 1D). On the other hand, Smad expression seemed to be higher at day E15 than at days E14, E16, and adult thymus. However, statistical analysis did not show significant differences between stages (Fig. 1G–I). This indicates that the complete Activin signaling machinery may be active during all stages of thymocyte development analyzed.

We next analyzed expression of Activin ligands in adult thymic subpopulations. For these experiments, we performed FACS sorting of DN, DP, CD4 SP, and CD8 SP thymocytes to a purity > 95%. As a source of stromal cells, we used deoxiguanosine-treated E15 thymus as has been previously reported (Jenkinson et al., 1982; Hager-Theodorides et al., 2002). We observed that Activin β A subunit is mainly expressed in stromal cells and, among thymocyte subpopulations, was preferentially expressed in DN cells, although it was also expressed in DP and SP subpopulations at lower levels (Fig. 2A). Statistical analysis showed that DNs expressed significantly higher levels of Activin β A compared to CD4 SP and CD8 SP subsets. Interestingly, among SP thymocytes, CD8 SP appeared to express significant higher levels than CD4 SPs. (Fig. 2A). Our data demonstrate for the first time Activin β A expression in thymocytes, which previously had been reported to be exclusively expressed in stromal cells (Rosendahl et al., 2003). However, Rosendahl et al. did not use purified stromal cells or individual thymocyte subpopulations to assess the source of Activin β A expression and they used a less sensitive method of detection. In contrast, Activin β B showed a different expression pattern, which was restricted to stromal cells (Fig. 2B). Since stromal cells were prepared after deoxiguanosine treatment, while thymocyte subpopulations were obtained from freshly isolated adult thymi, there might be a concern that some of the differences observed might be partially dependent on the treatment. However, the absence of β B subunits in adult sorted subpopulations suggests that the expression of Activin β B observed in whole adult untreated thymus was of stromal origin (compare Fig. 1B with Fig. 2B). These results are in contrast to

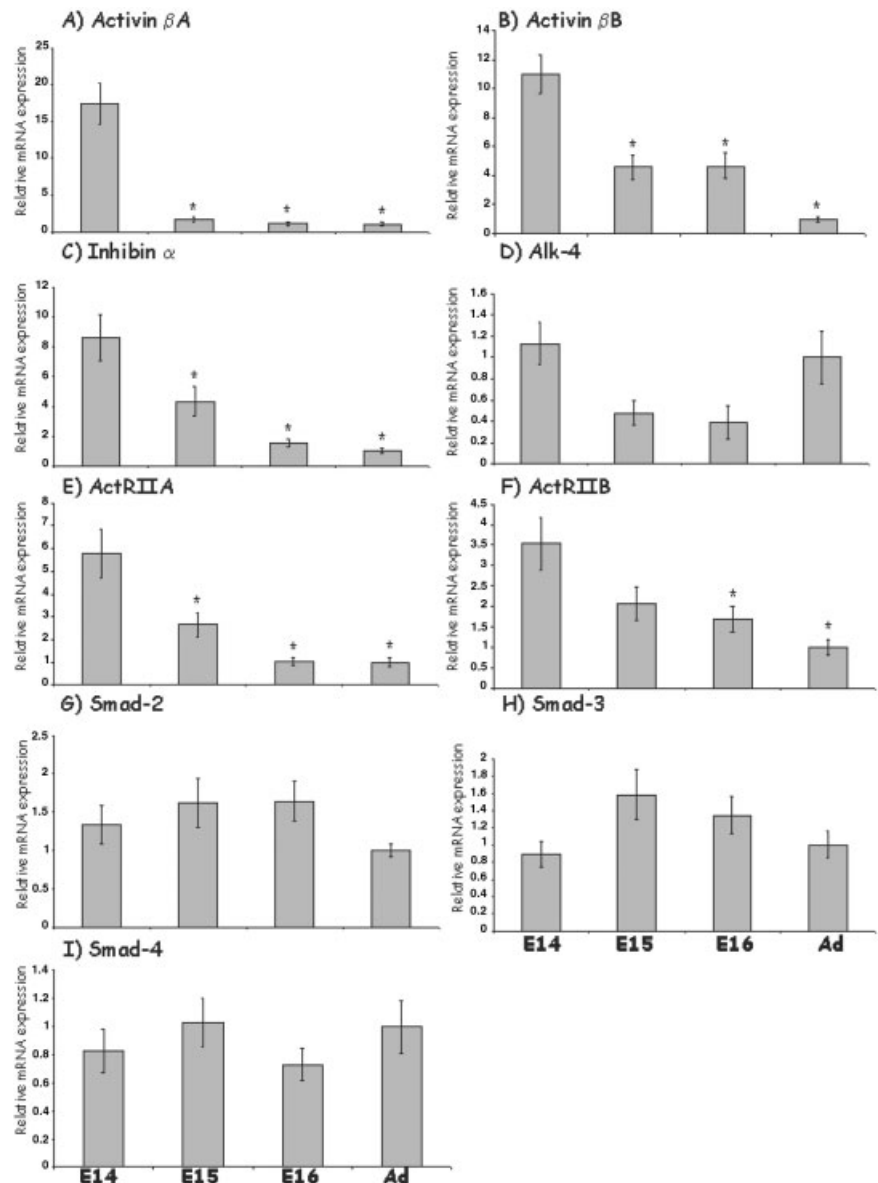


Fig. 1. Real time RT-PCR analysis in fetal and adult thymuses. Expression of Activin related genes: receptors Alk-4, ActRIIA, ActRIIB; ligands β A, β B, and α subunits; and signaling molecules Smad 2, 3, and 4 were analyzed from fetal thymus at days E14 to E16 of gestation and adult (Ad) thymus. Results show a representative experiment performed in triplicate of a total of five independent experiments. Data represent relative mRNA expression for each gene, compared to the expression in adult, which was used as a reference tissue (relative mRNA = 1). Each PCR reaction was normalized to the respective β Actin control. Error bars show standard errors from the triplicate samples. Asterisks indicate significant differences between the indicated values and E14 value ($P < 0.05$).

previously reported data by Rosendahl et al. (2003) who described expression of β B subunits in “sorted” thymocytes. However, these authors had used a different purification method. Finally, as shown in Figure 2C, Inhibin α subunits were mainly expressed in thymic stromal cells. However, early DN, DP, and CD4 SP subsets, but not CD8 SP thymocytes, expressed low levels of Inhibin α subunits.

On the other hand, analysis of Activin receptors showed that type I receptor Alk-4 was mostly expressed in DN thymocytes and stromal cells, although it was also expressed to a lesser extent in DP, CD4 SP, and CD8 SP thymocytes (Fig. 2D), implying that both stromal cells and thymocytes may potentially respond to the ligands. Statistical analysis showed that there were significant differences

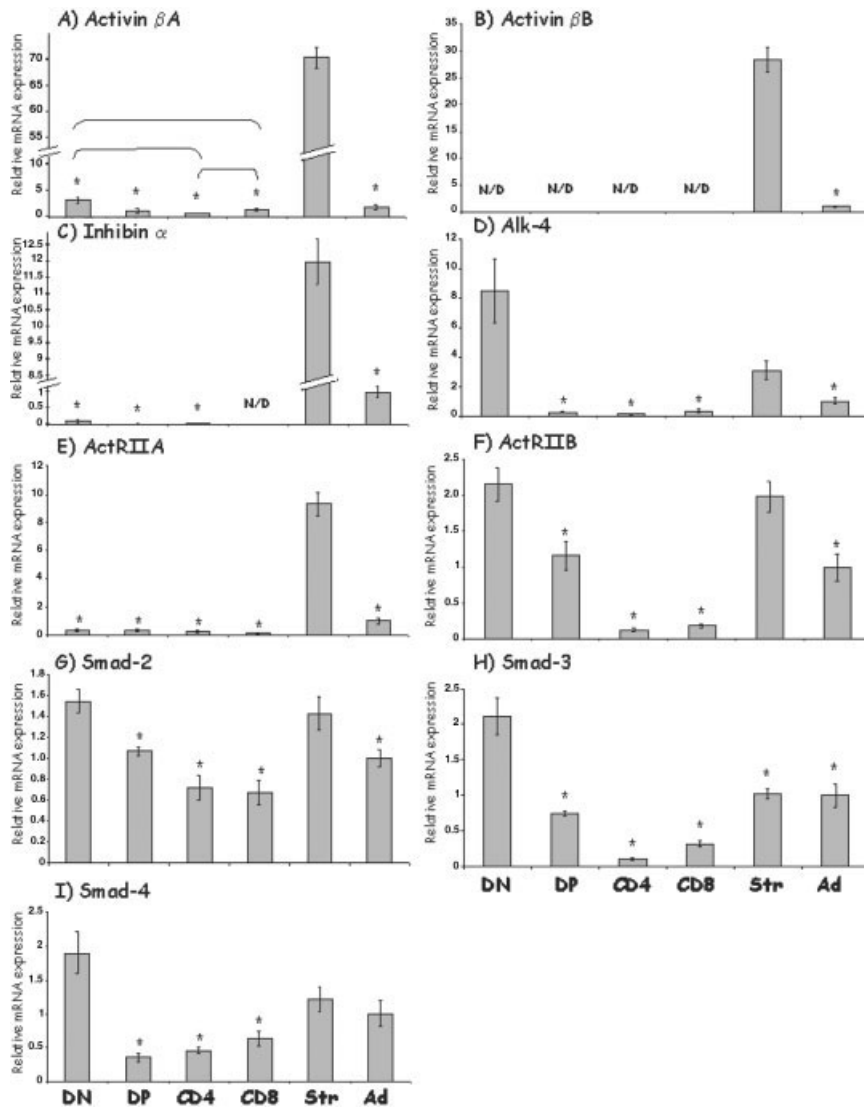


Fig. 2. Real time RT-PCR analysis from thymic subpopulations. Expression of Activin related genes: receptors Alk-4, ActRIIA, ActRIIB; ligands β A, β B, and α subunits; and signaling molecules Smad 2, 3, and 4 were analyzed from DN, DP, CD4 SP and CD8 SP, or from 2-deoxiguanosine-treated E15 fetal thymic lobes (E15 stroma, Str). Results show a representative experiment performed in triplicate of a total of five independent experiments. Data represent relative mRNA expression for each gene, compared to the expression in adult thymus, which was used as reference tissue (relative mRNA = 1). Each PCR reaction was normalized to the respective β Actin control. N/D: not detected. Error bars show standard errors from the triplicate samples. For Activin β A, β B, Inhibin α , and ActRIIA, asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between the indicated values and stromal cell values (A–C, E). For Alk4, ActRIIB, and Smads 2, 3, and 4, asterisks indicate significant differences between the indicated values and DN values (D, F–I). Other statistically significant differences between the indicated values are depicted by brackets.

in expression between DN and the rest of thymocyte subsets or adult thymus. Type II receptors ActRIIA and ActRIIB were expressed in stromal cells as well as in all thymocyte subpopulations. However, ActRIIA was significantly higher expressed in stromal cells compared to thymocyte subpopulations (Fig. 2E), while ActRIIB was not preferentially expressed in stromal cells, since DN cells expressed

comparable levels of this receptor. In addition, comparison between thymocyte subsets showed statistical differences between DN and DP, CD4 SP, or CD8 SP subpopulations (Fig. 2F). The correlation between Alk-4 and ActRIIB receptor expression is in agreement with the requirement of both type I and type II receptors to mediate Activin signals (reviewed in Masague, 1998).

Finally, Smad proteins were also expressed by both stromal cells and thymocytes and, as seen for Alk 4 and ActRIIB, the expression was significantly higher in DN cells compared to the rest of thymocyte subpopulations, while it was not significantly different compared to stromal cells, except for Smad 3 expression (Fig. 2G–I).

In conclusion, Activin β B expression seems to be restricted to stromal cells while Activin β A, Inhibin α , Alk-4, ActRIIA, ActRIIB, and Smad expression is shared by stromal and thymocyte subpopulations (mainly DN cells). The fact that both Alk 4, ActRIIB, and Activin-mediated signaling molecules (Smad 2, 3, 4) are preferentially expressed in DN thymocytes (Fig. 2D–I) suggests that this particular early precursor represents the main target for Activin ligands among thymocyte subsets. It is important to note that based on quantitative PCR analysis, stromal cells were always the major population expressing α and β subunits (Fig. 2A–C) so they appear to be the subpopulation responsible for the ligand production. In fact, β B subunit was exclusively detected in stromal cells, while α subunit was also present at low levels in some thymocyte subpopulations, but absent in CD8 SP cells (Fig. 2C). In this context, due to the preferential expression of ligand subunits by stromal cells, we cannot exclude the possibility that the decrease in Activin ligand signal observed in fetal thymi (Fig. 1A–C) might be due to a dilution effect of stromal cells, compared to the increasing numbers of thymocytes, which are strongly proliferating during the fetal developmental stages analyzed.

Since the data obtained from Real time RT-PCR only represents differences in expression of a particular gene between thymocyte differentiation stages or adult cell subsets, but does not allow us to compare expression of different genes in a particular thymic subpopulation, we decided to evaluate the differences in gene expression within the same tissue (mRNA abundance) (see Experimental Procedures section). As shown in Figure 3A, the analysis of mRNA abundance at different developmental stages showed that Inhibins A or B (formed by α/β A or α/β B subunits) rather than Activins (formed by β sub-

units), seem to be the major ligands expressed in fetal and adult thymus, since expression of the α subunit was 2–4 times higher than the β A subunit in early E14 and adult thymus, while this difference increased up to 15–20 times in E15 and E16 thymus. On the other hand, expression of the α subunit was 15–20 times higher than the β B subunit, in all developmental stages (Fig. 3A). This finding may have important implications on the role of Activins in T cell development, since Inhibins have been shown to bind to ActRII receptors, inhibit binding of Alk4 to ActRIIs, and therefore may antagonize Activin-mediated functions (Vale et al., 2004). Furthermore, the expression levels of Alk 4 and ActRIIB observed in all developmental stages suggest that they are the most likely receptor pair to mediate Activin signaling during thymocyte development (Fig. 3B). These results are in contrast to data recently reported by Rosendahl et al. (2003) who were unable to detect significant amounts of ActRIIB in thymocytes. This difference might be explained by the fact that they used a qualitative RT-PCR analysis, instead of Real Time PCR. Finally, analysis of Smad expression showed that Smad 2 was consistently higher than Smad 3 and 4 in all differentiation stages (Fig. 3C). These results are consistent with the recent report by Rosendahl et al. (2003) showing Smad 2 phosphorylation in thymocytes stimulated with Activin, and may have important implications in Activin-mediated signaling, since Smad 2 and Smad 3 may compete for binding to the co-smad (Smad-4). However, we cannot rule out a role for Smad 3 in Activin signaling, since phosphorylation of Smad 3 has not been yet investigated in the thymus.

Similarly, we performed the same analysis in thymic subpopulations from adult mice and E15 stromal cells (Fig. 4A–C). Our results showed that Inhibin α is the most abundant subunit produced by E15 stromal cells, while similar levels of α and β A subunits were expressed in thymocytes (Fig. 4A), although as shown in Figure 2A and C, expression was much lower than that observed in stromal cells. Among Activin type II receptors, ActRIIB was always expressed at higher

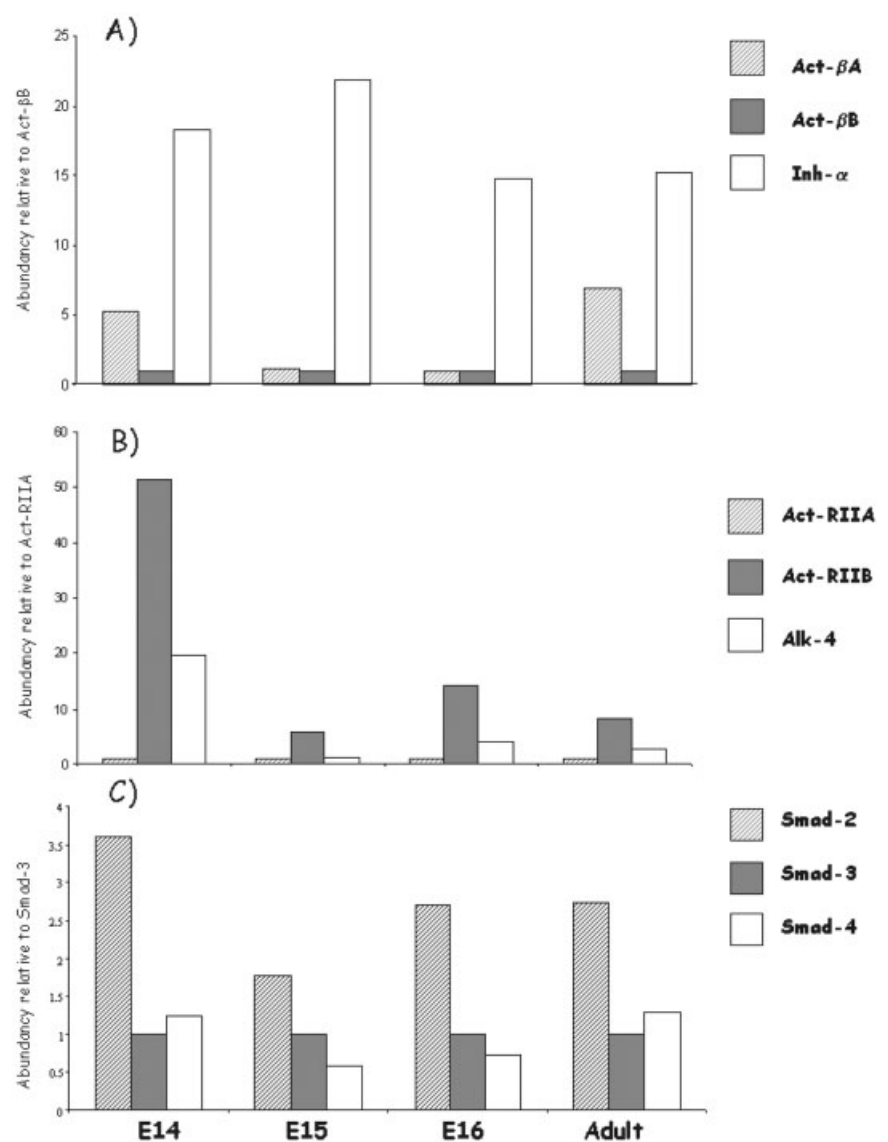


Fig. 3. Relative abundance of Activin-related genes during fetal thymic development. mRNA expression of Activin ligands (A), type I and type II receptors (B), and signaling proteins (C) at different fetal developmental stages. Data represent relative expression with respect to the indicated mRNA in the same sample based on initial specific amplicon numbers in equivalent amounts of cDNA, adjusted to the endogenous control (β -Actin). Results show a representative experiment out of five independent experiments. Values were obtained relative to Activin β B (A), ActRIIA (B), Smad 3 (C).

levels than ActRIIA in all thymic subpopulations tested (Fig. 4B), further supporting the idea that Alk4/ActRIIB may be mediating most of Activin signaling in the thymus, acting as an autocrine pathway in stromal cells. Furthermore, receptors Alk 4/ActRIIB are present in thymocytes (mostly DN), but levels of ligand are low in these cells, suggesting that stromal cells may regulate thymocyte differentiation in a paracrine pathway. Whether Inhibin and or Activin are promoting or inhibiting transition

of DN thymocyte differentiation towards DP thymocytes is currently unknown and will be addressed in future studies. In addition, although the receptors Alk 4 and ActRIIB are expressed in DP and SP thymocytes at lower levels (Fig. 2D and F), we cannot rule out a functional role of Activin or Inhibin in these cells. On the other hand, we do not exclude the possibility that other members of the TGF- β superfamily expressed in the thymus, such as BMPs, which have been shown to share type II receptors

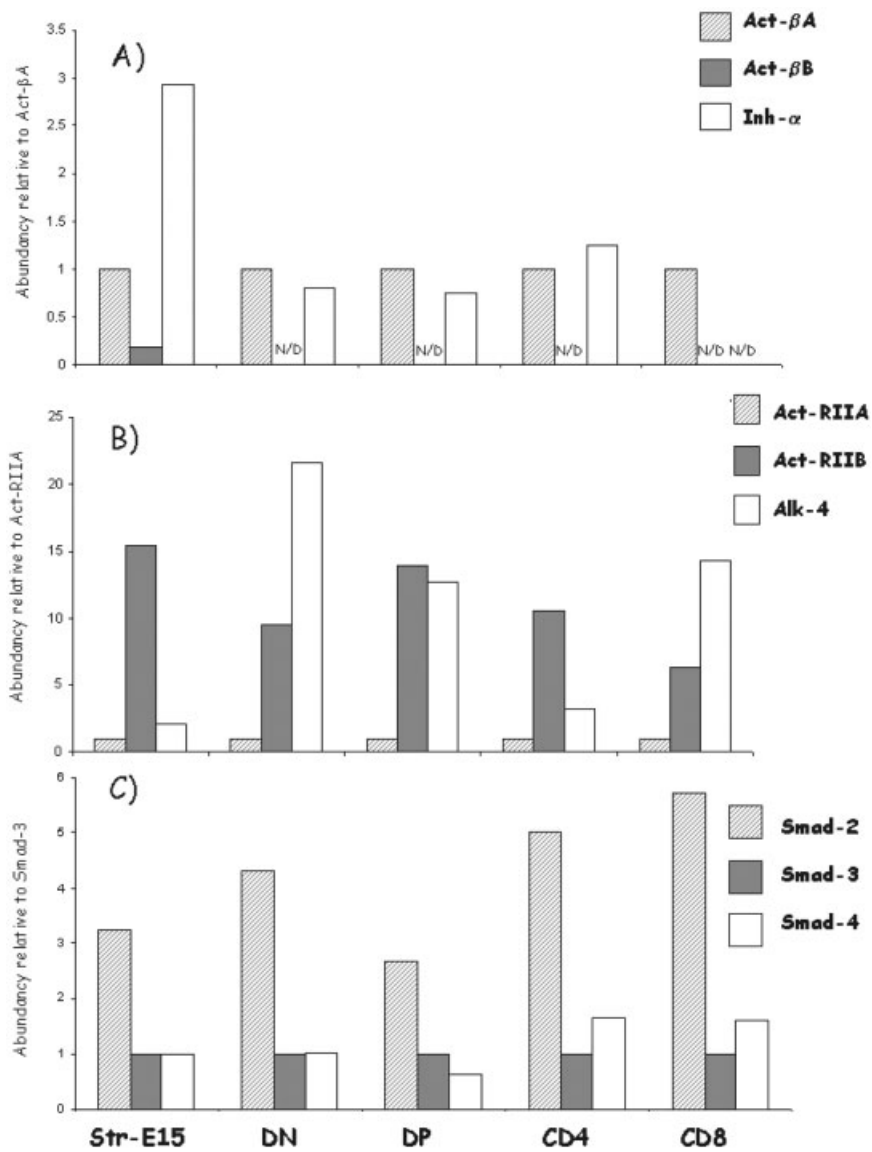


Fig. 4. Relative abundance of Activin-related genes in purified thymic subpopulations. mRNA expression of Activin ligands (A), receptors (B), and signaling proteins (C) in purified thymocyte subpopulations from adult mice or E15 stromal cells (Str-E15). Data represent relative expression with respect to the indicated mRNA in the same sample based on initial specific amplicon numbers in equivalent amounts of cDNA, adjusted to the endogenous control (β -Actin). Results show a representative experiment out of five independent experiments. Values were obtained relative to Activin β A (A), ActRIIA (B), Smad 3 (C). N/D, not detected.

with Activins (Yamashita et al., 1995), could also signal through these receptors. Finally, as previously shown for fetal thymus, Smad2 expression was higher than Smad3 and Smad4 in all the thymic subpopulations tested (Fig. 4C), further supporting the role of this protein, during T cell development (Rosendahl et al., 2003).

Finally, to confirm the RT-PCR results at the protein level, we performed immunohistochemistry assays with antibodies directed against type I

receptor Alk-4, Activin β A, and α subunits, in fetal and adult tissue sections. As shown in Figure 5A, Activin β A expression appeared to be higher at E14 and decreased at later developmental stages (E15, E16, and adult thymus). Expression of Inhibin α subunit was also confirmed in fetal and adult thymic sections, showing a strong staining in all developmental stages (Fig. 5B). Furthermore, as expected, we observed a pronounced staining for Alk-4 in E14 thymus and

also at days E15, E16, and adult thymus, although the intensity of staining seemed to be lower (Fig. 5C). As we showed in the RT-PCR results, Activin ligands were preferentially expressed by stromal cells. To further confirm this result, we performed staining on serial sections including other markers known to be expressed exclusively in stromal cells. For fetal E14 thymus analysis, we used an anti-cytokeratin antibody, specific for K5/K8 keratins, which are highly expressed in thymic epithelial cells (Fig. 6A), and for adult thymus we used anti MHC-Class II, highly expressed by medullary dendritic cells (Fig. 6C). We compared the stromal staining with the staining obtained with anti-Inhibin α antibody, demonstrating a similar expression pattern (Fig. 6B, fetal E14 thymus; 6D adult thymus).

Altogether, our results demonstrate for the first time the expression of the α subunit of the Activin family in the thymus, indicating that Inhibins may play an important role during thymocyte differentiation. Moreover, we could speculate that Activins/Inhibins might have a role in thymus organogenesis since we found expression of those ligands in stromal cells as early as day 14 of gestation, when interactions between incoming early lymphoid progenitors and stromal cells are crucial for further differentiation of stromal subtypes and thymocytes, leading to the anatomical compartmentalization of the thymus (Manley, 2000). Furthermore, due to the antagonizing role of Inhibins on Activin-mediated functions, the balance Activin/Inhibin expression may regulate many of the cellular responses that take place during thymocyte development (such as proliferation and apoptosis) and, by this means, may regulate important "checkpoints" during T cell maturation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

Four- to six-week-old adult thymus and E14–16 fetuses thymus from B6/D2 F1 hybrid mice obtained by crossing C57/BL6 females with DBA-2 males (obtained from Jackson Labora-

ories, Bar Harbor, ME) were used in our analysis.

RNA Sources and Primers

RNA was obtained from total adult and fetal E14–16 thymi, sorted adult thymocytes, E15 thymic stromal cells, and testicle as a positive control (not shown) (Meunier et al., 1988). For thymic subpopulations, thymi from 4–6-week-old B6/D2 mice were stained with CD4-phycoerythrin and CD8-CyChrome (PharMingen, San Diego, CA) and CD4, CD8, DP, and DN subpopulations were sorted using the flow-cytometer FACS Aria (Becton & Dickinson) to a purity of >95%. For stromal cell purification, E15 fetal thymi were treated for 5 days with deoxiguanosine (1.35 mM [Sigma Chemicals D-0901, St. Louis, MO]) in 5% CO₂ at 37°C.

RNA was isolated using RNA-60 reagent (Tel-Test Inc, Friendslaw, TX) according to the manufacturer's protocol. DNA was removed using the "DNA-free" reagent from Ambion Inc. (Austin, TX). cDNA was synthesized from total DNA-free RNA, using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and oligo dT (Roche, Mannheim, Germany).

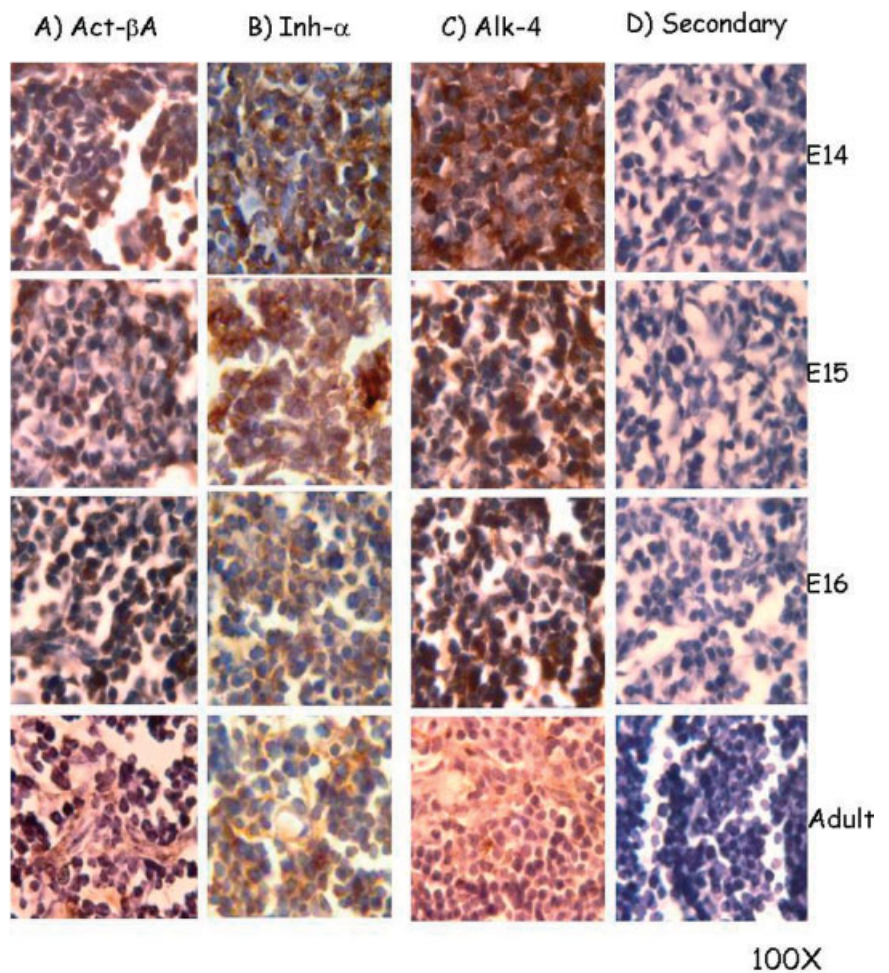
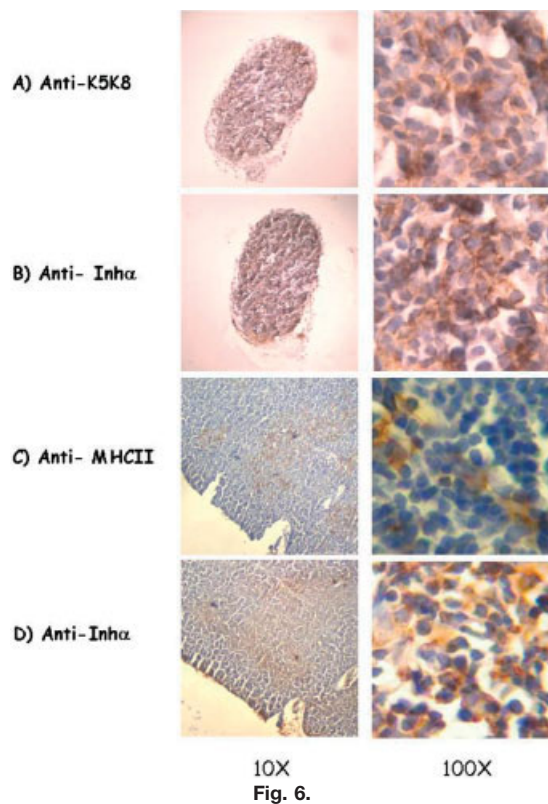


Fig. 5.

The PCR primers used were: β -Actin forward: 5'-TGGAATCCTGTGGCA-TCCATGAAAC-3' reverse: 5'-TAAA-ACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3';



10X
Fig. 6.

100X

Fig. 5. Expression of Alk-4, Activin- β A, and Inhibin α in the thymus. Thymic sections (5 μ m thick) from fetal E14–E16 or adult mice were stained with primary antibodies against Activin β A (A), Inhibin α (B), Alk-4 (C), or secondary reagent as a negative control (D). Positively stained cells are visualized in brown (by diaminobenzidine) and sections counterstained in blue (Harris hematoxylin). Images are shown at 100 \times magnification. One representative thymus out of four is shown.

Fig. 6. Preferential Inhibin α expression by stromal cells in the thymus. Serial sections (5 μ m thick) from E14 thymus (A,B) or adult thymus (C,D) were stained with primary antibodies against Inhibin α (B,D), cytokeratin K5/K8 (A), or MHC-II (C). Positively stained cells are visualized in brown (by diaminobenzidine) and sections counterstained in blue (Harris hematoxylin). Images are shown at 10 \times and 100 \times magnification. One representative thymus out of four is shown.

Smad-2 forward: 5'-ATGTCGTCC-ATCTTGCCATT-3' reverse: 5'-GTC-CCCAAATTTTCAGAGCAA-3'; Smad-3 forward: 5'-CACAGCCACCATGAAT-TACG-3' reverse: 5'-GAATATTGC-TCTGGGGCTCA-3'; Smad-4 forward: 5'-GAC-AAGGTGGGAAAGTGAA-3' reverse: 5'-CTCCACAGACGGGCA-TAGAT-3'; Activin β A forward: 5'-TGC-TTTGGCTGAGAGGATTT-3' reverse: 5'-CGGGTCTCTTCTTCAAGTGC-3'; Activin β B forward: 5'-TCCGCCTGT-ACTTCTTCGTC-3' reverse: 5'-AGC-TGTACACTGCACATCC-3'; Inhibin α forward: 5'-CCATCGAGCTGCTCT-CAATA-3' reverse: 5'-ACCTCCATCT-GAGGTGGTTC-3'; ActRIIA forward: 5'-CGTTTCGCCGTCTTCTTATC-3' reverse: 5'-GCCCTCACAGCAACAA-AAGT-3'; ActRIIB forward: 5'-GAT-ACCCATGGACAGGTTGG-3' reverse: 5'-TAATCGTGGGCTCATCTTC-3'; Alk-4 forward: 5'-TTCTTCCCCCTT-GTTGCTCT-3' reverse: 5'-A-GGCAG-TAGAAGGGCTTTC-3'.

Real-Time PCR

Real-time PCR was performed by amplifying 1 μ l of cDNA (1/40 of total cDNA yield obtained from 1–3 μ g of mRNA) with SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Amplification conditions for Activin β B, Inhibin α , ActRIIA, ActRIIB, Smad-2, Smad-3, and Smad-4, were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min. Amplification conditions for Activin β A and Alk-4 were 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 94°C for 15 s, 58°C for 45 s, and 60°C for 1 min. Following amplification, a melting point program was run to create melting profiles for each reaction described. The number of PCR cycles required for SYBR Green fluorescence to cross a threshold where there was a significant increase in change of fluorescence (CT = threshold cycle) was obtained using ABI PRISM 7000 Sequence Detection System Software. Total cDNA input was normalized to mouse β -Actin expression measured in parallel PCR reactions. For statistical analysis of RT-PCR data, the program Qgene was used (Muller et al., 2002). The mean of the normalized expression was calcu-

lated by averaging the CT values (from triplicate samples of the target gene and of the reference) and subsequent calculation of the mean normalized expression and its standard error (equations 3 and 4, respectively, according to Muller et al., 2002). The calculation of the normalized expression is supported by the amplification efficiency values calculated from the amplification efficiency plots constructed for each gene. These results were used to calculate the relative amount of each gene mRNA present in fetal thymi and between sorted thymic subpopulations or E15 stromal cells, compared to adult thymi. Unpaired two-tailed Student's *t*-test was performed. $P < 0.05$ was considered significant.

To analyze the relative abundance of different mRNAs within a particular tissue, we used standard curves obtained with known amounts of the specific amplified products, obtained from the same cDNA to interpolate our experimental data normalized to the endogenous invariable β actin control.

The PCR products were analyzed on a 2% (w/v) agarose gel to confirm purity and size product. Primers used in the PCR amplification were the same as described above.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded thymus (previously fixed and dehydrated) from fetal and adult mice were sliced (5 μ m thick) and rehydrated by serial washes with decreasing concentration of ethanol (from 100 to 50%). After quenching endogenous peroxidase activity by 10 min incubation with 3% H₂O₂, epitope exposure with citrate buffer in high-pressure conditions for 1 min and blocking with super block reagent for 6 min (Sensitec HRP, Scy Tek Laboratories, Logan, UT), sections were incubated with primary antibodies in blocking solution overnight at 4°C. Anti-Alk-4 (ACTR-IB, clone yT-17), anti-Activin- β A (Inhibin β A, clone C-18), and anti-Cytokeratin 5/8 (RCK102) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Anti Alk-4 and anti-Activin β A antibodies were biotinylated using a protocol adapted from (Guesdon et al., 1979); Anti-Inhibin α rabbit poly-

clonal antibody (Vaughan et al., 1989) was kindly provided by Dr. Wylie Vale, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA. Anti-MHC Class II (biotin anti-mouse I-A/I-E clone 2G9), was purchased from Pharmingen, San Diego, CA. Sections were washed 4 times with PBS \times 1 and streptavidin-HRP secondary reagent (Sensitec HRP, Scy Tek Laboratories) sheep anti-mouse-HRP or goat anti-rabbit HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) were added for 20 min at 37°C. As negative controls, normal rabbit sera or secondary reagents were used after the initial blocking step. Slides were developed for 5–20 min in diaminobenzidine-substrate (Sensitec-HRP) and counter-stained with Harris hematoxylin. Images were analyzed under a Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a Nikon Coolpix 4300 camera (Nikon Inc, Tokio, Japan).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Garciadiego, Pedro Medina, and Ramsés Chávez for technical assistance. We also thank Dr. Wylie Vale for kindly providing us with the anti-Inhibin α polyclonal antibody. We additionally extend our thanks to Dr. Leopoldo Santos-Argumedo and Dr. Eduardo García-Zepeda for a critical reading of the manuscript and Dr. Rafael Camacho and Ileana Licon for assistance in the analysis of the quantitative RT-PCR data. We gratefully acknowledge QFB Carlos Castellanos Barba from the flow-cytometry unit at the Instituto de Investigaciones Biomédicas for technical assistance during the cell sorting experiments. Finally, we extend our appreciation to Dr. Gerardo Arrellín from the mouse facility at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, for technical support and veterinary advice. This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; 42797-Q to G.S. and 42568-Q to J.C.M.) and Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA; IN200205 to J.C.M.). P.L. is the recipient of a fellowship from CONACyT supplemented by DGEP from UNAM.

REFERENCES

- Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. 1997. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272:27678–27685.
- Anderson G, Jenkinson EJ. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1:31–40.
- Baird AM, Lucas JA, Berg LJ. 2000. A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3. *J Immunol* 165:3680–3688.
- Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK. 2001. Mechanisms of inhibin signal transduction. *Recent Prog Horm Res* 56:417–450.
- Blackburn CC, Manley NR. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4:278–289.
- Ceredig R, Rolink T. 2002. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2:888–897.
- Cottrez F, Groux H. 2001. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol* 167:773–778.
- de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ. 1996. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 116:105–114.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95:737–740.
- Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merckenschlager M. 2002. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 196:163–171.
- Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27:1131–1139.
- Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, Varas A, Crompton T. 2002. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 169:5496–5504.
- Hedger MP, Drummond AE, Robertson DM, Risbridger GP, de Kretser DM. 1989. Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 61:133–138.
- Hedger MP, Phillips DJ, de Kretser DM. 2000. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 12:595–602.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465–471.
- Jenkinson EJ, Franchi LL, Kingston R, Owen JJ. 1982. Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur J Immunol* 12:583–587.
- Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16:137–161.
- Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR, Tabin CJ. 1997. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol* 189:57–67.
- Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557–568.
- Manley NR. 2000. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol* 12:421–428.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753–791.
- Merino R, Macias D, Ganan Y, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Rodriguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Hurler JM. 1999. Control of digit formation by activin signalling. *Development* 126:2161–2170.
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W. 1988. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:247–251.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32:1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. 1996. Dorsoroventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86:589–598.
- Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B. 1995. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* 154:5789–5798.
- Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. 2003. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol* 15:1401–1414.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700.
- Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH. 1997. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 272:28107–28115.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139–176.
- Suda T, Zlotnik A. 1992a. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha induce CD8 expression on CD8- thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8- pre-T cell subset. *J Immunol* 148:1737–1745.
- Suda T, Zlotnik A. 1992b. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3-CD4-CD8 alpha + cells generated in vitro by culturing CD25+CD3-CD4-CD8- thymocytes with T cell growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149:71–76.
- Takagi T, Harada J, Ishii S. 2001. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* 2:1048–1053.
- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH. 1994a. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264:101–104.
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. 1994b. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985–16988.
- Vale W, Wiater E, Gray P, Harrison C, Bilezikjian L, Choe S. 2004. Activins and inhibins and their signaling. *Ann NY Acad Sci* 1038:142–147.
- Varas A, Hager-Theodorides AL, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG, Crompton T. 2003. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* 24:197–206.
- Vaughan JM, Rivier J, Corrigan AZ, McClintock R, Campen CA, Jolley D, Voglmayr JK, Bardin CW, Rivier C, Vale W. 1989. Detection and purification of inhibin using antisera generated against synthetic peptide fragments. *Methods Enzymol* 168:588–617.
- von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O. 1999. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 11:135–142.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341–347.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K. 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130:217–226.
- Zhang Y, Musci T, Derynck R. 1997. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol* 7:270–276.
- Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86:599–606.

Review

The role of TGF- β superfamily during T cell development: new insights

P. Licona-Limón, G. Soldevila*

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, México DF-04510, Mexico

Received 8 November 2006; received in revised form 21 December 2006; accepted 23 December 2006
Available online 23 January 2007

Abstract

Members of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily are soluble factors that regulate a variety of functional responses including proliferation, differentiation, apoptosis and cell cycle, among others, depending not only on the cell type and its differentiation state, but also on the milieu of cytokines present. All three members of this superfamily: TGF- β s, bone morphogenetic proteins (BMPs) and Activins, have been shown to be expressed in the thymus suggesting their potential role as regulators of the T lymphocyte differentiation process. Although initial reports described the role of TGF- β in controlling specific checkpoints during thymocyte development, recent data has provided new evidence on the role of BMPs and Activins in this process. This review provides new insights on the function of members of the TGF- β superfamily at different stages of thymocyte development.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: TGF beta superfamily; BMP; Activin; Inhibin; Signaling; Thymocyte; Development

1. Introduction

T cell development is a highly regulated process. It has been demonstrated that both cellular interactions as well as soluble factors play a key role during thymocyte differentiation. Although several reports addressing the role of soluble factors in T cell function and homeostasis have shown the potential role of the superfamily of transformed growth factor β in the regulation of immune responses, little is known regarding the influence of these mediators during T cell development. TGF- β superfamily comprises multiple factors with a widespread expression, which are able to regulate a variety of cellular responses depending on the cell type and its maturation stage. In this review we will focus on the potential role of TGF- β superfamily members as critical regulators in T cell differentiation and maturation.

2. T cell development

The thymus is a primary lymphoid organ in which thymocyte development and repertoire selection of mature T lymphocytes

occurs [1]. Thymocyte differentiation is a highly regulated process dependent not only on interactions between early T cell precursors with stromal cells but also on the presence of soluble molecules such as chemokines, cytokines and growth factors. The thymus is a bilobed organ composed by stromal and thymocyte subpopulations that interact with each other, defining discrete anatomical microenvironments within the thymus, known as subcapsular, cortical and medullary regions [2]. At early embryonic stages (E10–11) fetal liver lymphoid progenitors seed the thymic epithelial rudiment derived from the third pharyngeal pouch [3–6]. After birth, the thymus is continually seeded by bone marrow-derived lymphoid progenitors reaching the thymus through the blood stream and entering at the cortico-medullary junction [7]. In the thymus three different subpopulations of thymocytes are found based on coreceptor expression: double negative (DN, CD4⁻ CD8⁻), double positive (DP, CD4⁺ CD8⁺) and single positive (SP, CD4⁺ or CD8⁺). Immature DN cells, have been further subdivided into four populations based on the expression of CD44 [8] and CD25 [9]; DN1: CD44⁺ CD25⁻; DN2: CD44⁺ CD25⁺; DN3: CD44⁻ CD25⁺ and DN4: CD44⁻ CD25⁻ (reviewed in [10]). At DN3, the first developmental checkpoint (also known as β selection) occurs at the cortical region of the thymus. At this stage, functionally rearranged TCR (T Cell Receptor) β gene pairs with a surro-

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223884; fax: +52 55 56223369.
E-mail address: soldevi@servidor.unam.mx (G. Soldevila).

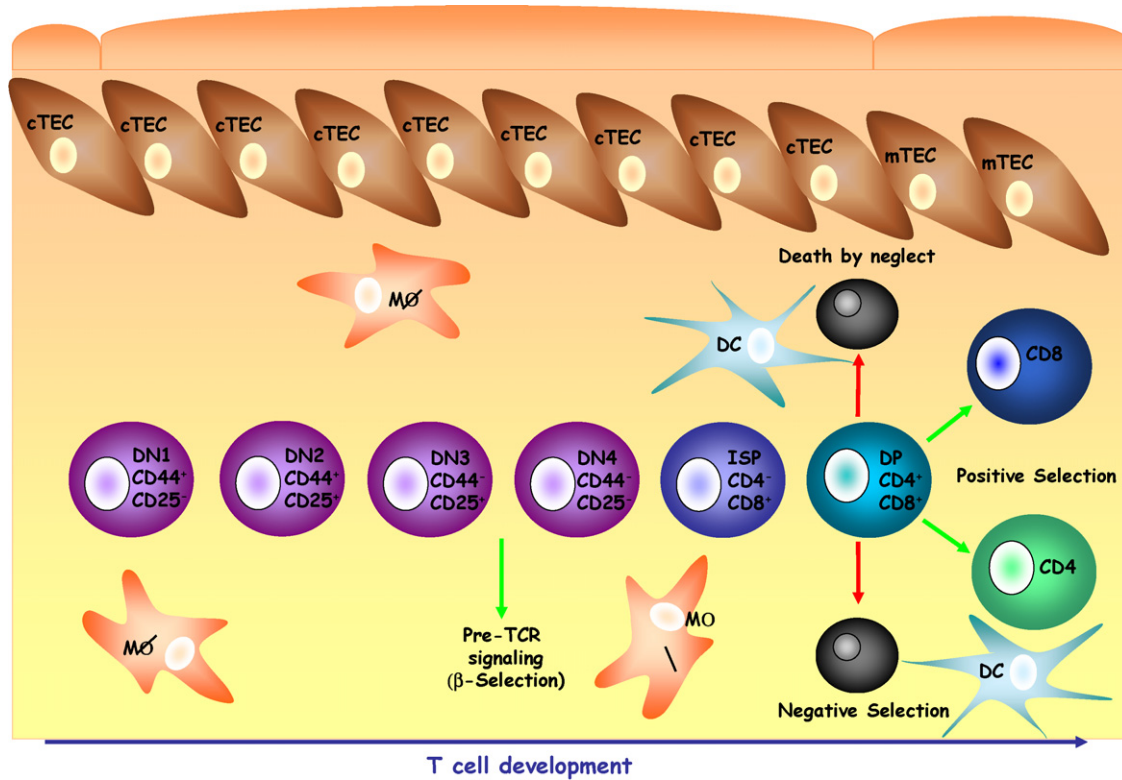


Fig. 1. Thymocyte development. In the thymus three major thymocyte subpopulations can be found based on the expression of CD4 and CD8 coreceptors: double negative (DN, CD4⁻ CD8⁻), double positive (DP, CD4⁺ CD8⁺) and single positive (SP, CD4⁺ or CD8⁺). At DN3 stage pre-TCR signaling promotes α chain rearrangement, cell proliferation and allows thymocytes to initiate coreceptor expression. At the DP stage, a high percentage of thymocytes which are unable to recognize self ligands on the context of self MHC die by neglect, while antigen recognition through the $\alpha\beta$ TCR leads to positive selection of those thymocytes able to recognize peptide/MHC complexes with low/intermediate affinity on cortical epithelial cells. At the same time, lineage commitment of positively selected thymocytes occurs, and they become mature CD4⁺ or CD8⁺ single positive thymocytes, ready to exit the thymus and migrate to periphery where they will get activated to become effector CD4⁺ “helper” or CD8⁺ “cytotoxic” T lymphocytes. When thymocytes reach the cortical-medullary junction, negative selection will induce deletion of those thymocytes whose TCRs have high avidity for peptide/MHC complexes expressed on the surface of dendritic cells or medullary epithelial cells, leading to apoptosis. cTEC: cortical thymic epithelial cell; mTEC: medullary thymic epithelial cell; M ϕ : macrophage; DC: dendritic cell.

gate α chain or pre-T α , forming an immature receptor known as pre-TCR, which will be expressed on the surface of DN3 thymocytes [11]. Signaling through the pre-TCR prevents further TCR β rearrangements (allelic exclusion), induces proliferation, and eventually leads to coreceptor expression and TCR α chain rearrangement (reviewed in [12]). The $\alpha\beta$ TCR expression at the DP stage allows the thymocytes to be positively or negatively selected in response to endogenous peptides expressed on MHC-bearing stromal cells. Based on aspects inherent to the TCR recognition such as avidity for the ligand (endogenous peptide/MHC complexes), most of thymocytes express TCRs with no measurable reactivity and die by neglect [13,14] while thymocytes with TCRs with low to moderate avidity are positively selected and allowed to mature into CD4⁺ or CD8⁺ SP cells (lineage commitment). Positive selection occurs in the cortical region of the thymus and is dependent on antigens expressed by cortical epithelial cells [15] (reviewed in [16]). On the other hand, negative selection takes place in the cortico-medullary junction and is mediated by medullary epithelial cells and bone marrow derived dendritic cells, expressing the ligand together with costimulatory molecules, which ensures the deletion of selected thymocytes with strong affinities for their selecting peptide-MHC and constitutes the basic mechanism of central

tolerance induction [17,18] (reviewed in [19]). Those thymocytes surviving selection, mature in the medulla to finally exit the thymus and migrate to secondary lymphoid organs, where they become activated, and thus enabled to exert their functional phenotype: “helper” for CD4⁺ or “cytotoxic” for CD8⁺ [20] (Fig. 1).

As has been extensively reported, thymocyte development is a tightly regulated process in which different stromal cells including epithelial cells, macrophages and dendritic cells, support interactions and signals required for the proper development of T cell precursors [21]. An example of this tight interaction is the developmentally regulated migration necessary for the developing thymocyte, in which differential expression of soluble factors by stromal cells such as chemokines provides a signal for thymic precursors undergoing differentiation in order to migrate and relocate within specific compartments in the thymus (reviewed in [22,23]). Nevertheless, there is also evidence suggesting that thymocytes themselves contribute to the growth and maintenance of the stromal compartment (reviewed in [24]). Recently, numerous studies have shown that different molecules such as cytokines and chemokines are important mediators in the differentiation program of thymocytes and, although several studies have revealed a relevant role of growth

Table 1
The transforming growth factor superfamily

Ligand	Type I receptor	Type II receptor	R-Smad, Co-Smad
TGF- β 1	T β R-I (ALK-5) TSR-I (ALK-1)	T β R-II	Smad2, Smad3, Smad4 Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
TGF- β 2 TGF- β 3			
TGF- β 4 (c) Activin β A	DAF-1 ActR-IB (ALK-4)	DAF-4 ActR-II ActR-IIB	Sma2, Sma3, Sma4 Smad2, Smad3, Smad4
Activin β B Activin β C Activin β E			
Inhibin α	?	ActR-II ActR-IIB	?
Dpp (D)	Tkv Sax	Punt	Mad, Medea
BMP-2	BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	BMPR-II	Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
BMP-4		ActR-II ActR-IIB	
BMP-7	ActR-I (ALK-2)		
GDF-1	ActR-IB (ALK-4) ALK-7	ActR-IIB	Smad2, Smad3, Smad4
GDF-5 (BMP-14)	BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	ActR-II ActR-IIB	
MIS/AMH	ActR-I (ALK-2) BMPR-IA (ALK-3) BMPR-IB (ALK-6)	AMHR-II	Smad1, Smad5, Smad8, Smad4
Nodal	ActR-IB (ALK-4)	ActR-IIB	Smad2, Smad3, Smad4

All member listed here have been identified in human and/or mouse. In parantheses homologues from *C. elegans* (c) and *Drosophila* (D). Daf: abnormal Dauer formation; Sma: small body size; Dpp: decapentaplegic; Tkv: thickveins; Sax: saxophone; Mad: mothers against Dpp; GDF: growth differentiation factor; MIS/AMH: Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone. For details see [39]. ?: not described.

factors belonging to the TGF- β superfamily in regulating multiple immune responses, including modulation of T cells in periphery (reviewed in [25–27]), their possible role in early T cell development has not yet been clearly defined.

3. TGF- β superfamily

TGF- β 1, the founding member of the TGF- β superfamily, was initially characterized by its ability to increase the growth of rat kidney cells together with epidermal growth factor (EGF) [28]. Since then, multiple ligands have been described and classified in this superfamily based on amino acid sequence comparison along the bioactive domain. TGF- β superfamily comprises a group of structurally related molecules ubiquitously and widely expressed from *C. elegans* and *Drosophila* to mammals (see Table 1). These factors regulate a variety of functional responses including proliferation, differentiation, apoptosis and cell cycle among others, depending not only on the cell type and its differentiation state, but also on the milieu of cytokines present [29–36]. TGF- β superfamily is divided into three different subfamilies: TGF- β s, BMPs and Activins. The signaling mechanism is preserved among all members and depends on ser-

ine/threonine kinase coupled receptors known as Type I (ALKs) and Type II receptors as well as Smad proteins [37,38]. Five Type II and seven Type I receptors have been identified in vertebrates (see Table 1 and reviewed in [39]). The signal initiates when the ligand (TGF- β or Activin) in a dimeric form binds to a Type II receptor, to further recruit a Type I receptor. Type II receptor phosphorylates Type I receptor at its conserved GS domain [40–42] and in turn, Type I receptor phosphorylates particular members of cytoplasmic proteins named Smads at their characteristic SSXS motif in the carboxy-terminal region (R-Smads or receptor-regulated Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 and Smad8) [43–47]. R-Smads are presented to the Type I receptor by scaffolding proteins such as SARA (SMAD anchor for receptor activation), facilitating their recognition and phosphorylation [48]. Once the R-Smads are phosphorylated, they dissociate from SARA and interact with Smad4 or Co-Smad (“common-mediator-Smad” or “collaborating-Smad”) [49] (reviewed in [50]). This interaction allows their translocation to the nucleus, where they interact with other transcriptional regulators to repress or activate gene expression [44–46] (reviewed in [51]). The main cytoplasmic inhibitory mechanism involves proteins belonging to the Smad proteins known as I-Smads (Inhibitory-

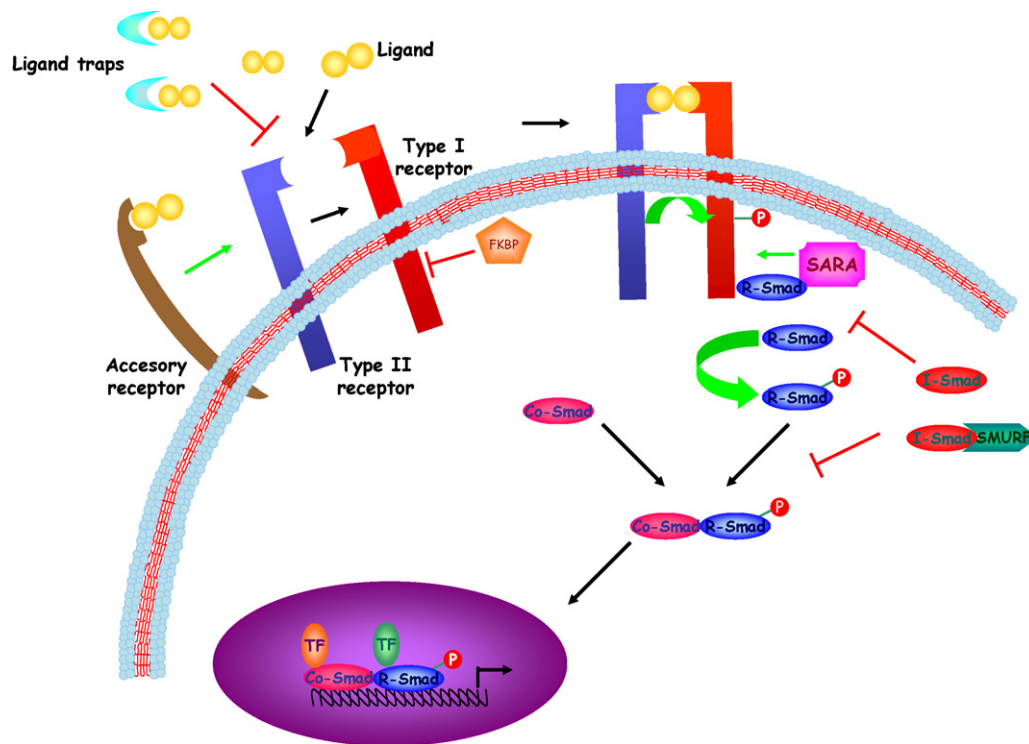


Fig. 2. TGF- β superfamily signaling. TGF- β superfamily members transduce signals through a couple of Types I and II transmembrane receptors with serine/threonine kinase activity. Binding of the dimeric ligand to a Type II receptor leads to the recruitment of a Type I receptor. Type II receptor phosphorylates Type I receptor which, in turn, phosphorylates R-Smads. Phosphorylated R-Smads interact with a Co-Smad and translocate to the nucleus, where they interact with other transcription factors and regulate gene expression. I-Smads inhibit the signal induced by R-Smads/Co-Smads complexes, by interfering with R-smad binding to Type I receptors or by competing for the Co-smad. Receptor and R-Smad degradation may be induced by the I-Smad association with SMURF. Additional interactions can also regulate the TGF- β superfamily signal including ligand “traps”, which inhibit the signal by sequestering the ligand, and anchoring proteins, such as SARA, which promote R-Smad recognition by Type I receptors. In some models, ligand interaction with Type II receptors may be facilitated by accessory receptors and FKBP binding to Type I receptor may inhibit Type II receptor dependent phosphorylation. TF: transcription factor.

Smads: Smad6 and Smad7); these molecules inhibit the signal induced by R-Smads/Co-Smads complexes, by interfering the binding of R-smad to Type I receptors [52,53] or by competing for binding to the Co-smad [54–57]. Other mechanisms known to control the signal at the extracellular compartment include the presence of soluble proteins or ligand traps, such as LAP (latency associated peptide) for TGF- β s [58]. Noggin and Chordin for BMPs [59,60]. Follistatin for Activins and BMPs [61–63] and Inhibins for Activins [64–67]. These molecules compete with the receptors for ligand binding. Accessory receptors such as β -glycan for TGF- β s and Inhibins [68,69], Endoglin [70] and Cripto [71], have also been described. These molecules facilitate binding of the ligands to Type II receptors. Receptor activation is also regulated by intracellular proteins: BAMBI (BMP and Activin membrane bound inhibitor) is a pseudoreceptor that interferes with receptor complex formation, thus inhibiting signal activation [72]. A unique feature of Type I receptors is the FKBP12 binding at its GS domain, preventing phosphorylation mediated by Type II receptors in basal conditions [73]. Once activated, TGF- β receptors and R-Smads are negatively regulated by their association with I-Smad in complex with E3 ubiquitin ligases SMURFs (Smad ubiquitination regulatory factors) [74–77] leading to degradation in proteasome and termination of TGF- β signaling (Fig. 2).

4. TGF- β s and T cell development

There is growing evidence implicating TGF- β superfamily members in the control of T cell development. The first observation of TGF- β as a regulator of T cell function was described by Kehrle et al. who showed the inhibition of IL-2 dependent proliferation in human lymphocytes by a mechanism involving downregulation of IL-2 receptor [78]. This study also revealed a regulated expression of the TGF- β receptor and ligand with lower levels in resting, compared to stimulated T cells, highlighting the relevance of TGF- β as an immunomodulatory factor. Other reports in mice later confirmed the antiproliferative role of TGF- β 1 on thymocytes in response to IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 and TNF- α [79–82].

In vitro analysis of cytokines able to induce the expression of CD8 in early thymic precursors (CD25⁺) together with IL-7 administration, postulated TGF- β 1 as a potent inducer of CD8 expression in CD3⁻ thymocytes from adult and fetal murine thymus, with a stronger induction in fetal derived precursors [83]. This early CD8 expression had been previously reported to be present in normal mice as an intermediate subpopulation previous to the acquisition of CD4 expression to become a DP cell (CD4⁺ CD8⁺) [84–86]. The capacity of TGF- β to induce this CD3⁻ CD8⁺ population *in vitro* in fetal thymic organ cul-

tures (FTOC), demonstrated for the first time the potential role of TGF- β 1 during T cell differentiation [87,88]. Takahama et al., also demonstrated TGF- β 1 and TGF- β 2 expression in cortical epithelial cells from adult and fetal murine thymus, which may regulate cell cycle progression of early thymic precursors in a paracrine way, and were able to identify a TGF- β 1-associated complex which suggests the expression of β -glycan on these same cells [88]. Regarding TGF- β expression in the thymus, initial observations evaluating the expression pattern of TGF- β isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3) in early stages of mouse development, implied that lymphocyte precursors from fetal liver and thymus might be subjected to the action of TGF- β 1 but not TGF- β 2 or TGF- β 3 [89]. However, Takahama later demonstrated the expression of biologically active TGF- β 2 isoform in cortical thymic epithelial cells. In contrast to mice, a latent form of TGF- β 1 seems to be expressed in human triple negative thymocytes TN: CD4⁻ CD8⁻ CD3⁻. TGF- β 1 conversion to its active form is induced by CD8⁺ CD3⁺ mature cells, thus inhibiting TN proliferation and negatively regulating thymocyte maturation in an autocrine way. The authors do not discard the possibility of TGF- β sources from stromal components [90]. Evidence of TGF- β influence on human thymic epithelial cells (TECs) has also been reported; TGF- β 1 and TGF- β 3 regulate cytokine expression in TECs, directly affecting T cell development [91]. Altogether, these studies outline the importance of TGF- β in T cell development through direct effect on both thymocyte and epithelial cell compartments.

Studies using TGF- β 1 deficient mice demonstrated the significant role of this molecule for normal development, with more than 50% intrauterine lethality. The phenotype of these mice also revealed the immunosuppressive activity of TGF- β 1 and the requirement for a regulated immune response, showing an excessive inflammatory response; which provided a model to address a variety of responses ranging from inflammation to tissue repair, autoimmunity and allograft rejection [92]. The authors reported no significant histological lesions in the thymus. In contrast, another study by Christ et al. [93] using the same model, demonstrated reduced total thymic cellularity, although they observed hyperplasia of the thymic medulla and reduction of the thymic cortex. Furthermore, despite the hyperproliferative phenotype of TGF- β 1 deficient T lymphocytes, they observed impaired *in vitro* proliferative T cell responses after mitogenic stimulation (Con A), due to impaired inducible IL-2 mRNA expression and IL-2 secretion, which could be reversed after exogenous administration of IL-2. Finally, the authors concluded that T cell maturation might be dysregulated in the absence of β 1. Moreover, later studies comparing the thymic phenotype of young (postnatal day 3–7) versus older (2–3 week old) TGF- β 1 deficient mice showed a defect in the selection and maturation of thymocytes with a reduction in DP subpopulation and an increase in DN and CD4⁺ in older knock-out mice [94]. Functional responses through TCR signaling in early precursors from young mice were also tested; while TCR stimulation is known to induce apoptosis in immature thymocytes [95,96], deficient thymocytes are inherently hyperresponsive to Ca²⁺-mediated mitogenic stimu-

lus and more physiological stimulus such as CD3 and CD28 costimulation. [Ca²⁺]_i levels are higher in TGF- β 1 deficient CD4⁺ thymocytes, suggesting a role for TGF- β 1 in inhibiting aberrant T cell expansion by maintaining low levels of [Ca²⁺]_i in SP T cells; this observation could explain the high proliferation rate in mature CD4⁺ cells in deficient mice that ultimately leads to the autoimmune disease observed in these mice [97].

Initial insights about TGF- β influence on specific signals during T cell maturation was addressed by Plum et al. [98] who reported that exogenous administration of TGF- β 1 or TGF- β 2 inhibits the growth of thymocytes in FTOC in a dose-dependent fashion, reducing the total cell numbers by up to 95%. Thymocyte differentiation was also affected in the generation of DN, DP and CD4⁺, but not CD8⁺ cells. Analysis among DN subpopulations demonstrated an initial blockade at DN1 immature stage: 81% from total DN subpopulations compared with 30% in untreated thymic lobes. Phenotypic characterization of CD8⁺ cells generated in the presence of TGF- β 1, showed that these were mature SP cells expressing CD8 $\alpha\beta$, TCR $\alpha\beta$ and CD3, providing evidence against previous reports suggesting differentiation of CD8⁺ intermediate immature precursors induced by the same ligand [83,87]. Moreover, cell cycle analysis demonstrated that these CD8⁺ cells were not generated by proliferation of this specific stage; therefore, TGF- β 1 might be promoting the lineage commitment of DP cells towards CD8⁺ phenotype or, alternatively, inhibiting the CD4⁺ differentiation, as suggested by the CD4⁺ increase observed in TGF- β 1 deficient mice [93,98]. However, none of these studies had shown evidence regarding the activation of the canonical TGF- β signaling pathway, such as R-Smad phosphorylation until a report by Mamura et al. who demonstrated pSmad2 induction after TGF- β 1 treatment in human peripheral T cells [99]. This study also suggested a crosstalk between TGF- β signals and TCR mediated responses, based on the fact that ligation of the TCR also induced phosphorylation of Smad2 in a mature circulating pool of human T cells. In addition, recent reports analyzing thymic subpopulations, have also demonstrated preferential expression of TGF- β Type I receptor (ALK5) and pSmad2 induction in response to TGF- β 1 in SP thymocytes [100].

Loss of either TGF- β 2 or TGF- β 3 also results in embryonic or perinatal lethality and seems to have non-redundant developmental roles [101–103]. Since the fatal phenotype of ligand deficient mice discard the possibility of evaluating the implications of this absence in adult mice, new strategies using dominant negative T β RII in conditional deletion models emerged [104–106]. A dominant negative form of T β RII expressed under the control of the murine CD4 promoter, which restricts its expression to T cells, mimics the TGF- β 1 deficient mice phenotype, demonstrating the importance of TGF- β 1 signal in the maintenance of T cell homeostasis. This study showed no apparent deficiencies in T cell development, since transgenic mice versus non-transgenic mice displayed similar percentages of thymic subpopulations [106]. However, the authors did not evaluate the repertoire of selected T cells in the transgenic mice which might be

affected and potentially contribute to the autoimmune phenotype observed.

Recent attempts trying to investigate the role of TGF- β signaling in T cell development *in vivo*, used an inducible Cre/lox

model to disrupt T β RII expression in hematopoietic cells, which were used as donors in bone marrow transplantation assays. This report concludes, in contrast to previous reports [98], that TGF- β is dispensable for thymic development of all thymocyte subpop-

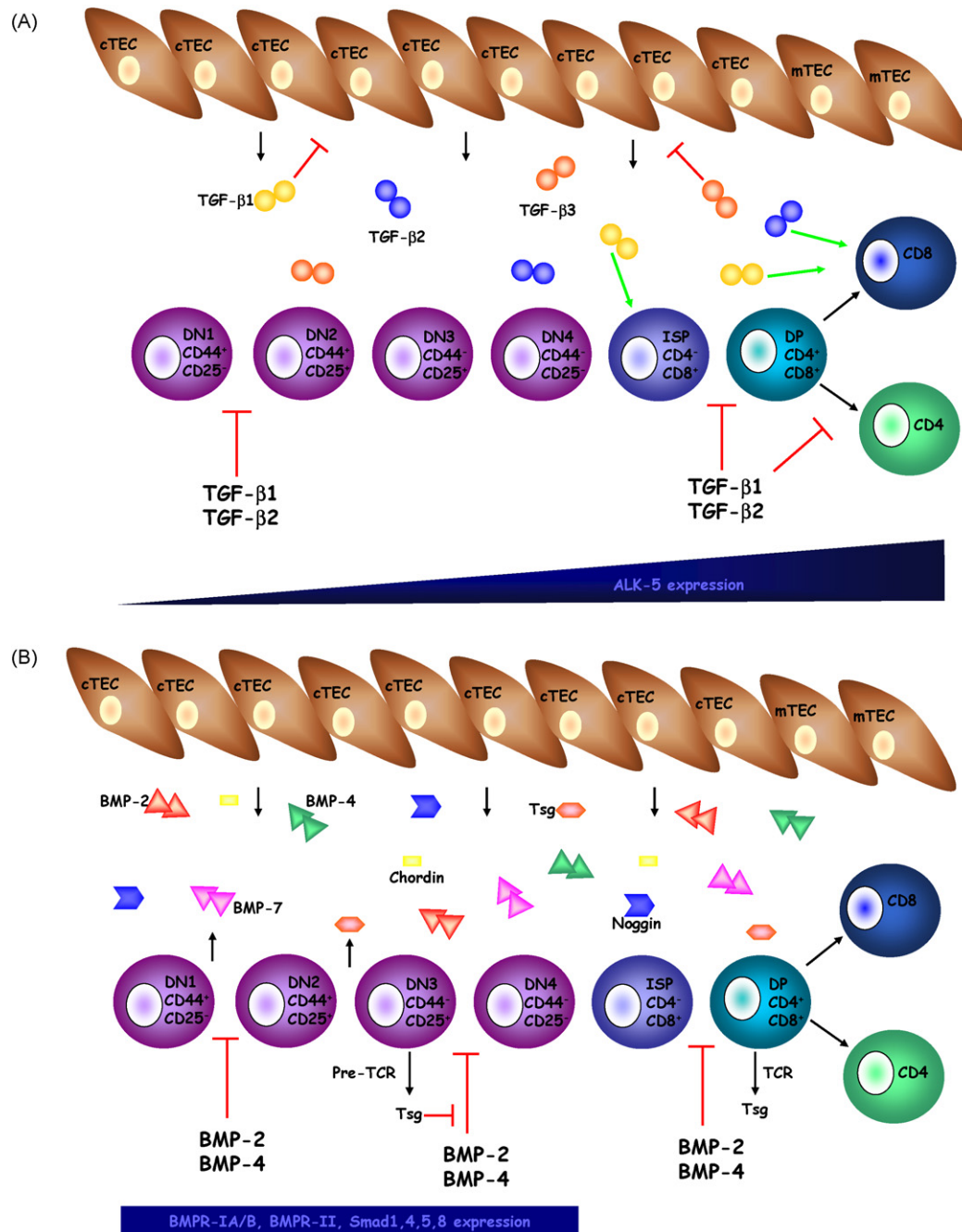


Fig. 3. Role of TGF- β superfamily in T cell development. (A) TGF- β s regulate T cell differentiation: TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 are produced by epithelial cells within the thymus. TGF- β 1 and TGF- β 2 affect thymocyte development at DN1, DP and CD4 $^{+}$, TGF- β 1 seems to promote maturation to ISP (intermediate single positive) and, as well as TGF- β 2, induces maturation towards CD8 $^{+}$ SP cells. TGF- β 1 and TGF- β 3 can also block cytokine production by stromal cells and Type I receptor (ALK5) has been shown to be expressed preferentially in SP cells. (B) BMPs regulate thymocyte development: BMPs modulate the DN to DP transition during thymocyte development. BMP-2, BMP-4, Chordin and Noggin are produced by stromal cells. BMP-2 and BMP-4 appear to negatively regulate the transition from DN1 to DN2 and from DN3 to DN4. BMP-7 and Tsg are also produced by thymocytes. Pre-TCR and TCR signaling induce the secretion of Tsg by thymocytes, which together with the expression of other inhibitors from stromal origin, allows the maturation process to continue. Types I and II receptors as well as Smad proteins are expressed in DN thymocytes but expression of these receptors has not yet been described in other subpopulations (DP and SP cells). (C) Activin expression in the thymus: Smad2, Smad3, Type I (ALK4) and Type II receptors are preferentially expressed in DN thymocytes; Activin β B, β C and β E expression seems to be restricted to stromal component while Activin β A, and inhibin α expression is shared with thymocytes; Inhibin α is highly expressed in fetal and adult thymic stroma, compared with the other ligand subunits however, the functional implication of this expression needs to be addressed in the future.

the authors assessed the functional relevance of BMP expression in the thymus and showed that BMP-4 and BMP-2 but not BMP-7 impaired the progression of thymocytes from DN to DP stage of development and reduced the percentage of thymocytes in the G2/M phase of the cell cycle. In contrast, chordin had the opposite effects. Tsg alone was not able to reverse the BMP induced arrest at DN stage, but was able to block DP progression when it was added together with chordin. An interesting finding was the increased Tsg expression after pre-TCR or TCR crosslinking; the authors proposed a model in which BMP-dependent DN arrest may be temporarily reversed at DN3 subpopulation by the pre-TCR mediated induction of Tsg allowing DN3 cells to progress to the DP stage. Furthermore, we could speculate that a similar mechanism might be taking place at the DP stage, where the reported TCR mediated induction of Tsg might also allow DP thymocytes to differentiate into SP cells, although evidence supporting this possibility is still missing [132]. In a very similar report, Hager-Theodorides et al. also showed expression of BMP related proteins such as BMP-2, BMP-4, chordin and Tsg in the thymus, as well as noggin, which was demonstrated for the first time [133]. BMP-4 expression seems to be restricted to subcapsular and cortical areas of the thymus where DN3s are localized. They confirmed BMPRIA, BMPRII, BMPRII, Smad1, Smad4, Smad5 and Smad8 in DN (CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻) sorted subpopulations, showing that early precursors express all the molecules necessary to respond to BMP-2 and BMP-4. Using the same approach as Graf et al. [132] (FTOC), they studied the influence of BMP signaling during thymocyte development. A BMP-regulated blockade in early precursors at DN1 stage was observed. Total cell numbers were not significantly different in BMP-4 treated versus non-treated thymic lobes, although BMP-4 seemed to enhance survival of DN1 cells and decreased the percentages of apoptotic cells. As was previously demonstrated, BMP-4 also inhibited thymocyte proliferation. Noggin treatment led to an increase in DN4 and DP cells and total cell numbers, although proliferation was not affected. Unexpectedly, Noggin also decreased the percentages of apoptotic cells. Finally, a recent report by Tsai et al. confirmed the early arrest at DN1 in T cell development mediated by BMP-4 [134].

Altogether, there is increasing evidence supporting the role of BMPs during the T cell differentiation processes that take place in the thymus, which suggests that the BMP signals need to be negatively regulated in early T cell precursors in order to complete its maturation program. Among the negative regulators shown to be expressed in the thymus, Tsg seems to play a key role at two highly controlled developmental checkpoints: after pre-TCR and TCR signaling, possibly by modulating the morphogen gradient as has been proposed by Graf et al. (summarized in Fig. 3B).

Regarding Tsg function in the thymus; it was shown that Tsg expression was required to antagonize BMP-mediated signaling, since Smad 1 phosphorylation was increased in Tsg^{-/-} thymocytes. Furthermore, the absence of Tsg resulted in a reduction of thymic cellularity, possibly due to increased thymocyte apoptosis. Interestingly, subpopulation analysis showed that the percentages of single positive cells were increased while the

DPs were decreased. However, the authors did not discuss the relevance of these findings on thymocyte development, neither did they evaluate the effect of the absence of Tsg on the DN subpopulation, which was previously reported to be responsive to BMP signals in *in vitro* assays [135].

Finally, a recent report where the BMP antagonist Noggin was transgenically expressed in thymic stromal cells, highlights the importance of BMP signals in the descensus of the thymic anlage to the mediastinum during embryogenesis [136]. Transgenic mice showed normal percentages of thymocyte subpopulations although there was a reduction in thymus cellularity. The authors concluded that thymocyte development was not qualitatively affected, and that it was the thymic stroma that depends on BMP signals.

6. Activins and T cell development

Only a few reports have addressed the role of Activins during thymocyte development. Most of these studies have been performed *in vitro*. Initial studies showed the antiproliferative effect of Activin A in mitogenically activated mature rat thymocytes [137]. In this report, Inhibin A opposed the action of Activin A, as has been described in a variety of cell types and functional responses [138–143]. Activin was also found to antagonize the induction of interferon- γ in response to Inhibin in human lymphocytes [144]. Similar observations demonstrated that the Activin A-mediated inhibition of thymocyte growth might be partially caused by inhibition of IL-6 production. However, when IL-6 was exogenously administered, Activin A was able to increase the thymocyte growth, suggesting a dual role for Activin regulating the proliferative response in T cells depending on the local cytokine milieu [145]. A more detailed study performed in purified human lymphocytes showed that Activin A induces apoptosis through an increased expression of the inositol phosphatase SHIP [146]. None of these studies addressed the potential role of Activins in T cell maturation and only recently, expression of Activin signaling molecules was demonstrated in adult mice thymus [100]. Analysis of the signaling pathway evaluated as induction of Smad 2 phosphorylation in response to Activin, was preferentially observed in DN early precursors, a subpopulation that showed the highest Type I receptor (ALK4) expression, according to cell surface staining and FACS analysis. Expression of ActRIIA, one of the Type II receptors for Activin, ActRII β , ActRII β , ActRII β and ActRII β , was also shown. In a recent study our group has reported the first quantitative analysis of the expression of Activin/Inhibin signal components in different developmental stages from fetal to adult thymus, as well as in thymocyte and stromal compartments [147]. Our results showed for the first time Inhibin α expression in the thymus. We also observed a higher expression of the Type I and II receptors ALK4, ActRIIA, ActRIIB, Smad2, Smad3 and Smad4 in early embryonic E14 thymus compared with E16 or adult. Among thymocytes, DN cells expressed higher levels of Alk4, as was previously reported. Ligand analysis demonstrated a preferential expression of β A, β B and Inhibin α by stromal cells although β A and α subunits, but not β B, were also detected in thymocytes. Interestingly, based on the ligand subunits abundance,

we proposed that Inhibins and not Activins may be the major ligands of the Activin family expressed during thymus organogenesis and early thymocyte differentiation [147]. Due to the antagonizing nature of Activin/Inhibin interactions, the balance in the differential expression of these proteins during thymocyte development may regulate cellular responses relevant during T cell maturation. Therefore, the role of Activins in thymocyte development still needs to be addressed (Fig. 3C).

7. Conclusion

There is increasing evidence showing the role of members of the TGF- β superfamily in regulating different stages of thymocyte development. TGF- β seems to be involved in regulating the transition from DN1 to DN2, but also the generation of the CD8 SP subpopulation. BMPs have been shown to inhibit the transition DN1–DN2 and DN3–DN4, although the role of BMPs at later stages of development has not yet been investigated. On the other hand, the precise role of Activins/Inhibins in thymocyte development still remains unresolved. However, the recent demonstration of Inhibins as the major ligands of the Activin subfamily expressed in murine thymus, suggests that a balance between agonist and antagonistic signals must be regulating T cell differentiation in the thymus, providing further complexity into the role of this superfamily during the cellular processes that take place during T cell development.

Finally, many questions still remain unresolved. For example, the involvement of TGF- β factors as modulators of critical processes during T cell development such as negative selection, which is a crucial event for central tolerance, as may be inferred by the autoimmune phenotype of TGF- β 1 deficient mice, or the role of this superfamily of mediators in the process of positive selection, implied by the phenotype of Shn-2 knock out mice.

Acknowledgements

We want to thank Dr. Eduardo García-Zepeda and Dr. Marina Macías Silva, for critical reading of the manuscript. PL is supported by a fellowship from Conacyt # 176483 and from DGEP, UNAM.

References

- [1] Miller JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961;2:748–9.
- [2] Scollay R, Godfrey DI. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 1995;16:268–73, discussion 273–264.
- [3] Manley NR. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol* 2000;12:421–8.
- [4] Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev* 2001;1:31–40.
- [5] Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev* 2004;4:278–89.
- [6] Bockman DE, Kirby ML. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 1984;223:498–500.
- [7] Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001;194:127–34.
- [8] Lesley J, Trotter J, Hyman R. The Pgp-1 antigen is expressed on early fetal thymocytes. *Immunogenetics* 1985;22:149–57.
- [9] Ceredig R, Lowenthal JW, Nabholz M, MacDonald HR. Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature* 1985;314:98–100.
- [10] Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev* 2002;2:888–97.
- [11] Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, Palacios R, Owen MJ, Hayday AC, et al. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kD glycoprotein. *Cell* 1993;75:283–94.
- [12] Wiest DL, Berger MA, Carleton M. Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: a receptor without a ligand? *Semin Immunol* 1999;11:251–62.
- [13] Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990;2:3–12.
- [14] Strasser A. Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1995;7:228–34.
- [15] Anderson G, Hare KJ, Platt N, Jenkinson EJ. Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. *Eur J Immunol* 1997;27:1838–42.
- [16] Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol Today* 1999;20:463–8.
- [17] Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720–3.
- [18] Baldwin KK, Trenchak BP, Altman JD, Davis MM. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol* 1999;163:689–98.
- [19] Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139–76.
- [20] Gabor MJ, Godfrey DI, Scollay R. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur J Immunol* 1997;27:2010–5.
- [21] Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FA, White AJ, et al. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev* 2006;209:10–27.
- [22] Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev* 2006;6:127–35.
- [23] Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* 2002;23:305–13.
- [24] van Ewijk W, Shores EW, Singer A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 1994;15:214–7.
- [25] Letterio JJ. TGF- β signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene* 2005;24:5701–12.
- [26] Chen W, Wahl SM. TGF- β : receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 2002;5:62–91.
- [27] Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev* 2002;2:46–53.
- [28] Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5339–43.
- [29] Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R. TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001;20:2254–72.
- [30] Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor- β (1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res* 2001;89:1155–60.
- [31] Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF-(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1035–9.
- [32] Chen S, Cao Y, Zeng G, Duan E. Transforming growth factor- α promotes mouse blastocyst outgrowth and secretion of matrix metalloproteinases. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:1300–4.
- [33] Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF- β released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001;14:715–25.

- [34] Choy L, Derynck R. Transforming growth factor- β inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 2003;278:9609–19.
- [35] Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6686–91.
- [36] Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF- β response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol* 2001;167:773–8.
- [37] Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, et al. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992;71:1003–14.
- [38] Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 1996;383:168–72.
- [39] Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753–91.
- [40] Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *EMBO J* 1996;15:6231–40.
- [41] Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994;370:341–7.
- [42] Wieser R, Wrana JL, Massague J. GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J* 1995;14:2199–208.
- [43] Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997;11:984–95.
- [44] Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996;87:1215–24.
- [45] Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. T β RI phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 1997;272:27678–85.
- [46] Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH. Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1997;272:28107–15.
- [47] Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, et al. TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997;16:5353–62.
- [48] Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* 1998;95:779–91.
- [49] Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. *Nature* 1996;383:832–6.
- [50] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
- [51] Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 1998;95:737–40.
- [52] Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* 1997;389:622–6.
- [53] Nakao A, Roijer E, Imamura T, Souchelnytskyi S, Stenman G, Heldin CH, et al. Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the TGF- β signaling pathway. *J Biol Chem* 1997;272:2896–900.
- [54] Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998;12:186–97.
- [55] Yamada M, Szendro PI, Prokscha A, Schwartz RJ, Eichele G. Evidence for a role of Smad6 in chick cardiac development. *Dev Biol* 1999;215:48–61.
- [56] Zhao J, Shi W, Chen H, Warburton D. Smad7 and Smad6 differentially modulate transforming growth factor β -induced inhibition of embryonic lung morphogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:23992–7.
- [57] Zhao J, Crowe DL, Castillo C, Wuenschell C, Chai Y, Warburton D. Smad7 is a TGF- β -inducible attenuator of Smad2/3-mediated inhibition of embryonic lung morphogenesis. *Mech Dev* 2000;93:71–81.
- [58] Gentry LE, Webb NR, Lim GJ, Brunner AM, Ranchalis JE, Twardzik DR, et al. Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:3418–27.
- [59] Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsal-ventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996;86:589–98.
- [60] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996;86:599–606.
- [61] Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 1990;247:836–8.
- [62] Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 1994;77:283–95.
- [63] de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116:105–14.
- [64] Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 1986;234:205–8.
- [65] Petraglia F, Sawchenko P, Lim AT, Rivier J, Vale W. Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science* 1987;237:187–9.
- [66] Lebrun JJ, Vale WW. Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 1997;17:1682–91.
- [67] Xu J, McKeegan K, Matsuzaki K, McKeegan WL. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *J Biol Chem* 1995;270:6308–13.
- [68] Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994;124:557–68.
- [69] Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 2000;404:411–4.
- [70] Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027–30.
- [71] Yeo C, Whitman M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell* 2001;7:949–57.
- [72] Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, et al. Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999;401:480–5.
- [73] Chen YG, Liu F, Massague J. Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 1997;16:3866–76.
- [74] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999;400:687–93.
- [75] Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K, et al. TGF- β induces assembly of a Smad2-Smur2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* 2001;3:587–95.
- [76] Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001;276:12477–80.
- [77] Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, et al. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- β signaling by Smad7. *J Biol Chem* 2003;278:10716–21.
- [78] Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986;163:1037–50.

- [79] Ellingsworth LR, Nakayama D, Segarini P, Dasch J, Carrillo P, Waegell W. Transforming growth factor- β s are equipotent growth inhibitors of interleukin-1-induced thymocyte proliferation. *Cell Immunol* 1988;114:41–54.
- [80] Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, et al. Transforming growth factor- β is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1988;140:3026–32.
- [81] Chantry D, Turner M, Feldmann M. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor β . *Eur J Immunol* 1989;19:783–6.
- [82] Kim KJ, Abrams J, Alphonso M, Pearce M, Thorbecke GJ, Palladino MA. Role of endogenously produced interleukin-6 as a second signal in murine thymocyte proliferation induced by multiple cytokines: regulatory effects of transforming growth factor- β . *Cell Immunol* 1990;131:261–71.
- [83] Suda T, Zlotnik A. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α induce CD8 expression on CD8 $^-$ thymic subsets including the CD25 $^+$ CD3 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ pre-T cell subset. *J Immunol* 1992;148:1737–45.
- [84] Paterson DJ, Williams AF. An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. *J Exp Med* 1987;166:1603–8.
- [85] MacDonald HR, Budd RC, Howe RC. A CD3 $^-$ subset of CD4 $^-$ 8 $^+$ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4 $^+$ 8 $^+$ cells. *Eur J Immunol* 1988;18:519–23.
- [86] Shortman K, Wilson A, Egerton M, Pearce M, Scollay R. Immature CD4 $^-$ CD8 $^+$ murine thymocytes. *Cell Immunol* 1988;113:462–79.
- [87] Suda T, Zlotnik A. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^+$ cells generated in vitro by culturing CD25 $^+$ CD3 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ thymocytes with T cell growth factor- β and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1992;149:71–6.
- [88] Takahama Y, Letterio JJ, Suzuki H, Farr AG, Singer A. Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor β . *J Exp Med* 1994;179:1495–506.
- [89] Schmid P, Cox D, Bilbe G, Maier R, McMaster GK. Differential expression of TGF β 1, β 2 and β 3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 1991;111:117–30.
- [90] Mossalayi MD, Mentz F, Ouaz F, Dalloul AH, Blanc C, Debre P, et al. Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor- β 1 mechanism. *Blood* 1995;85:3594–601.
- [91] Schluns KS, Cook JE, Le PT. TGF- β differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 α , and IL-1 β in human thymic epithelial cells. *J Immunol* 1997;158:2704–12.
- [92] Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:770–4.
- [93] Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, et al. Immune dysregulation in TGF- β 1-deficient mice. *J Immunol* 1994;153:1936–46.
- [94] Boivin GP, O'Toole BA, Ormsby IE, Diebold RJ, Eis MJ, Doetschman T, et al. Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor- β 1-deficient mice. *Am J Pathol* 1995;146:276–88.
- [95] Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989;337:181–4.
- [96] McConkey DJ, Hartzell P, Amador-Perez JF, Orrenius S, Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 1989;143:1801–6.
- [97] Bommireddy R, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Doetschman T. TGF β 1 inhibits Ca $^{2+}$ -calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J Immunol* 2003;170:3645–52.
- [98] Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B. Influence of TGF- β on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* 1995;154:5789–98.
- [99] Mamura M, Nakao A, Goto D, Kato M, Saito Y, Iwamoto I. Ligation of the T cell receptor complex results in phosphorylation of Smad2 in T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:124–7.
- [100] Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. Transforming growth factor- β - and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol* 2003;15:1401–14.
- [101] Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 1997;124:2659–70.
- [102] Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, et al. Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995;11:409–14.
- [103] Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11:415–21.
- [104] Bottinger EP, Jakubczak JL, Haines DC, Bagnall K, Wakefield LM. Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor β receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz[α]anthracene. *Cancer Res* 1997;57:5564–70.
- [105] Wang XJ, Greenhalgh DA, Bickenbach JR, Jiang A, Bundman DS, Krieg T, et al. Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor β (TGF- β) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF- β -mediated growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2386–91.
- [106] Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000;12:171–81.
- [107] Leveen P, Carlsen M, Makowska A, Oddsson S, Larsson J, Goumans MJ, et al. TGF- β type II receptor-deficient thymocytes develop normally but demonstrate increased CD8 $^+$ proliferation in vivo. *Blood* 2005;106:4234–40.
- [108] Bassing CH, Shou W, Muir S, Heitman J, Matzuk MM, Wang XF. FKBP12 is not required for the modulation of transforming growth factor β receptor I signaling activity in embryonic fibroblasts and thymocytes. *Cell Growth Differ* 1998;9:223–8.
- [109] Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;19:2495–504.
- [110] He W, Li AG, Wang D, Han S, Zheng B, Goumans MJ, et al. Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. *EMBO J* 2002;21:2580–90.
- [111] Arora K, Dai H, Kazuko SG, Jamal J, O'Connor MB, Letsou A, et al. The *Drosophila schnurri* gene acts in the Dpp/TGF β signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* 1995;81:781–90.
- [112] Grieder NC, Nellen D, Burke R, Basler K, Affolter M. *Schnurri* is required for *Drosophila* Dpp signaling and encodes a zinc finger protein similar to the mammalian transcription factor PRDII-BF1. *Cell* 1995;81:791–800.
- [113] Marty T, Muller B, Basler K, Affolter M. *Schnurri* mediates Dpp-dependent repression of *brinker* transcription. *Nat Cell Biol* 2000;2:745–9.
- [114] Dai H, Hogan C, Gopalakrishnan B, Torres-Vazquez J, Nguyen M, Park S, et al. The zinc finger protein *schnurri* acts as a Smad partner in mediating the transcriptional response to decapentaplegic. *Dev Biol* 2000;227:373–87.
- [115] Udagawa Y, Hanai J, Tada K, Grieder NC, Momoeda M, Taketani Y, et al. *Schnurri* interacts with Mad in a Dpp-dependent manner. *Genes Cells* 2000;5:359–69.
- [116] Harland RM. The transforming growth factor β family and induction of the vertebrate mesoderm: bone morphogenetic proteins are ventral inducers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10243–6.

- [117] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10:1580–94.
- [118] Takagi T, Harada J, Ishii S. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* 2001;2:1048–53.
- [119] Dewulf N, Verschueren K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Vande Spiegle KM, et al. Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 1995;136:2652–63.
- [120] Outram SV, Varas A, Pepicelli CV, Crompton T. Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* 2000;13:187–97.
- [121] Dick A, Risau W, Drexler H. Expression of Smad1 and Smad2 during embryogenesis suggests a role in organ development. *Dev Dyn* 1998;211:293–305.
- [122] Flanders KC, Kim ES, Roberts AB. Immunohistochemical expression of Smads 1–6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF- β s. *Dev Dyn* 2001;220:141–54.
- [123] Scott IC, Steiglitz BM, Clark TG, Pappano WN, Greenspan DS. Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain. *Dev Dyn* 2000;217:449–56.
- [124] Graf D, Fisher AG, Merckenschlager M. Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Res* 1997;25:2239–40.
- [125] Graf D, Timmons PM, Hitchins M, Episkopou V, Moore G, Ito T, et al. Evolutionary conservation, developmental expression, and genomic mapping of mammalian Twisted gastrulation. *Mamm Genome* 2001;12:554–60.
- [126] Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, De Robertis EM. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 2000;405:757–63.
- [127] Yu K, Srinivasan S, Shimmi O, Biehs B, Rashka KE, Kimelman D, et al. Processing of the *Drosophila* Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity. *Development* 2000;127:2143–54.
- [128] Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Maas SA, Cho KW, Greenspan DS. Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature* 2001;410:475–8.
- [129] Chang C, Holtzman DA, Chau S, Chickering T, Woolf EA, Holmgren LM, et al. Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 2001;410:483–7.
- [130] Ross JJ, Shimmi O, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, et al. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 2001;410:479–83.
- [131] Larrain J, Oelgeschlager M, Ketpura NI, Reversade B, Zakin L, De Robertis EM. Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* 2001;128:4439–47.
- [132] Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merckenschlager M. The developmentally regulated expression of *Twisted gastrulation* reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002;196:163–71.
- [133] Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002;169:5496–504.
- [134] Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* 2003;102:3947–53.
- [135] Nosaka T, Morita S, Kitamura H, Nakajima H, Shibata F, Morikawa Y, et al. Mammalian twisted gastrulation is essential for skeletal lymphogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:2969–80.
- [136] Bleul CC, Boehm T. BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* 2005;175:5213–21.
- [137] Hedger MP, Drummond AE, Robertson DM, Risbridger GP, de Kretser DM. Inhibin and activin regulate [3 H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1989;61:133–8.
- [138] Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. A homodimer of the β -subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138:1129–37.
- [139] Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779–82.
- [140] McLachlan RI, Robertson DM, de Kretser D, Burger HG. Inhibin—a non-steroidal regulator of pituitary follicle stimulating hormone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987;1:89–112.
- [141] Hsueh AJ, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, et al. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5082–6.
- [142] Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor- β and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;146:1405–12.
- [143] Yu J, Shao LE, Lemas V, Yu AL, Vaughan J, Rivier J, et al. Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature* 1987;330:765–7.
- [144] Petraglia F, Sacerdote P, Cossarizza A, Angioni S, Genazzani AD, Franceschi C, et al. Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon- γ production. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:496–502.
- [145] Hedger MP, Phillips DJ, de Kretser DM. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1 β or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 2000;12:595–602.
- [146] Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, et al. Activin/TGF- β induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 2002;4:963–9.
- [147] Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* 2006;235:1124–32.