



Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**“Análisis de las vías de señalización involucradas en la
diferenciación
de los linfocitos T
y la generación de células T reguladoras”**

Karen Elizabeth Nava Castro

Tutor: Dra. Gloria Soldevila Melgarejo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Departamento de Inmunología

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

A mi tía Ivone,

Por ser siempre mi apoyo

y ejemplo...

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soldevila y a la Dra. Adelaida Sarukhán por ser guías en el desarrollo de este proyecto, por compartir su conocimiento y sobretodo su amistad...

A los miembros del Comité, la Dra. Carmen Sánchez, el Dr. Vianney Ortiz y el Dr. Eduardo García por sus opiniones y críticas que enriquecieron el proyecto.

Al Q. Jesús Ramsés Chávez por su apoyo técnico durante la realización del proyecto.

A la MVZ. Georgina Díaz Herrera, a la Laboratorista Josefina Montoya Garay y al MVZ. Gerardo Arrellín Rosas, por su apoyo y asesoría con el manejo y cuidado de los modelos de ratones.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo, a María Petra Muñoz García y Alfonso Martínez Amud, por su apoyo en la obtención de bibliografía para el desarrollo del proyecto.

A mis padres y a mi hermana... por su apoyo incondicional...

A mis abuelos... por ser un ejemplo de vida...

A Héctor... por incitarme ser mejor persona cada día...

A mi familia... tíos, primos y sobrinos... porque ellos hacen la vida divertida...

A mi tía Telma por sus grandes consejos sobre las relaciones personales...

A Paula, Ramsés, Diana, Germán, Violeta, Nelly, Xóchitl, Carlos, Roxana, Ebzadrel, Horacio, Marce, Gisela y Horacio Villafán... porque sin ellos, el trabajo en el laboratorio no hubiera sido lo que es...

A Paula Santoyo y Paula Licona por ser mi conciencia, mis confidentes y estar conmigo aún cuando la distancia sea grande...

A Enrique... por creer en mí y no dejar que lo olvide...

A Mónica, Laura, Maricarmen, Jafet, Enrique, Luis y Ricardo... por dejarme ver el otro lado de la ciencia... por las mañanas de café y las discusiones bizarras...

A Jaqueline, Alicia, Abigail, Magda, Martita, Betty, Diana, Selene, Alejandra, Fabiola, Miroslava y la Dra. Galindo... por recibirme y darme un espacio en esta nueva experiencia...

I. Índice

I.	Índice.....	5
II.	Resumen.....	8
III.	Abstract.....	9
IV.	Introducción	
	a. Células T reguladoras	
	i. Fenotipo.....	10
	ii. Descripción histórica y autoinmunidad.....	11
	iii. Especificidad antigénica.....	12
	iv. Mecanismos de regulación de las células nTregs.....	13
	v. Papel de las Tregs en el control de la respuesta patogénica	15
	b. Desarrollo de los linfocitos T y las células T reguladoras “naturales”.....	16
	c. Señalización mediada por el Receptor del Linfocito T (TCR).....	19
	d. Modelos de Selección en la diferenciación de los linfocito T naïve y reguladores	
	i. Selección Positiva versus Selección Negativa.....	23
	ii. Elección de linaje CD4 vs. CD8	
	1. Modelo estocástico/selectivo.....	28
	2. Modelo Instructivo.....	30
	3. Modelo de intensidad de señal.....	31
	4. Modelo de la duración de la señal.....	33
	5. Modelo de señalización cinética.....	34

6.	Análisis Bioquímico de la elección de linaje	
	a.	Los co-receptores y su asociación a Lck.....35
	b.	La vía de las MAPK.....36
	c.	Señalización a través de Notch.....37
	d.	Factores de transcripción.....40
	e.	Contribución de las citocinas y quimiocinas.....41
	iii.	Selección de las células T reguladoras “naturales”42
V.	Justificación.....	49
VI.	Hipótesis.....	50
VII.	Objetivos.....	50
VIII.	Materiales y Métodos	
	a.	Ratones.....51
	b.	Anticuerpos.....51
	c.	Líneas celulares.....52
	d.	Dimerizadores.....53
	e.	Expresión de moléculas en superficie.....53
	f.	Tinción de moléculas intracelulares.....53
	g.	Determinación de pAnticuerpos en timocitos.....54
	h.	Detección de pErk en líneas celulares.....55
	i.	Expresión de Foxp3.....56
	j.	Clonación de vectores.....56
	k.	Generación de proteínas quiméricas CD3 ϵ /CD4.....57
	l.	Ensayos de fosforilación por Western Blot.....58

m.	Flujos de calcio.....	59
n.	Infección retroviral.....	60
IX.	Resultados	
i.	Análisis de la señalización en las células T reguladoras en un modelo transgénico.....	63
ii.	Análisis de la señalización en células Tregs en ratones silvestres.....	74
b.	Modelo de inducción de señalización a través del TCR.....	76
c.	Análisis de la señalización <i>in vivo</i> : Modelo de infección retroviral.....	93
X.	Discusión.....	99
XI.	Conclusiones particulares.....	105
XII.	Conclusión general.....	106
XIII.	Bibliografía.....	107
XIV.	Artículo.....	122

II. Resumen

La diferenciación de los linfocitos T en el timo depende de la activación de diversas vías de señalización durante esta etapa. Los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación a un linaje T específico, CD4 cooperador, CD8 citotóxico, o bien células T reguladoras naturales (nTreg) se han sustentado en diferencias en la duración de la interacción TCR-MHC/péptido, así como de la intensidad y/o duración de las señales. En cuanto a la diferenciación hacia el fenotipo T regulador, algunos estudios sugieren que se requieren señales de alta avidéz para inducir la selección de estas células. Sin embargo, estas señales no deben rebasar el umbral de señal que induzca su muerte por selección negativa.

En este trabajo analizamos la vía de señalización del TCR y las moléculas coestimuladoras con la finalidad de demostrar que existe una mayor activación de estas vías, así como mecanismos compensatorios que modulen estas señales. Para ello utilizamos un modelo de ratones que expresan un TCR específico y su ligando, así como ratones silvestres. Nuestros resultados demuestran que las células T reguladoras presentan un incremento basal en la fosforilación de moléculas clave en la señalización mediada por el TCR, confirmando el reconocimiento de antígenos endógenos con alta avidéz. Así como una disminución en la respuesta al entrecruzamiento del TCR, lo cual correlaciona con su falta de respuesta. Este patrón se comparte entre las células T reguladoras de ratones silvestres, así como las células reguladoras antígeno-específicas, lo que nos permite identificar un patrón de señalización característico de estas células reguladoras. Finalmente, desarrollamos un modelo de activación de vías de señalización que permite analizar la contribución de moléculas particulares durante la diferenciación de los linfocitos T.

III. Abstract

The differentiation to CD4, CD8 or regulatory T cells in the thymus depends on different signaling pathways. It has been proposed that the molecular signals involved in the generation of these cells differ in the avidity or duration of TCR/MHC interaction. It has been proposed that high avidity interactions are required for Treg selection. However, there should be some compensatory mechanisms that avoid the induction of negative selection of these cells. Here, we used double transgenic mice (TCR-HA × IgHA) and followed the kinetics and phosphorylation status of HA-specific Tregs that develop in the absence or presence of their agonist ligand expressed in the thymus, as well as of polyclonal “naturally occurring” Tregs (nTregs). We found that, in basal conditions, nTregs showed enhanced basal phosphorylation of c-Cbl, Erk and PI3K, indicating their selection by high avidity ligands. However, in response to TCR cross-linking, both nTregs from Balb/c mice and HA-specific Tregs showed reduced levels of phosphorylated Erk1/2, c-Cbl and Akt. We conclude that thymus-derived Tregs display a characteristic “signaling signature” that suggests qualitative differences in TCR-mediated signaling that may not be explained merely by a higher TCR avidity. Finally, we developed a signal induction model that allows us to determine the role of particular molecules during T cell development.

IV. Introducción

a. Células T reguladoras

i. Fenotipo

Existen distintos tipos de células T reguladoras que modulan la homeostasis y la tolerancia a antígenos propios. En términos generales, las células T reguladoras se dividen en dos grupos principales: las células T reguladoras “naturales” CD4⁺CD25⁺ (nTregs, “naturally-occurring T regulatory cells”) y las células T reguladoras “inducibles” o “adquiridas” (iTregs/aTregs), entre las que se encuentran las células secretoras de IL-10 (Tr1), células secretoras de TGF- β (Th3), células T CD8⁺ restringidas por Qa-1, células T CD8⁺CD122⁺, células T γ/δ y células NKT (revisado en (1-6)).

Las células nTregs se generan en el timo y corresponden al 5-10% de la población total de células T CD4⁺. Se caracterizan principalmente por la expresión en altos niveles de CD25 (IL-2R α) (7) y el factor de transcripción Foxp3 (8, 9), así como otras moléculas como CD5^{alto}, CD45RB^{bajo}, CTLA-4, PD-1, LAG-3 (10), GITR (11), Galectina-1 (12) y CD103 (revisado en (13, 14)). Estas células no son capaces de responder a la estimulación a través de su TCR, sin embargo, son capaces de proliferar cuando son co-estimuladas por IL-2. Estas células están involucradas en suprimir la respuesta tanto de células CD4⁺ como CD8⁺ ya sea de manera dependiente de contacto o dependiente de citocinas (IL-4, IL-10 ó TGF- β). Por su parte, las células reguladoras periféricas o “inducidas” se diferencian a partir de células CD4⁺CD25⁻ que se activan en presencia de algunas citocinas como TGF- β y constituyen del 10-50% de las células T en expansión. La expresión de Foxp3 es inducida por la presencia de TGF- β ((15) y revisado en (16)) y es necesaria para mantener el fenotipo regulador en este grupo de células (17). Sin embargo, también se ha observado que

Foxp3 se expresa temporalmente en células activadas y posteriormente es regulado negativamente (18).

ii. Descripción histórica y autoinmunidad

La idea de que las células T reguladoras “naturales” se generaban en el timo fue propuesta en ensayos de timectomía neonatal en los que se desarrollan enfermedades autoinmunes múltiples (19-22). En estos ensayos, la transferencia de células de bazo de ratones normales, pero no la de ratones timectomizados, prevenía el desarrollo del fenotipo autoinmune (23), lo que confirmaba la teoría de que las células reguladoras o “supresoras”, se generaban en el timo.

La caracterización de Foxp3 como el gene determinante para la caracterización del fenotipo regulador se describió al analizar el fondo genético del síndrome IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome), una enfermedad que manifiesta múltiples enfermedades autoinmunes, alergia severa y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD, Inflammatory Bowel Disease) (24, 25), así como del genotipo de los ratones *scurfy*, en los que se observa un síndrome similar (26). En ambos modelos se describió que el gen alterado era el factor de transcripción Foxp3 (27-30). Finalmente, la sobreexpresión de Foxp3 en células no reguladoras CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺, induce la adquisición de un fenotipo anérgico y parcialmente regulador (proliferación *in vitro*, transferencia *in vivo*) (8, 9, 31); con lo que se estableció la importancia de Foxp3 y las células T reguladoras en el desarrollo de autoinmunidad.

iii. Especificidad antigénica

Inicialmente se describió que las células T reguladoras reconocían antígenos propios, ya que la transferencia de células de bazo normales a ratones timectomizados en el día 3 postnatal (D3), previene la generación del fenotipo autoinmune. Sin embargo, si las células se extraen de un donador que ha sido sujeto a la extracción de algún órgano en particular; se elimina la respuesta autoinmune para el resto de los órganos, excepto para el tejido extraído en el donador (32, 33). Con respecto al repertorio antigénico que es presentado a los timocitos que van a ser seleccionados, se describió que su deficiencia (en ratones Aire^{-/-}) induce un síndrome autoinmune poliendócrino (34, 35). Así mismo se requiere para la expresión promiscua de antígenos de tejido periférico en las células epiteliales medulares tímicas (mTEC) (36). Adicionalmente, se determinó que las células Aire⁺ son capaces de seleccionar células Foxp3⁺ (37), por lo que se sugiere que este es un mecanismo de tolerancia contribuye a controlar la respuesta inmune contra lo “propio”.

La posibilidad de que las células T reguladoras compartieran el repertorio antigénico con las células T “vírgenes” o “naïve” se propuso en estudios en los que se analizaron las secuencias de las regiones V α y V β utilizados por las células T reguladoras y en los que concluyeron que no existían diferencias significativas en el uso de estas cadenas por las células T reguladoras y las células T naïve (38). Sin embargo, otros estudios en los que se secuenciaron las cadenas TCR α utilizando una TCR β fija, determinaron que el repertorio antigénico coincide parcialmente, lo que sugería un repertorio distinto entre ambas subpoblaciones (39).

Pacholczyk y colaboradores (40), utilizando un modelo de ratones transgénicos para un TCR con una sola cadena TCR β y diversas cadenas TCR α (TCR^{miniEp}), generaron

hibridomas derivados de células CD4⁺Foxp3⁺ o CD4⁺Foxp3⁻ que fueron cultivados posteriormente en presencia de complejos MHC cargados con péptidos endógenos (self-antigens) o extraños (non-self antigens) y seguidas mediante la secuenciación de las cadenas TCR α . En estos ensayos se obtuvieron dos conclusiones principales: 1) una alta proporción de TCR's expresados por las células naïve es compartido por las células T reguladoras, lo que garantiza una adecuada modulación de la respuesta inmune; y 2) tanto las células T reguladoras como las células naïve son preferentemente capaces de reconocer antígenos extraños y proliferar en respuesta a ello, mientras que los antígenos propios no inducen tal respuesta. Con lo que proponen que los péptidos de selección en el timo son distintos a los que inducen respuesta en la periferia.

iv. Mecanismos de regulación de las células Tregs

La supresión mediada por las células T reguladoras naturales puede ser dependiente o independiente de contacto y son capaces de modular tanto la respuesta de linfocitos T activados como de las células presentadoras de antígenos (revisado en (41, 42)). Con respecto a los mecanismos dependientes de contacto, se describió que las células T reguladoras expresan moléculas que inducen señales negativas a las células T efectoras. Entre éstas se encuentran CTLA-4 (43), que compite con CD28 y bloquea las señales de coestimulación a través de B7 (CD80/CD86) (44). CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) y CD73 (ecto-5'-nucleotidase) inducen un aumento en la concentración de adenosina en la región pericelular que inhibe la expresión de citocinas y altera la función celular (45). Asimismo, las células T reguladoras son capaces de aumentar la concentración de AMP cíclico (cAMP) en las células efectoras, inhibiendo la proliferación

de éstas y la producción de IL-2 (46) y también pueden inducir muerte celular mediante la liberación de granzima B y perforina (47, 48).

Los mecanismos independientes de contacto fueron descritos inicialmente en cultivos en los que la presencia de una membrana semipermeable entre las células T reguladoras y las células T efectoras, inhibía la supresión mediada por estas células (38). Entre estos mecanismos se encuentran la secreción de citocinas inmunomoduladoras como TGF- β , IL-10 e IL-35, que han sido relacionadas con la inhibición de la expresión de algunos factores de transcripción como Stat-4, GATA-3, T-bet y NF κ B. TGF- β induce la fosforilación de la cinasa Tec y el flujo de calcio (49-52). IL-10 se asocia a una menor producción de anticuerpos IgE en modelos de asma (revisado en (53, 54)) y CD35 con una supresión de la proliferación celular (55). Sin embargo, el papel de estas citocinas en los mecanismos de supresión de las células T reguladoras sigue en controversia, ya que otros autores, mediante el bloqueo de estas citocinas o el análisis de modelos deficientes, concluyen que no son imprescindibles para esta función (38, 56, 57).

Así como se lleva a cabo una regulación de las células efectoras, las células T reguladoras son capaces de modular también las funciones de las células presentadoras de antígenos (APC). Entre los mecanismos de supresión a estas células se encuentran la disminución de la expresión de CD80 y CD86 (58), la inducción de la expresión de la enzimaIDO (indoleamine 2,3-dioxigenase) que cataboliza triptófano en kinurenina, un derivado tóxico para las células T que rodean a la APC (59, 60), así como la inducción de la muerte de células B (61). Todos estos mecanismos están mediados por la expresión de CTLA-4 en las células Treg.

Un aspecto importante sobre los mecanismos de supresión ejercidos por las células T reguladoras es que éstas deben encontrarse pre-activadas para ejercer su función ((62) y revisado en (63)), es por ello que tanto la especificidad antigénica, como la afinidad de sus receptores y moléculas coestimuladoras son factores determinantes para los mecanismos de supresión y tolerancia.

v. ***Papel de las Tregs en el control de la respuesta inmune***

Las células T reguladoras poseen también un papel importante en la modulación de la respuesta inmune. Powrie y colaboradores han descrito un mecanismo de regulación “cuantitativo” en el cual, los factores determinantes entre tolerancia y activación son 1) las condiciones de activación de las células presentadoras; 2) la localización y distribución de los antígenos; y 3) los patrones de circulación de las células T. De manera que la relación entre la cantidad de células T reguladoras contra las células T efectoras y la disponibilidad de antígeno determina la respuesta inmune.

Bajo este modelo, en condiciones basales, las células presentadoras circulan por los diversos tejidos y son capaces de fagocitar y presentar antígenos locales sin llegar a ser activadas. Algunas de ellas serán capaces de llegar a los órganos linfoides secundarios y presentar los antígenos tanto a las células T reguladoras como a las efectoras (64). En este caso, no se montará una respuesta ya que las células efectoras no serán activadas completamente y la presentación de antígenos por las células presentadoras inmaduras será principalmente a las células T reguladoras gracias a que sus receptores poseen mayor afinidad que los de las células efectoras (65).

En condiciones de infección, las células presentadoras serán activadas por la presencia del agente patógeno, por lo que un mayor número de células presentadoras llegarán a los órganos linfoides secundarios y expondrán tanto antígenos del patógeno como antígenos propios. La gran disponibilidad de antígeno derivado del patógeno será suficiente para sobrepasar la activación de las células T reguladoras y permitir la expansión de las efectoras. Sin embargo, bajo estas condiciones de proliferación también se dividen las células T reguladoras, por lo que, una vez que se ha eliminado al patógeno, el número de células reguladoras, así como la mayor afinidad de sus receptores y la disponibilidad de péptidos, permitirá una activación preferencial de éstas células y por lo tanto, el control de la respuesta de las células efectoras (revisado en (66)).

b. Desarrollo de los linfocitos T y las células nTregs

Tanto la generación de células T maduras, capaces de discriminar y reconocer antígenos propios o extraños en un organismo, como la generación de las células T reguladoras “naturales” depende de la selección de sus progenitores linfoides durante la maduración en el timo. En términos generales, este proceso de maduración se lleva a cabo en el timo y se divide en tres principales etapas que se caracterizan por la expresión de los co-receptores CD4 y CD8: el estadio Doble Negativo (DN, CD4⁻CD8⁻), el estadio Doble Positivo (DP, CD4⁺CD8⁺) y el estadio Positivo Sencillo (SP, por sus siglas en inglés, CD4⁺CD8⁻ ó CD4⁻CD8⁺)(Figura 1).

Anatómicamente, cada una de estas subpoblaciones tímicas se encuentran localizadas en regiones particulares del timo. Los progenitores provenientes de la médula ósea entran en el timo a través de vénulas cercanas a la región cortico-medular y a partir de

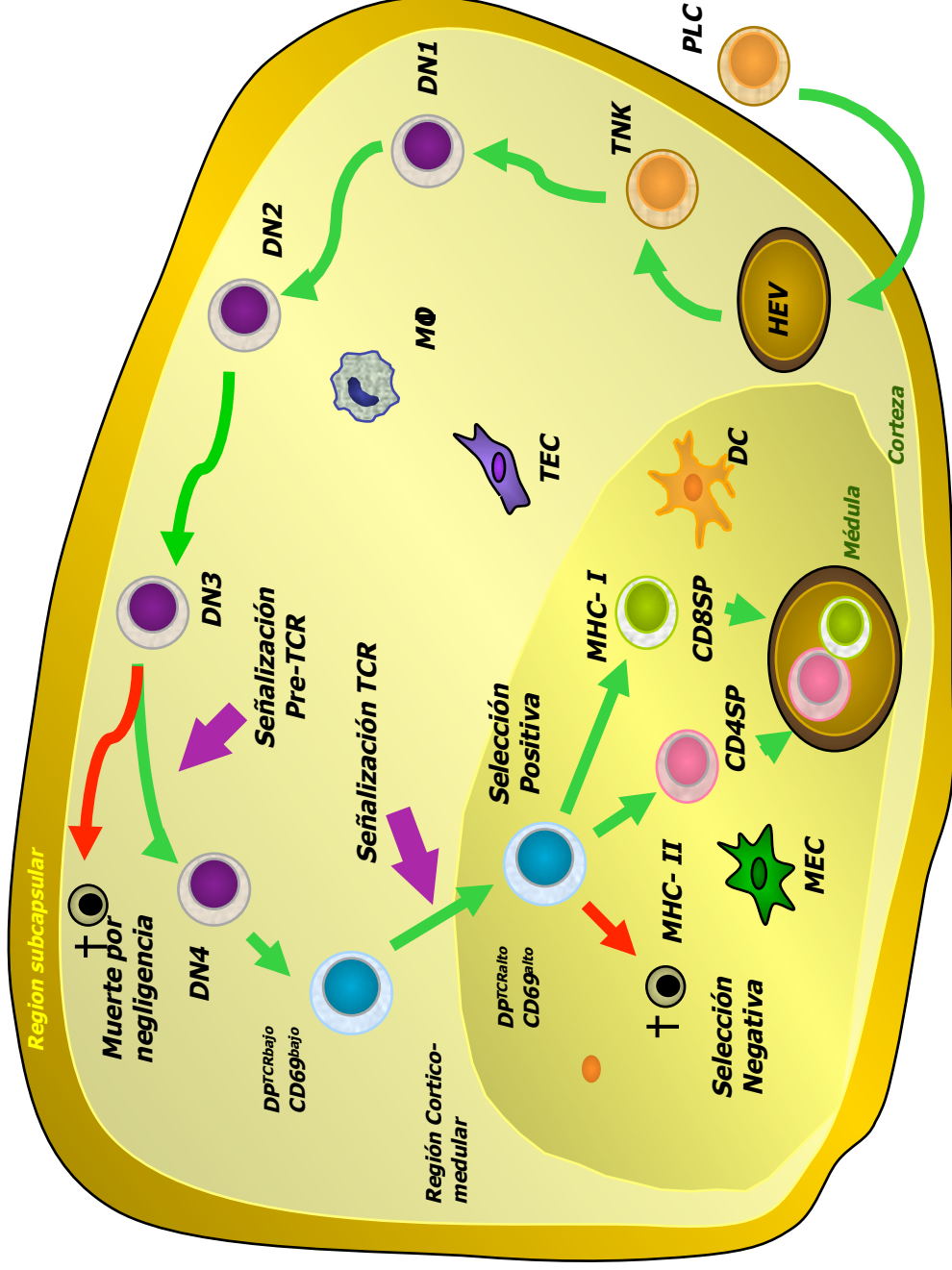


Figura 1. Proceso de maduración de los linfocitos T en el timo. El proceso de diferenciación se divide en tres etapas caracterizadas por la expresión de los co-receptores: el estadio de Dobles Negativos (DN), el estadio de Dobles positivos (DP) y el estadio de Positivos Sencillos (CD4SP y CD8SP). Los progenitores (PLC) entran en el timo a través de vénulas cercanas a la región cortico-medular(HEV). Y migran como timocitos DN hacia la región subcapsular y posteriormente hacia la corteza del timo, en donde se diferencian a timocitos DP; en el que los timocitos expresan los co-receptores CD4, CD8 y la forma madura del receptor TCR $\alpha\beta$. Este receptor les permite reconocer péptidos endógenos expresados por células estromales tímicas y llevar a cabo los procesos de selección: la selección positiva, la selección negativa y la selección de linaje CD4/CD8.

este punto, migran como timocitos DN hacia la región subcapsular y posteriormente hacia la corteza del timo, en donde se diferencian a timocitos DP. Finalmente los timocitos DP llegan a la región medular como timocitos maduros CD4⁺CD8⁻ ó CD4⁻CD8⁺ (revisado en (67-70)).

El estadio DN se subdivide en cuatro subpoblaciones basadas en la expresión de las moléculas CD44 y CD25: el estadio DN1 (CD44⁺CD25⁻), el estadio DN2 (CD44⁺CD25⁺), el estadio DN3 (CD44⁻CD25⁺) y el estadio DN4 (CD44⁻CD25⁻)(revisado en (71)). Durante el estadio DN se lleva a cabo el rearreglo de la cadena TCR β , que en conjunto con la cadena preT α , forman el preTCR ((72) y revisado en (73)). La señalización a través de este receptor, conocida como “Selección β ”, permite la diferenciación del estadio DN3-DN4 al estadio de DP. Originalmente se demostró que la señalización de este receptor “inmaduro” era independiente de ligando, ya que la expresión de cadenas carentes de los dominios extracelulares de la cadena pre-T α , recuperaba la generación de células T en ratones deficientes de las enzimas de recombinación (Rag^{-/-} y scid^{-/-}) (74). Sin embargo, se desconocían los mecanismos que permitían una señalización autónoma de este receptor. Posteriormente se propuso que la oligomerización de este receptor por dominios presentes en la región proximal a la membrana de la cadena pre-T α , así como su constante internalización, son factores cruciales para inducir las señales de diferenciación del estadio DN al DP (75, 76). Entre los eventos que se inician como consecuencia de la señalización a través del pre-TCR se encuentran: el inicio de una ronda de proliferación, el final de la expresión de CD25, el final del rearreglo de la cadena TCR β y el inicio del rearreglo de la cadena TCR α (revisado en (70, 77)). Las células que no son capaces de inducir una señal de diferenciación a través de este receptor mueren por apoptosis.

Durante el estadio de DP, los timocitos expresan simultáneamente los co-receptores CD4 y CD8 así como la forma madura del receptor TCR $\alpha\beta$. Este receptor les permite reconocer péptidos endógenos expresados por células estromales tímicas y llevar a cabo tres procesos de selección: la selección positiva, la selección negativa, la elección de linaje CD4/CD8 y su diferenciación a células T reguladoras. En términos generales, se ha propuesto que los timocitos que reciben señales de avidéz intermedia son seleccionados “positivamente”, mientras que aquellos que no reciben alguna señal, mueren en un proceso conocido como “muerte por negligencia”. Por otro lado, aquellos timocitos que reciben señales de alta avidéz, son eliminados en un proceso llamado “selección negativa” (revisado en (78)). Este proceso de selección constituye uno de los principales mecanismos de tolerancia. Finalmente, los timocitos seleccionados positiva y negativamente, sufren una diferenciación final a los linajes CD4SP con fenotipo “cooperador”, CD8SP con fenotipo “citotóxico” ó CD4⁺CD25⁺ con fenotipo T regulador. El momento exacto en que se lleva a cabo la diferenciación al fenotipo regulador está aún en controversia y será discutido más adelante.

c. Señalización a través del TCR (T Cell Receptor)

El primer evento posterior a la interacción entre el TCR y el complejo péptido-MHC es la fosforilación de las regiones ITAM (“Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motifs”) presentes en las regiones citoplásmicas de las proteínas del complejo TCR ζ /CD3 por la cinasa Lck, miembro de la familia de cinasas Src ((79, 80) y revisado en (81)). Esta cinasa se recluta al complejo debido a su interacción con el dominio intracelular de los co-receptores CD4 y CD8 ((82-84)). Una vez fosforiladas las regiones ITAM, funcionan como

sitios de reclutamiento para otras proteínas con regiones SH2, como la cinasa ZAP-70, de la familia Syk. Esta cinasa se auto-fosforila y activa, y a su vez, es capaz de fosforilar a otras proteínas, entre las que se encuentra la proteína adaptadora LAT ((85, 86) y revisado en (87)). LAT posee sitios de reclutamiento para distintas proteínas, como Grb2, GADS, PLC γ -1, Itk y PI $_3$ K, que activan tres principales vías de señalización: la vía de las MAP cinasas (MAPK, “Mitogen Activated Protein kinase”), la movilización de Ca $^{2+}$ intracelular y el rearrreglo del citoesqueleto (revisado en (88)). Estas vías de señalización convergen en la activación de factores de transcripción involucrados en la activación y maduración de los linfocitos T (Figura 2).

La vía de las MAP cinasas es una cascada de vías de señalización que se caracterizan por la fosforilación sucesiva de cinasas capaces de actuar sobre tirosinas y/o serinas y treoninas, ó simplemente sobre serinas y treoninas. La vía está formada por una “cinasa activada por mitógenos” (MAPK, “mitogen-activated protein kinase”), una cinasa que fosforila a la MAPK en serina/treonina (MAKK, “MAP kinase kinase”) y una cinasa que fosforila y activa a esta última (MAPKKK, “MAP kinase kinase kinase”). Existen tres principales MAP cinasas: ERK-1 y2, P38 y JNK. La vía de las MAP cinasas se activa por el reclutamiento de Sos, un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF, “guanine exchange factor”), a la proteína adaptadora Grb2. Esta ubicación, cercana a la membrana, le permite activar a Ras (una proteína perteneciente a la familia de las GTPasas pequeñas), que a su vez, interacciona y activa a Raf-1, la primer cinasa en la vía (MAPKKK). Raf-1 activa a MEK-1 y 2 (MAKK), que a su vez activan a ERK-1 y 2 (MAPK). Por otro lado, P38 se activa por MEK-3, 4 y 6 (MAPKK) y JNK por MEK-4 y 7. Una vez fosforiladas, ERK, P38 y JNK

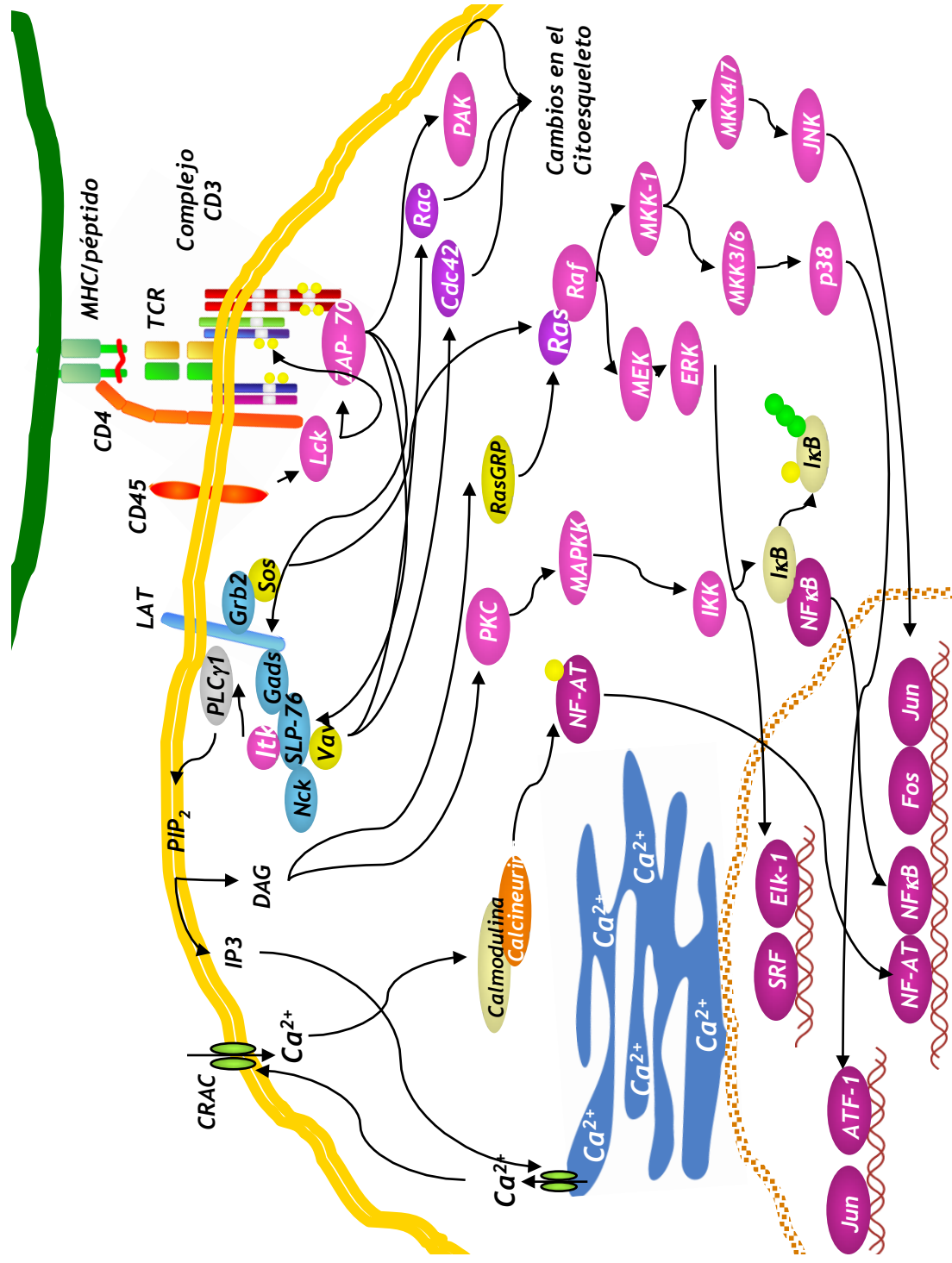


Figura 2. Vías de señalización a través del TCR. La interacción entre el TCR con el MHC/péptido induce la activación de tres vías principales: la vía de las MAP cinasas, la liberación de calcio intracelular y el rearrreglo del citoesqueleto. Estas vías convergen en la activación de factores de transcripción involucrados en la activación y maduración de los linfocitos T.

translocan al núcleo y activan diversos factores de transcripción como: Ets, Elk-1, NF-AT y el complejo AP-1 (Fos-Jun) (revisado en (89)).

La movilización de Ca^{2+} intracelular comienza con la activación de PLC γ -1 por Lck, ZAP-70 y las cinasas de la familia Tec: Itk y Rlk (90-92). La PLC γ -1 hidroliza el fosfatidil inositol difosfato (PI(4,5)P₂) presente en la membrana citoplásmica, en fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). El IP₃ se une a su receptor (IP₃R) en el retículo endoplásmico permitiendo la salida de Ca^{2+} presente en este organelo. El aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma activa canales localizados en la membrana celular, llamados canales CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels), y esto permite a su vez, una segunda entrada de Ca^{2+} al citoplasma del linfocito. El Ca^{2+} se une y activa a la fosfatasa de serina/treonina, Calcineurina, que actúa sobre el factor de transcripción NF-AT y permite su translocación al núcleo (revisado en (93, 94)).

Por otro lado, el DAG recluta a la cinasa de serina/treonina PKC- θ a la membrana en donde es activada por Lck. PKC- θ está involucrada en la activación de algunos miembros de la familia de las MAP cinasas como JNK y MKK4 (95). Adicionalmente, PKC- θ , así como PKC α , se han involucrado en la activación de IKK y la activación del factor de transcripción NF- κ B en respuesta a la activación del TCR y la co-estimulación por CD28 (96). El DAG recluta también al factor intercambiador de nucleótidos de guanina RasGRP (Ras guanyl nucleotide-releasing protein), que a su vez, activa Ras y consecuentemente, la vía de las MAP cinasas (97).

El re-arreglo del citoesqueleto es también un evento imprescindible en la señalización del TCR ya que está involucrado en mantener la estabilidad de la interacción del complejo TCR/MHC-péptido favoreciendo la formación de una sinapsis inmunológica

madura (revisado en (98, 99)). El rearrreglo del citoesqueleto comienza con la interacción de la molécula adaptadora SLP-76 con LAT, que a su vez recluta al intercambiador de nucleótidos de guanina, Vav y quien es fosforilado por ZAP-70. Vav se asocia con las proteínas ancladoras de membrana Vinculina y Talina, quienes están involucrados en la unión de F-actina a la membrana. Vav activa además al complejo Wasp/Arp2/3 a través de la GTPasa Cdc42, iniciando el proceso de polimerización de actina (revisado en (100)).

d. Modelos de selección de los linfocitos T “naïve” y nTregs.

Los procesos de selección positiva, negativa y la elección de linaje, garantizan que el repertorio de linfocitos T sea capaz de reconocer antígenos extraños presentados por moléculas del MHC propio, pero al mismo tiempo, permite erradicar la mayoría de las clonas auto-reactivas que podrían causar daño al propio organismo.

Existen diversos modelos en los que se plantean diferencias en las características de las señales que inducen uno u otro evento de selección y que podrían ayudar a entender también los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación al fenotipo regulador.

i. *Selección positiva y selección negativa*

Para la selección positiva/negativa se propusieron dos modelos para la discriminación de las señales: un modelo cualitativo, que proponía que péptidos excluyentes inducían señales distintas capaces de promover ya sea la selección positiva o la selección negativa de las clonas; y el modelo cuantitativo o de “afinidad”, que proponía que

señales de baja avides, seleccionaban positivamente, mientras que péptidos de alta avides, seleccionaban negativamente (revisado en (101)).

El modelo cualitativo fue apoyado por estudios en los que mediante la interacción con péptidos no estimulatorios (antagonistas) se seleccionaban positivamente a los timocitos; mientras que la interacción con péptidos agonistas, inducían delección clonal (102). Estudios adicionales demostraron que la interacción de péptidos alterados podían transmitir señales “cualitativamente” distintas y que estas señales repercutían en la fosforilación de la cadena TCR ζ y la activación de la cinasa ZAP-70 (103).

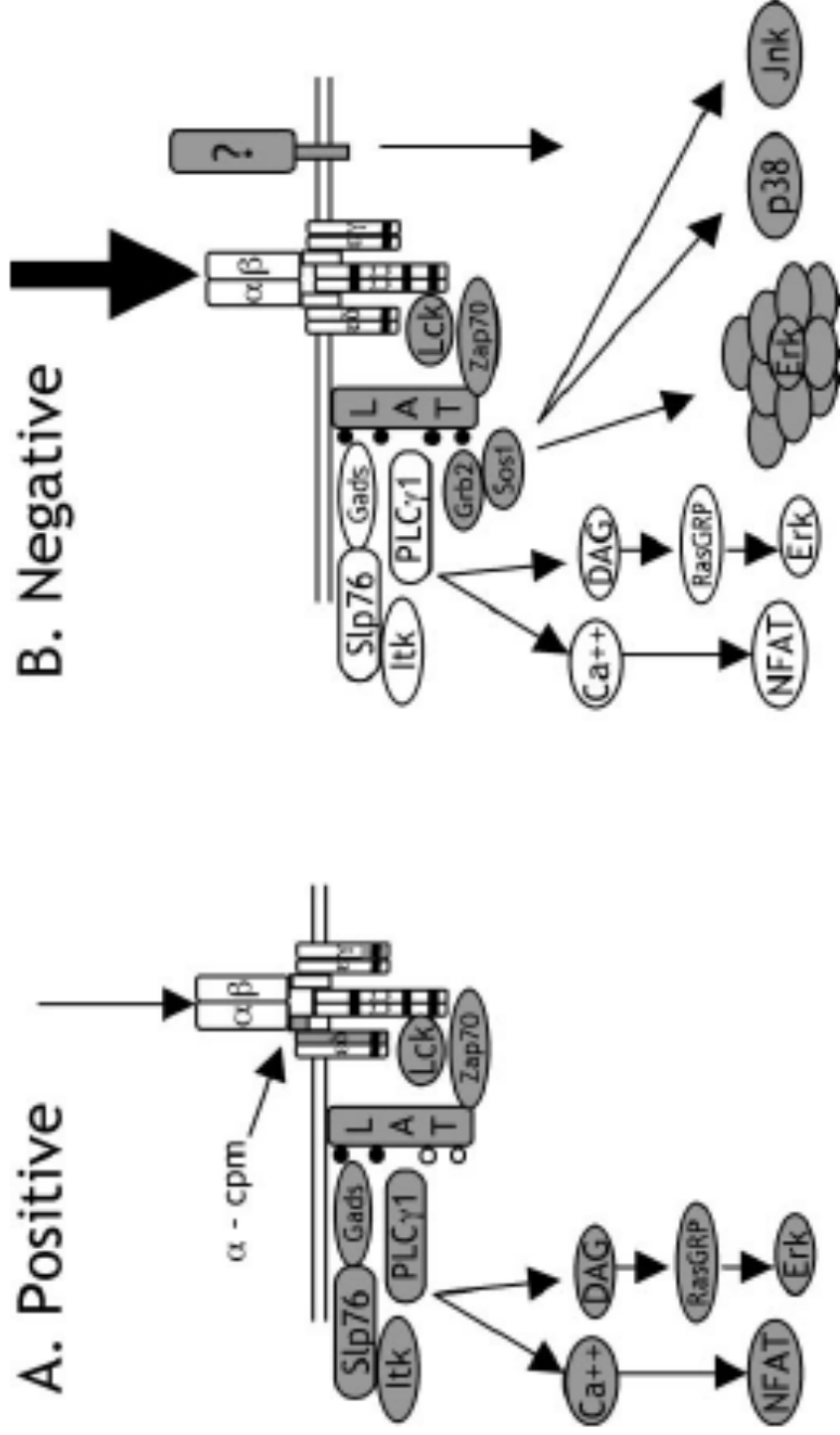
El modelo “cuantitativo” o “de avides” no sólo tomaba en consideración las señales transducidas por el TCR, sino también otras señales como las de las moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión y algunos factores de crecimiento que se encuentran dentro del ambiente tímico durante la maduración de los timocitos. De esta manera, señales de alta avides inducidas por una alta concentración de péptido o una baja concentración de un péptido de alta afinidad, podrían inducir la muerte de los timocitos. Por el contrario, altas concentraciones de los péptidos de baja afinidad, las células serían seleccionadas positivamente, puesto que mantendrían un nivel de avides bajo (104, 105).

Para intentar entender el mecanismo molecular a través del cual el TCR puede discriminar las señales que inducen selección positiva versus negativa, se analizaron las características a nivel de señalización del TCR que podrían definir el destino de las células. A nivel de fosforilación del complejo TCR ζ /CD3 (106), como se mencionó anteriormente, el nivel de fosforilación de la cadena TCR ζ es mayor en presencia de ligandos que seleccionan negativamente, mientras que se observa una fosforilación parcial en presencia de ligandos que inducen selección negativa (106). Otros trabajos demuestran que existe una

fosforilación diferencial en presencia de péptidos asociados a la selección positiva. En este caso, la eliminación del péptido de conexión de la cadena TCR α (α CPM, “ α connecting peptide”) o la cadena CD3 δ afectan la selección positiva pero no tiene efecto en la selección negativa (107), a pesar de que otros autores demostraron que la deficiencia en la cadena CD3 δ afecta tanto a la selección positiva como a la negativa (108).

Con respecto a moléculas cascada abajo en la señalización del TCR, se ha propuesto que la fosforilación de la proteína adaptador a LAT juega un papel importante en la definición de las señales que inducen selección positiva versus negativa. Una de las moléculas cruciales que se reclutan a LAT y tienen un papel importante en este evento de selección es la PLC γ -1, ya que al eliminar el sitio de anclaje de esta fosfolipasa se afectan ambos procesos de selección (109). Por otro lado, el análisis de los ratones heterocigotos para la deleción de Grb2 (Grb2 $^{+/-}$) se demostró que esta proteína no era requerida para la selección negativa pero sí para la selección positiva. Estos estudios proponen que la interacción con péptidos relacionados con señales de selección positiva inducen una fosforilación parcial de LAT, con lo que se permite la activación de la vía de PLC- γ 1, la producción de DAG y la inducción de flujos de calcio (110). Estos eventos son capaces de activar RasGRP e inducir una activación baja y sostenida de ERK y NF-AT. Por otro lado, la interacción del TCR con péptidos que inducen selección negativa muestran una fosforilación completa de LAT, el reclutamiento del complejo Grb2/Sos y con ello una activación fuerte, pero transitoria de las tres vías de las cinasas MAP: Erk, P38 y JNK (revisado en (78)) (Figura 3).

Crabtree y colaboradores, han aportado datos importantes que ayudan a comprender los mecanismos moleculares involucrados en la selección positiva: mediante el



Modificado de Starr, et al. Annu. Rev. Immunol. 2003.

Figura 3. Diferencias en la activación de vías de señalización durante la selección positiva y negativa. La interacción con péptidos relacionados con señales de selección positiva, induce una fosforilación parcial de LAT que permite la activación de la vía de PLC- γ 1, la producción de DAG y la inducción de flujos de calcio. Estos eventos son capaces de activar RasGRP y una activación baja y sostenida de ERK y NF-AT. Por otro lado, la interacción del TCR con péptidos que inducen selección negativa, muestran una fosforilación completa de LAT, el reclutamiento del complejo Grb2/Sos y con ello una activación fuerte, pero transitoria de las cinasas MAP: Erk, P38 y JNK.

análisis de ratones deficientes de Calcineurina y el factor de transcripción NF-AT, que carecen de una subpoblación de timocitos “pre-seleccionados” con una mayor capacidad de activar Erk y presentan una disminución en la selección positiva. Demostraron que Calcineurina es requerida para la activación incrementada de Erk por péptidos de baja avidéz, por lo que es indispensable para la selección positiva pero no es necesaria para la selección negativa inducida por péptidos de alta avidéz (111).

Recientemente se describió una molécula cuya expresión está restringida al timo, Themis (“thymus-expressed molecule involved in selection”) y que parece tener un papel crucial en la selección positiva de los timocitos (112). Dos grupos de trabajo describieron que la deficiencia de Themis repercute en una menor proporción de timocitos CD4SP y CD8SP, sin embargo no tiene repercusión en procesos de selección negativa. En estos trabajos, la caracterización de Themis como una proteína con un dominio rico en prolina y con posibilidad de ser fosforilada en tirosina, la propone como un posible elemento en la vía de señalización del TCR, ya que en ambos trabajos describen su interacción con Grb2 (113, 114).

ii. ***Elección de linaje CD4 vs. CD8***

Con respecto a la elección de linaje CD4 vs. CD8, los primeros modelos se basaron en el estudio de ratones deficientes para las moléculas co-receptoras o las del MHC, así como algunas modificaciones a la expresión de las mismas (115-118) a partir de los cuales se propusieron también diversos modelos:

1. Modelo estocástico o selectivo

El modelo estocástico o selectivo propone que todos los timocitos “terminan” la expresión de uno de los co-receptores “al azar”, antes o durante la selección positiva y sólo aquellos timocitos cuyo TCR corresponda al co-receptor adecuado (TCR específico para MHC-I y CD8 ó TCR específico para MHC-II y CD4) podrán ser seleccionados positivamente. De otra manera, no serán capaces de recibir una señal de supervivencia y morirán por apoptosis (Figura 4A).

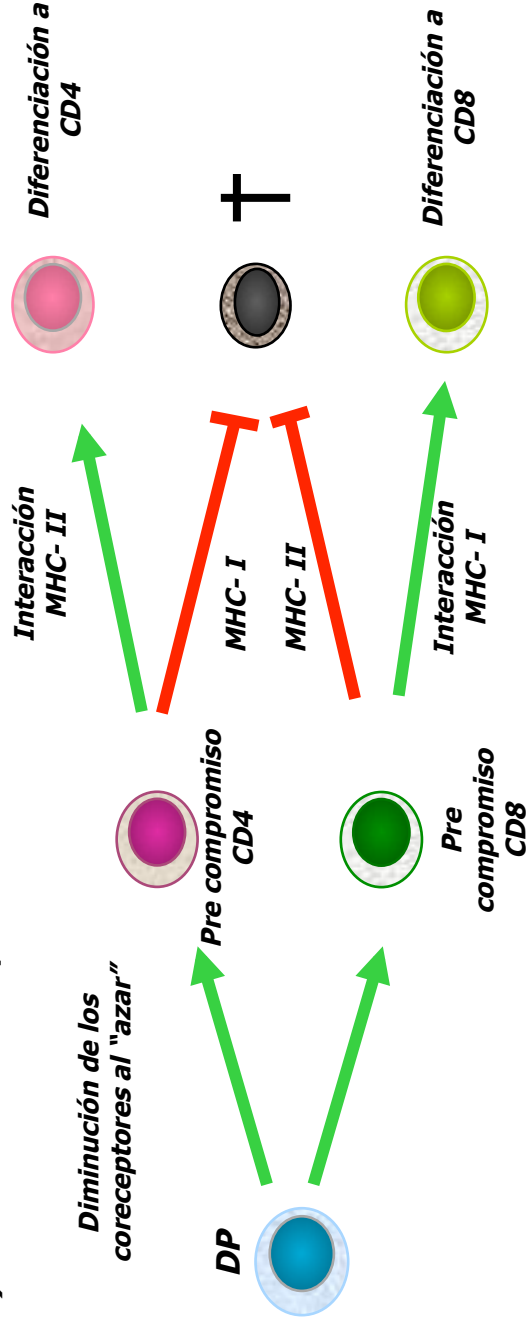
Este modelo fue propuesto basado en análisis de ratones deficientes para moléculas del MHC. En particular, ratones deficientes para MHC clase II mostraban una población intermedia de timocitos ($CD4^+CD8^{\text{bajo}}$). La población contraria ($CD4^{\text{bajo}}CD8^+$) se encontró también en los ratones deficientes para MHC clase I (119). La presencia de estas poblaciones apoyaba la idea de que la elección de linaje no dependía como primera instancia de la señalización inducida a través del TCR.

Un trabajo realizado por Leung y colaboradores, en el que se elimina la secuencia del silenciador de CD4 manteniendo la expresión de esta molécula en timocitos DP y CD8SP, determinó que existe una generación de linfocitos $CD8^+$ con fenotipo citotóxico (CTL) que mantienen la expresión de CD4 y que están restringidos a moléculas del MHC Clase II (120). Estos datos apoyaron el modelo de selección estocástico ya que la presencia del co-receptor CD4 no modifica el fenotipo final de los linfocitos en periferia.

2. Modelo instructivo

El modelo instructivo por su parte, propone que la señal transducida por la interacción del TCR/co-receptor/MHC/péptido dirige la elección de linaje. De esta manera,

A) Modelo Estocástico/Selectivo



B) Modelo Instructivo

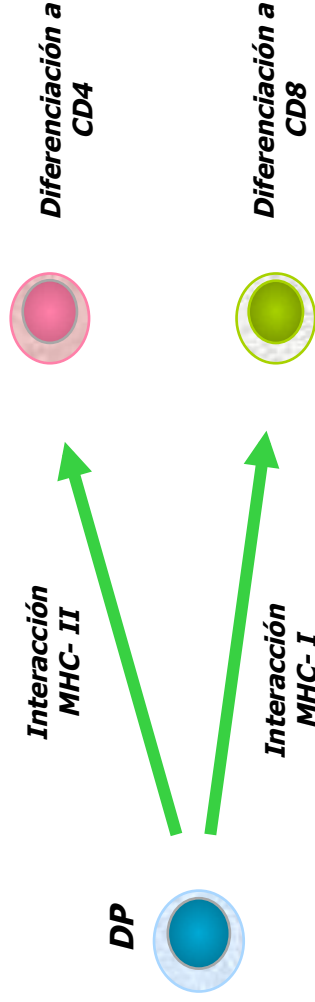


Figura 4. Modelos Instructivo y estocástico de la elección de linaje CD4 vs. CD8. A) El modelo estocástico o selectivo propone que todos los timocitos “terminan” la expresión de uno de los co-receptores “al azar”, antes o durante la selección positiva; y sólo aquellos timocitos cuyo TCR corresponda al co-receptor adecuado (TCR específico para MHC-I y CD8 ó TCR específico para MHC-II y CD4); podrán ser seleccionados positivamente. De otra manera, no serán capaces de recibir una señal de supervivencia y morirán por apoptosis. B) El modelo instructivo por su parte, propone que la señal transducida por la interacción del TCR/co-receptor/MHC/péptido dirige la elección de linaje. De manera que, un TCR restringido a moléculas MHC-II induce la regulación negativa de CD8, mientras que TCR específicos para moléculas MHC-I, “apagan” la expresión de CD4.

un TCR restringido a moléculas MHC-II induce la regulación negativa de CD8, mientras que TCR específicos para moléculas MHC-I, “apagan” la expresión de CD4 (Figura 4B).

Este modelo se basó en la observación que TCR's específicos para moléculas MHC clase II se diferenciaban a células CD4⁺, mientras que TCR's específicos para moléculas MHC clase I se diferenciaban a células CD8⁺ ((121-124) y revisado en (125)). Los primeros trabajos que apoyaron el modelo instructivo se basaban en el estudio de modelos deficientes para los co-receptores (CD4^{null}/CD8^{null} mice) en los que se observaba una falta de generación de células específicas para MHC-II y MHC-I, respectivamente (126, 127). También se observó que la expresión forzada de CD8 bajo el promotor de CD2, aumentaba la selección de células restringidas para MHC-I, sin afectar la diferenciación a CD4⁺ (128). Otros trabajos en los que expresaban mutantes de las cadenas CD8 α o CD8 β , mostraron una deficiencia en la generación de células CD8⁺ (126, 128, 129). Finalmente, diversos estudios en los que se intercambiaban los dominios transmembranales/citoplásmicos de CD8 colocando los de CD4 en ratones transgénicos para un TCR específico para MHC-I, se observó que se generaba un gran número de células TCR-específicas CD4⁺CD8⁻ con fenotipo “cooperador”. Todos estos datos apoyaban la teoría que el dominio citoplásmico del co-receptor era el responsable de la elección de linaje (130-132). Sin embargo, más adelante, la expresión de estos híbridos de CD8-CD4 en ausencia de la cadena CD8 α mostraron un gran número de células restringidas para MHC-I con fenotipo tanto “citotóxico” como “cooperador”, lo que sugería que el dominio citoplásmico de CD4, más que inducir una señal de elección de linaje, aumentaba la selección positiva (133).

Una versión modificada del modelo instructivo fue el modelo “asimétrico”, que proponía que la diferenciación al fenotipo CD4⁺ era un proceso que se llevaba a cabo

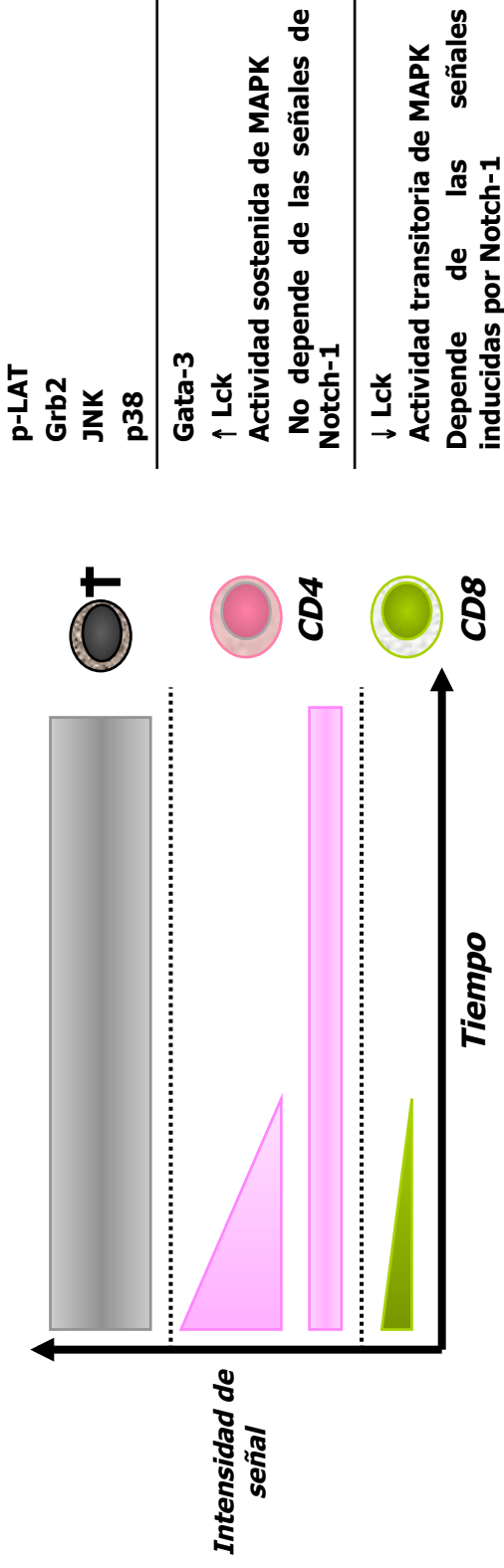
siempre y de manera independiente a la interacción con el MHC, mientras que la diferenciación a CD8⁺ requería tanto la expresión del MHC-I como su interacción con el TCR (129). Además, se describieron algunas señales específicas para CD8 que involucraban algunas moléculas independientes del TCR como Notch, una familia de receptores membranales involucrados en diversos procesos de elección de linaje (134). Sin embargo, posteriormente se describió que tanto el fenotipo CD4 como el CD8 requieren de señales independientes del TCR, como Notch, así como de citocinas y/o factores de transcripción específicos que serán descritos más adelante.

3. Modelo de intensidad de la señal (Signal-strength model)

Las evidencias con respecto al modelo instructivo no eran capaces de explicar la elección de linaje, ya que implicaba que las señales transducidas por la interacción de TCR con moléculas MHC-II debían ser “cualitativa-” o “cuantitativamente” diferentes de las transducidas por la interacción TCR/MHC-I para promover la diferenciación a los linajes CD4 y CD8, respectivamente. Es por esto que diversos estudios con diferentes modelos experimentales propusieron un modelo más preciso del modelo instructivo, conocido como “Modelo de intensidad de señal” (Signal strength model). En este modelo, la intensidad de la señal transducida a través del TCR es el factor que define la elección de linaje. Mientras que células que reciben señales fuertes inducen la diferenciación a CD4⁺, señales de baja intensidad inducen la diferenciación al fenotipo CD8⁺ (Figura 5A).

Este modelo fue inicialmente apoyado por ensayos en los que se inducía la diferenciación al linaje CD4⁺ por el entrecruzamiento del mismo con anticuerpos bi-

A) Intensidad de señal (Intensidad o duración de la señal)



B) Modelo de señalización cinética

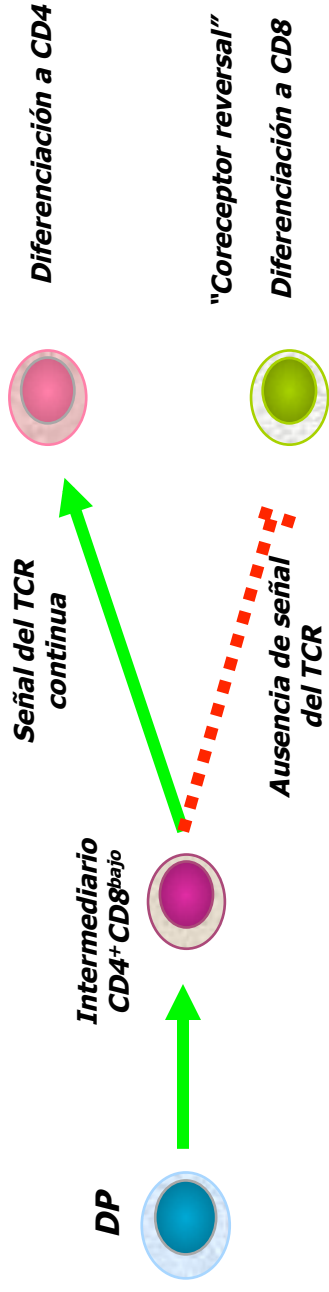


Figura 5. Modelos de la Intensidad de señal y señalización cinética de la elección de linaje CD4 vs. CD8. A) El modelo de intensidad de señal” (Signal strength model) propone que la intensidad de la señal transducida a través del TCR define la elección de linaje. Las células que reciben señales fuertes inducen la diferenciación a CD4⁺, mientras que señales de baja intensidad inducen la diferenciación al fenotipo CD8⁺. B) El modelo de señalización “cinética” propone que la “duración” de la señal transducida por el TCR determina la elección de linaje. En este modelo la señal del TCR induce la regulación negativa del co-receptor CD8, generando la población intermedia CD4⁺CD8^{bajo}, capaz de diferenciarse a ambos linajes. Si la señal continúa, se terminará la expresión de CD8 y se diferenciará a CD4⁺. Si la señal cesa, entonces se terminará la expresión de CD4 y reexpresará CD8, proceso llamado “conversión de co-receptor” (“Coreceptor reversal”).

específicos para CD3/CD4 ó CD3/CD8 (135). Este efecto era independiente de la interacción con el MHC y era menos eficiente cuando se entrecruzaba CD3 y CD8. En este mismo trabajo se demostró que la diferenciación al fenotipo CD8⁺ se obtenía entrecruzando solamente CD3 ((136) y revisado en (137)); lo que sugería que se requiere una mayor señal para diferenciar al fenotipo “cooperador”. Estos estudios demostraron adicionalmente que el entrecruzamiento con los anticuerpos anti-CD3 y CD4 inducían una mayor fosforilación de la cadena TCR ζ , CD3 ϵ , ZAP-70 (136) y la vía de las cinasas MAP (138); mientras que el entrecruzamiento con anti-CD3 exclusivamente, inducía sólo la fosforilación de TCR ζ y una fosforilación parcial de ZAP-70 (136). Más adelante, otros estudios contribuyeron a reinterpretar los resultados ya que al aumentar las concentraciones de anti-CD3 o la concentración de péptido en cultivos de timo, no se favorecía la diferenciación al linaje CD4⁺, pero se aumentaba la selección negativa (101, 139, 140).

4. Modelo de la duración de la señal

Germain y colaboradores propusieron el modelo de la duración de la señal con base en resultados en los que utilizaron un modelo de cultivo de timo de “dos-pasos”. En este modelo, el primer paso consiste en cultivar timocitos DP de un ratón TCR transgénico en presencia de péptidos que inducen selección positiva. Posteriormente, en el segundo paso, los timocitos “pre-activados” (DP CD69^{alto}) incubados en cultivos de re-agregación con células estromales deficientes para moléculas del MHC y se analizó la generación de poblaciones SP. Los autores concluyeron que el desarrollo dependía de la duración de la señal durante el primer contacto, mientras que la duración del segundo contacto era irrelevante (141, 142). Es decir, señales de larga duración inducen la diferenciación a CD4⁺,

mientras que señales de corta duración inducen la diferenciación a CD8⁺ (revisado en (143)). Adicionalmente, en este modelo se estudió el papel de Notch, una molécula relacionada con diversos eventos de elección de linaje y se concluyó que aunque su participación no era esencial para la diferenciación al linaje CD8; era necesaria para la maduración completa de los timocitos comprometidos al linaje CD8 (Figura 5A).

5. **Modelo de señalización “cinética” (“Kinetic signaling”)**

El modelo de señalización “cinética” fue propuesto por Singer y colaboradores; y también sugiere que la “duración” más que la “intensidad” de la señal transducida por el TCR determina la elección de linaje (revisado en (144)). La principal diferencia con respecto al modelo de Germain et. al. radica en que la señal del TCR induce una regulación negativa inicial del co-receptor CD8, generando la población intermedia CD4⁺CD8^{bajo}, descrita previamente (129). Esta población “pre-comprometida” es aún capaz de diferenciarse a ambos linajes y la diferencia dependerá del tiempo que persista la señal. Si la señal que recibe el timocito continúa, se terminará la expresión de CD8 y se diferenciará a CD4⁺. Si la señal cesa, entonces se terminará la expresión de CD4 y se volverá a expresar CD8, mediante un proceso llamado “conversión de co-receptor” (“Coreceptor reversal”) (Figura 5B). En estos ensayos, se utilizaron cultivos secuenciales en los que primero se estimularon los timocitos en presencia de PMA (Phorbol 12-myristate acetate) + Ionomicina (cultivo de estimulación) y posteriormente se incubaban en presencia de IL-7 (cultivos de recuperación) por 11 días. Estos ensayos también concluyeron que la diferenciación hacia el linaje CD8 requería de la presencia de IL-7 y que la señalización inducida por esta citocina era inhibida por el TCR.

Algunas de las aseveraciones de este modelo son: 1) la intensidad de señal determina el número de timocitos que serán seleccionados, mientras que la duración de la señal, determinará el linaje al cual se diferenciarán. 2) El tiempo que se mantenga el co-receptor en la interacción TCR/MHC/péptido definirá el linaje, más que el co-receptor *per se*. 3) La duración de la señal dependerá principalmente de la afinidad del TCR por su ligado, de manera que TCR's de baja afinidad se diferenciarán a linaje CD8, mientras que TCR's de afinidad intermedia se diferenciarán al linaje CD4. Esto último, siempre y cuando el co-receptor esté presente en la interacción para mantener una señal más alta que la que induce la diferenciación al linaje CD8. Finalmente, TCR's de alta afinidad, se diferenciarán al fenotipo CD4, aún cuando el co-receptor no esté presente en la interacción (144) (Figura 5B).

6. *Análisis Bioquímico de la elección de linaje*

Para entender los mecanismos que definen la elección de linaje es importante describir las diferencias a nivel de las características del complejo TCR/co-receptor/MHC/péptido y de las vías de señalización que se inducen por esta interacción en presencia de uno u otro de los co-receptores.

a. *Los co-receptores y su asociación a Lck*

Los co-receptores tienen dos funciones principales en la interacción TCR/MHC: 1) estabilizar la interacción TCR/MHC/péptido, ya que reconocen regiones no polimórficas en la molécula del MHC ((145) y revisado en (146)); y 2) reclutar al complejo de señalización TCR ζ /CD3, a la cinasa Lck, mediante la interacción no covalente del dominio citoplásmico

de los co-receptores con las cisteínas C²⁰ y C²² de la región N-terminal de esta cinasa (82-84). Con respecto a este último punto, se ha descrito que la cinasa Lck se asocia de manera más eficiente a la molécula de CD4 que a CD8 (25% vs. 2% respectivamente en células en estadio DP)(147), además de que aproximadamente el 40% de las moléculas de CD8 expresadas en el timo murino son variantes de “splicing” alternativo que no pueden asociarse a Lck (ya que carecen del dominio intracelular de CD8 α) (148, 149). En base a estas observaciones, se ha propuesto que las señales transducidas por el TCR en presencia de CD4 son más “fuertes/intensas” comparadas con las inducidas en presencia de CD8. Esta teoría es apoyada por estudios en los que se expresa una mutante activa de Lck en timocitos restringidos para MHC-I. La expresión de esta mutante genera una señal “fuerte” y polariza la diferenciación al fenotipo CD4⁺, mientras que la expresión de una mutante negativa, induce una señal “débil” y promueve la diferenciación al linaje CD8⁺ (150). Adicionalmente, el análisis de ratones deficientes para Csk, un regulador negativo de Lck y Fyn (151), muestra una mayor actividad de estas cinasas y una mayor diferenciación al linaje CD4⁺ independientemente de la especificidad del TCR. Sin embargo, en estos trabajos concluyen que se requiere necesariamente la activación de Fyn y Lck para lograr este efecto (152, 153).

b. La vía de las MAPK

La vía de las MAPK es una vía compartida para diversas funciones celulares que convergen en la regulación de la expresión genética y su papel en la selección positiva y negativa ha sido ya previamente descrito (revisado en (78)). Sin embargo, su papel en la elección de linaje no ha sido bien caracterizado ya que algunos proponen que esta vía en

imprescindible para la diferenciación a ambos linajes mientras que otros apoyan que es importante sólo para la elección a linaje CD4. Dentro de los trabajos que apoyan la primer postura se encuentran algunos en los que se expresan mutantes negativas de Ras o MEK (154-156) o modelos deficientes de RasGRP (97), en cuyo caso se observa una falta de selección positiva de ambos linajes. Con respecto a la segunda teoría, existe evidencia de que esta vía es importante para la diferenciación de CD4: 1) la expresión de mutantes hiperactivadas de Erk promueven la diferenciación a linaje CD4 (157); 2) el uso de inhibidores de MEK 1/2 genera un menor número de timocitos CD4SP en cultivos de timo fetal (157-159); 3) la expresión de mutantes activas de MEK-1 incrementa la diferenciación a linaje CD4 (160). Estos datos apoyan la teoría en la diferenciación a CD4 requiere de una activación mayor o sostenida de la vía de las cinasas de MAP que la diferenciación a CD8.

Finalmente, a nivel de factores de transcripción relacionados con la vía de las cinasas MAP, se ha descrito que Egr-1 (“Early growth response-1”) es uno de los primeros factores de transcripción que se activan en respuesta a la señalización del TCR en timocitos DP (161). De manera interesante, estudios en los que se sobre-expresa este factor de transcripción, se ha observado una mayor selección positiva (162), mientras que si se elimina la expresión de éste en ratones deficientes, se disminuye este proceso de selección (163). Esto sugiere un papel importante en el proceso de selección positiva, aunque su papel en la elección de linaje no ha sido todavía definido.

c. Señalización a través de Notch

Notch es una familia de receptores transmembranales tipo-I altamente conservados que han sido involucrados en la regulación de diversos procesos de elección de linaje

celular (164). Esta familia de receptores fue descrita inicialmente en *Drosophila* y se relacionaban con decisiones de linaje de las células neurales y epidermales. En este organismo se ha descrito un receptor Notch y 2 ligandos (Delta y Serrate), mientras que en mamíferos se describieron 4 receptores (Notch1-4) y 7 ligandos (3 Delta-like, 2 Serrate-like y 2 Jagged). La expresión en timo de ratones se encuentra definida de la siguiente manera: los 4 receptores están expresados en tanto en timocitos y como en células estromales ; mientras que los ligandos, Jagged-1 y -2, Delta-like- 1 y -3 se expresan en células del estroma tímico. Por otro lado, los timocitos expresan los ligandos Jagged-1 y todos los ligandos Delta-like (165).

La cascada de señalización de esta vía inicia con la interacción de Notch y su ligando. Esta interacción induce el corte en dos sitios de Notch. El primero libera el dominio extracelular, mientras que el segundo, libera el dominio intracelular (NotchIC) (revisado en (166)). Este fragmento entonces es translocado al núcleo, donde activa la transcripción de los genes HES (Hairy/Enhanced of Split) que codifican para las proteínas bHLH (Basic helix-loop-helix) (revisado en (167)), involucradas en la represión de diversos genes.

Con respecto al desarrollo de los linfocitos, la vía de Notch se ha relacionado con los diversos procesos de elección de linaje (revisado en (168)). En la elección de linaje a linfocitos B o T, se ha descrito que Notch juega un papel importante en la diferenciación a linaje T, ya que en ausencia de Notch-1, las células que llegan al timo se diferencian a linaje B (169). De la misma manera, si se expresan las formas activas de Notch (NotchIC) (170), o su ligando Delta-4 (171, 172) en precursores de médula ósea, la diferenciación se polariza al linaje T. Este mismo efecto se observa en ratones que sobre-expresan los blancos de Notch, Hes-1 y -5 (173).

A nivel de diferenciación a linaje $T\alpha/\beta$ vs $T\gamma/\delta$, la función de Notch no está bien definida. Algunos trabajos proponen que la señalización a través de Notch es crucial para pasar la selección β , ya que al expresar mutantes activas de Notch (Notch1CN) en ratones deficientes para TCR β (TCR $\beta^{-/-}$) se induce la maduración al estadio DP. Sin embargo este efecto no se observa en ratones Rag $^{-/-}$. Además, cuando se reconstituye médula ósea con sólo una copia funcional de Notch-1, se promueve la diferenciación a linaje α/β a expensas del linaje γ/δ (174).

Finalmente, con respecto a la elección de linaje CD4 vs. CD8, inicialmente se propuso que la señalización de Notch inducía la diferenciación a linaje CD8 $^{+}$, ya que ensayos en los que se expresaba la Notch-1 IC , bajo el promotor de Lck, se generaba una mayor proporción de timocitos CD8SP (134). Sin embargo, otros grupos, utilizando también modelos en los que se expresaba esta forma activada de Notch-1, observaron una mayor proporción de ambos linajes (175, 176). Posteriormente, análisis de ambos modelos, probaron que se generaba un mayor número de timocitos CD8SP y un menor número de CD4SP, apoyando el modelo en que Notch es importante para promover la diferenciación del linaje CD8 $^{+}$ (177). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que Notch, más que determinar el linaje de los timocitos, contribuye a aumentar la señalización del TCR. En estudios en los que se han eliminado los genes para las dos presenilinas (PS1 y PS2) involucradas en la liberación del dominio intracelular de Notch, en timocitos que expresan un TCR específico, se observa una menor proporción de timocitos CD4SP, así como una menor señalización a través de este TCR. Así mismo, observan que este fenómeno se observa en presencia de TCR's de mediana/baja afinidad, ya que al expresar un TCR de alta afinidad, se compensa la falta de señalización observada por la carencia de ambas presenilinas ((178) y revisado en (179)).

d. Factores de transcripción

Así como se han asociado diversas vías de señalización a los eventos de selección positiva, negativa y la elección de linaje, estas vías de señalización convergen en la activación de genes, por lo que se han descrito diversos factores de transcripción involucrados en estos procesos de selección.

En cuestión de elección de linaje CD4 versus CD8, se han descrito diversas regiones de regulación para ambos genes (revisado en (180-184)), así como factores de transcripción asociados a la represión o el mantenimiento de los genes. En términos de represión, se han asociado diversos factores de transcripción al silenciamiento del gen de CD4, entre ellos se encuentran RUNX-3, HES- 1 y SAF. Las proteínas de la familia RUNX están definidas por dominios de unión al DNA conocidos como dominios “Runt”; y en mamíferos, contienen 3 miembros (RUNX-1 al 3) de los cuales, sólo RUNX-3 se ha asociado al silenciamiento de CD4 durante la elección de linaje (185). Por su parte, HES-1 se une a la región S1 del silenciador de CD4 y su activación se ha asociado a las señales inducidas por Notch (186, 187). Sin embargo, su papel en la elección de linaje aún no se define, ya que la eliminación de esta proteína en cultivos de timo fetal no alteró la función del silenciador (188). Finalmente, se ha descrito que el factor de transcripción SAF (Silencer-associated factor), cuya expresión se observa en todos los linfocitos T, se encuentra exclusivamente asociado al núcleo en aquellos timocitos que han terminado la expresión de CD4 (189).

Otro factor de transcripción asociado a la elección de linaje es GATA-3. A nivel de timo, este factor de transcripción está expresado principalmente en timocitos CD4SP y en la población transicional CD4⁺CD8^{bajo} y se expresa poco en timocitos CD8SP y CD4^{bajo}CD8⁺ (190). Así mismo, la sobreexpresión de esta proteína en cultivos de timo fetal induce la

polarización al fenotipo CD4SP (191), mientras que la eliminación de éste en un modelo de “knock out” condicionales elimina la diferenciación a CD4SP sin afectar a la población CD8SP (192). GATA-3, por otro lado, es capaz de activar la expresión del factor de transcripción ThPOK, mediante la unión a su promotor (193). Por su parte, ThPOK ha sido descrito como un regulador importante de la diferenciación al linaje CD4 por dos mecanismos: 1) evita la activación del silenciador de CD4 (194) y 2) suprime la expresión de Runx-3, previamente descrito como un factor importante en el silenciamiento de CD4 (195). Adicionalmente, Kappes y colaboradores, describieron recientemente la activación de ThPOK en respuesta al entrecruzamiento con anticuerpos anti-TCR de timocitos inmaduros (196).

e. Contribución de las citocinas y quimiocinas

Recientemente, Singer y colaboradores, analizaron en detalle el papel de IL-7 en la elección de linaje y asociaron la señalización mediada por esta citocina a la activación del factor de transcripción Runx-3 (197). Los autores propusieron un modelo de “dos pasos” que apoya el modelo cinético de la elección de linaje en la que, en un primer paso, los timocitos reciben una señal del TCR durante la selección positiva y esto los diferencia a una población intermedia CD4⁺CD8^{bajo}. A partir de este punto, el segundo evento de diferenciación depende de si la señal del TCR persiste o se termina. En el primer caso, las células se diferencian a CD4SP involucrando la activación de factores de transcripción como GATA-3 y ThPOK. Si la señal del TCR termina, los timocitos deben ser “rescatados” por señales secundarias, inducidas por citocinas como IL-7 y éstas señales a su vez, activarán al factor de transcripción Runx-3 (Figura 6).

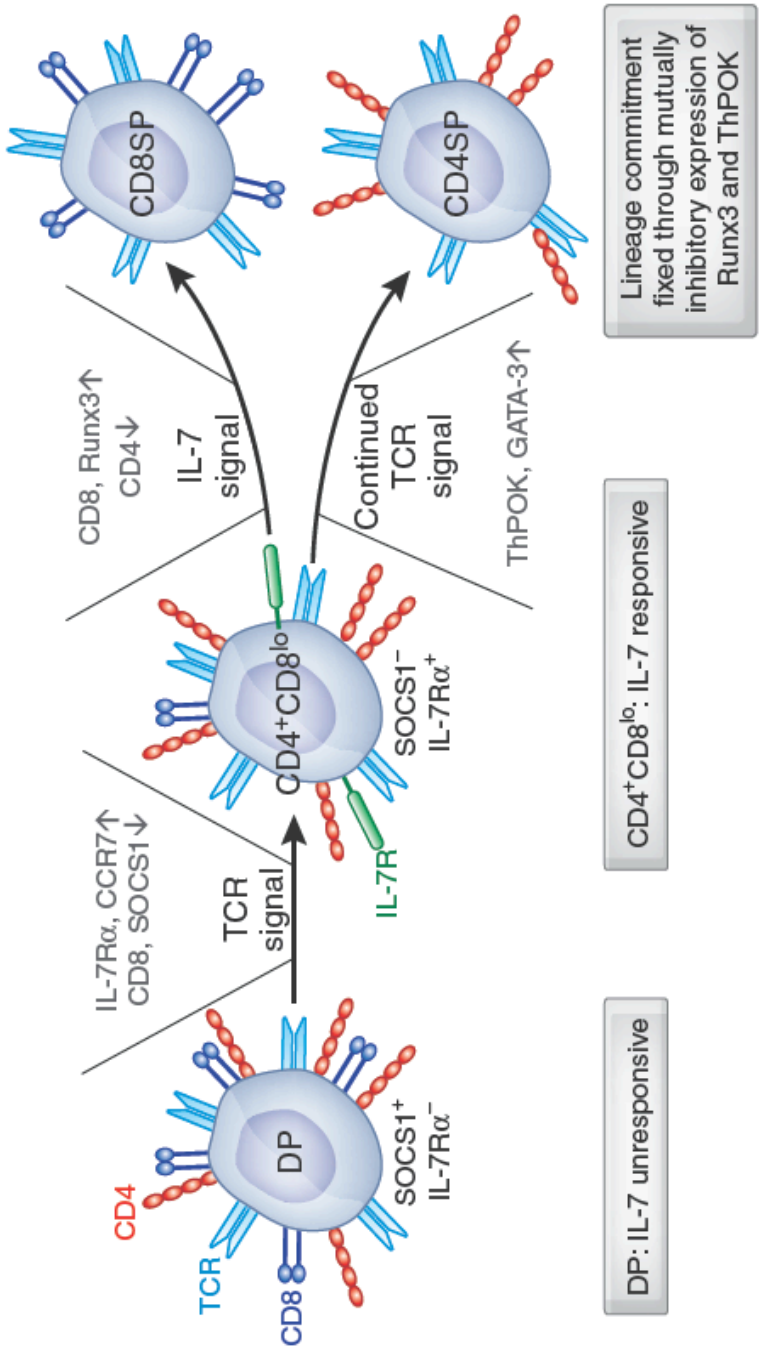
También se han asociado los eventos de selección positiva con la migración de los timocitos de la corteza a la médula. En particular, el receptor de quimiocinas CCR7, que se sobreexpresa durante la selección positiva, y sus ligandos, CCL19 y CCL21, que son preferentemente expresados en la médula y cuya deficiencia altera la localización de las subpoblaciones DP y CD4SP/CD8SP en el timo. Recientemente, el grupo de Robey describió que la diferenciación de los timocitos DP al linaje CD8 se asocia con una mayor expresión de CCR7 en los timocitos CD8SP, ya que la sobreexpresión de CCR7 en timocitos restringidos para MHC-Clase II promueve la diferenciación de éstos al fenotipo CD8SP. Así mismo, observan que este aumento de CCR7 se asocia con una disminución en la expresión del factor de transcripción ThPOK (198).

iii. Selección de células nTregs

Para la maduración de los linfocitos T se ha propuesto que péptidos que seleccionan positivamente a los timocitos inducen una activación parcial y temporal de las vías de señalización, mientras que péptidos que inducen selección negativa, activan de manera total y sostenida estas vías.

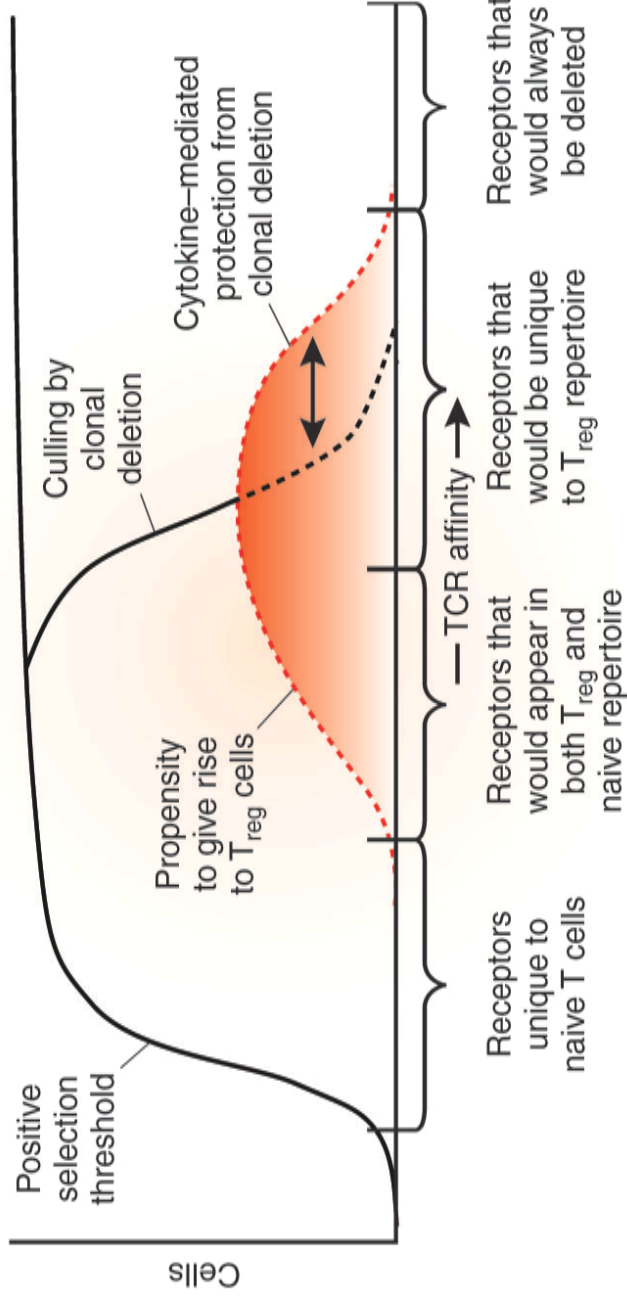
En el caso las células T reguladoras “naturales”, los mecanismos moleculares que determinan la diferenciación a este linaje no se han definido aún. Sin embargo, mucha de la evidencia sugiere que las células T reguladoras requieren de señales de alta avidez/intensidad para ser seleccionadas (199, 200), pero sin que éstas alcancen los umbrales que inducen selección negativa (14) (Figura 7).

Para las células T reguladoras, diversas observaciones a nivel de la señalización del TCR apoyan la teoría de una señalización aumentada pero modulada. Por un lado, la



Gascoigne, N. Nat. Immunol. 2010.

Figura 6. Modelo de los dos señales y papel de IL-7 en la elección de linaje. El modelo de dos pasos propone que una señal inicial por el TCR prediferencia a las células a una subpoblación CD4⁺CD8^{lo}. El segundo paso de diferenciación depende de si la señal del TCR persiste o se termina. En el primer caso, las células se diferencian a CD4SP involucrando la activación de factores de transcripción como GATA-3 y ThPOK. Si la señal del TCR termina, los timocitos deben ser “rescatados” por señales secundarias, inducidas por citocinas como IL-7 y éstas señales a su vez, activarán al factor de transcripción Runx-3.



Nature Immunol. 2009. 10 (6): 565.

Figura 7. La afinidad en la selección de células T reguladoras “naturales”. La evidencia con respecto a la generación de células T reguladoras propone que éstas células requieren de señales de alta avides/intensidad para ser seleccionadas. Sin embargo, estas señales no deben alcanzar los umbrales que induzcan la selección negativa de estas clonas. Adicionalmente, se muestra que la diversidad de receptores pueden o no ser compartidos por las células T reguladoras y las células efectoras.

expresión de TCR's transgénicos en presencia de ligandos expresados por el estroma tímico durante la maduración de timocitos induce, en algunos reportes, un aumento en el número de células Tregs, lo que sugiere que estas señales promueven el fenotipo regulador (201). Sin embargo, otros trabajos han reportado sólo un aumento en la proporción de estas células, proponiendo que este aumento relativo es causa de la delección incrementada por alta especificidad de los receptores y la presencia de estos péptidos (202).

A nivel de transducción de señales se ha observado que existen diferencias entre la población reguladora y su contraparte naïve. En estudios en los que se analizó la fosforilación de diversas moléculas en la vía de señalización del TCR, se observó una mayor fosforilación de la cadena TCR ζ en células CD4⁺CD25⁺ en comparación con las células CD4⁺CD25⁻ (incremento de 1.5–4) (203). Cascada abajo, la reducción o eliminación de señales a través de la interacción de LAT/PLC γ -1 y la consecuente activación de la vía de Erk alteran la generación de las células T reguladoras. Ejemplo de ello son los ratones que tienen una mutación en la Y136 de LAT (sitio de unión de PLC γ 1). Estos ratones poseen un fenotipo autoinmune debido a la ausencia de estas células en la periferia (204). Para la vía de Raf/Mek/Erk, la expresión de mutantes negativas de Raf, afectan la selección de las células T reguladoras (205); sin embargo en este trabajo concluyen que este efecto es debido a una menor selección positiva, como estaba previamente descrito. Más adelante, el análisis de ratones deficientes de RasGRP (RasGRP^{-/-}) muestra una discreta disminución en el número de células T reguladoras en comparación con las células naïve, además de una menor expresión del TCR y CD5, lo que sugiere una diferenciación parcial de esta subpoblación (206). Estos datos concuerdan con los modelos de selección positiva y negativa en los que la fosforilación de LAT y en este caso, la participación de RasGRP-1,

poseen un papel importante en el reclutamiento de moléculas cascada abajo y la inducción de muerte o supervivencia de los timocitos.

CD5 es una molécula que se encuentra expresada en las células T y B tanto en estadios tempranos de maduración como en células de la periferia y se encuentra asociado a sus respectivos receptores (207, 208). A nivel de diferenciación de los timocitos, se ha descrito que CD5 funciona como un regulador negativo de las señales inducidas a través del TCR (209), sugiriendo que podría rescatar aquellas células que expresen receptores de alta afinidad. Análisis recientes de ratones deficientes para esta molécula realizados en nuestro laboratorio, describen que existe un enriquecimiento de las células T reguladoras en ausencia de esta molécula, así como un mayor índice de apoptosis de las células T naïve. Así mismo, se observó una fosforilación aumentada de Erk y disminuida de AKT en respuesta a la activación con anti-CD3 + anti-CD28 (210).

También se ha observado que la ausencia de reguladores negativos del TCR juegan un papel importante en la generación de las células T reguladoras. Uno de ellos es SHP-1, una fosfatasa involucrada en establecer los umbrales de señalización del TCR relacionados con la selección positiva y negativa de los timocitos. En este caso, ratones deficientes para SHP-1 muestran un incremento en el porcentaje de las Tregs (211).

Además de las señales transducidas por el TCR, otras moléculas como son las coestimuladoras y las citocinas poseen un papel importante en la generación/mantenimiento de las Tregs. Se ha descrito que ratones deficientes en CD28 y sus ligandos B7-1/2, tienen un menor número de células Tregs (212, 213). Por otro lado, algunos trabajos reportan que la deficiencia de CTLA-4 no afecta la generación y/o activación de las células T reguladoras (214); sin embargo, datos más recientes en los que

se sobreexpresa esta molécula, muestran un número reducido de células Tregs en periferia ((215) y revisado en (216, 217)).

También se ha descrito que las citocinas poseen un papel importante en la generación y/o mantenimiento de las células T reguladoras. Entre las más importantes está la interleucina 2 (IL-2), así como su receptor (218) y la vía de señalización asociada a ésta (IL-2R α , IL-2R β , la cadena gamma común, asociada a los receptores de citocinas (γ_c) (219), JAK-1, JAK-3 (219) y STAT-5 (220)). Ya que la deficiencia de alguna de estas proteínas repercute en una falta de células T reguladoras y en la expresión de Foxp3. IL-2 es importante para mantener la expresión de este factor de transcripción en la periferia, pero parece no ser crucial en la generación de estas células en el timo (221). Por tanto, se propuso que otras citocinas, también asociadas a la cadena γ_c , como IL-7 o IL-15, podrían contribuir en este proceso de selección (218). Con respecto a estas citocinas, la evidencia sugiere que no son necesarias para la diferenciación de las células T reguladoras, ya que la ausencia de ellas no disminuye de forma considerable esta subpoblación. Sin embargo, se ha descrito el papel del receptor de IL-7, en particular la cadena IL-7R α . Ya que en ratones deficientes de esta cadena no se generan células T Foxp3⁺. En otros ensayos se demostró que en ausencia de las señales por IL-2, esta cadena aumenta su expresión, lo que sugiere un mecanismo de compensación (222). Por otro lado, la citocina TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), cuyo receptor comparte la cadena α del receptor de IL-7, es capaz de inducir la generación de células Tregs *in vitro* en ausencia de células dendríticas (223). Sin embargo, los ratones deficientes para esta el receptor de esta citocina (TSLPR) no muestran una disminución significativa de esta población; lo que apoya que tanto IL-7 como TSLP son redundantes en este proceso (224).

En conclusión, el conjunto de estas vías modifica los diversos procesos de supervivencia, delección o elección de linaje; y aún cuando estos datos sugieren que la intensidad/duración de las señales, en conjunto, son una característica en estos eventos, no se ha definido claramente cuáles son las señales determinantes en estos procesos.

VI. Hipótesis

Existen vías de señalización específicas que determinan la diferenciación al fenotipo de células T reguladoras. Estas señales se traducen en patrones de fosforilación particulares que serían compartidos por las células T reguladoras “naturales” y las células T reguladoras antígeno-específicas.

VII. Objetivo general

Determinar las vías de señalización involucradas en la diferenciación tanto de células T reguladoras antígeno-específicas en un modelo transgénico, como de células T reguladoras “naturales” en ratones silvestres.

VIII. Objetivos particulares

- a. Analizar la cinética de generación de células T reguladoras en un modelo transgénico antígeno-específico durante su maduración en el timo.
- b. Analizar los patrones de fosforilación en células reguladoras antígeno específicas, en presencia o ausencia del autoantígeno durante su selección, en condiciones basales y de activación.
- c. Analizar los patrones de fosforilación en condiciones basales y de activación en las células T reguladoras “naturales” (nTreg).
- d. Establecer un modelo de inducción de señalización por el TCR que nos permita activar específicamente distintos componentes del complejo TCR/CD3 y del co-receptor CD4, para modular las señales del TCR durante el desarrollo de los timocitos.

V. Justificación

Existe controversia acerca de las señales involucradas en la diferenciación de las células reguladoras en el timo. Aunque existe evidencia que apoya el modelo de la avidéz de la señal, donde la intensidad de la señal transducida por el TCR tiene un papel crucial en la diferenciación de los linfocitos T reguladores en el timo, también existen reportes recientes que sugieren que el enriquecimiento de células T reguladoras observado en modelos murinos donde se incrementa la señal del TCR, es debido a un cambio en la relación entre las células T naïve y las células T reguladoras, donde éstas últimas, presentan mayor resistencia a la muerte inducida por exceso de señal que las células T naïve, más que en una generación de células T reguladoras *de novo*. Además, no existe información sobre las vías de señalización involucradas en la selección de T reguladoras antígeno-específicas. Debido a que la selección de las células reguladoras naturales (nTregs) puede producirse tanto en la corteza como en la médula, mientras que la expresión de autoantígenos en modelos transgénicos controlada ha sido dirigida utilizando promotores tejido-específicos, se desconoce si las Tregs antígeno-específicas comparten los mismos requerimientos para su selección en el timo.

IX. Materiales y Métodos

a. *Ratones*

Se utilizaron ratones de las cepas silvestres Balb/c y C57/BL6. Los ratones transgénicos TCRHA^{+/+} y IgHA^{+/+} (descritos en (225-227) y donados por la Dra. Adelaida Sarukhán) expresan un TCR específico para el péptido 111-119 de la hemaglutinina (HA) del virus de Influenza, presentado por moléculas del MHC I-E^d y el péptido HA bajo el promotor y las secuencias reguladoras de Igκ, respectivamente. Estos ratones fueron cruzados para obtener las líneas TCRHAxBalb/c (TCRHA, simple transgénico, sTg) y TCRHAxIgHA (doble transgénico, dTg). Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y controladas de alimentación, luz y temperatura, de acuerdo a los lineamientos institucionales.

b. *Anticuerpos*

En los ensayos de estimulación se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-CD3 murino biotinilado (2C11, 10μg/ml. BD Biosciences), anti-CD28 biotinilado (37.51, 10μg/ml. BD Biosciences), y para entrecruzar el anticuerpo primario se utilizó estreptavidina purificada (20 μg/ml, Pierce).

Para la detección de las moléculas participantes en la cadena de señalización se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-mCD4-biotina (L3T4), anti-mCD4-FITC (L3T4), anti-mCD4-APC (RM4-5), anti-mCD8PE-Cy7 (Ly-2), anti-mCD25-FITC (7D4), anti-mCD25-PE (3C7), anti-mCD25-biotina (3C7), anti-pErk-AlexaFluor647 (T202/Y204), anti-pP38-AlexaFluor647 (T180/Y182), anti-pc-Cbl-AlexaFluor647 (pY700) (todos de BD Biosciences); anti-TCRHA acoplado a PE (6.5PE, donado por la Dra. Adelaida Sarukhán);

anti-pErk (p44/42 MAPK, Thr202/Tyr204, E10), anti-pAKT (Ser473) (Cell Signaling) y anti-Erk total (K-23), anti-pPI3K (Tyr508) (Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-Foxp3-APC (FJK-16s. eBioscience); Los anticuerpos primarios no acoplados fueron detectados con los siguientes anticuerpos secundarios: cabra anti-IgG de conejo-FITC (Zymed, Invitrogen), anti-ratón y anti-conejo acoplados a HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ); y streptavidina-APC-Cy7 (BD Biosciences).

Para la detección de las proteínas quiméricas en la superficie se utilizó el anticuerpo primario anti-CD2 humano biotinilado (TS2.18, proporcionado por la Dra. B. Bierer, Dana Farber Cancer Institute, Boston MA, USA). Para reconocer este anticuerpo primario se utilizó estreptavidina conjugada a ficoeritrina (streptavidin-PE, BD Biosciences).

En los ensayos de fosforilación en las líneas celulares se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-CD2 humano biotinilado (TS2.18, proporcionado por la Dra. B. Bier. Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA. USA; 5µg/ml), anti-CD3 murino biotinilado (2C11, 10µg/ml. BD Biosciences), y para entrecruzar el anticuerpo primario se utilizó estreptavidina purificada (10 y 20 µg/ml, Pierce).

c. *Líneas celulares*

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de timocitos (timomas) en estadio DN2, células Bw5147 y en estadio DN3, EL-4. Ambas líneas se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) complementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) (Gibco, Invitrogen), glutamina (292 µg/ml), estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml (Gibco, Invitrogen) y HEPES 12.5 mM (Gibco BRL Grand Island, NY. USA). Las líneas BwControl, BwεFKBP*1, BwεFKBP*3, BwCD4FKBP*3, EL4Control, EL4εFKBP*3 y

EL4CD4FKBP*2, que expresan establemente las quimeras de la cadena CD3 ϵ y CD4 respectivamente, se mantuvieron en el mismo medio añadiendo 1.2 μ g/ml Geneticina (Gibco, Invitrogen).

Las líneas celulares derivadas de fibroblastos derivados de riñón humano, 293T; y murino 3T3 se mantuvieron en medio DMEM con 10% SFB, glutamina, mezcla de antibióticos-antimicóticos y HEPES.

d. *Dimerizadores*

El dimerizador AP20187 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) es una molécula orgánica de bajo peso molecular capaz de permear la membrana e interactuar con dos ligandos al mismo tiempo e inducir su acercamiento, conocidos como “inductores químicos de dimerización” (chemical inducers of dimerization, CIDs). Estos inductores constan de dos dominios que reconocen específicamente dominios que han sido fusionados a las proteínas de interés.

e. *Expresión de proteínas en superficie*

Para la detección de moléculas en superficie se colocaron las células en solución de lavado de FACS (PBS pH. 7.4, 2% SFB y 0.02% NaN₃), y se centrifugaron 5 min a 1,000 rpm. Las células se incubaron con 50 ml de solución de lavado con el anticuerpo primario, se incubaron por 30 min a 4°C, se centrifugaron y se eliminaron los sobrenadantes. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se lavaron tres veces con 200 μ l de solución de lavado. Después del último lavado, las células se incubaron con 50 μ l de solución de lavado con el anticuerpo secundario por 30 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces con 200 μ l

de solución de lavado y se fijaron con 100 μ l de solución de fijación (4% de paraformaldehído en PBS pH. 7.4). Las células se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta analizarlas utilizando un citómetro de flujo (FACScalibur®, Becton & Dickinson). Las tinciones fueron analizadas utilizando los programas Cell Quest® (Becton & Dickinson) y FlowJo®.

f. *Determinación de moléculas fosforiladas en timocitos*

Para la determinación de las formas fosforiladas de Erk, P38, Cbl, PI2K y AKT en los timocitos de los ratones transgénicos se utilizó el protocolo recomendado por BD biosciences (PhosphoFlow) modificado como a continuación se describe. Los timos fueron extraídos del ratón en medio de estimulación (DMEM, 0.5% SFB) y disgregados utilizando membranas de nylon (150 mm. Small Parts™). Se eliminaron los eritrocitos incubando las células en solución de lisis de eritrocitos ("RBC buffer", 155 mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 0.1mM EDTA) por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con medio de estimulación. Se hizo la tinción de superficie incubando los anticuerpos primarios (CD4, CD8, 6.5PE ó CD25) por 15 min a 4°C, se lavaron y se estimularon con: Pervandato de sodio (100 nM, 5 min), PMA+Ionomicina (20 ng/ml y 200 ng/ml, respectivamente, 5 min), anti-CD3bn y anti-CD28bn (10 μ g/ml, ambos 3 min a 4°C). Los anticuerpos fueron entrecruzados con estreptavidina purificada (20 μ g/ml, 3 ó 5 min). Todas las estimulaciones se llevaron a cabo a 37°C, previamente estandarizando el tiempo de estimulación (5 min para Erk, P38 y c-Cbl; y 3 min para PI3K y AKT). Después de la estimulación, las células fueron fijadas con solución de lisis/fijación (Lyse/Fix buffer) por 10 min a 37°C y posteriormente incubadas con solución de permeabilización (Perm buffer II). Finalmente, las células fueron lavadas e

incubadas con los anticuerpos intracelulares (pErk, pP38, pc-Cbl acoplados a Alexa647; ó pPI3K pAKT purificados) por 15 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos purificados fueron detectados con anti-ratón acoplado a FITC o anti-conejo acoplado a PE. Todas las muestras se capturaron en los citómetros BD FACScalibur ó BD FACSAria (BD Biociences) y se analizaron con el programa FlowJo®.

g. *Determinación de Erk fosforilado en líneas celulares*

Para la determinación de Erk en las líneas celulares, se contaron las células y se inocularon 10^7 células en cajas de petri con 10 ml de medio de “starving” (RPMI 1640, 0.5% SFB, glutamina, estreptomycin, penicilina y HEPES) por 18 horas, para disminuir la fosforilación basal. Se centrifugaron y se fijaron con 100 μ l de solución de fijación (4% de paraformaldehído en PBS pH. 7.4) por 10 min a 37°C. Se añadió 1 ml de solución de lavado de FACS (PBS pH. 7.4, 2% SFB y 0.02% Azida de Sodio) y se centrifugaron. A cada muestra se añadió 1 ml de etanol absoluto en frío (EtOH 100%, -20°C) y se incubaron por 30 min en hielo. Se centrifugaron y lavaron nuevamente con 1 ml de solución de lavado de FACS. Se añadieron los anticuerpos en un volumen de 50 μ l y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se resuspendieron en 200 μ l de solución de fijación. Las células se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta analizarlas utilizando un citómetro de flujo (FACScalibur®, Becton & Dickinson). Las tinciones fueron analizadas utilizando los programas Cell Quest® (Becton & Dickinson) y FlowJo®.

h. *Expresión de Foxp3*

La determinación de la expresión de Foxp3 se realizó utilizando el protocolo recomendado por el proveedor (eBioscience). Los timos fueron extraídos del ratón en PBS y disgregados utilizando membranas de nylon. Se eliminaron los eritrocitos incubando las células en solución de lisis por 10 min a temperatura ambiente. Se hizo la tinción de superficie incubando los anticuerpos primarios (CD4, CD8, 6.5PE ó CD25) por 15 min a 4°C, se lavaron y se fijaron y permeabilizaron con la solución recomendada en el kit (Treg Staining Kit, eBioscience) 30 min a 4°C, se lavaron con solución de lavado de FACS y se lavaron con medio de permeabilización (Perm buffer). Finalmente se añadió el anticuerpo anti-Foxp3 acoplado a PE-Cy5 por 30 min a 4°C en medio de permeabilización. Todas las muestras se capturaron en el citómetro BD FACSAria (BD Biociencias) y se analizaron con el programa FlowJo®.

i. *Clonación de vectores*

Para generar las proteínas quiméricas que contienen 1, 2 ó 3 copias del FKBP-12 (F36V)(FK*) se realizaron dos pasos secuenciales de clonación: 1) generación de los fragmentos de 1, 2 y 3 copias del ligando FKBP*; y 2) clonación de estos fragmentos en el extremo 5' de las construcciones para CD4 y CD3ε.

Para generar los fragmentos con 1, 2 y 3 copias del ligando del dimerizador se utilizó el plásmido pC4Fv1E (Ariad Pharmaceutical) que contiene 1 copia del gen que codifica para este ligando. A partir de este plásmido, se crearon 2 y 3 copias *in tandem* del gen utilizando los sitios de restricción SpeI/BamHI y XbaI/BamHI, en los que los sitios SpeI y XbaI pueden unirse, perdiendo el sitio de corte. Los plásmidos generados contienen 1 copia (pC4Fv1E), 2

copias (pC4Fv2E) y 3 copias (pC4Fv13E). Posteriormente se cambiaron los sitios XbaI y BamHI por el sitio XhoI en el extremo 3' y EcoRI/XhoI en el extremo 5'. Los fragmentos de 2 y 3 copias fueron insertados en el extremo 5' de las construcciones para CD4 ó CD3ε (pSK # 8 CD2CD4FKBP y pSK #11 CD2εFKBPx3 (98)) utilizando el sitio de restricción XhoI.

Las quimeras fueron sub-clonadas en dos plásmidos de expresión: 1) CD4 MA (pBJ5 que contiene la quimera para CD4 con los sitios FKBP endógenos (228)) para expresión en células eucariontes utilizando los sitios de restricción Not1/EcoR1; y 2) el plásmido retroviral MIG (proveído por el Dr. José Alberola-Ila), para generar partículas virales e infectar timocitos en ensayos de cultivo de timo fetal, utilizando la enzima EcoR1.

j. Generación de proteínas quiméricas CD3ε/CD4

Para generar líneas que expresan establemente las quimeras se transfectaron por electroporación 10^7 células Bw5147 ó EL-4 con 5 µg de los plásmidos CD2εFKBP*1MA, CD2εFKBP*3MA, CD2CD4FKBP*3MA. Se utilizó un electroporador BTX modelo ECM630 (BTX). Las condiciones de electroporación utilizadas fueron: 960µF, 125 ohms, 240 volts en 300µl de medio para electroporar (RPMI 1640, 10% SFB, glutamina, estreptomycin y penicilina en ausencia de HEPES). Las células se incubaron en 10 ml de medio RPMI completo por 18 horas. Posteriormente se pasaron a cajas con 10 ml de medio de ayuno y se incubaron 18 horas más.

Para las transfecciones estables, se utilizaron 10^7 células y se electroporaron con 10 µg de los mismos plásmidos previamente linearizados con la enzima EcoRI. Las células se recuperaron en 10 ml de medio completo y posteriormente se pasaron a medio completo

con geneticina (1.2 $\mu\text{g/ml}$ o 1.9 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar las células que han integrado el DNA en su genoma.

k. *Ensayos de fosforilación por WesternBlot*

Se contaron las células y se inocularon 10^7 células en cajas de Petri con 10 ml de medio de “ayuno” (RPMI 1640, 0.5% SFB) por 18 horas, para disminuir la fosforilación basal. Se centrifugaron y se resuspendieron en 300 μl de medio con: Pervanadato (100mM), PMA/Ionomicina (10 ng/ml y 0.1 mM respectivamente), anti-CD2bn (5 $\mu\text{g/ml}$) + estreptavidina purificada (10 $\mu\text{g/ml}$), AP20187 (0.1 μM /1 μM / 5 μM , 1 y 5 min). Se incubaron 3 min a 37°C y se detuvo la estimulación con 600 μl de solución de “stop” a 4°C (PBS, 20mM NaF y 1mM Na_3VO_4). Las células que fueron estimuladas con el dimerizador se incubaron 20 min a 37°C y se detuvo la estimulación con 600 μl de solución de “stop” a 4°C. Todas las células se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se resuspendieron para lisar en 100 μl de solución de lisis (1% Tritón X-100, 20mM Tris pH 7.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , Aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, Leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, Pepstatina A 1 $\mu\text{g/ml}$, DTT 1 μM y PMSF 10 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron con la solución de lisis por 10 min a 4°C y se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm. Finalmente se recuperaron los sobrenadantes.

A partir de 100 μl de los sobrenadantes, se tomaron 40 μl y se añadió 40 μl de colorante para proteínas (20 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% Glicerol y Azul de Bromofenol). Todas las muestras se hirvieron por 5 min a 95°C y se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm. Las muestras se separaron en geles de SDS-PAGE (10%) (Bio Rad Laboratories).

Para hacer la hibridización, se transfirieron las proteínas a membranas de difloruro de polivinilo (PVDF) de 0.45 μ M (Millipore Co.) por transferencia semi-seca en un equipo de Owl Scientific (1 hora a 10 volts o 1 Amp). Al finalizar la transferencia las membranas se bloquearon con una solución de TSA (Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Azida de Sodio 0.02%), 0.1% Tween 20 y 5% leche en polvo sin grasa por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación. Los anticuerpos primarios se incubaron en TSA, 0.1% Tween 20, 1% de leche por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación. Finalmente los anticuerpos secundarios se colocaron en TS, 0.1% Tween 20, 1% de leche por 20. Las proteínas se revelaron con ECL (Amersham Pharmacia) y se expusieron en placas de rayos X (Biomax MR, KODAK).

1. *Flujos de Calcio*

Se marcaron 5×10^6 células con Fluo-3 y Fura-Red (Molecular Probes. Invitrogen) siguiendo el siguiente protocolo: se preparó una solución de Ácido Plurónico (0.5 μ g/ml en medio RPMI al 2% SFB) (Molecular Probes, Invitrogen). Se diluyeron los viales de Fluo3 y Fura Red en 50 μ l de DMSO estéril y se preparó la solución de tinción 2x, añadiendo 30 μ l de Fluo3 (6 μ g/ml) y 50 μ l de Fura Red (10 μ g/ml) a los 5 ml de medio RPMI, 2% de SFB + Ácido plurónico. Esta solución es utilizada para permeabilizar las células y permitir la entrada de los fluoróforos. Aparte, se contaron las células y se diluyeron en medio a 1×10^7 células por ml. Se mezcló 1:1 la suspensión de células y la solución de tinción 2x y se incubaron por 45 min a 37°C, agitando cada 10 min. Se lavaron las células 3 veces con 1 ml de medio RPMI al 2% SFB. Las pastillas celulares se resuspendieron en medio RPMI al 2% de suero fetal Bovino y se incubaron por 45 min a temperatura ambiente, agitando cada 10

min. Las células se lavaron nuevamente con 1 ml de RPMI sin SFB y se resuspendieron finalmente en 1 ml de este medio. Para las estimulaciones, se prepararon tubos de FACS con 1 ml de medio sin SFB. Al momento de pasarlas por el FACS, se le añadieron 300 µl de la suspensión de células a cada tubo y se colocaron a 37°C. Se estimularon añadiendo al momento: los dimerizadores AP20187 (1µM), anti-CD3biotina (10 µg/ml) o anti-CD2 biotina (10 µg/ml) seguidos de estreptavidina (20 µg/ml). Para verificar las condiciones de las células y la máxima liberación de calcio se añadió Ionomicina (500 ng/ml). Los resultados fueron adquiridos utilizando un Citómetro de Flujo marca FACScalibur® (Becton and Dickinson) y el programa CellQuest® (Becton and Dickinson). Para analizar los flujos de calcio se utilizó el programa FACS Assistant® (Becton and Dickinson), que permite calcular la razón de las fluorescencias FL1/FL3 y los resultados fueron importados en el programa Microsoft Excel® para graficar.

m. *Infección retroviral*

Para hacer el análisis de las quimeras en células de médula ósea, se purifican progenitores de médula ósea de ratones MHC KO adultos (6-12 semanas) y se ponen en cultivo por 5 días con las citocinas IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml) y SCF (1/50 sobrenadante BHK-MKL). Posteriormente se infectan con los sobrenadantes virales y polibrene (8 µg/ml). Se centrifugan 90 min a 2,500 rpm. Una vez centrifugadas, se sustituye el 50% del sobrenadante viral con medio fresco + citocinas y se dejan incubar 24-48 h. En esta parte del ensayo se han obtenido porcentajes de infección de aproximadamente el 20-30% en los últimos ensayos.

Una vez infectadas las células, se recuperan y se transfieren a los ratones MHC KO irradiados ($1-2 \times 10^6$ células por ratón). Después de 6-8 semanas se extraen el timo, los ganglios, mesentéricos y periféricos, el bazo y la médula ósea del fémur. Mediante tinción de superficie y citometría de flujo se determina el porcentaje y el estadio de diferenciación de las células GFP⁺ en cada uno de los órganos, inducido por la presencia del dimerizador o con anticuerpos anti-CD2.

X. Resultados

a. Análisis de la señalización en la selección de células T reguladoras

Para analizar las vías de señalización involucradas en la diferenciación a células T reguladoras (nTregs, CD4⁺CD25⁺) utilizamos un modelo de ratones transgénicos (previamente descrito por Kirber, et al. 1994) en el que se ha observado la generación de células T reguladoras y su función en periferia (199, 229). Sin embargo, la generación de estas células en el timo de estos ratones aún no se ha descrito.

En este modelo de ratones transgénicos se expresa tanto un receptor específico (TCRHA) como su péptido de reconocimiento. En estos ratones, el péptido HA (111-119) se expresa en el contexto de la molécula del MHC clase II, I-E^d, bajo el control del promotor de Ig-k en células hematopoyéticas, incluyendo las células del epitelio tímico. Las células T reguladoras generadas en el ratón doble transgénico (TCRHA x IgHA) muestran un fenotipo anérgico en respuesta a la estimulación con antígeno *in vitro*, pero son capaces de responder al antígeno *in vivo*. Expresan altos niveles de CTLA-4 e IL-10 y son capaces de inhibir la proliferación de otras células de manera antígeno-específica (199).

i. Caracterización de la expresión de Foxp3 en timocitos DP y CD4SP de los ratones transgénicos

Nuestro primer objetivo fue determinar la expresión de Foxp3 en células TCRHA-específicas en las subpoblaciones tímicas, comparando el ratón simple transgénico (TCRHA) con el doble transgénico (TCRHA x IgHA). Cuando analizamos la expresión de Foxp3 en la población TCRHA específica, encontramos que existe un mayor porcentaje de células Foxp3⁺ tanto en las subpoblaciones de timocitos DP (9.1% vs 2.8%) como CD4SP

(24.4% vs 1.4%) de los ratones TCRHA x IgHA que en los TCRHA (Figura 8A). Así mismo, encontramos también un incremento en el porcentaje de células Foxp3⁺ dentro de las células que no expresan el receptor específico, lo que concuerda con la generación de células T reguladoras “naturales” (nTregs).

Una de las moléculas inicialmente asociadas al fenotipo de células reguladoras es la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R α o CD25). Por lo tanto analizamos la expresión de este marcador dentro las subpoblaciones DP y CD4SP que expresan Foxp3. Nuestros datos muestran que Foxp3 se expresa exclusivamente en la población 6.5⁺CD25^{+/alto} en los ratones TCRHA (Figura 8B y C). Sin embargo, en los ratones TCRHA x IgHA, la expresión de Foxp3 se observa también dentro de la población 6.5⁺CD25⁻ en timocitos CD4SP (Figura 8C). El aumento en el porcentaje de células Foxp3 en el ratón TCRHA x IgHA fue estadísticamente significativo y se vio reflejado también en un incremento en el número total de timocitos Foxp3⁺ (Figura 8D y E, respectivamente). Estos datos apoyan la teoría en la que ligandos de alta afinidad podrían inducir la selección a células T reguladoras (revisado en (230)).

ii. Análisis de la señalización en las células T reguladoras en un modelo de ratones transgénicos

Para determinar las vías de señalización involucradas en la generación de las células reguladoras, comparamos los patrones de fosforilación de las vías de señalización del TCR y CD28 en las células que expresan el TCR específico (6.5⁺). Para lograr este objetivo utilizamos la citometría de flujo como herramienta de detección ya que nos permite analizar poblaciones complejas y/o poco representadas (231). Se compararon dos

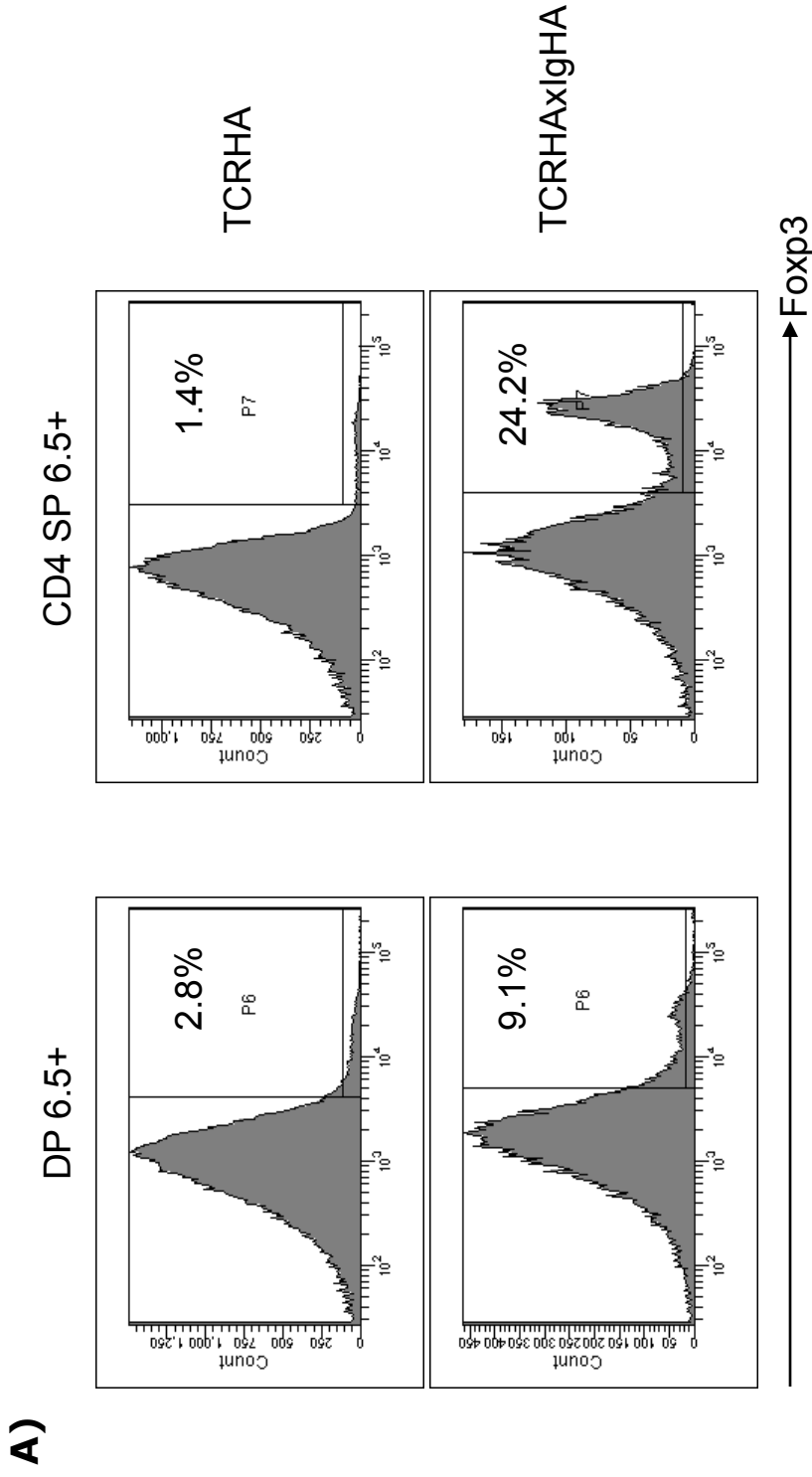


Figure 8. La expresión de el ligando agonista en el timo incrementa el porcentaje de timocitos Foxp3+ DP y CD4SP. Se tiñeron timocitos totales de los ratones TCRHA o TCRHxIgHA con los anticuerpos CD4, CD8, 6.5, CD25 y FoxP3. Se analizó la expresión de Foxp3 en las poblaciones DP y CD4SP de acuerdo a la expresión del receptor específico (6.5) y CD25 (A) Ensayo representativo de la expresión de Foxp3 (n = 4). (B) La población CD25⁺FoxP3⁺ aumenta en la población DP en presencia del ligando (C) El porcentaje de Foxp3 aumenta en las células CD25⁺ y CD25⁻ en presencia del ligando agonista. (D) Porcentaje y número total de timocitos FoxP3⁺ dentro de la población 6.5⁺ en los ratones simple y doble transgénicos. Se muestran los valores promedio ± el error estándar de 4 experimentos independientes. *p ≤ 0.1, **p ≤ 0.05, ***p < 0.01.

Gated on DP population

B)

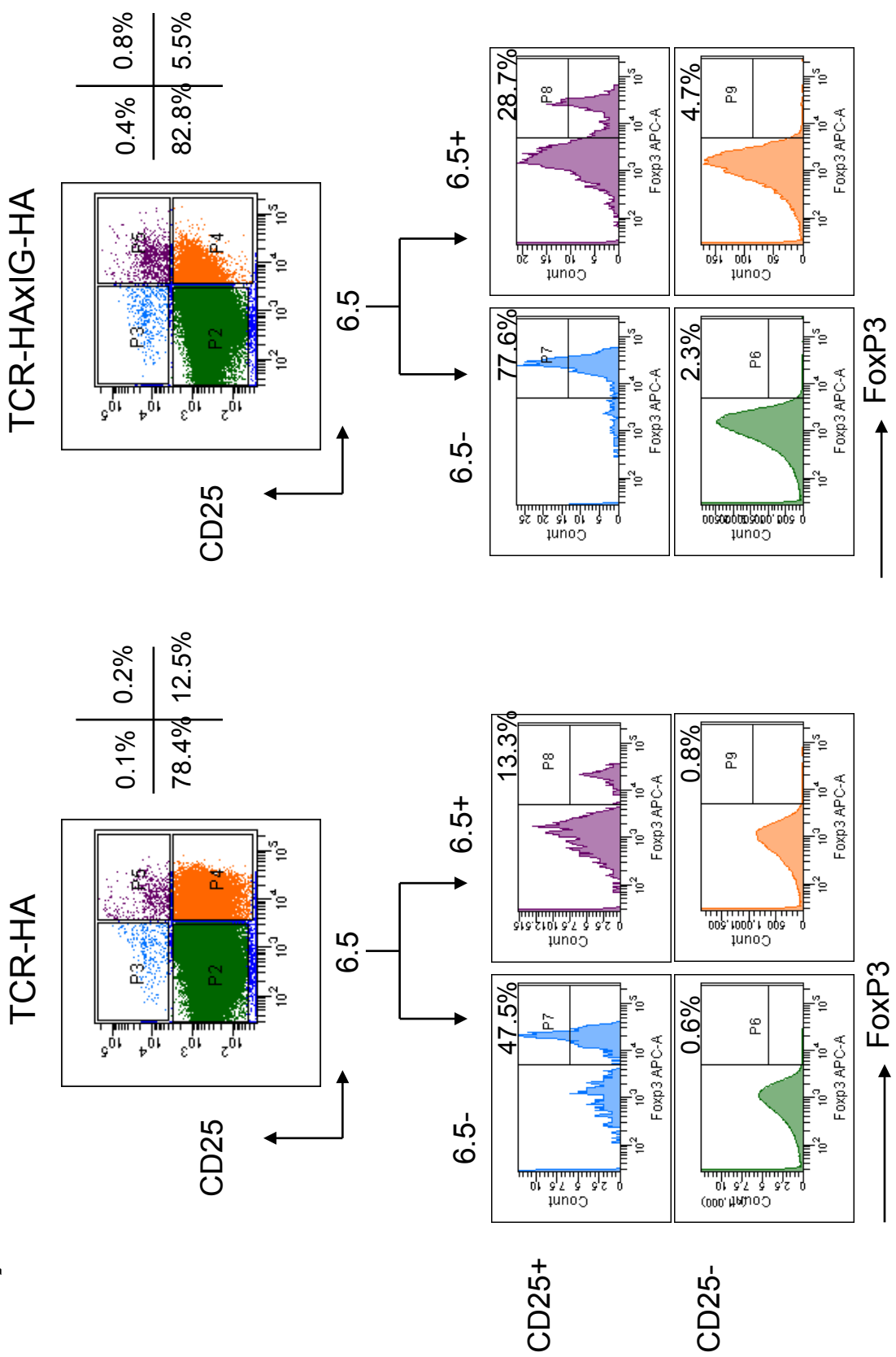


Figure 8. Continuación.

c) Gated on CD4SP population

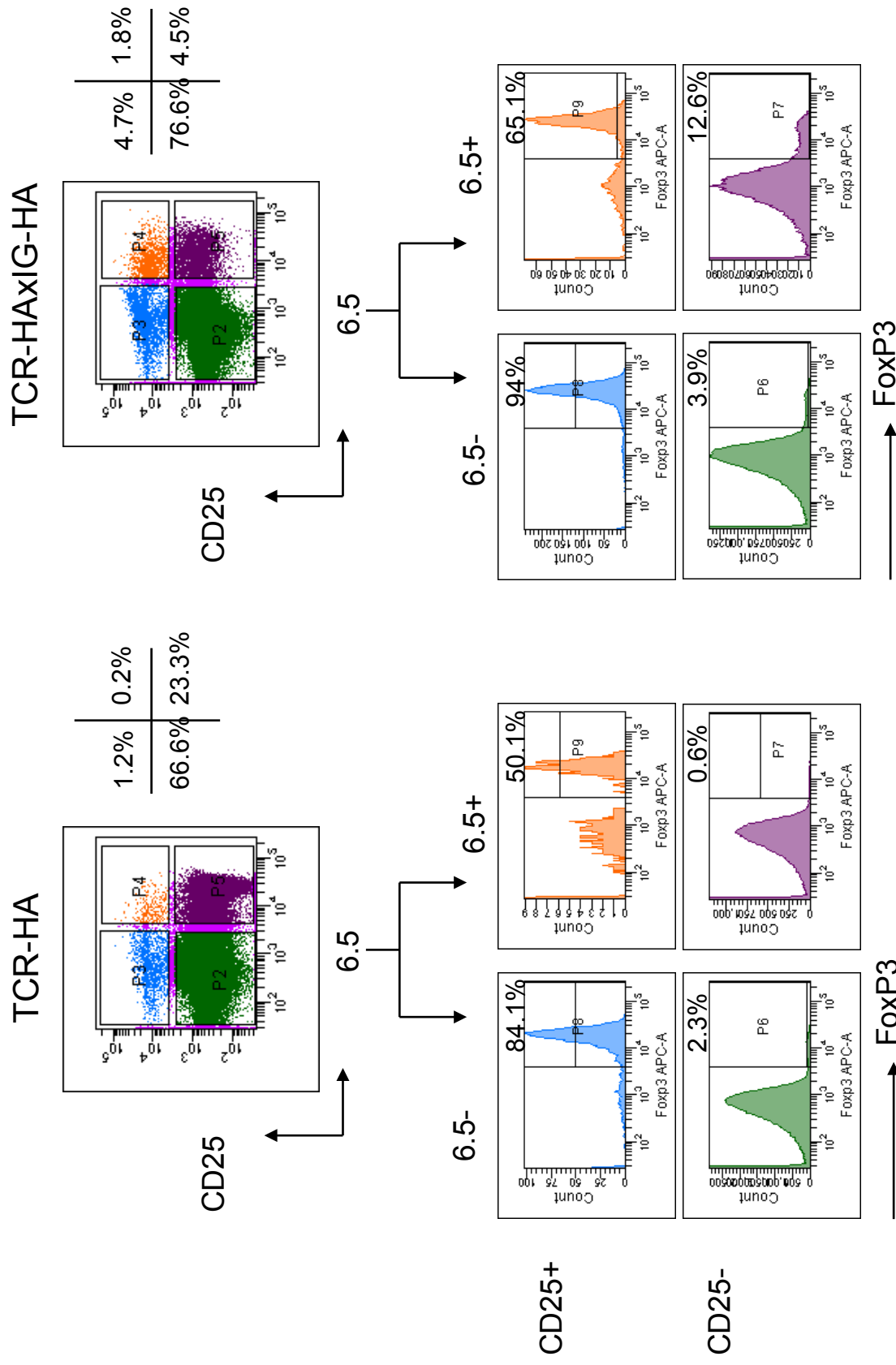
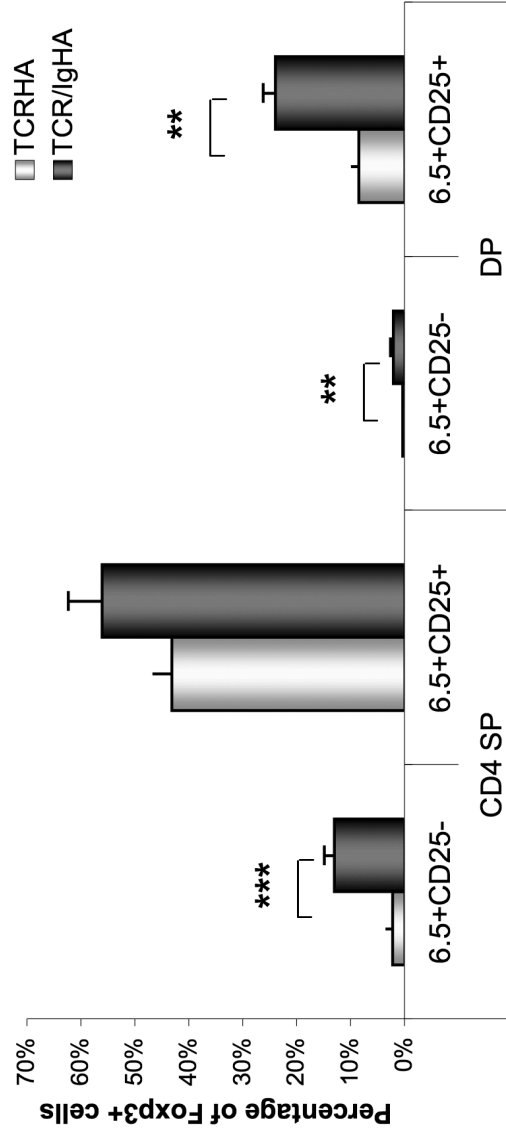


Figure 8. Continuación.

D)



E)

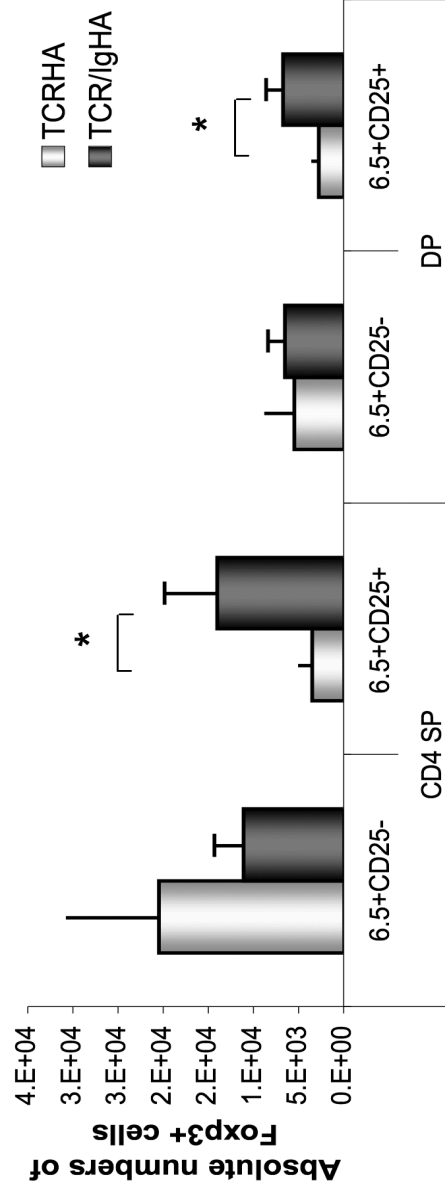


Figure 8. Continuación.

condiciones de fosforilación: la fosforilación basal, en timocitos recién extraídos del órgano y que se mantuvieron en medio con 0.5% SFB; y la fosforilación en respuesta a estímulo, en la que se incubaron los timocitos en presencia de PMA/Ionomicina o anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28.

Inicialmente analizamos la fosforilación de las MAP cinasas Erk1/2 y P38, como moléculas involucradas en los procesos de selección positiva y negativa de los timocitos, respectivamente (revisado en (78)). No encontramos diferencias significativas en cuanto a la fosforilación basal de estas moléculas en timocitos DP y CD4SP 6.5⁺ de ambos ratones. Sin embargo observamos una tendencia en la que la fosforilación de Erk es mayor en los timocitos CD4SP 6.5⁺ del ratón TCRHA x IgHA en comparación con los timocitos del ratón TCRHA. Por el contrario, la fosforilación de P38 se encuentra disminuida en esta población del ratón TCRHA x IgHA (Figura 9).

Cuando analizamos la fosforilación de Erk en condiciones de estimulación, encontramos que no hay diferencias en la activación de estas moléculas en los timocitos DP de ambos ratones. Sin embargo, los timocitos 6.5⁺ CD4SP del ratón TCRHA x IgHA tuvieron una menor fosforilación, de Erk en respuesta al entrecruzamiento con anti-CD3, pero respondieron normalmente a la estimulación con PMA+Ionomicina (Figura 10A).

Para P38, los datos nuevamente fueron contrarios a lo observado para Erk. La fosforilación de P38 en respuesta al anti-CD3 fue mayor, tanto los timocitos DP como los CD4SP 6.5⁺ del ratón TCRHA x IgHA que su contraparte en el ratón TCRHA (Figura 10B). Estos datos sugieren que Erk1/2 es preferencialmente activado en células naïve, mientras que P38 se asocia más al fenotipo regulador.

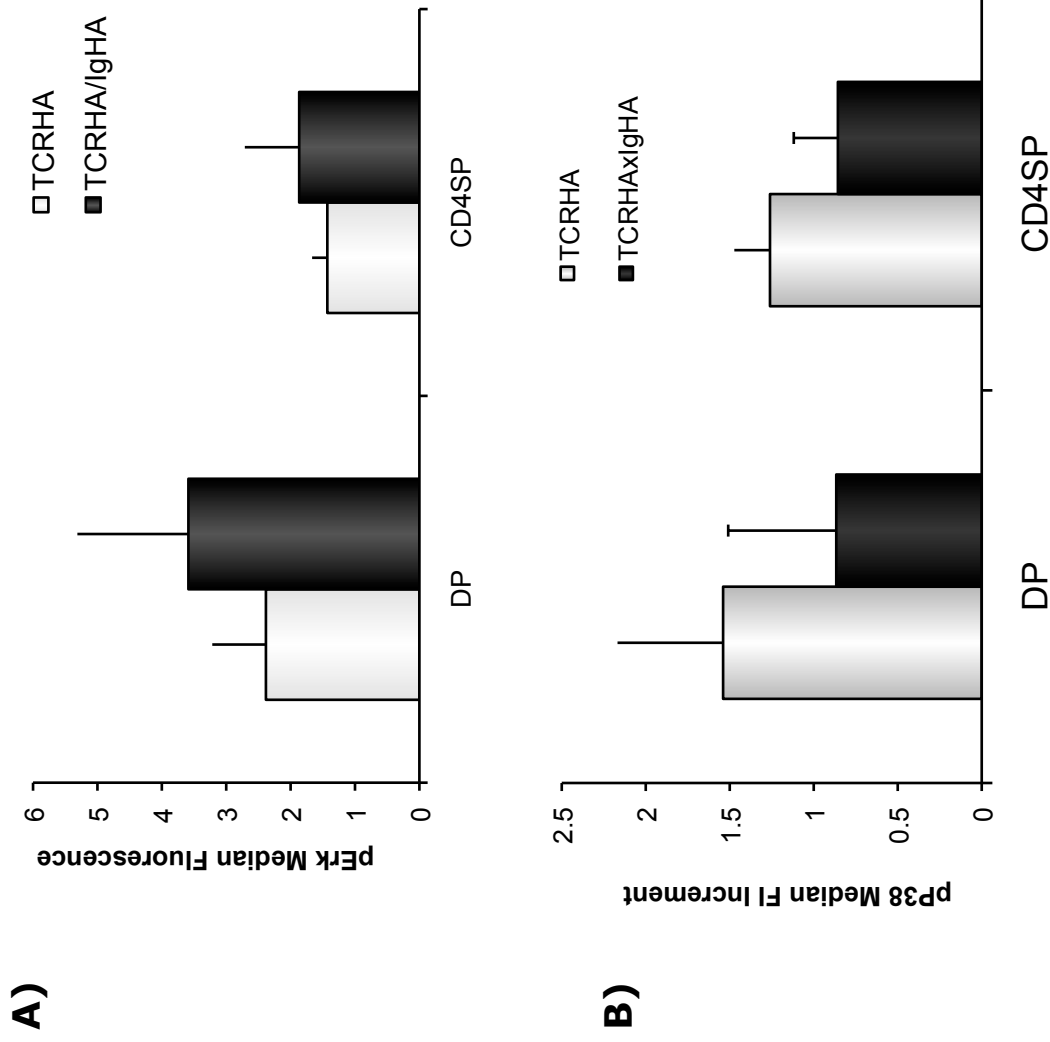


Figura 9. La fosforilación basal aumentada de Erk1/2 y disminuída para P38 en timocitos seleccionados en presencia del ligando agonista. Se determinó la fosforilación basal de Erk1/2 (A) y P38 (B) en timocitos 6.5⁺ de los ratones TCRHA x Balb-c y TCRHA x IgHA, calculando la relación entre los valores obtenidos en las muestras sin estimular sin anticuerpo anti-pErk o pP38. Se muestra los promedios \pm error estándar (Erk: n = 5; P38 n = 3).

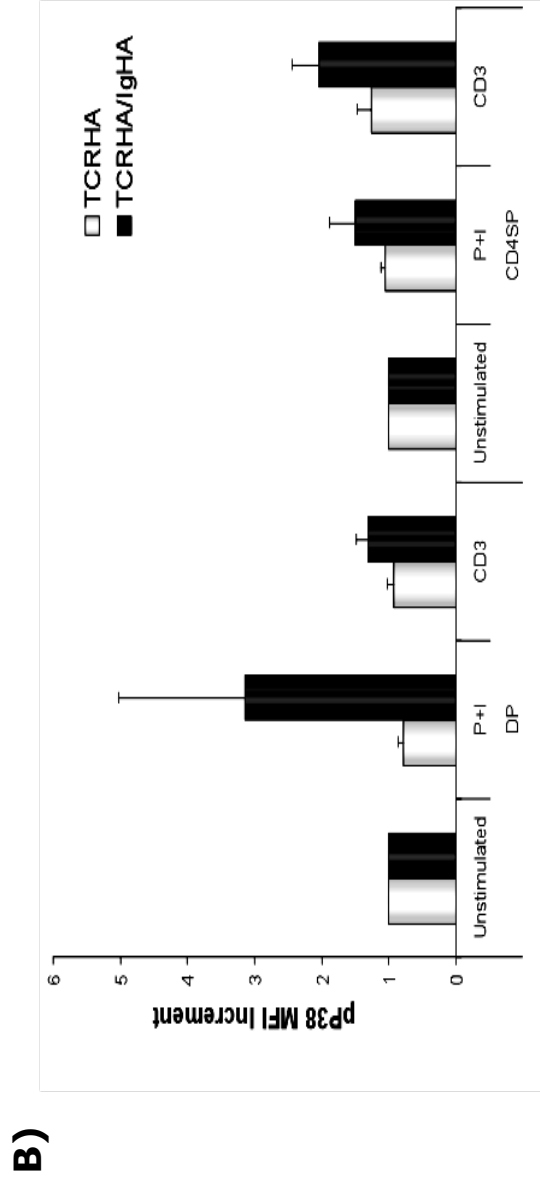
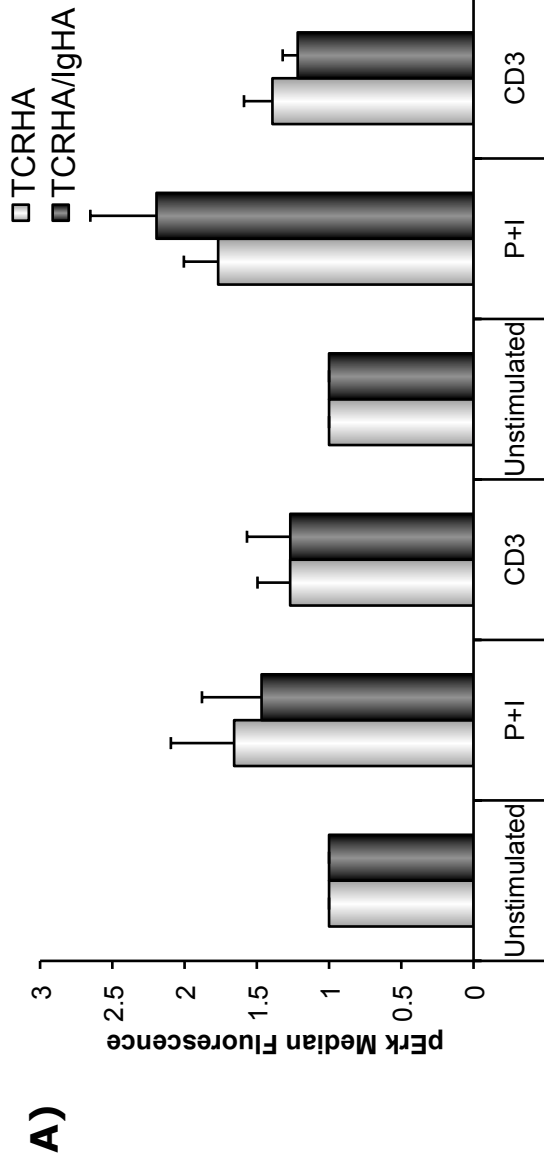


Figura 10. Fosforilación en respuesta a estímulo de Erk1/2 y P38 en timocitos de los ratones transgénicos. Se determinó la fosforilación de Erk1/2 (A) y P38 (B) en timocitos 6.5⁺ de los ratones TCRHA x Balb-c y TCRHA x IgHA; en respuesta a: PMA+Ionomicina o anti-CD3. Se calcularon los valores mediante la relación entre los datos obtenidos en las muestras estimuladas entre los datos de las muestras sin estimular (medio). Se muestra los promedios \pm error estándar (Erk: n = 5; P38 n = 3).

Las señales transducidas a través del TCR durante la maduración de los timocitos generan señales tanto positivas como negativas que convergen en la diferenciación a los diversos linajes. Con respecto a la diferenciación a células T reguladoras, se ha propuesto debido a que son clonas de alta avidéz, requieren de mecanismos que disminuyan la intensidad de la señal inducida a través de su TCR, para evitar su selección negativa. Uno de los reguladores negativos descritos de la señalización del TCR es la ligasa de ubiquitinas, c-Cbl (232, 233). Esta molécula ha sido descrita previamente como un regulador negativo de las señales transducidas por el TCR en células T reguladoras (revisado en (234)), por lo que suponemos que su fosforilación podría estar aumentada en las células 6.5⁺ en nuestros ratones TCRHA x IgHA. De manera sorprendente, encontramos que tanto la fosforilación basal, como en respuesta a anti-CD3 + anti-CD28, son menores en las células del ratón TCRHA x IgHA, que las del ratón TCRHA (Figura 11).

Otra molécula que ha sido relacionada con el desarrollo y función de las células T reguladoras es la cinasa AKT (231, 235). Nuestros datos demostraron que tanto las células del ratón TCRHA, como las del TCRHA x IgHA respondieron de manera similar al entrecruzamiento con anti-CD3. Sin embargo, al añadir anti-CD28 al entrecruzamiento con anti-CD3, sólo las células DP y CD4SP del ratón TCRHA respondieron a este estímulo. De alguna manera, las células del ratón TCRHA x IgHA son insensibles al entrecruzamiento con anti-CD28 (Figura 12).

Estos resultados sugieren que la señalización en las células T reguladoras de nuestro ratón doble transgénico TCRHA x IgHA poseen una señalización deficiente inducida por el entrecruzamiento del TCR. Sin embargo, ya que la población 6.5⁺ de estos ratones contiene

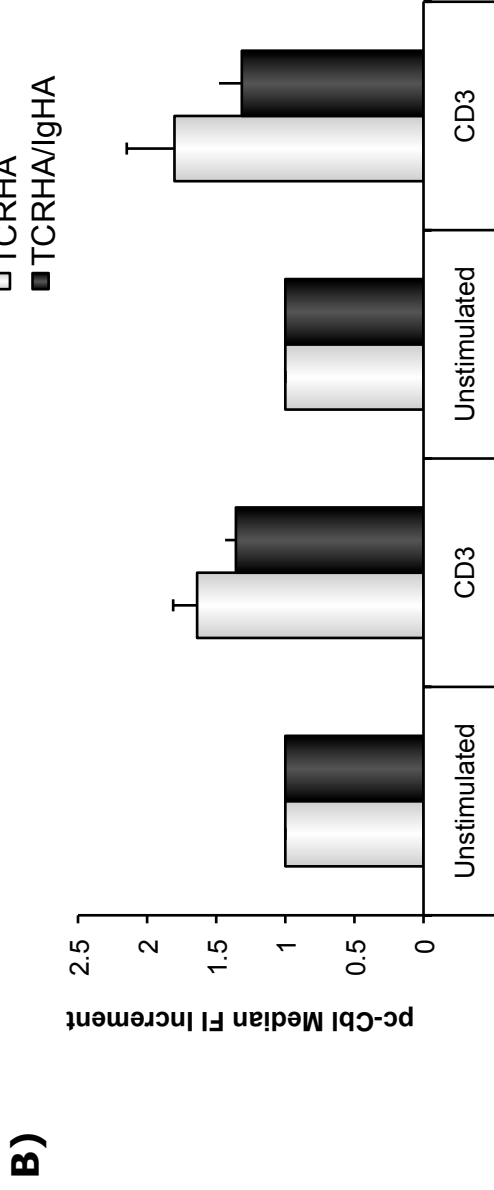
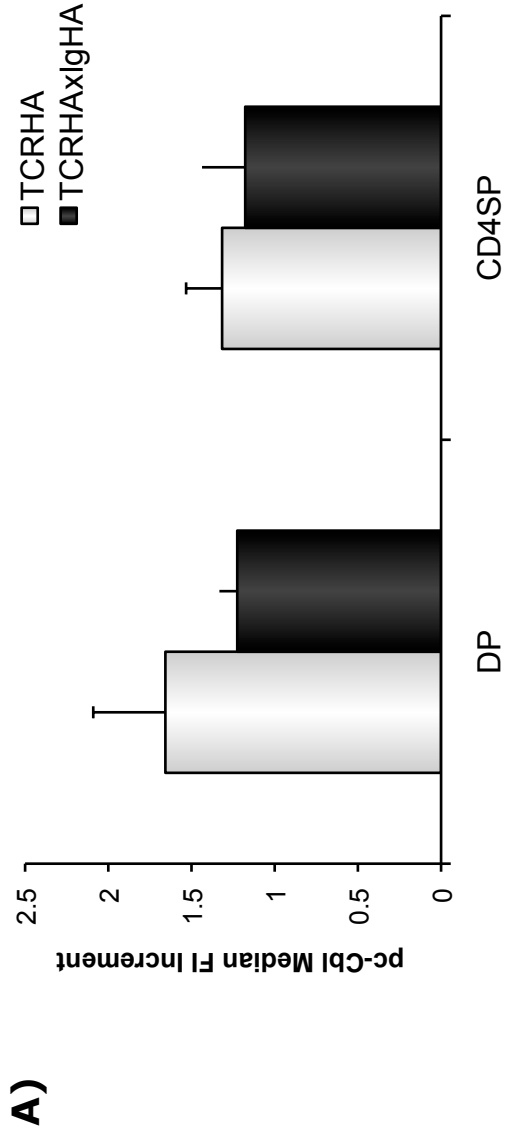
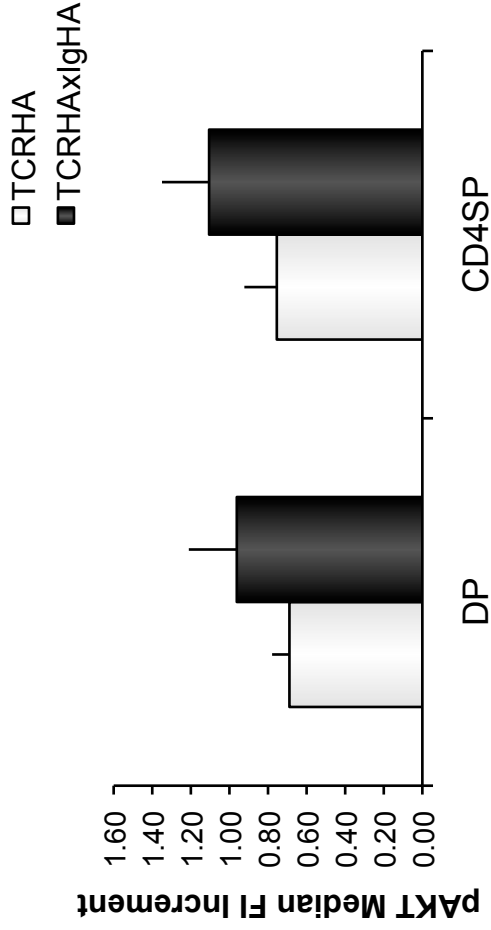


Figura 11. Menor fosforilación basal y en respuesta a estímulo de c-Cbl en los timocitos del ratón TCRHA x IgHA. Se determinó la fosforilación de c-Cbl en condiciones (A) basales y (B) en respuesta a anti-CD3. Se calcularon los valores mediante la relación entre los datos obtenidos en las muestras estimuladas entre los datos de las muestras sin estimular (medio) en timocitos 6.5⁺ de los ratones TCRHA x Balb-c y TCRHA x IgHA; Se muestra los promedios \pm error estándar (Basal: n=3; Estimulados: n = 5).

A)



B)

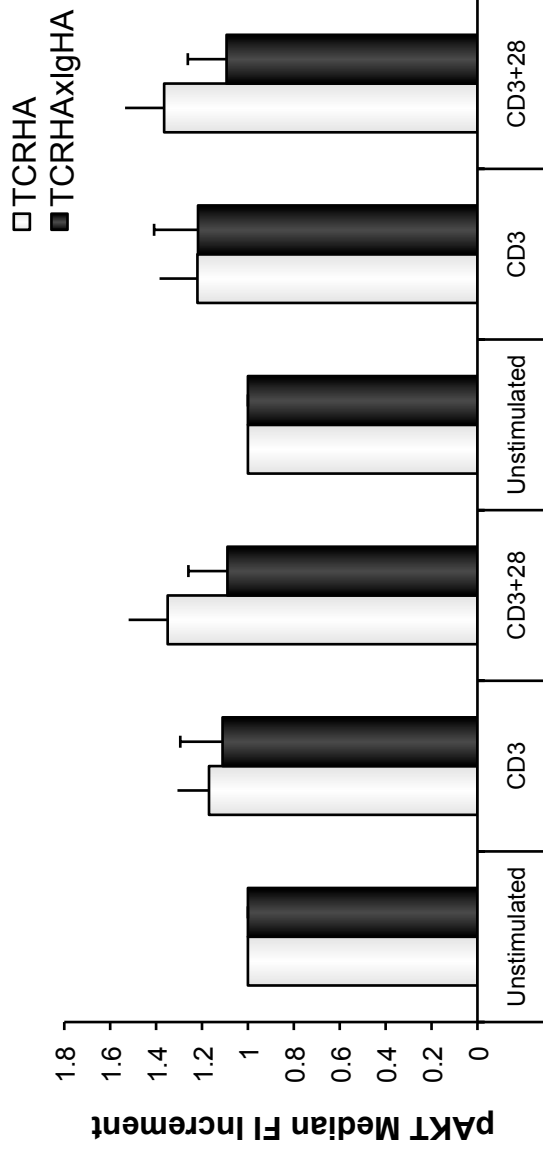


Figura 12. Los timocitos del ratón TCRHA x IgHA poseen mayores niveles de AKT fosforilado pero no responden al entrecruzamiento con anti-CD28. Se determinó la fosforilación de AKT en condiciones (A) basales y (B) en respuesta a anti-CD3 o anti-CD3 + anti-CD28. Se calcularon los valores como se menciona anteriormente. Las gráficas representan los promedios \pm error estándar (n = 5).

un porcentaje de células Foxp3⁺; decidimos validar nuestros datos en una población de células T reguladoras “naturales” en ratones silvestres.

iii. Análisis de la señalización en células nTregs de ratones silvestres

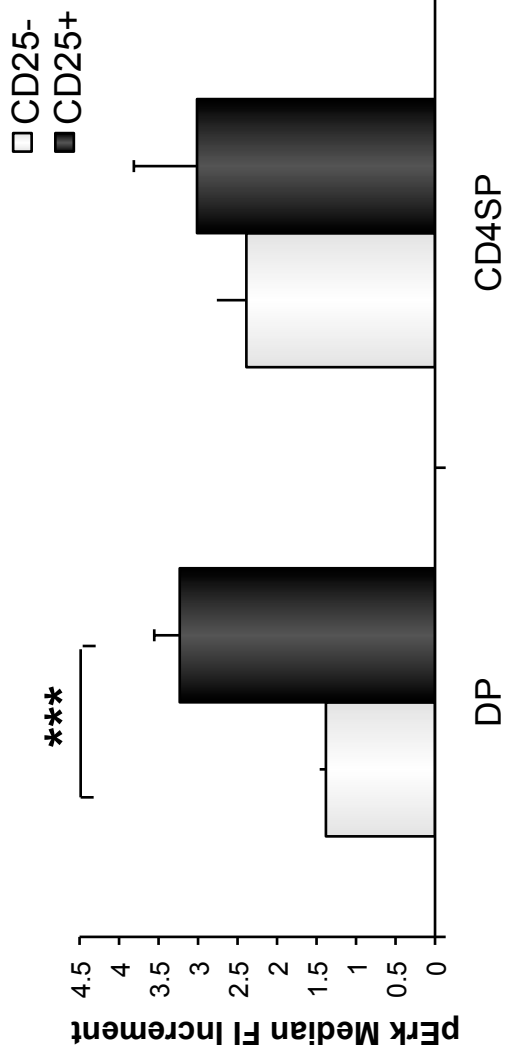
Para analizar los patrones de fosforilación en las células T reguladoras naturales, decidimos analizar la fosforilación de las moléculas anteriormente descritas en la población CD25^{+/alto}, previamente descritas como células T reguladoras “naturales”, y que fueron caracterizadas por la expresión del factor de transcripción Foxp3 (>80-90% de células CD25^{+/alto}).

Con respecto a la fosforilación basal de Erk, se observó que las células DP CD25^{+/alto} poseen una mayor fosforilación basal que las células CD25⁻. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa en las células CD4SP CD25^{+/alto} (Figura 13A). P38, por su parte, tuvo el mismo comportamiento que Erk tanto en las células DP como en las CD4SP, a pesar de que las diferencias no alcanzaron la significancia (datos no mostrados).

En condiciones de estimulación, las células CD25⁻ y CD25^{+/alto} respondieron de manera similar al entrecruzamiento con anti-CD3 y PMA+Ionomicina. Sin embargo, solamente las células CD25⁻ fueron capaces de inducir la fosforilación de Erk en respuesta a anti-CD3 + anti-CD28 (Figura 13B). Estos resultados confirman la falta de respuesta observado en las células reguladoras 6.5⁺ de nuestro ratón TCRHA x IgHA, por lo que proponemos que las células reguladoras poseen una deficiencia a nivel proximal en la señalización a través del TCR.

Por otro lado, la fosforilación de la ligasa de ubiquitina, c-Cbl se encontró aumentada en la población CD25^{+/alto} de estos ratones en condiciones basales. Sin

A)



B)

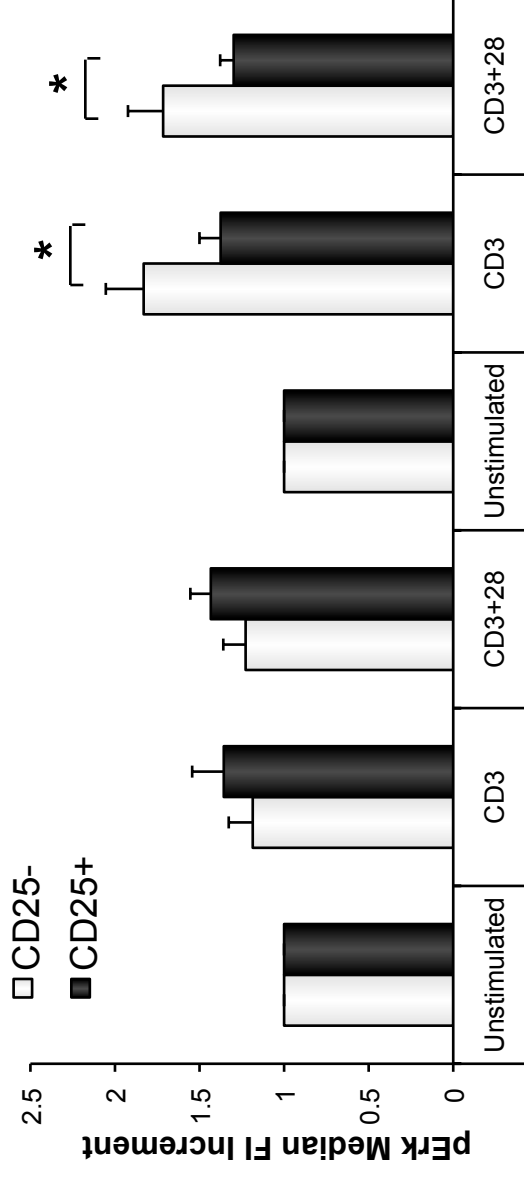


Figura 13. Los timocitos CD25⁺/alto poseen una mayor fosforilación basal de Erk1/2, pero una menor activación de esta cinasa en respuesta a la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Se determinó la fosforilación basal (A) y en respuesta a estímulo (B) en timocitos DP y CD4SP por citometría de flujo. Se muestra los promedios ± error estándar (Erk n = 6; P38 n = 6; c-Cbl n = 5) *p ≤ 0.01. *p ≤ 0.1..**

embargo, y nuevamente confirmando la respuesta observada en los ratones transgénicos, estas células no fueron capaces de inducir la fosforilación de c-Cbl en respuesta a la estimulación con anti-CD3 pero respondieron normalmente a la estimulación con anti-CD3 + anti-CD28 (Figura 14).

Finalmente, analizamos la fosforilación de las cinasas AKT y PI3K como marcadores de la señalización inducida a través de CD28 y que se han relacionado con la maduración de las células T reguladoras “naturales” (revisado en (63)). Tanto PI3K como AKT tienen un mayor nivel de fosforilación basal en las células CD25^{+/alto} DP y CD4SP que las células CD25⁻ (Figura 15). Este dato concuerda con la mayor fosforilación basal de c-Cbl en estos ratones, ya que se ha relacionado a esta ligasa con el reclutamiento de PI3K al complejo de señalización del TCR (213).

Con respecto a la fosforilación en respuesta al entrecruzamiento con anti-CD3 + anti-CD28, los timocitos CD25^{+/alto} DP mostraron un incremento en la fosforilación de AKT. Sin embargo, una vez que estas células alcanzan el estadio CD4SP, no son capaces de inducir una completa fosforilación tanto de PI3K como de AKT (Figura 16); confirmando los datos de las células T reguladoras del ratón transgénico.

b. Modelo de inducción de señalización a través del TCR

Como parte de las herramientas para definir cuáles son las proteínas y/o vías de señalización involucradas en la diferenciación de los linfocitos T durante su maduración en el timo, utilizamos un sistema de dimerización que nos permite entrecruzar proteínas particulares y analizar la consecuencia de estas interacciones. Este sistema se ha utilizado en nuestro laboratorio para definir la contribución de las cadenas del complejo TCR ζ /CD3

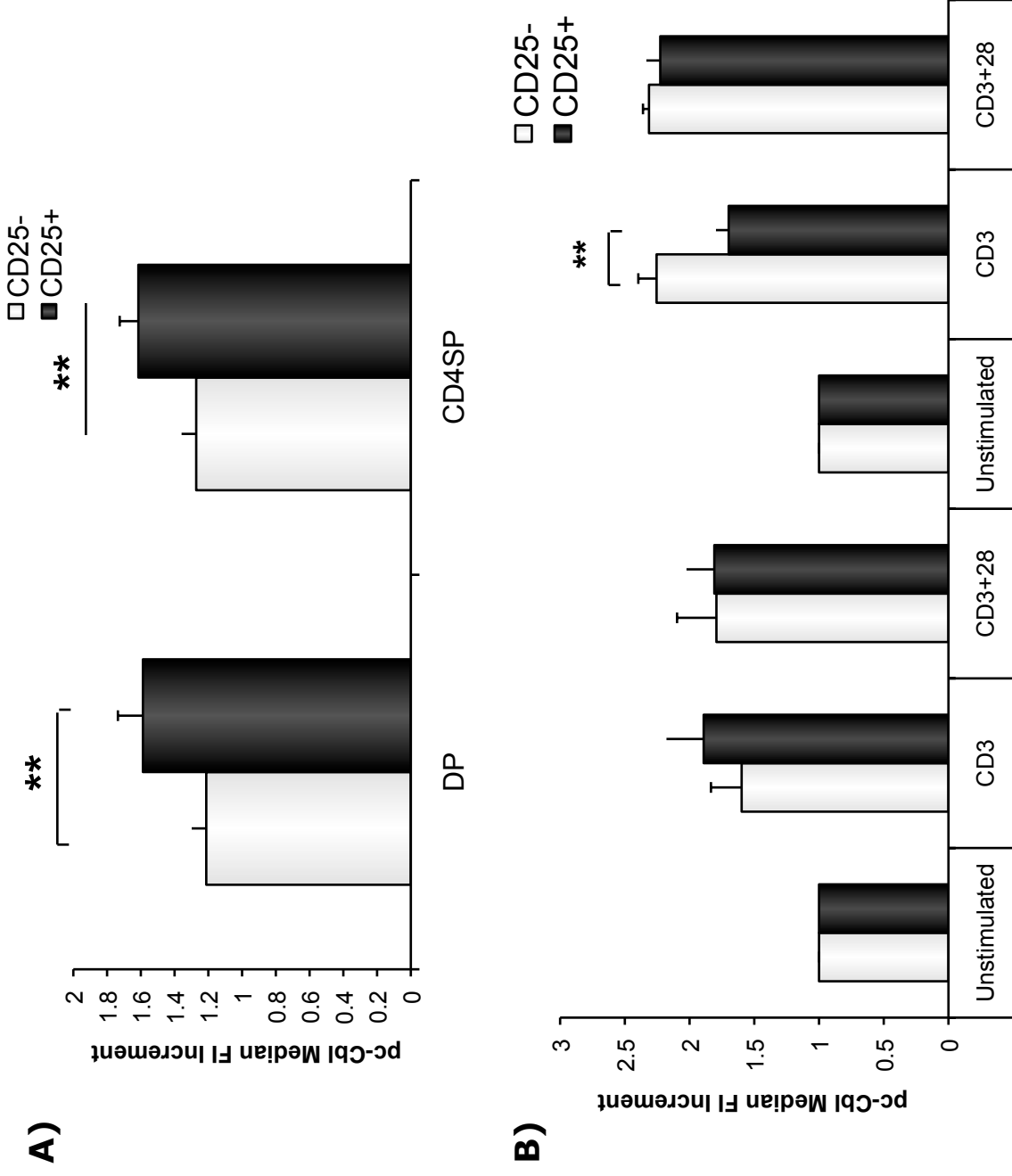


Figura 14. Los timocitos CD25^{+/alto} poseen una fosforilación basal de c-Cbl mayor que su contraparte CD25⁻, pero responden ineficientemente al estímulo con anti-CD3. Se determinó la fosforilación de c-Cbl en condiciones (A) basales y (B) en respuesta a anti-CD3 o anti-CD3+28. Se calcularon los valores mediante la relación entre los datos obtenidos en las muestras estimuladas entre los datos de las muestras sin estimular (medio) en timocitos CD25^{+/alto} y CD25⁻. Se muestra los promedios \pm error estándar (n = 5).

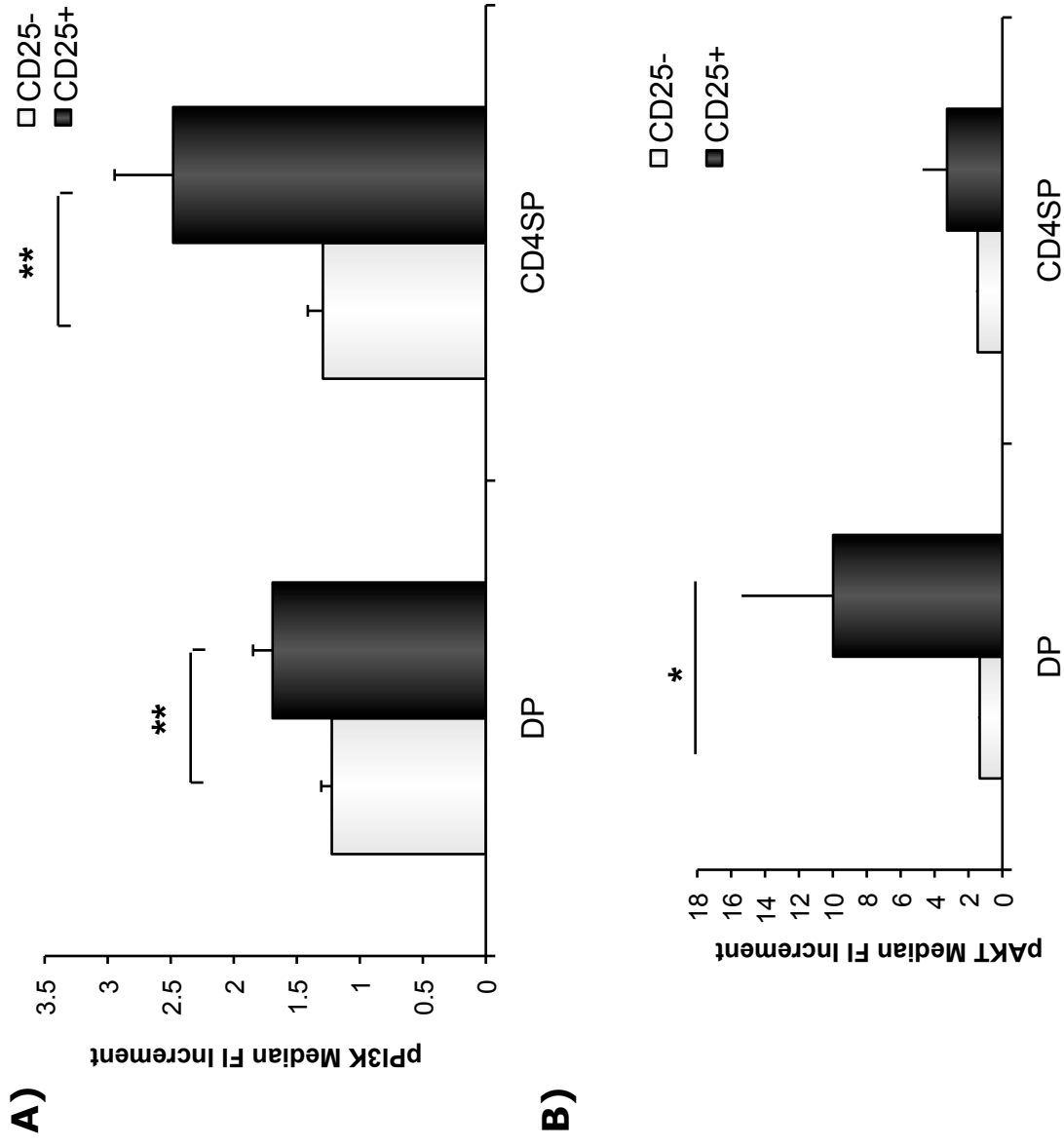


Figura 15. Los timocitos CD25^{+/alto} poseen una mayor fosforilación de PI3K y AKT que su contraparte CD25⁻. Se determinó la fosforilación basal de PI3K (A) y AKT (B) en timocitos CD25^{+/alto} y CD25⁻. Se calcularon los valores como se menciona anteriormente. Se muestra los promedios \pm error estándar (n = 8).

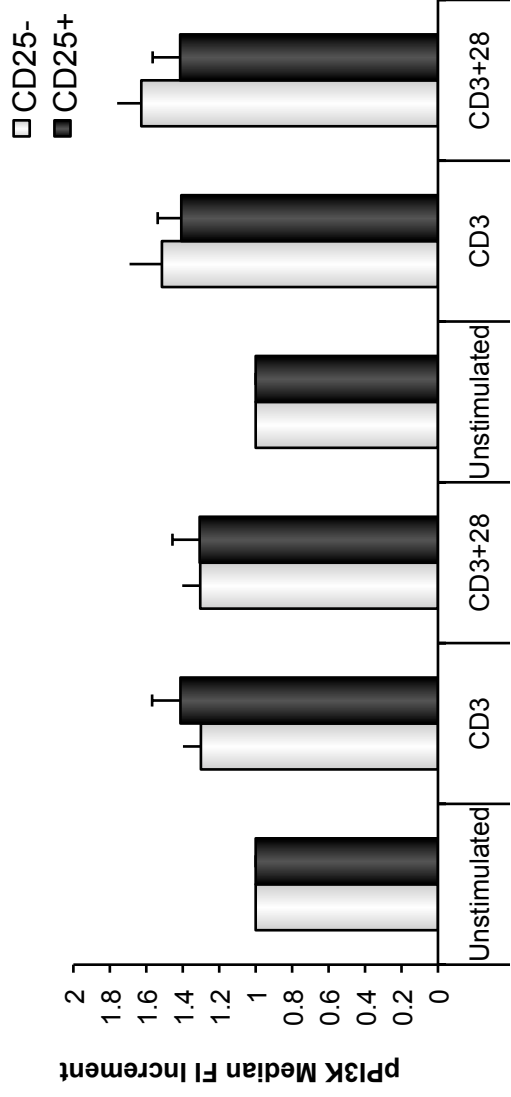
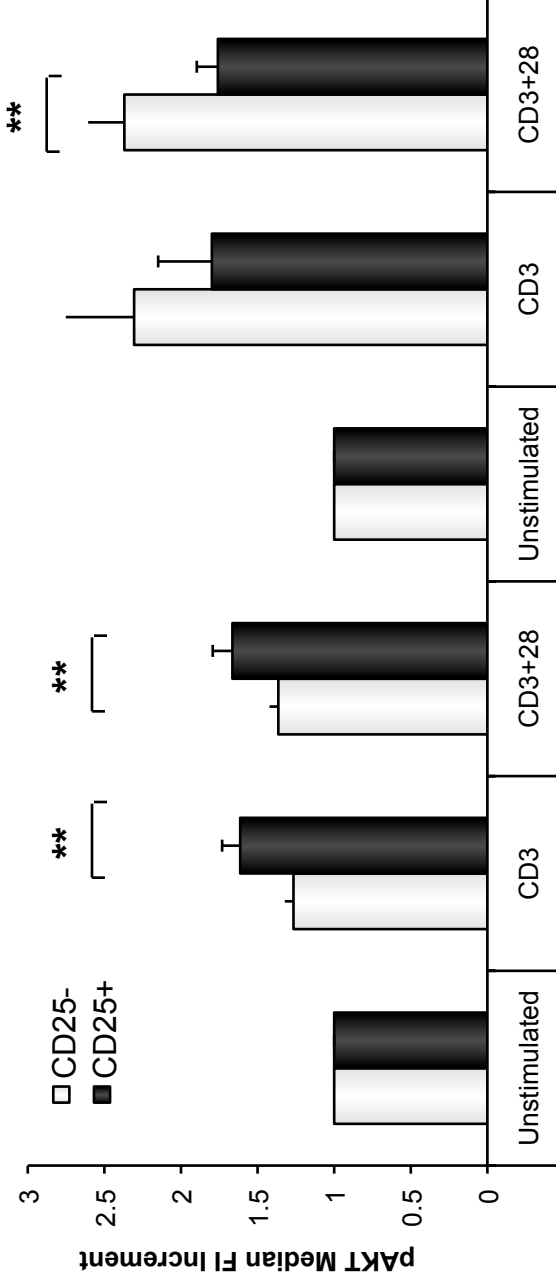
A)**B)**

Figura 16. Las células CD4SP CD25^{-/alto} responden de manera ineficientemente a la coestimulación con anti-CD28, mientras que los timocitos en estadio DP, responden mejor que los timocitos CD25⁺. Se determinó la fosforilación de PI3K (A) y AKT (B) en respuesta a anti-CD3 o anti-CD3 + anti-CD28. Se calcularon los valores como se menciona anteriormente. Las gráficas representan los promedios \pm error estándar (n = 8).

en la activación de los linfocitos T (228). Este sistema de dimerización está basado en el uso de moléculas orgánicas de bajo peso molecular capaces de permear la membrana e interactuar con dos ligandos al mismo tiempo e inducir su dimerización. A estas moléculas se les conoce como “inductores químicos de dimerización” (chemical inducers of dimerization, CIDs). Estos inductores constan de dos dominios que reconocen específicamente dominios que han sido fusionados a las proteínas de interés.

Para nuestro análisis, generamos quimeras de las proteínas CD4 y CD3 ϵ que contienen los dominios intracelulares de éstas, el dominio extracelular del CD2 humano y 1 ó 3 copias de la proteína chaperona FKBP modificada (F36V) y utilizamos como dimerizador a la molécula AP20187 (molécula derivada del dimerizador orginal AP1510). Las quimeras se generaron clonando el dominio extracelular del CD2 humano, los dominios intracelulares de CD4 y CD3 ϵ y los dominios de FKBP en el plásmido pSK(amp^r) y posteriormente insertando estas construcciones en el plásmido de expresión para células eucariontes pBJ5(neo^r). Se generaron líneas estables en la línea derivada de timocitos murinos, BW5147 (ATCC: CRL-1588); para las quimeras CD4FK*3, ÉpsilonFK*1 y ÉpsilonFK*3; que posteriormente fueron clonadas para elegir líneas con alta expresión (Figura 17).

Como se mencionó anteriormente, una de las vías de señalización más relevantes en la diferenciación de los timocitos a células naïve es la vía de las MAP cinasas, entre ellas, la cinasa Erk1/2 (revisado en (236)). Por lo que analizamos la fosforilación de esta cinasa en células estimuladas con el anticuerpo anti-CD2 humano, PMA+Ionomicina o el dimerizador AP20187 tanto por citometría de flujo como por Western Blot utilizando la quimera ÉpsilonFK*3. El entrecruzamiento extracelular de esta quimera por el anticuerpo anti-CD2

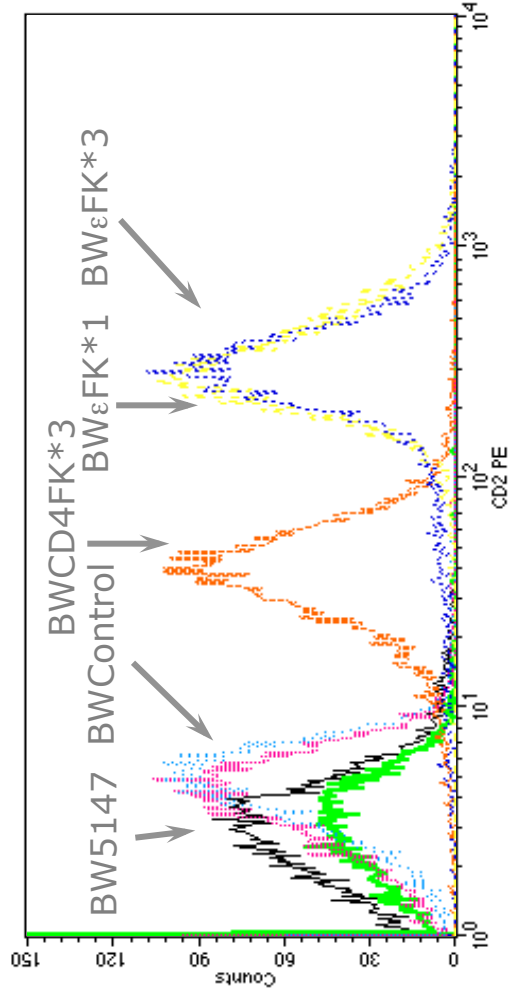


Figura 17. Expresión de las quimeras en la línea BW5147, determinada por una tinción extracelular para hCD2bn+StrepPE. En negro, células sin teñir y en verde, células con StrepPE.

fue capaz de inducir la fosforilación de Erk1/2 en ensayos de citometría de flujo. Sin embargo el entrecruzamiento intracelular con el dimerizador AP20187 no fue capaz de inducir la fosforilación de Erk1/2 (Figura 18). Para este ensayo, analizamos exclusivamente la señal activada por esta quimera.

Otra aproximación para analizar la activación de Erk fue detectar la fosforilación de esta cinasa en ensayos de Western blot utilizando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada de Erk1/2 (p42/p44, Thr202/Tyr204) y posteriormente determinar la proteína total, utilizando un anticuerpo contra la forma no fosforilada de esta cinasa. En estos ensayos observamos ciertas diferencias respecto a los resultados obtenidos por citometría de flujo. De manera similar a los experimentos de citometría de flujo, el entrecruzamiento extracelular de las quimeras de CD3 ϵ con el anticuerpo anti-hCD2 aumentó la fosforilación de Erk1/2. Sin embargo, en este caso el entrecruzamiento intracelular (AP20187) de las quimera ÉpsilonFK*3 también indujo la fosforilación de Erk1/2, mientras que no se observó una fosforilación significativa de Erk1/2 en la clona estable de ÉpsilonFK*1. Esto podría deberse a que el entrecruzamiento del receptor quimérico en FK*3 es mayor que en FK*1, puesto que contienen 3 copias de FKBP12(F36V) respecto a una sola copia de FKBP12 (F36V), lo que puede significar oligomerización (ÉpsilonFK*3) versus dimerización (ÉpsilonFK*3) (Figura 19).

En el caso de la línea BwCD4FK*3 la fosforilación basal de Erk1/2 es mayor a la observada en las líneas silvestre y las de Épsilon; y el entrecruzamiento tanto extracelular, con el anticuerpo anti-hCD2 o con el dimerizador (AP20187, 1') fue capaz de inducir una débil fosforilación de Erk1/2. (Figura 19). Estos resultados concuerdan con datos recientes obtenidos en el laboratorio, que demuestran que la expresión de la quimera CD4-2FK* en la

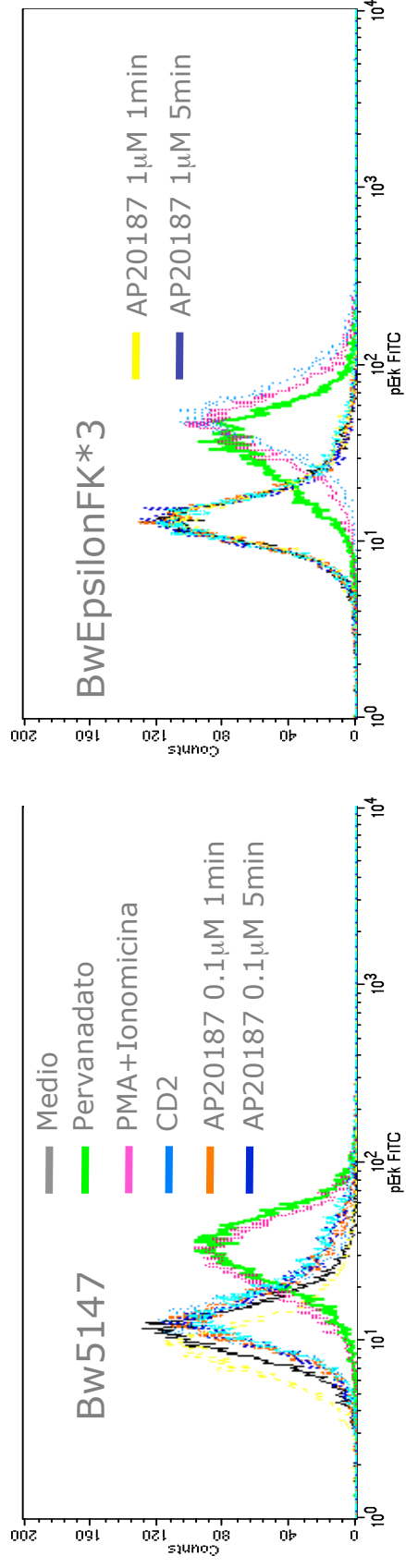


Figura 18. El entrecruzamiento extracelular de EpsilonFK*3 es capaz de inducir la fosforilación de Erk-1/2. 1×10^6 células de las líneas Bw5147 y BwEpsilonFK*3 se dejaron en medio RPMI + 0.5% de SFB por 18-20 horas. Se recuperaron y se estimularon con: Medio, Pervanadato (100 μM), PMA/Ionomicina (10 ng/ml y 0.1 μM respectivamente), anti-CD2bn (5 μg/ml) + Estreptavidina purificada (10 μg/ml), AP20187 (0.1 μM/1 μM, 1 y 5 minutos). Las células se tiñeron con anti-pErk y se analizaron por citometría de flujo.

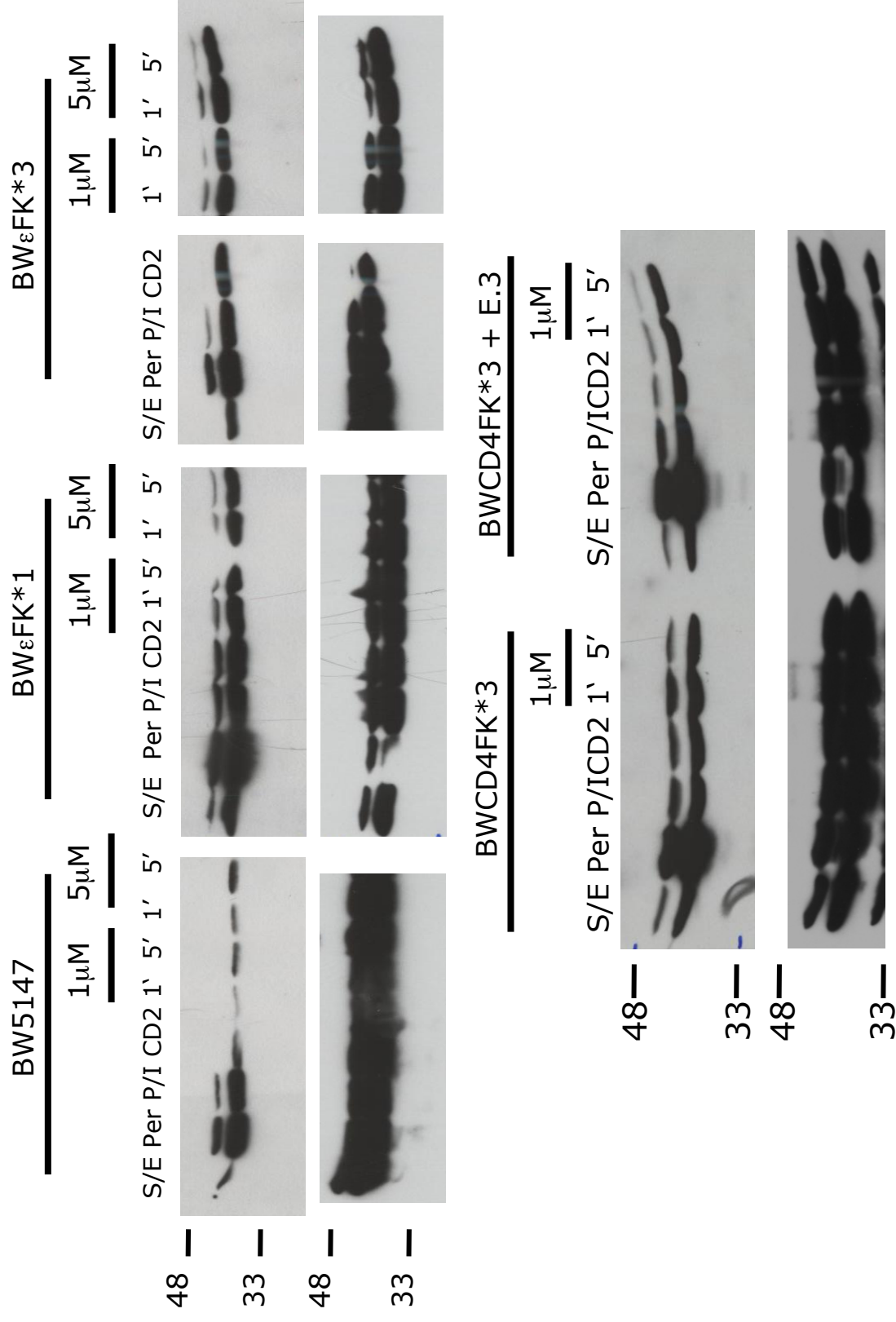


Figura 19. Fosforilación de Erk-1/2 inducida por el entrecruzamiento extracelular de EpsilonFK*1 y EpsilonFK*3. Fosforilación basal en BwCD4FK*3. 1×10^7 células de las líneas Bw5147, BwEpsilonFK*1, BwEpsilonFK*3, BwCD4FK*3, BwCD4FK*3 cotransfectada con EpsilonFK*3 se dejaron en medio RPMI + 0.5% de SFB por 18-20 horas. Se recuperaron y se estimularon como en la Figura 2. Se determinó la fosforilación de Erk 1/2 por Western Blot utilizando anti- pErk (panel de arriba). Para normalizar el nivel de fosforilación se determinó en las mismas muestras la proteína Erk total (panel de abajo). Y se realizó la densitometría para evaluar el nivel de fosforilación (no mostrado).

línea de timoma EL-4 (que se encuentra en el estadio DN3) aumenta la fosforilación basal de Erk1/2, y es además capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2. De manera interesante, la activación de la quimera Epsilon-3FK* en esta línea también fue capaz de inducir la fosforilación de Zap70 (V, Rayón. Tesis de maestría publicada, UNAM, 2009).

Así mismo, decidimos analizar las señales inducidas al coexpresar y entrecruzar tanto la quimera de ÉpsilonFK*3 y CD4*3, sin embargo, no observamos un aumento inducido por el entrecruzamiento extracelular o intracelular con respecto a las células no estimuladas.

Otra manera de evaluar la consecuencia de la activación celular es analizar cambios en el patrón de expresión de marcadores de diferenciación expresados en la superficie de los timocitos. Por esta razón, decidimos analizar la expresión de marcadores de maduración en el timo en las líneas que expresan la quimera de ÉpsilonFK*3. Concretamente se realizó la tinción de las células con anticuerpos anti-CD25, CD44, CD4, CD8, CD3, TCR β , CD5, CD69 y c-kit, antes y después de 3 días de cultivo en presencia del dimerizador, para ver su transición desde estadios DN hasta SP. Como se observa en la Figura 20, el entrecruzamiento extracelular ó intracelular de la quimera ÉpsilonFK*3 no fue capaz de modificar significativamente los patrones de expresión de marcadores de diferenciación en la maduración de la línea de timocitos inmaduros en la que está expresado (estadio DN1, CD25^{neg}CD44^{pos}) o los marcadores: TCR β ^{neg}, CD3^{neg}, CD4^{neg}, CD8^{neg}, CD5^{neg} y CD69^{neg}; así como no expresar el CD2 humano (hCD2^{neg}) (Figura 20).

Debido a que la línea celular Bw5147 se encuentra en un estadio DN1-DN2, y por tanto un estado muy temprano de maduración, y la capacidad de señalización intracelular varia a lo largo del proceso de diferenciación de los timocitos, decidimos investigar la

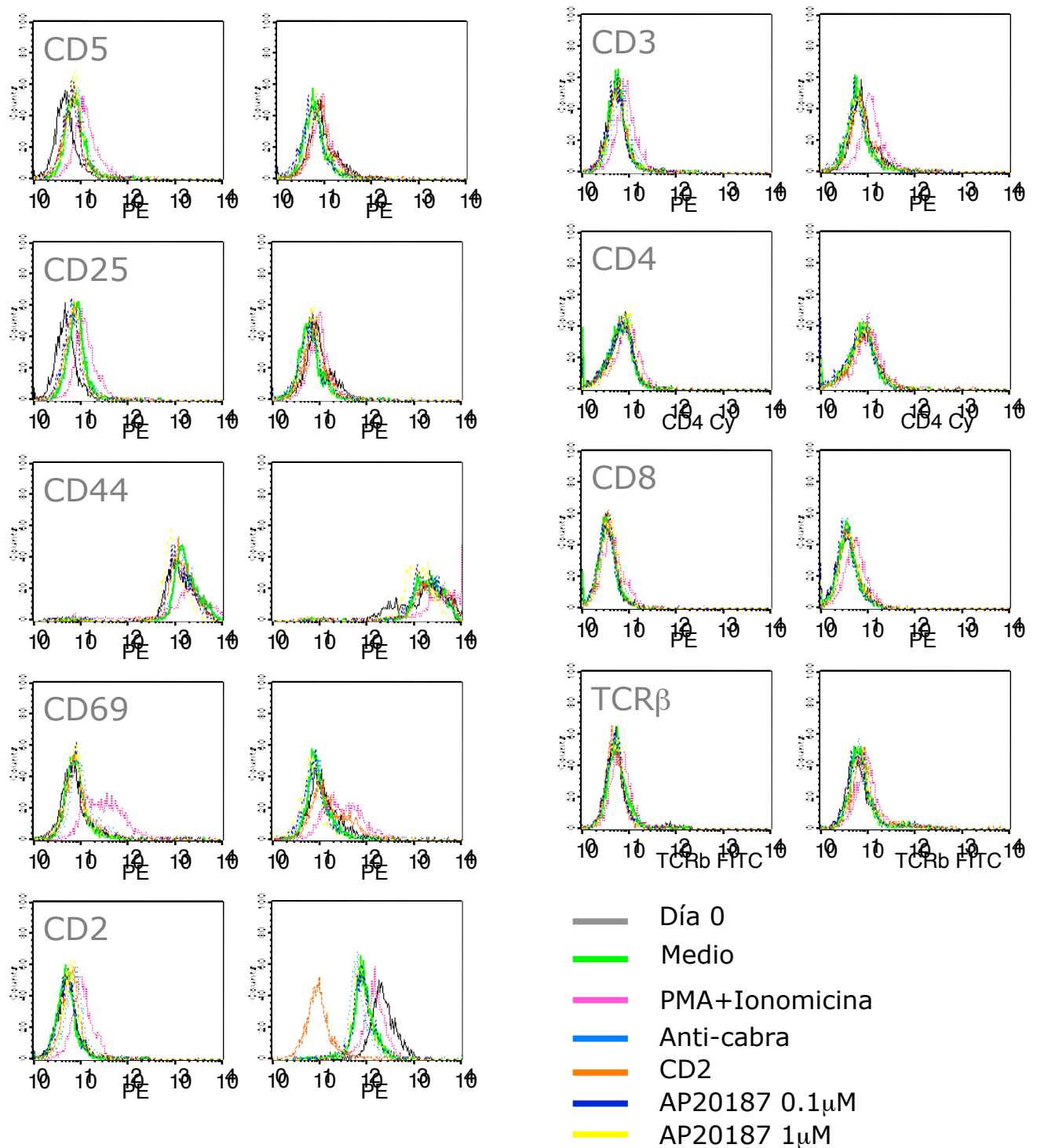


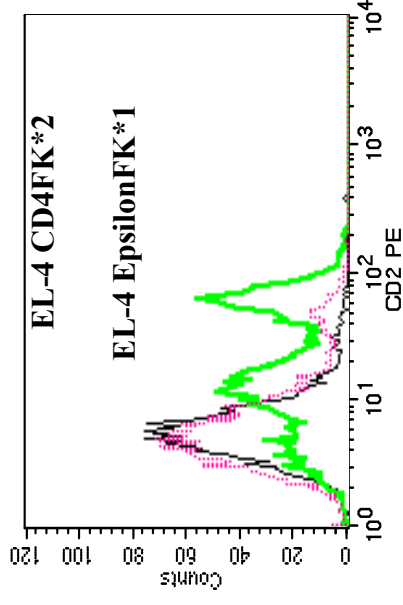
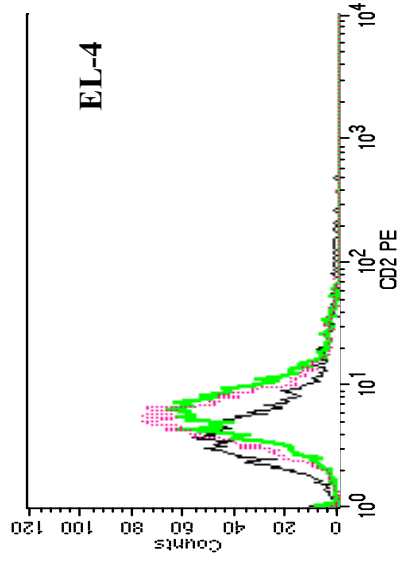
Figura 20. El entrecruzamiento de la quimera EpsilonFK*3 no es suficiente para inducir la expresión de marcadores de activación. 1x10⁶ células de las líneas Bw5147 y BwEpsilonFK*3 se estimularon por 18-20 horas con medio RPMI + 10% SFB, PMA/Ionomicina (10 ng/ml y 0.1 µM respectivamente), cabra anti- Ig ratón purificado (10 µg/ml), anti-CD2 purificado (5µg/ml) + cabra anti- Ig ratón purificado (10 µg/ml), AP20187 (0.1 µM) y AP20187 (1 µM). Se evaluó la expresión de los siguientes marcadores: CD5, CD25, CD44, CD69, CD2h, CD3, CD4, CD8 y TCRβ. Se muestra la expresión basal de los marcadores al día 0.

capacidad de transducción de señales de nuestras quimeras en una línea celular de timocitos que se encuentra en un estadio más avanzado, concretamente la línea EL-4 (DN3) y que por tanto expresa el pre-TCR en su superficie. Esta línea se transfectó con los plásmidos de las quimeras EpsilonFK*1, EpsilonFK*3, CD4FK*2 y CD4FK*3. Se añadieron como controles células EL-4 transfectadas con plásmido vacío y células transfectadas con el plásmido para la quimera de ZetaFKBPx3 (que contiene los dominios FKBP no mutados y que es ligando para el dimerizador AP1510 (228)). En este caso, las células transfectadas fueron teñidas de igual manera con el anticuerpo anti-hCD2 (Figura 21A). Posteriormente, se enriquecieron las poblaciones de mayor expresión mediante una tinción anti-hCD2 y separación por citometría de flujo (Figura 21B).

Con respecto a los ensayos de diferenciación mediante la expresión de marcadores específicos, encontramos que esta línea celular expresa principalmente marcadores de estadio DN1 (CD25^{neg}, CD44^{pos}, CD4/CD8^{neg}). Sin embargo, expresa también marcadores de activación (CD5^{pos}, CD69^{int}) así como CD3 y TCR β . Lo que sugiere que podría ser una línea en DN3 (Figura 22).

Adicionalmente, se estandarizaron las condiciones de estimulación para determinar la actividad de las cinasas Erk1/2. Para establecer la concentración adecuada de PMA y Ionomicina se realizaron pruebas de estimulación con diferentes concentraciones de PMA y Ionomicina: 10 y 25 ng/ml y 0.1, 1 y 1.2 μ M, respectivamente. Además, se utilizó Pervanadato 100 μ M como control positivo de fosforilación y células no estimuladas como control negativo. Los anticuerpos anti-hCD2bn y anti-mCD3bn se utilizaron a 5 μ g/ml y fueron incubados por 15 min a 4°C y posteriormente entrecruzados con 10 μ g/ml de estreptavidina purificada por 3 min a 37°C. El dimerizador AP20187 se utilizó a 1 μ M y se

A)



B)

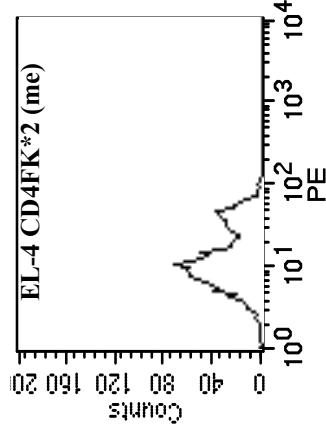
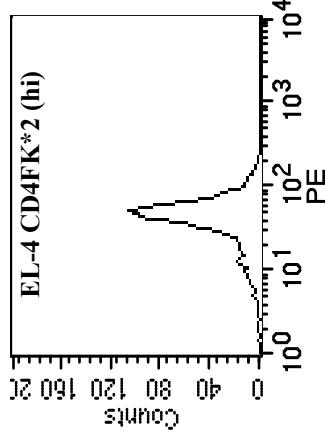
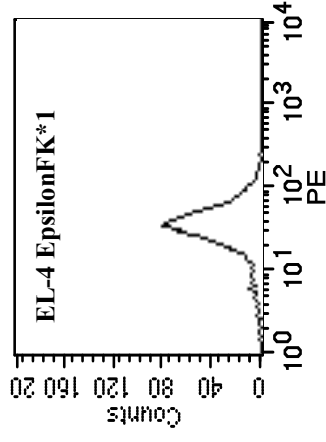


Figura 21. Expresión de las quimeras en la línea EL-4. A) Expresión de las quimeras determinada por una tinción extracelular para hCD2bn+StrepPE. En negro, células sin tñir y en verde, células con Estreptavidina PE (para E.6-1 y EL-4). CD4FK*2 en verde y EpsilonFK*1 en rosa. B) Expresión de las quimeras en la línea EL-4 después de separar por citometría de flujo. Para la línea que expresa la quimera de CD4, se separaron dos clones de mediana y alta expresión.

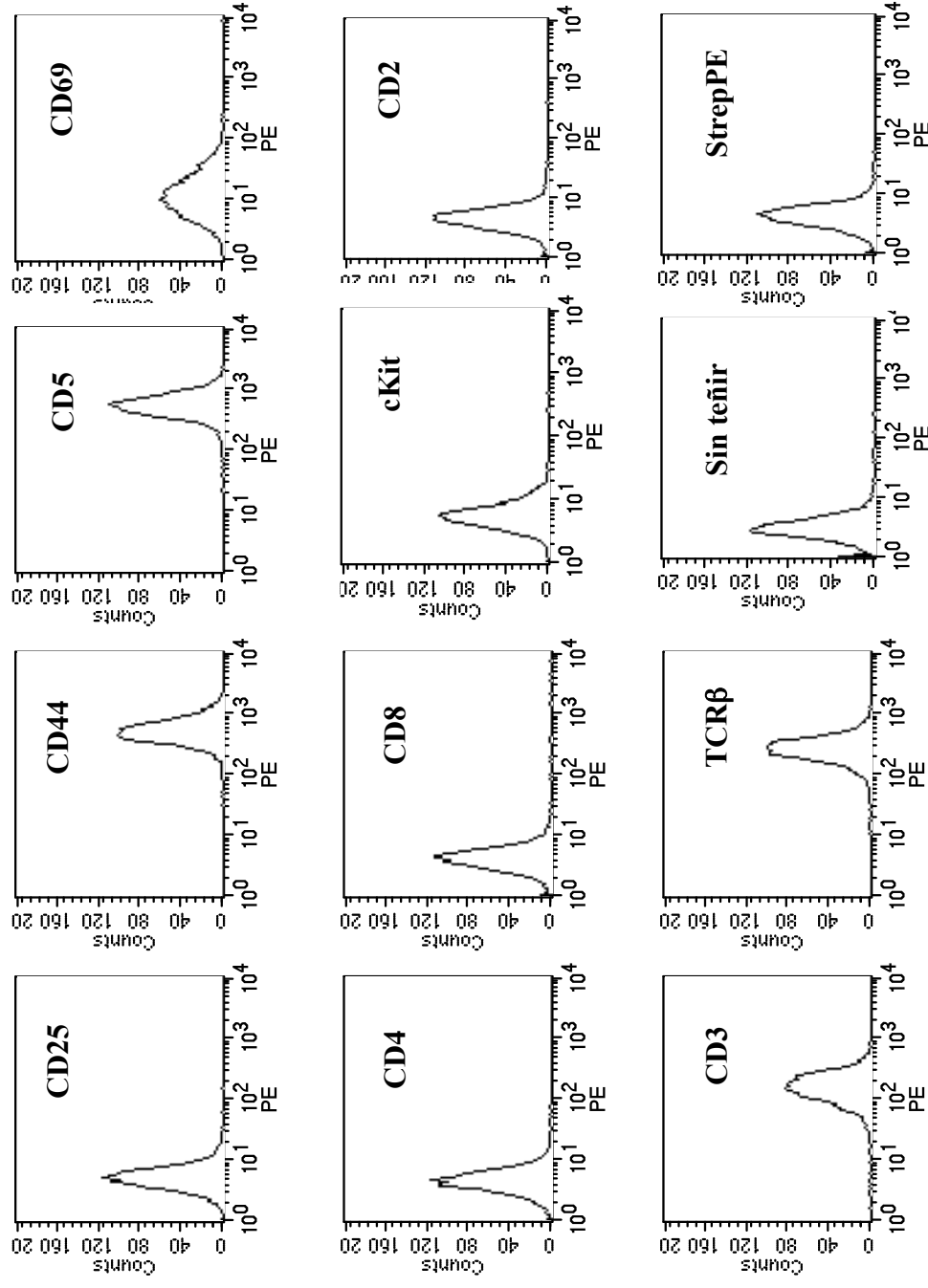


Figura 22. Expresión de marcadores de diferenciación y activación en la línea EL-4 después de separar por citometría de flujo. 1×10^5 células fueron teñidas con los anticuerpos CD25, CD44, CD4, CD8, CD3, TCR β , CD5, CD69 y c-kit, acoplados a biotina y estreptavidina PE.

incubó 5 min a 37°C. Las células se mantuvieron en medio RPMI + 0.5% de SFB por 18-20 horas y se estimularon 5 min a 37°C para medio y PMA/Ionomicina; y 15 min a 37°C para Pervanadato. Posteriormente se hizo la tinción intracelular con anti-pErk + Goat anti-mouse FITC y se analizaron en el FACsCalibur. Con estos ensayos se determinó que la concentración ideal de PMA/Ionomicina es 10 ng/ml y 0.1 μ M respectivamente. También se observó que no hay actividad de Erk inducida por el anticuerpo anti-hCD2, ni por el dimerizador AP20187. Sin embargo, la estimulación por el anticuerpo anti-CD3 no fue capaz de inducir la activación de Erk (Figura 23).

Se analizó también la capacidad de estas células para inducir flujos de calcio en respuesta a las diferentes condiciones de estimulación. Para ello, se tiñeron las células con los colorantes Fluo-3 y Fura-Red y posteriormente fueron estimuladas con las concentraciones usadas para el ensayo de activación de Erk. Los flujos de calcio fueron determinados por citometría de flujo. En estos ensayos se confirmó que la línea celular es capaz de activar la liberación de calcio inducida por la estimulación de PMA/Ionomicina y anti-CD3 (10 μ g/ml). La estimulación por anti-CD2 o el dimerizador no fue capaz de inducir flujo de calcio (Figura 24). Por lo tanto, esta línea podría ser utilizada, posteriormente, para analizar el flujo de calcio en las líneas que expresen nuestras quimeras.

Estas líneas EL-4 estables fueron clonadas y han sido utilizadas posteriormente en el laboratorio para el análisis de la activación condicional de CD4 y CD3 Épsilon, mediante el entrecruzamiento con el dimerizador AP2018, demostrando su capacidad de inducir la fosforilación de Zap70 y Erk1/2 (Tesis de maestría de Violeta Rayón, UNAM, 2009).

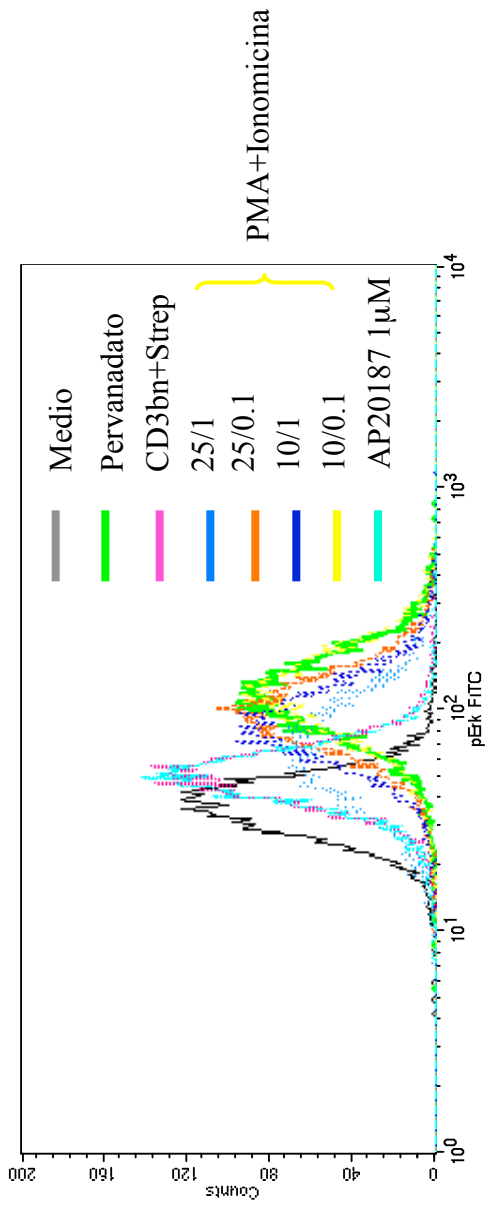


Figura 23. Estandarización de las condiciones de estimulación para detectar Erk-1/2. 1×10^6 células de la línea EL-4 se dejaron en medio RPMI + 0.5% de SFB por 18-20 horas. Se recuperaron y se estimularon con: Medio, Pervanadato ($100 \mu\text{M}$), PMA/Ionomicina (10 y 25 ng/ml, 1 y $0.1 \mu\text{M}$ respectivamente), anti-CD2bn ($5 \mu\text{g/ml}$) + Estreptavidina purificada ($10 \mu\text{g/ml}$), AP20187 ($0.1 \mu\text{M}/1 \mu\text{M}$, 1 y 5 minutos). Las células se tiñeron con anti-pErk y se analizaron por citometría de flujo.

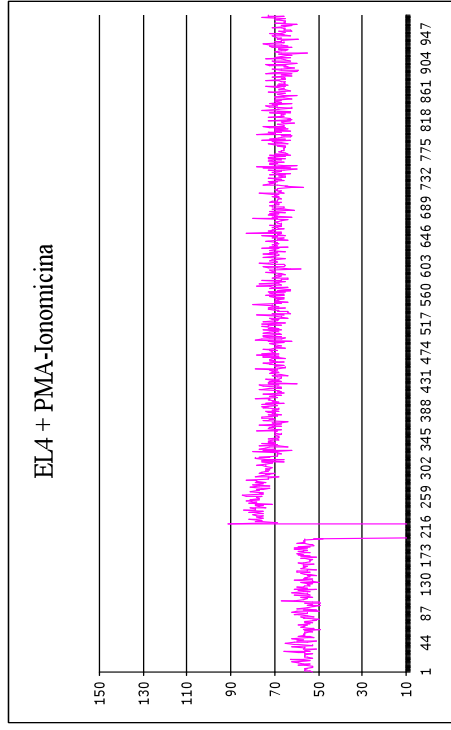
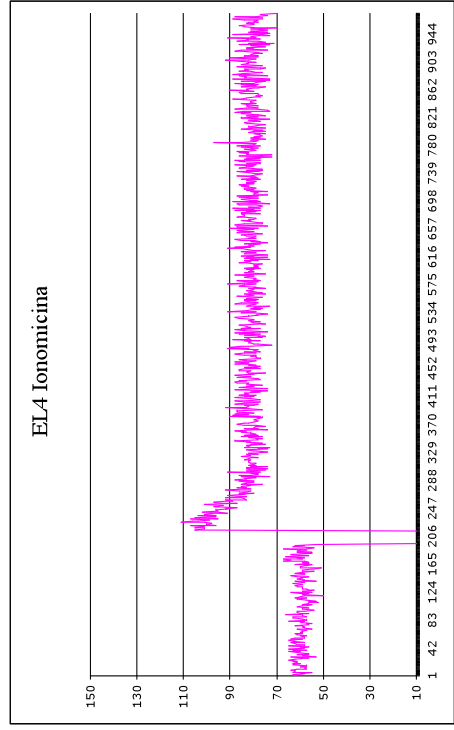
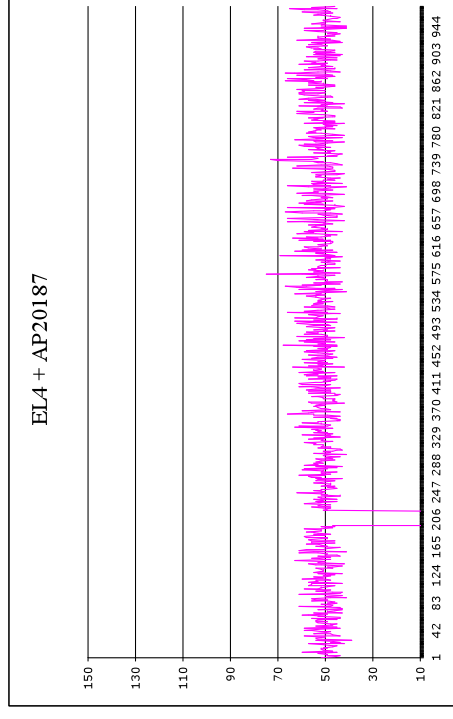
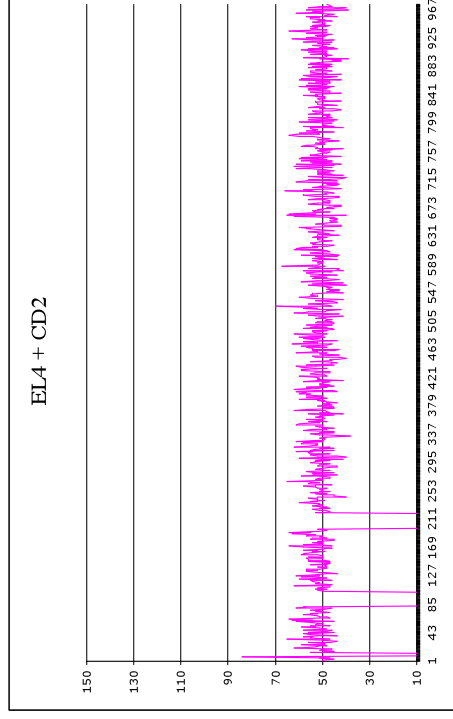
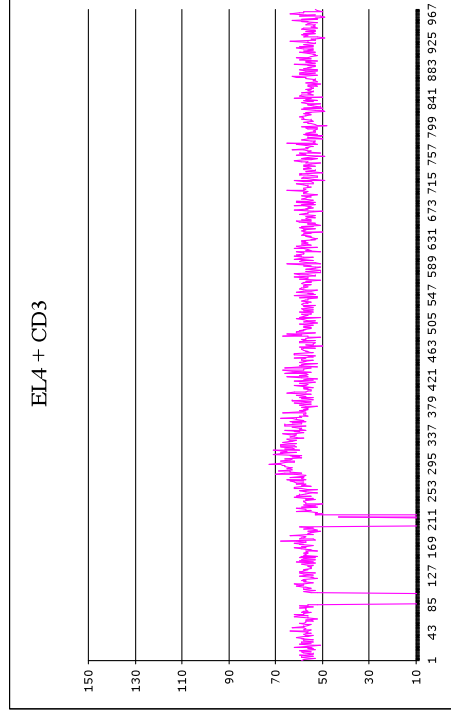


Figura 24. Estandarización de las condiciones de estimulación para detectar flujo de calcio en la línea EL-4 . 0.5×10^6 células de la línea EL-4 fueron teñidas con los colorantes Fluo-3 y Fura-Red y se estimularon con: PMA/Ionomicina (10 ng/ml, y 0.1 μ M respectivamente), anti-CD2bn (5 μ g/ml) + Estreptavidina purificada (10 μ g/ml), anti-CD3bn (10 μ g/ml) + Estreptavidina purificada (20 μ g/ml AP20187 (1 μ M). Se determinó la liberación de calcio mediante la relación Fluo-3/Fura-Red.



c. Análisis de la señalización *in vivo*: Modelo de infección retroviral

Adicionalmente al análisis en líneas celulares, decidimos estandarizar un modelo de expresión de nuestras quimeras que nos permitiera evaluar el efecto de la señalización en el desarrollo de los timocitos *in vivo*. Para ello, utilizamos un sistema retroviral que nos permite seguir las células que expresan nuestras proteínas quiméricas mediante la utilización de la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero y cuya expresión correlaciona con la expresión de la proteína de interés ((237) y revisado en (238)). Los plásmidos virales (MIG), que contienen las quimeras de CD4FK*2, CD4FK*3, ÉpsilonFK*1 y ÉpsilonFK*3, fueron transfectados en fibroblastos humanos de la línea HEK293 (riñón embrionario humano) para obtener las partículas virales de los sobrenadantes del cultivo. El título de los sobrenadantes es verificado infectando fibroblastos murinos de la línea 3T3 y posteriormente se utilizaron para infectar ya sea, timocitos DN extraídos de fetos de ratones silvestres de día 14 de gestación (d14) ó células progenitoras extraídas de médula ósea de ratones de 6-8 semanas. Con respecto a la infección de timocitos DN, se obtuvieron porcentajes de transfección de hasta 25% de células GFP⁺ (Figura 25) y de infección en células 3T3 de entre 5 y 16% (Figura 26).

Con respecto al análisis en las células de médula ósea, las células fueron infectadas con el plásmido vacío (con porcentajes de infección del 20-30%) (Figura 27) y transferidas a ratones MHC KO irradiados ($1-2 \times 10^6$ células por ratón). Después de 6-8 semanas se extrajeron el timo, los ganglios, mesentéricos y periféricos, el bazo y la médula ósea del fémur y se analizó la expresión de GFP⁺ en cada uno de los órganos. Nuestros resultados muestran un 10% de células GFP⁺ en los diferentes órganos de los ratones analizados, así como un desarrollo normal de las células transferidas a ratones C57/BL6 (Figura 28) con lo

que este modelo puede ser utilizado para un posterior análisis con las quimeras y el dimerizador.

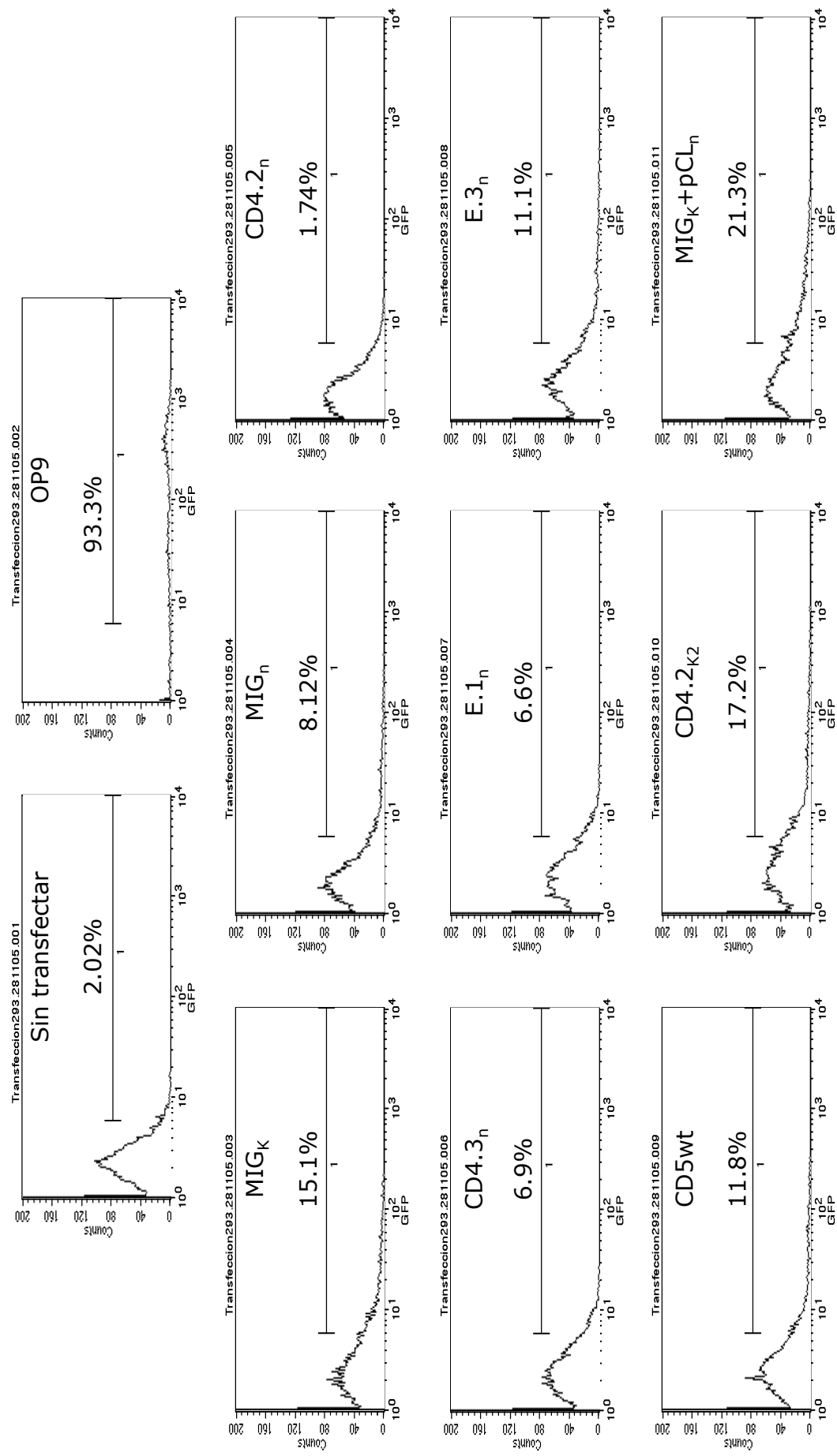


Figura 25. Transfección de plásmidos retrovirales en la línea HEK-293T . Las células son transfectadas con 4-5 μ g de plásmido MCSV (vacío o con las quimeras) + 4-5 μ g de plásmido pCLECO (para empacar el virus). A las 24 horas se sustituye el sobrenadante y a las 48 horas se recupera. Se muestra la transfección de diferentes plásmidos. OP9 corresponde a una línea celular que expresa constitutivamente GFP.

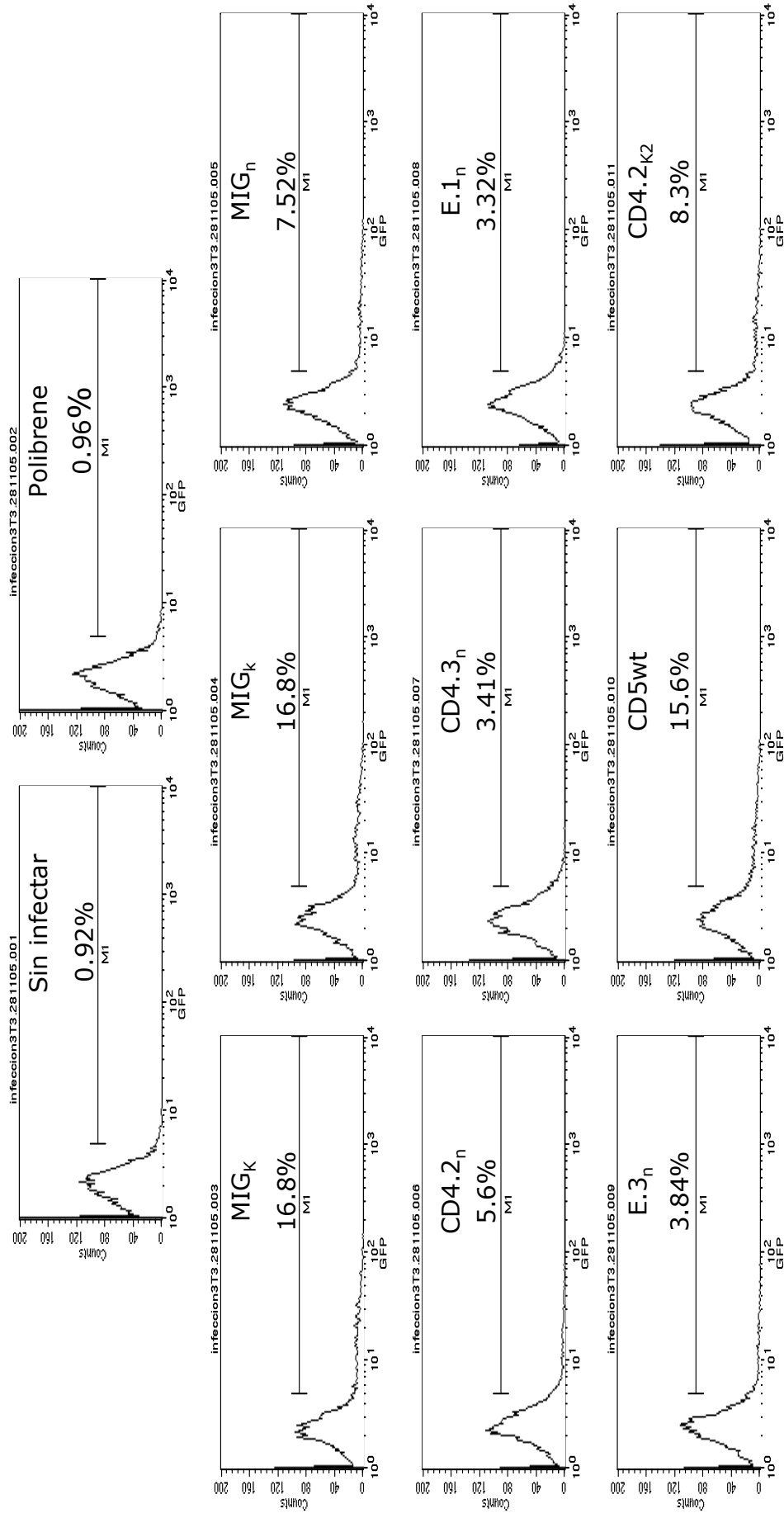


Figura 26. Infección de sobrenadantes retrovirales en la línea 3T3 . Las células son infectadas por centrifugación con ml de sobrenadante viral + polibrene (5 µg/ml). Después de 24 horas se recuperan las células y se analiza la expresión de GFP.

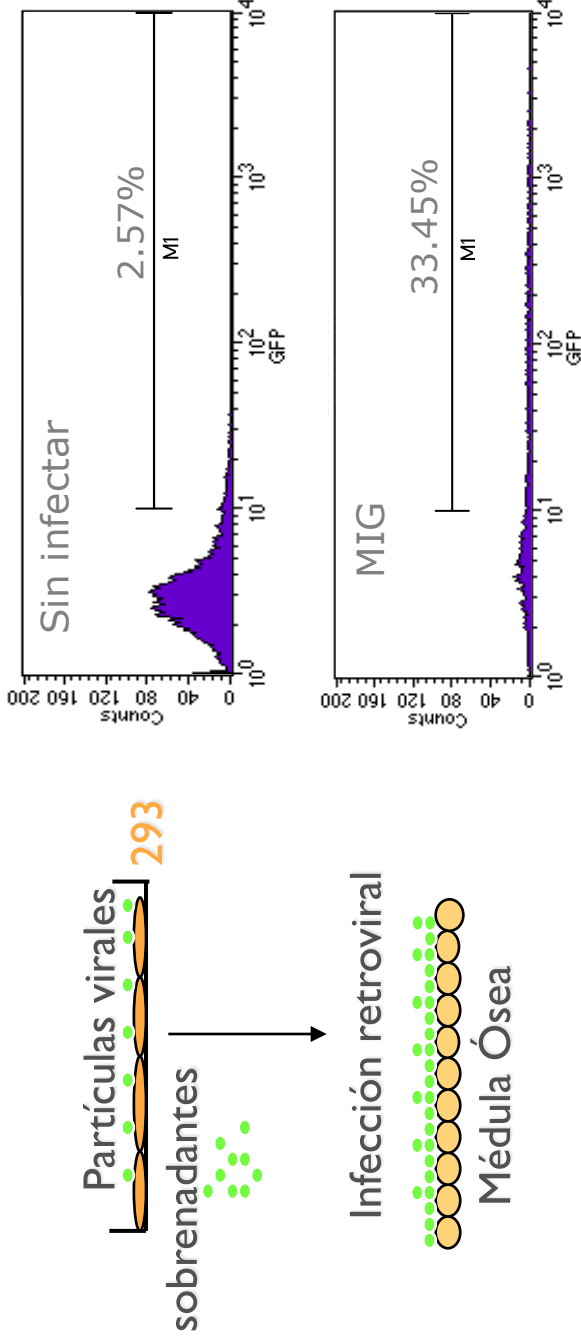


Figura 27. Expresión de GFP en células de médula ósea infectadas con el plásmido MCSV. Se transfectó línea HEK-293T con el plásmido MCSV para generar sobrenadantes virales. Las células de médula ósea son infectadas por centrifugación con 1 ml de sobrenadante viral + polibreno (8 $\mu\text{g/ml}$) por 90 minutos a 2,500 rpm. Una vez terminada la centrifugación, se sustituye el 50% del sobrenadante y se añade medio fresco más citocinas. Después de 24-48 horas se recuperan las células, se analiza la expresión de GFP y se reconstituyen ratones irradiados (1,250 rads) con $1-2 \times 10^6$ células por ratón. Se muestra el porcentaje de células GFP⁺ determinado por citometría de flujo. La expresión de GFP correlaciona con la expresión del gen insertado en el plásmido.

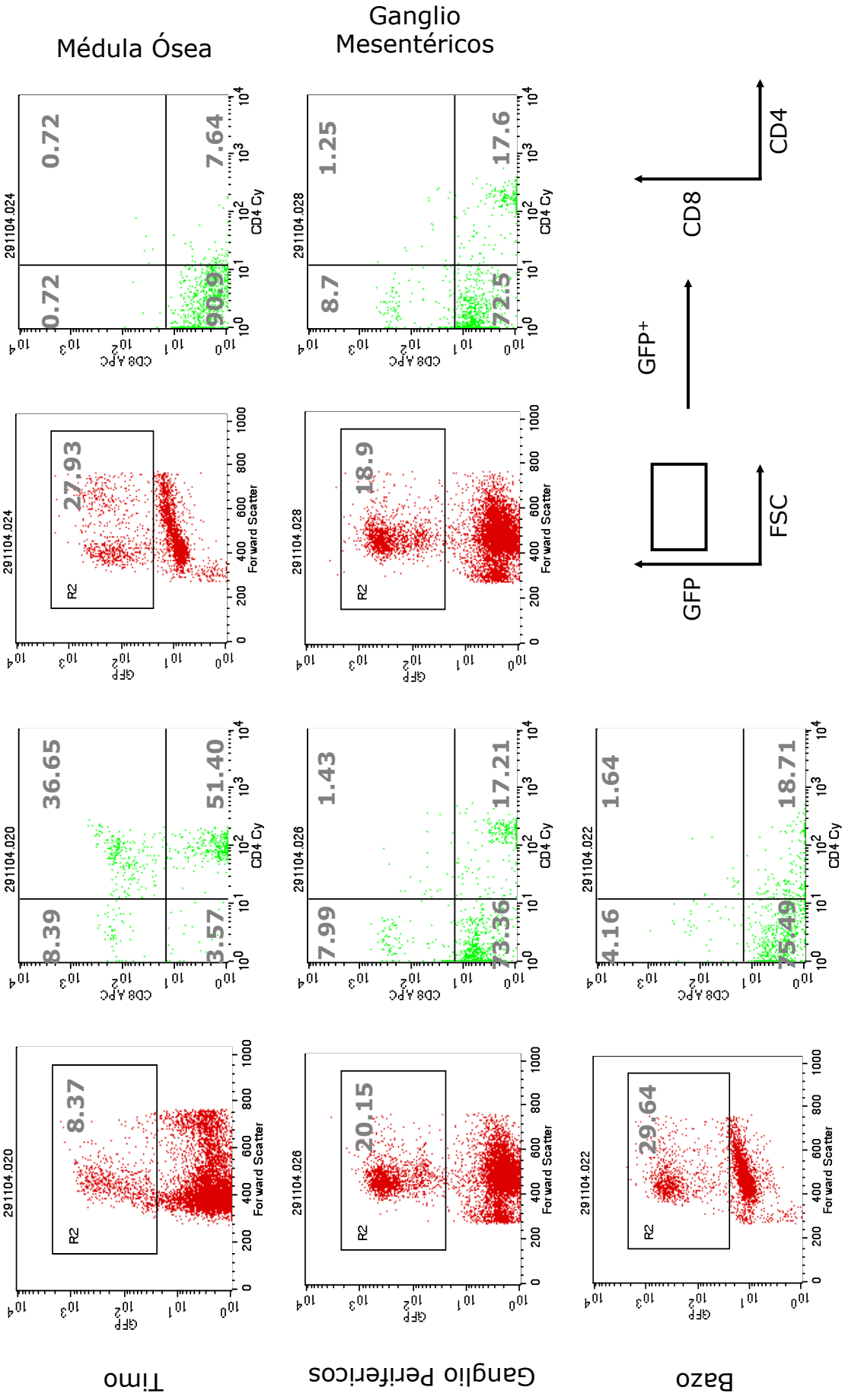


Figura 28. Las células de médula ósea GFP⁺ son capaces de reconstituir timo y órganos linfoides secundarios. 2x10⁷ células de médula ósea transfectadas con el plásmido MCSV (control GFP) fueron inyectadas intravenosamente en ratones irradiados de la cepa C57/B6 previamente irradiados. 9 semanas después de la transferencia se analizó la reconstitución del timo, médula ósea y la migración a órganos linfoides secundarios, mediante la expresión de los marcadores CD4 y CD8 de las células GFP⁺.

XI. Discusión

Los mecanismos moleculares involucrados en la maduración de los timocitos y la generación de células T reguladoras en el timo están aún en discusión. En este trabajo analizamos las vías de señalización involucradas en la diferenciación de las células T reguladoras en modelos *in vivo*.

Con respecto a la generación de células T reguladoras, analizamos algunas moléculas en la vía de señalización del TCR, así como de CD28, con el fin de determinar vías particulares relacionadas con la diferenciación de estas células. Para ello utilizamos tanto un modelo de ratones transgénicos en el que se expresan al mismo tiempo un TCR específico como su péptido (HA), y en el cual se ha descrito la generación de células T reguladoras antígeno-específicas (199, 227), así como ratones silvestres, con el fin de comparar la selección de las células reguladoras “naturales” con las que expresan un receptor de alta afinidad. Debido a que la generación de células reguladoras a nivel de timo no se había descrito en los ratones TCRHA x IgHA, realizamos un análisis de la expresión de Foxp3 en las poblaciones DP y CD4SP de estos ratones y su contraparte TCRHA (donde los timocitos transgénicos se desarrollan en ausencia del péptido agonista HA). En estos ensayos encontramos un incremento significativo en el porcentaje de células Foxp3⁺ dentro de la población TCR-específica (6.5⁺) tanto en el estadio DP como CD4SP en los ratones que expresan el péptido específico (TCRHA x IgHA) en comparación con los ratones que no lo expresan (TCRHA x Balb-c). Este incremento se ha observado también en otro modelo, en el que se utiliza el mismo receptor, pero en el que el péptido HA es expresado bajo el promotor de GFAP. En este modelo observan que la expresión de Foxp3 se induce en las células 6.5⁺ sólo cuando el antígeno se encuentra expresado en células del estroma tímico (239). Con respecto al

número total de células, observamos también un incremento, pero en este caso, los datos no alcanzaron significancia. Esto se podría explicar por la alta mortalidad de las células TCR-específicas al encontrar su antígeno y la alta afinidad de la interacción.

Estos datos por un lado apoyan la teoría de que las señales del TCR “instruyen” a los timocitos a diferenciarse al fenotipo regulador. Sin embargo, como también se ha propuesto anteriormente, el incremento relativo de esta población puede deberse a una mayor resistencia de las células reguladoras a ser seleccionadas negativamente (240).

Cuando analizamos la expresión de CD25 en los timocitos de los ratones TCRHA x IgHA encontramos que la expresión de Foxp3 no se encuentra restringida a la población CD25^{+/alto}, como se observa en los ratones silvestres, sino también en células 6.5⁺CD25⁻, y que ésta aumenta durante la diferenciación del estadio DP al CD4SP. Este dato concuerda con la generación de una población CD25⁻ con fenotipo regulador observado en la periferia de estos ratones (199). En este trabajo, los autores proponen que no es necesaria la expresión de antígenos en el epitelio tímico, ya que las células (CD25⁻ con fenotipo regulador) se pueden diferenciar al fenotipo regulador en presencia de células hematopoyéticas de médula ósea como células presentadoras. Por otro lado, otros grupos que han encontrado estas células CD25⁻, proponen que podrían ser seleccionadas por la interacción con otros tipos celulares células dendríticas tímicas o macrófagos, dato que ha sido confirmado por el grupo de Liblau y colaboradores, utilizando un modelo similar (239).

Aún falta por definir si esta población de células Foxp3⁺CD25⁻ son un subtipo diferente de células reguladoras “instruidas o pre-programadas” antes de llegar al timo y pudieran ser los progenitores de las células reguladoras generadas en periferia (iTregs) o son células

seleccionadas por otro tipo de presentadoras que en modelos transgénicos, expresan antígenos con una mayor densidad.

Con respecto a las vías de señalización involucradas en la generación de células reguladoras, analizamos inicialmente la fosforilación de Erk1/2 y P38 como moléculas que se han asociado a los eventos de selección positiva y negativa. En condiciones basales, no encontramos diferencias significativas en la fosforilación de Erk1/2 y P38 en las células reguladoras (CD25^{+/alto}) con respecto a las naïve (CD25⁻) en los ratones transgénicos (TCRHA x IgHA). Sin embargo, se encontraron diferencias con respecto a ambas moléculas en los ratones silvestres: las células reguladoras muestran una mayor fosforilación de Erk1/2 y P38 en la subpoblación de timocitos DP, mientras que en los timocitos CD4SP estas diferencias no son tan marcadas. El incremento en la fosforilación basal de estas moléculas concuerda con una mayor fosforilación de la cadena TCR ζ observada tanto en timocitos como en células periféricas CD25^{+/alto} (203) y apoyan la teoría de que señales de alta avides/intensidad promueven la diferenciación al fenotipo regulador.

En condiciones de estimulación, los timocitos CD4SP 6.5⁺CD25^{+/alto} del ratón TCRHA x IgHA responden de manera deficiente al entrecruzamiento por anti-CD3 en comparación con las células que no han visto su antígeno (TCRHA x Balb-c). Este fenómeno se observa de la misma manera en las células T reguladoras de los ratones silvestres, en los que la deficiencia se observa también en respuesta a anti-CD3 + anti-CD28, mientras que la respuesta a PMA+Ionomicina es similar en ambos ratones. Este resultado sugiere una deficiencia en la señalización de las células T reguladoras a nivel del complejo TCR/CD3 y la señalización inicial en esta vía. Esta falta de respuesta de Erk contradice resultados obtenidos por otro grupo, en el que describen una fosforilación aumentada de Erk y una

disminución de la fosforilación Akt en células T reguladoras periféricas humanas (231). Estas diferencias podrían deberse a las condiciones celulares dependiendo del estadio de maduración (timocitos versus células periféricas), el origen celular (ratón versus humano); o por las diferencias en las condiciones experimentales, entre las que están los tiempos de estimulación utilizados. Con respecto a esto, se ha descrito que es importante la localización y la activación temporal de estas proteínas durante la selección positiva y negativa; ya que péptidos que inducen selección positiva, inducen un flujo de calcio lento, un reclutamiento deficiente de TCR ζ y ZAP-70, una fosforilación parcial de LAT y una activación retardada de Erk, después de 5-10 min de estimulación. De manera contraria, péptidos que inducen selección negativa, muestran un flujo de calcio más rápido, una mayor fosforilación de TCR ζ , ZAP-70 y LAT y una activación fuerte y transitoria de Erk durante los primeros 1-2 min de estimulación. Por su parte, P38 fosforilada está aumentada en esta subpoblación en los ratones TCRHA x IgHA en comparación con los TCRHA x Balb-c. Sin embargo, este aumento no se observó en los ratones silvestres, por lo que será necesario utilizar otras metodologías para definir el papel de P38 en este proceso.

Nuestros datos con respecto a esta vía, en la que observamos una deficiencia en la fosforilación de Erk pero un aumento en la de P38, concuerdan con datos publicados anteriormente en los que células T reguladoras “inducidas” (iTregs), con fenotipo anérgico, muestran deficiencias en la activación de Erk y JNK, pero una mayor activación de P38 ((241) y revisado en (242)).

Puesto que el TCR que expresan nuestros ratones transgénicos son receptores con alta afinidad por su ligando, nuestra hipótesis planteaba la posibilidad de una mayor fosforilación de los reguladores negativos de la señal del TCR. Uno de estos reguladores

negativos descritos de la señalización del TCR es la ligasa de ubiquitinas, c-Cbl (232, 233) y la cual se ha descrito como una molécula importante para mantener el fenotipo anérgico de las células T reguladoras (revisado en (234)). De forma inesperada, encontramos que la fosforilación de c-Cbl, tanto basal como en respuesta a anti-CD3, está disminuida en las células $6.5^{+}CD25^{+}/alto$ del ratón TCRHA x IgHA en comparación con las células del ratón TCRHA x Balb-c.

Por su parte, las células $CD25^{+}/alto$ de los ratones silvestres muestran, como esperábamos, una mayor fosforilación basal de c-Cbl tanto en el estadio DP como CD4SP. Sin embargo, en respuesta a estimulación, se mantiene la deficiencia en la fosforilación de esta ligasa de ubiquitina, tal cual se había observado en los ratones transgénicos. Esta diferencia en la fosforilación de c-Cbl en los ratones transgénicos y silvestres puede ser explicada por la diferencia en los niveles de expresión del TCR, ya que este receptor se expresa desde el estadio DN y no posee mecanismos de regulación endógenos.

Finalmente, analizamos la fosforilación de las cinasas PI3K y AKT como marcadores de la señalización inducida a través de CD28 y que se han relacionado con la maduración de las células T reguladoras “naturales” (revisado en (63)). PI3K se encontró aumentada en los timocitos $CD25^{+}/alto$ de las subpoblaciones DP y CD4SP de los ratones silvestres, mientras que en respuesta a estimulación, encontramos una disminución no significativa en la fosforilación de ésta en ambos estadios.

En el caso de AKT, tanto en el modelo de los ratones transgénicos como en los ratones silvestres encontramos una fosforilación basal aumentada en las células T reguladoras ($CD25^{+}/alto$) en estadio DP que en su contraparte $CD25^{+}/alto$ de los ratones TCRHA x Balb-c y $CD25^{-}$ en los silvestres. Cabe mencionar que esta diferencia no se observó en timocitos en

estadio CD4SP. De manera interesante, los timocitos DP inducen una fosforilación aumentada de esta cinasa en respuesta al entrecruzamiento con anti-CD3 + anti-CD28, mientras que los timocitos CD4SP muestran una clara deficiencia en la fosforilación de esta proteína. Estas diferencias en el comportamiento de PI3K y AKT en los diferentes estadios podría sugerir que durante el estadio DP, las células “potencialmente” reguladoras, inducen señales de mayor intensidad; sin embargo, una vez seleccionadas, deben tener mecanismos de modulación que concuerden con su posterior fenotipo anérgico.

En conclusión, nuestros datos con respecto a la generación de las células T reguladoras “naturales” sugieren que los timocitos que se seleccionan en presencia de un antígeno específico, muestran una señalización particular caracterizada por una falta de activación de Erk, c-Cbl y AKT pero una mayor activación de P38 en respuesta a la estimulación por el TCR. Mientras que en condiciones basales, se observó una mayor activación de Erk, c-Cbl y PI3K.

Finalmente, generamos un modelo de activación condicional de receptores quiméricos que podrá ser utilizado como base para analizar la participación de moléculas en particular en la diferenciación de los timocitos a los linajes CD4SP, CD8SP y su diferenciación a células T reguladoras. Con respecto a esta parte, el modelo *in vitro* es capaz de determinar la activación de moléculas importantes en la señalización del pre-TCR y el TCR, como por ejemplo la vía de las MAPK, la vía de calcio, así como analizar el efecto sobre la expresión de marcadores de diferenciación; mientras que el análisis *in vivo* nos permitirá reproducir el proceso de maduración natural de las células en el timo.

XII. Conclusiones particulares

1. La expresión de Foxp3 se observa desde el estadio de DP tanto en el ratón TCRHA como el ratón TCRHAxIgHA.

2. La presencia del péptido HA en el estroma tímico de los ratones TCRHAxIgHA incrementa el porcentaje de las células Foxp3+ con respecto a las células del ratón TCRHA.

3. No observamos diferencias significativas en los niveles de fosforilación basal de las células del ratón TCRHA con respecto a las células del ratón TCRHAxIgHA.

4. Los timocitos 6.5+ del ratón TCRHAxIgHA presentan una menor fosforilación de Erk en respuesta a la estimulación con anti-CD3 con respecto a los timocitos 6.5+ del ratón TCRHA. Sin embargo, en respuesta a PMA+Ionomicina es similar en ambos ratones, lo que sugiere un defecto en la señalización proximal al TCR.

5. De manera similar, la fosforilación la c-Cbl en respuesta a la estimulación con CD3 parece ser menor en el ratón TCRHAxIgHA con respecto a los timocitos 6.5+ del ratón TCRHA.

6. De manera contraria, la fosforilación de P38 parece aumentada en los ratones TCRHAxIgHA en respuesta al entrecruzamiento de CD3.

7. Las nTregs presentan niveles basales incrementados de pERK, pPI3K, y pCCBL, y al igual que las Treg antígeno-específicas muestran una deficiente fosforilación de pErk, c-CBL, PI3K y pAkt en respuesta al entrecruzamiento de CD3.

XIII. Conclusión general

Los datos obtenidos en esta tesis, demuestran que existe una “patrón de señalización característico” que comparten las células T reguladoras generadas en el timo (nTregs y antígeno-específicas), y que indica el requerimiento de señales de alta avidéz para promover su selección, y adquisición de un fenotipo regulador con características típicas de células “anérgicas”.

XIV. Bibliografia

1. Baecher-Allan, C., and D. A. Hafler. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:203-216.
2. Lu, L., M. B. Werneck, and H. Cantor. 2006. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev* 212:51-59.
3. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
4. Sakaguchi, S. 2006. Regulatory T cells: Meden Agan. *Immunological Reviews* 212:5-7.
5. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:8-27.
6. Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens, and A. M. Thornton. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212:60-73.
7. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
8. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
9. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
10. Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513.
11. McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
12. Kubach, J., P. Lutter, T. Bopp, S. Stoll, C. Becker, E. Huter, C. Richter, P. Weingarten, T. Warger, J. Knop, S. Mullner, J. Wijdenes, H. Schild, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2007. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110:1550-1558.
13. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
14. Shevach, E. M. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193:F41-46.
15. Horwitz, D. A. 2008. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res Ther* 10:227.
16. Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 29:429-435.
17. Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo, and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775.

18. Ziegler, S. F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 37:21-23.
19. Kojima, A., Y. Tanaka-Kojima, T. Sakakura, and Y. Nishizuka. 1976. Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest* 34:550-557.
20. Kojima, A., Y. Tanaka-Kojima, T. Sakakura, and Y. Nishizuka. 1976. Prevention of postthymectomy autoimmune thyroiditis in mice. *Lab Invest* 34:601-605.
21. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
22. Taguchi, O., and Y. Nishizuka. 1981. Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin Exp Immunol* 46:425-434.
23. Taguchi, O., and Y. Nishizuka. 1980. Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: T cell requirement in adoptive cell transfer. *Clin Exp Immunol* 42:324-331.
24. Powell, B. R., N. R. Buist, and P. Stenzel. 1982. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 100:731-737.
25. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
26. Rusell, W. L., L. B. Rusell, and J. S. Gower. 1959. Exceptional Inheritance of a sex-linked gene in the mouse explained on the basis that the X/O sex-chromosome constitution is female. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:554-560.
27. Bennett, C. L., M. E. Brunkow, F. Ramsdell, K. C. O'Briant, Q. Zhu, R. L. Fuleihan, A. O. Shigeoka, H. D. Ochs, and P. F. Chance. 2001. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53:435-439.
28. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
29. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
30. Wildin, R. S., and A. Freitas. 2005. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun* 25 Suppl:56-62.
31. Khattry, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
32. Seddon, B., and D. Mason. 1999. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med* 189:877-882.
33. Taguchi, O., and Y. Nishizuka. 1987. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. *J Exp Med* 165:146-156.
34. Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an

- immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-1401.
35. Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C. C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4:350-354.
 36. Taubert, R., J. Schwendemann, and B. Kyewski. 2007. Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self-tolerance and autoimmunity. *Eur J Immunol* 37:838-848.
 37. Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee, A. Rolink, and L. Klein. 2007. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8:351-358.
 38. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
 39. Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tzgnik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21:267-277.
 40. Pacholczyk, R., J. Kern, N. Singh, M. Iwashima, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2007. Nonsel-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 27:493-504.
 41. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21:1105-1111.
 42. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
 43. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
 44. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10398-10403.
 45. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
 46. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
 47. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
 48. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
 49. Chen, C. H., C. Seguin-Devaux, N. A. Burke, T. B. Oriss, S. C. Watkins, N. Clipstone, and A. Ray. 2003. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation,

- Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 197:1689-1699.
50. Chen, C. T., Y. C. Yi, S. C. Chiang, K. C. Liu, Y. L. Lin, and S. T. Lee. 2005. Selection of immunodominant fragments from envelope gene for vaccine against Japanese encephalitis virus in DNA priming-protein boosting protocols. *Microb Pathog* 38:53-62.
 51. Gorelik, L., P. E. Fields, and R. A. Flavell. 2000. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165:4773-4777.
 52. Lin, J. T., S. L. Martin, L. Xia, and J. D. Gorham. 2005. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol* 174:5950-5958.
 53. Akdis, C. A., and M. Akdis. 2009. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:735-746; quiz 747-738.
 54. Askenasy, N., A. Kaminitz, and S. Yarkoni. 2008. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 7:370-375.
 55. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
 56. Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Hermine, and O. Devergne. 2008. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 181:6898-6905.
 57. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
 58. Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio, and F. Ivars. 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240-249.
 59. Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069-1077.
 60. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101.
 61. Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925-3932.
 62. Gagnerault, M. C., J. J. Luan, C. Lotton, and F. Lepault. 2002. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med* 196:369-377.
 63. Bluestone, J. A., and Q. Tang. 2005. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 17:638-642.
 64. Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, and N. Bhardwaj. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191:423-434.
 65. Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193:233-238.

66. Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2:816-822.
67. Petrie, H. T., and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25:649-679.
68. Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9:833-844.
69. Boehm, T. 2008. Thymus development and function. *Curr Opin Immunol* 20:178-184.
70. Anderson, G., and E. J. Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1:31-40.
71. Shortman, K., and L. Wu. 1996. Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14:29-47.
72. Hedrick, S. M., D. I. Cohen, E. A. Nielsen, and M. M. Davis. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149-153.
73. Garcia, K. C., L. Teyton, and I. A. Wilson. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17:369-397.
74. Irving, B. A., F. W. Alt, and N. Killeen. 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905-908.
75. Ledbetter, J. A., R. L. Evans, M. Lipinski, C. Cunningham-Rundles, R. A. Good, and L. A. Herzenberg. 1981. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med* 153:310-323.
76. Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, K. Ogata, K. Sakata-Sogawa, M. Hiroshima, D. L. Wiest, M. Tokunaga, and T. Saito. 2006. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* 7:67-75.
77. von Boehmer, H., and H. J. Fehling. 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15:433-452.
78. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
79. June, C. H., M. C. Fletcher, J. A. Ledbetter, and L. E. Samelson. 1990. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 144:1591-1599.
80. Samelson, L. E., M. D. Patel, A. M. Weissman, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46:1083-1090.
81. Wange, R. L., and L. E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197-205.
82. Shaw, A. S., K. E. Amrein, C. Hammond, D. F. Stern, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59:627-636.
83. Shaw, A. S., J. Chalupny, J. A. Whitney, C. Hammond, K. E. Amrein, P. Kavathas, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1990. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 10:1853-1862.

84. Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60:755-765.
85. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
86. Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade, and L. E. Samelson. 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 275:23355-23361.
87. Zhang, W., and L. E. Samelson. 2000. The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* 12:35-41.
88. van Oers, N. S., and A. Weiss. 1995. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Semin Immunol* 7:227-236.
89. Rincon, M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* 13:339-345.
90. Debnath, J., M. Chamorro, M. J. Czar, E. M. Schaeffer, M. J. Lenardo, H. E. Varmus, and P. L. Schwartzberg. 1999. rlk/TXK encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. *Mol Cell Biol* 19:1498-1507.
91. Schaeffer, E. M., J. Debnath, G. Yap, D. McVicar, X. C. Liao, D. R. Littman, A. Sher, H. E. Varmus, M. J. Lenardo, and P. L. Schwartzberg. 1999. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* 284:638-641.
92. Scharenberg, A. M., and J. P. Kinet. 1998. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* 94:5-8.
93. Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497-521.
94. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
95. Avraham, A., S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, and Y. Ben-Neriah. 1998. Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:2320-2330.
96. Khoshnan, A., D. Bae, C. A. Tindell, and A. E. Nel. 2000. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165:6933-6940.
97. Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1:317-321.
98. Anton van der Merwe, P., S. J. Davis, A. S. Shaw, and M. L. Dustin. 2000. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12:5-21.
99. Dustin, M. L., and J. A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1:23-29.
100. Samstag, Y., S. M. Eibert, M. Klemke, and G. H. Wabnitz. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* 73:30-48.
101. Sebzda, E., V. A. Wallace, J. Mayer, R. S. Yeung, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1994. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 263:1615-1618.

102. De Magistris, M. T., J. Alexander, M. Coggeshall, A. Altman, F. C. Gaeta, H. M. Grey, and A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 68:625-634.
103. Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267:515-518.
104. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1994. Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369:750-752.
105. Sebzda, E., T. M. Kundig, C. T. Thomson, K. Aoki, S. Y. Mak, J. P. Mayer, T. Zamborelli, S. G. Nathenson, and P. S. Ohashi. 1996. Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* 183:1093-1104.
106. Love, P. E., and E. W. Shores. 2000. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 12:591-597.
107. Backstrom, B. T., U. Muller, B. Hausmann, and E. Palmer. 1998. Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science* 281:835-838.
108. Dave, V. P., Z. Cao, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, A. de la Hera, S. Tonegawa, and D. J. Kappes. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 16:1360-1370.
109. Sommers, C. L., J. Lee, K. L. Steiner, J. M. Gurson, C. L. Depersis, D. El-Khoury, C. L. Fuller, E. W. Shores, P. E. Love, and L. E. Samelson. 2005. Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection. *J Exp Med* 201:1125-1134.
110. Gong, Q., A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson, and A. C. Chan. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2:29-36.
111. Gallo, E. M., M. M. Winslow, K. Cante-Barrett, A. N. Radermacher, L. Ho, L. McGinnis, B. Iritani, J. R. Neilson, and G. R. Crabtree. 2007. Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature* 450:731-735.
112. Johnson, A. L., L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S. Y. Choi, T. L. Crockford, T. Lambe, H. Domaschensz, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Cornall, and R. H. Schwartz. 2009. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol* 10:831-839.
113. Fu, G., S. Vallee, V. Rybakina, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, and N. R. Gascoigne. 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol* 10:848-856.
114. Lesourne, R., S. Uehara, J. Lee, K. D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N. P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, R. Bosselut, and P. E. Love. 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* 10:840-847.
115. Grusby, M. J., H. Auchincloss, Jr., R. Lee, R. S. Johnson, J. P. Spencer, M. Zijlstra, R. Jaenisch, V. E. Papaioannou, and L. H. Glimcher. 1993. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3913-3917.
116. Grusby, M. J., R. S. Johnson, V. E. Papaioannou, and L. H. Glimcher. 1991. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253:1417-1420.

117. Koller, B. H., P. Marrack, J. W. Kappler, and O. Smithies. 1990. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 248:1227-1230.
118. Zijlstra, M., M. Bix, N. E. Simister, J. M. Loring, D. H. Raulet, and R. Jaenisch. 1990. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344:742-746.
119. Crump, A. L., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, and H. Cantor. 1993. Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10739-10743.
120. Leung, R. K., K. Thomson, A. Gallimore, E. Jones, M. Van den Broek, S. Sierro, A. R. Alsheikhly, A. McMichael, and A. Rahemtulla. 2001. Deletion of the CD4 silencer element supports a stochastic mechanism of thymocyte lineage commitment. *Nat Immunol* 2:1167-1173.
121. Kaye, J., M. L. Hsu, M. E. Sauron, S. C. Jameson, N. R. Gascoigne, and S. M. Hedrick. 1989. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 341:746-749.
122. Kisielow, P., H. S. Teh, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730-733.
123. Scott, B., H. Bluthmann, H. S. Teh, and H. von Boehmer. 1989. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 338:591-593.
124. Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335:229-233.
125. von Boehmer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 8:531-556.
126. Fung-Leung, W. P., M. W. Schilham, A. Rahemtulla, T. M. Kundig, M. Vollenweider, J. Potter, W. van Ewijk, and T. W. Mak. 1991. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65:443-449.
127. Rahemtulla, A., W. P. Fung-Leung, M. W. Schilham, T. M. Kundig, S. R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C. J. Paige, R. M. Zinkernagel, and et al. 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180-184.
128. Robey, E. A., B. J. Fowlkes, J. W. Gordon, D. Kioussis, H. von Boehmer, F. Ramsdell, and R. Axel. 1991. Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell* 64:99-107.
129. Suzuki, H., J. A. Punt, L. G. Granger, and A. Singer. 1995. Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* 2:413-425.
130. Itano, A., P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella, and E. Robey. 1996. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 183:731-741.
131. Seong, R. H., J. W. Chamberlain, and J. R. Parnes. 1992. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* 356:718-720.
132. Seong, R. H., and J. R. Parnes. 1992. Alteration of T cell lineage commitment by expression of a hybrid CD8/CD4 transgene. *Adv Exp Med Biol* 323:79-87.

133. Bosselut, R., L. Feigenbaum, S. O. Sharrow, and A. Singer. 2001. Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes. *Immunity* 14:483-494.
134. Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster, and P. Salmon. 1996. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87:483-492.
135. Bommhardt, U., M. S. Cole, J. Y. Tso, and R. Zamoyska. 1997. Signals through CD8 or CD4 can induce commitment to the CD4 lineage in the thymus. *Eur J Immunol* 27:1152-1163.
136. Basson, M. A., U. Bommhardt, M. S. Cole, J. Y. Tso, and R. Zamoyska. 1998. CD3 ligation on immature thymocytes generates antagonist-like signals appropriate for CD8 lineage commitment, independently of T cell receptor specificity. *J Exp Med* 187:1249-1260.
137. Basson, M. A., U. Bommhardt, P. J. Mee, V. L. Tybulewicz, and R. Zamoyska. 1998. Molecular requirements for lineage commitment in the thymus--antibody-mediated receptor engagements reveal a central role for lck in lineage decisions. *Immunol Rev* 165:181-194.
138. Chau, L. A., J. A. Bluestone, and J. Madrenas. 1998. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J Exp Med* 187:1699-1709.
139. Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel, and S. Tonegawa. 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76:651-663.
140. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
141. Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
142. Yasutomo, K., C. Doyle, L. Miele, C. Fuchs, and R. N. Germain. 2000. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 404:506-510.
143. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.
144. Singer, A. 2002. New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr Opin Immunol* 14:207-215.
145. Garcia, K. C., C. A. Scott, A. Brunmark, F. R. Carbone, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 384:577-581.
146. Konig, R. 2002. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 14:75-83.
147. Wiest, D. L., L. Yuan, J. Jefferson, P. Benveniste, M. Tsokos, R. D. Klausner, L. H. Glimcher, L. E. Samelson, and A. Singer. 1993. 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 coreceptor molecules. *J Exp Med* 178:1701-1712.

148. Zamoyska, R. 1994. The CD8 coreceptor revisited: one chain good, two chains better. *Immunity* 1:243-246.
149. Zamoyska, R., P. Derham, S. D. Gorman, P. von Hoegen, J. B. Bolen, A. Veillette, and J. R. Parnes. 1989. Inability of CD8 alpha' polypeptides to associate with p56lck correlates with impaired function in vitro and lack of expression in vivo. *Nature* 342:278-281.
150. Hernandez-Hoyos, G., S. J. Sohn, E. V. Rothenberg, and J. Alberola-Ila. 2000. Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* 12:313-322.
151. Chow, L. M., M. Fournel, D. Davidson, and A. Veillette. 1993. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 365:156-160.
152. Schmedt, C., K. Saijo, T. Niidome, R. Kuhn, S. Aizawa, and A. Tarakhovsky. 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature* 394:901-904.
153. Schmedt, C., and A. Tarakhovsky. 2001. Autonomous maturation of alpha/beta T lineage cells in the absence of COOH-terminal Src kinase (Csk). *J Exp Med* 193:815-826.
154. Alberola-Ila, J., K. A. Forbush, R. Seger, E. G. Krebs, and R. M. Perlmutter. 1995. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373:620-623.
155. Alberola-Ila, J., K. A. Hogquist, K. A. Swan, M. J. Bevan, and R. M. Perlmutter. 1996. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 184:9-18.
156. Swan, K. A., J. Alberola-Ila, J. A. Gross, M. W. Appleby, K. A. Forbush, J. F. Thomas, and R. M. Perlmutter. 1995. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *Embo J* 14:276-285.
157. Sharp, L. L., and S. M. Hedrick. 1999. Commitment to the CD4 lineage mediated by extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase and lck signaling. *J Immunol* 163:6598-6605.
158. Sharp, L. L., D. A. Schwarz, C. M. Bott, C. J. Marshall, and S. M. Hedrick. 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 7:609-618.
159. Bommhardt, U., M. A. Basson, U. Krummrei, and R. Zamoyska. 1999. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* 163:715-722.
160. Sugawara, T., T. Moriguchi, E. Nishida, and Y. Takahama. 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9:565-574.
161. Shao, H., D. H. Kono, L. Y. Chen, E. M. Rubin, and J. Kaye. 1997. Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med* 185:731-744.
162. Miyazaki, T., and F. A. Lemonnier. 1998. Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, early growth response 1 (Egr-1). *J Exp Med* 188:715-723.
163. Bettini, M., H. Xi, J. Milbrandt, and G. J. Kersh. 2002. Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol* 169:1713-1720.
164. Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
165. Felli, M. P., M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino, and I. Screpanti. 1999. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol* 11:1017-1025.

166. Fortini, M. E. 2001. Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* 13:627-634.
167. Davis, R. L., and D. L. Turner. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20:8342-8357.
168. Pear, W. S., and F. Radtke. 2003. Notch signaling in lymphopoiesis. *Semin Immunol* 15:69-79.
169. Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-558.
170. Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, T. Kadesch, R. R. Hardy, J. C. Aster, and W. S. Pear. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11:299-308.
171. Dorsch, M., G. Zheng, D. Yowe, P. Rao, Y. Wang, Q. Shen, C. Murphy, X. Xiong, Q. Shi, J. C. Gutierrez-Ramos, C. Fraser, and J. L. Villeval. 2002. Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease. *Blood* 100:2046-2055.
172. Yan, X. Q., U. Sarmiento, Y. Sun, G. Huang, J. Guo, T. Juan, G. Van, M. Y. Qi, S. Scully, G. Senaldi, and F. A. Fletcher. 2001. A novel Notch ligand, Dll4, induces T-cell leukemia/lymphoma when overexpressed in mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 98:3793-3799.
173. Kawamata, S., C. Du, K. Li, and C. Lavau. 2002. Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21:3855-3863.
174. Washburn, T., E. Schweighoffer, T. Gridley, D. Chang, B. J. Fowlkes, D. Cado, and E. Robey. 1997. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88:833-843.
175. Deftos, M. L., E. Huang, E. W. Ojala, K. A. Forbush, and M. J. Bevan. 2000. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity* 13:73-84.
176. Izon, D. J., J. A. Punt, L. Xu, F. G. Karnell, D. Allman, P. S. Myung, N. J. Boerth, J. C. Pui, G. A. Koretzky, and W. S. Pear. 2001. Notch1 regulates maturation of CD4+ and CD8+ thymocytes by modulating TCR signal strength. *Immunity* 14:253-264.
177. Fowlkes, B. J., and E. A. Robey. 2002. A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *J Immunol* 169:1817-1821.
178. Laky, K., and B. J. Fowlkes. 2007. Presenilins regulate alphabeta T cell development by modulating TCR signaling. *J Exp Med* 204:2115-2129.
179. Laky, K., and B. J. Fowlkes. 2008. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol* 20:197-202.
180. Bosselut, R. 2004. CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol* 4:529-540.
181. Ellmeier, W., S. Sawada, and D. R. Littman. 1999. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* 17:523-554.
182. Kioussis, D., and W. Ellmeier. 2002. Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. *Nat Rev Immunol* 2:909-919.
183. Nava, K., and G. Soldevila. 2004. Molecular signals involved in CD4 versus CD8 T cell commitment. *Inmunología* 23:313-327.
184. Siu, G. 2002. Controlling CD4 gene expression during T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 14:441-451.

185. Woolf, E., C. Xiao, O. Fainaru, J. Lotem, D. Rosen, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Goldenberg, O. Brenner, G. Berke, D. Levanon, and Y. Groner. 2003. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7731-7736.
186. Allen, R. D., 3rd, H. K. Kim, S. D. Sarafova, and G. Siu. 2001. Negative regulation of CD4 gene expression by a HES-1-c-Myb complex. *Mol Cell Biol* 21:3071-3082.
187. Kim, H. K., and G. Siu. 1998. The notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. *Mol Cell Biol* 18:7166-7175.
188. Kaneta, M., M. Osawa, K. Sudo, H. Nakauchi, A. G. Farr, and Y. Takahama. 2000. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164:256-264.
189. Kim, W. W., and G. Siu. 1999. Subclass-specific nuclear localization of a novel CD4 silencer binding factor. *J Exp Med* 190:281-291.
190. Nawijn, M. C., R. Ferreira, G. M. Dingjan, O. Kahre, D. Drabek, A. Karis, F. Grosveld, and R. W. Hendriks. 2001. Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice. *J Immunol* 167:715-723.
191. Hernandez-Hoyos, G., M. K. Anderson, C. Wang, E. V. Rothenberg, and J. Alberola-Ila. 2003. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* 19:83-94.
192. Pai, S. Y., M. L. Truitt, C. N. Ting, J. M. Leiden, L. H. Glimcher, and I. C. Ho. 2003. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity* 19:863-875.
193. Wang, L., K. F. Wildt, J. Zhu, X. Zhang, L. Feigenbaum, L. Tessarollo, W. E. Paul, B. J. Fowlkes, and R. Bosselut. 2008. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 9:1122-1130.
194. Muroi, S., Y. Naoe, C. Miyamoto, K. Akiyama, T. Ikawa, K. Masuda, H. Kawamoto, and I. Taniuchi. 2008. Cascading suppression of transcriptional silencers by ThPOK seals helper T cell fate. *Nat Immunol* 9:1113-1121.
195. Egawa, T., and D. R. Littman. 2008. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat Immunol* 9:1131-1139.
196. He, X., K. Park, H. Wang, Y. Zhang, X. Hua, Y. Li, and D. J. Kappes. 2008. CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus. *Immunity* 28:346-358.
197. Park, J. H., S. Adoro, T. Guintier, B. Erman, A. S. Alag, M. Catalfamo, M. Y. Kimura, Y. Cui, P. J. Lucas, R. E. Gress, M. Kubo, L. Hennighausen, L. Feigenbaum, and A. Singer. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* 11:257-264.
198. Yin, X., E. Ladi, S. W. Chan, O. Li, N. Killeen, D. J. Kappes, and E. A. Robey. 2007. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J Immunol* 179:7358-7364.
199. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-763.

200. Larkin, J., 3rd, A. L. Rankin, C. C. Picca, M. P. Riley, S. A. Jenks, A. J. Sant, and A. J. Caton. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen. *J Immunol* 180:2149-2157.
201. Hori, S., M. Haury, A. Coutinho, and J. Demengeot. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8213-8218.
202. van Santen, H. M., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 200:1221-1230.
203. Andersson, J., I. Stefanova, G. L. Stephens, and E. M. Shevach. 2007. CD4+CD25+ regulatory T cells are activated in vivo by recognition of self. *Int Immunol* 19:557-566.
204. Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203:119-129.
205. Willoughby, J. E., P. S. Costello, R. H. Nicolas, N. J. Robinson, G. Stamp, F. Powrie, and R. Treisman. 2007. Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J Immunol* 179:6836-6844.
206. Chen, X., J. J. Priatel, M. T. Chow, and H. S. Teh. 2008. Preferential development of CD4 and CD8 T regulatory cells in RasGRP1-deficient mice. *J Immunol* 180:5973-5982.
207. Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, J. L. Cordell, C. J. van Noesel, and R. A. van Lier. 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 24:812-816.
208. Osman, N., A. I. Lazarovits, and M. J. Crumpton. 1993. Physical association of CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23:1173-1176.
209. Tarakhovsky, A., W. Muller, and K. Rajewsky. 1994. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur J Immunol* 24:1678-1684.
210. Ordonez-Rueda, D., F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E. A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2009. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol* 39:2233-2247.
211. Carter, J. D., G. M. Calabrese, M. Naganuma, and U. Lorenz. 2005. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 174:6627-6638.
212. Lohr, J., B. Knoechel, S. Jiang, A. H. Sharpe, and A. K. Abbas. 2003. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nature immunology* 4:664-669.
213. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
214. Boden, E., Q. Tang, H. Bour-Jordan, and J. A. Bluestone. 2003. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis Foundation symposium* 252:55-63; discussion 63-56, 106-114.
215. Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, and T. Saito. 2005. CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17:421-427.

216. Salomon, B., and J. A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19:225-252.
217. Sansom, D. M., and L. S. Walker. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev* 212:131-148.
218. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
219. Mayack, S. R., and L. J. Berg. 2006. Cutting edge: an alternative pathway of CD4⁺ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals. *J Immunol* 176:2059-2063.
220. Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerenyi, G. Stephens, L. Durant, W. T. Watford, A. Laurence, G. W. Robinson, E. M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu, and J. J. O'Shea. 2007. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109:4368-4375.
221. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152-162.
222. Vang, K. B., J. Yang, S. A. Mahmud, M. A. Burchill, A. L. Vegoe, and M. A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285-3290.
223. Jiang, Q., H. Su, G. Knudsen, W. Helms, and L. Su. 2006. Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol* 7:6.
224. Mazzucchelli, R., J. A. Hixon, R. Spolski, X. Chen, W. Q. Li, V. L. Hall, J. Willette-Brown, A. A. Hurwitz, W. J. Leonard, and S. K. Durum. 2008. Development of regulatory T cells requires IL-7Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112:3283-3292.
225. Kirberg, J., A. Baron, S. Jakob, A. Rolink, K. Karjalainen, and H. von Boehmer. 1994. Thymic selection of CD8⁺ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180:25-34.
226. Lanoue, A., C. Bona, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 1997. Conditions that induce tolerance in mature CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 185:405-414.
227. Buer, J., A. Lanoue, A. Franzke, C. Garcia, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 1998. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 187:177-183.
228. Soldevila, G., C. Castellanos, M. Malissen, and L. J. Berg. 2001. Analysis of the individual role of the TCRzeta chain in transgenic mice after conditional activation with chemical inducers of dimerization. *Cell Immunol* 214:123-138.
229. Lambomez, F., K. Jooss, F. Vasseur, and A. Sarukhan. 2002. Tolerance induction to self antigens by peripheral dendritic cells. *Eur J Immunol* 32:2588-2597.
230. Fathman, C. G., and N. B. Lineberry. 2007. Molecular mechanisms of CD4⁺ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 7:599-609.
231. Crellin, N. K., R. V. Garcia, and M. K. Levings. 2007. Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells. *Journal of immunological methods* 324:92-104.

232. Naramura, M., I. K. Jang, H. Kole, F. Huang, D. Haines, and H. Gu. 2002. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3:1192-1199.
233. Naramura, M., H. K. Kole, R. J. Hu, and H. Gu. 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15547-15552.
234. Loeser, S., and J. M. Penninger. 2007. Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Semin Immunol* 19:206-214.
235. Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 205:565-574.
236. Alberola-Ila, J., and G. Hernandez-Hoyos. 2003. The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev* 191:79-96.
237. Van Parijs, L., Y. Refaeli, J. D. Lord, B. H. Nelson, A. K. Abbas, and D. Baltimore. 1999. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11:281-288.
238. Lois, C., Y. Refaeli, X. F. Qin, and L. Van Parijs. 2001. Retroviruses as tools to study the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:496-504.
239. Cabarrocas, J., C. Cassan, F. Magnusson, E. Piaggio, L. Mars, J. Derbinski, B. Kyewski, D. A. Gross, B. L. Salomon, K. Khazaie, A. Saoudi, and R. S. Liblau. 2006. Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8453-8458.
240. Kim, J. M., J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-197.
241. Adler, H. S., S. Kubsch, E. Graulich, S. Ludwig, J. Knop, and K. Steinbrink. 2007. Activation of MAP kinase p38 is critical for the cell-cycle-controlled suppressor function of regulatory T cells. *Blood* 109:4351-4359.
242. Adler, H. S., and K. Steinbrink. 2008. MAP kinase p38 and its relation to T cell anergy and suppressor function of regulatory T cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7:1-7.

A Specific Signalling Signature Characterizes the Development of Naturally Occurring and Antigen-Specific Regulatory T Cells

Karen Nava,¹ Diana Ordoñez-Rueda,¹ Adelaida Sarukhán,^{1,2}
Jesús R. Chávez-Ríos,¹ Eduardo A. García-Zepeda,¹
and Gloria Soldevila¹

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

²Present address, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, MI, Italy

The molecular signals involved in the generation of thymic regulatory T cells (Treg) still remain controversial. It has been proposed that high avidity interactions are required for Treg selection. Here, we used double transgenic mice (TCR-HA × IgHA) and followed the kinetics and phosphorylation status of HA-specific Tregs that develop in the absence or presence of their agonist ligand expressed in the thymus, as well as of polyclonal “naturally occurring” Tregs (nTregs). We found that, in basal conditions, nTregs showed enhanced basal phosphorylation of c-Cbl, Erk and PI3K, indicating their selection by high avidity ligands. However, in response to TCR cross-linking, both nTregs from Balb/c mice and HA-specific Tregs showed reduced levels of phosphorylated Erk1/2, c-Cbl and Akt. We conclude that thymus-derived Tregs display a characteristic “signalling signature” that suggests qualitative differences in TCR-mediated signalling that may not be explained merely by a higher TCR avidity.

Keywords Regulatory T cell, Signaling, Development, TCR transgenic, FoxP3.

INTRODUCTION

Naturally occurring Tregs (nTregs) constitute about 5–10% of CD4⁺ T cells and are characterized by high expression of CD25 (IL-2R α), but more specifically by

Address correspondence to Gloria Soldevila, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70228, Circuito Escolar s/n Mexico City, Distrito Federal CP-04510, Mexico; E-mail: soldevi@servidor.unam.mx

the expression of the transcription factor FoxP3, a key regulator of nTreg development and function (Fontenot et al., 2003). In addition, nTregs also express other markers including CD5, CD45RB^{lo}, CTLA-4, PD-1, LAG-3 and GITR, reviewed in (Shevach et al., 2006).

The molecular mechanisms involved in the selection of regulatory T cells in the thymus are still under discussion. TCR transgenic models in which antigen-specific Tregs develop in the presence of thymic expression of agonist peptide, suggested that they may require high affinity/avidity signals to develop (Apostolou et al., 2002; Larkin et al., 2008) but not too high to induce negative selection of these clones (Shevach, 2001). Several observations support the theory of enhanced but modulated signalling: (1) Expression of transgenic receptors specific for ligands expressed by thymic stromal cells during T cell maturation, show an increase in the number (Hori et al., 2002) or proportion (van Santen et al., 2004) of Tregs; (2) Mice with reduced signaling through LAT/PLC- γ 1 or abrogation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway results in absence (Koonpaew et al., 2006) or reduction (Willoughby et al., 2007) of nTregs, respectively; (3) Mice deficient for SHP-1, a negative regulator of TCR mediated signaling, show an increase in the percentage of CD4⁺CD25⁺ Treg cells (Carter et al., 2005).

Finally, other signals involved in the generation and/or maintenance of nTreg development include costimulatory molecules such as CD28 and B7 (Salomon and Bluestone, 2001) and cytokines such as IL-2, IL-7, IL-15 and TSLP, reviewed in (Wan and Flavell, 2006).

Based on this evidence, we analyzed the phosphorylation state of different molecules related to TCR and CD28 signalling pathways during the development of Tregs in the thymus. We hypothesized that basal phosphorylation would be enhanced in regulatory T cells that have contacted high-avidity ligands when compared to naïve T cells, indicating a “more activated” state. Nevertheless, since Tregs must modulate their signals after TCR-MHC peptide ligation to escape negative selection, we expected that Treg would respond inefficiently to CD3 mediated signals.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Transgenic mice expressing a TCR $\alpha\beta$ specific for peptide 111–119 from Influenza virus HA, presented by I-E^d have been previously described (Kirberg et al., 1994; Lanoue et al., 1997). IG-HA mice, expressing the HA (Lanoue et al., 1997), were crossed with mice to generate TCRHAxIgHA double-transgenic mice (Buer et al., 1998). Balb/c wild-type (wt) mice and transgenic mice were bred in our animal facility in accordance to institutional guidelines.

Antibodies. The following antibodies were used: 6.5-PE clonotypic antibody (Lanoue et al. 1997); anti-mouse CD4-biotin (L3T4), anti-mouse CD4-FITC (L3T4), anti-mouse CD4-APC (RM4-5), anti-mouse CD8-PE-Cy5 (Ly-2),

anti-mouse CD25-FITC (7D4), anti-mouse CD25-PE (3C7) and anti-mouse CD25-biotin (7D4). Alexa647-coupled pErk (T202/Y204), pP38 (T180/Y182) and pc-Cbl (pY700), were purchased from BD Biosciences. Anti-FoxP3-APC (FJK-16s, eBioscience Inc, San Diego, CA). Anti-pPI3K (Tyr508) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and-pAkt (Ser 473) (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). APC-Cy7 conjugated streptavidin (BD Biosciences), FITC-coupled Goat Anti-Rabbit IgG (Zymed Laboratories Inc, Invitrogen, Carlsbad, CA) were used as secondary antibodies. For stimulation assays: hamster anti-mouse CD3 ϵ -biotin (145-2C11) and hamster anti-mouse CD28-biotin (37.51) (BD Biosciences). ImmunoPure[®] streptavidin (Pierce) was used for biotinylated antibody cross-linking.

FoxP3 Expression. Thymocytes and peripheral lymphocytes from Balb/c, TCR-HA or TCR-HA/IgHA mice were stained with Treg Staining Kit (eBioscience). Briefly, cells were stained with anti-CD4, CD8, TCR-HA (6.5) and CD25 and incubated with Fixation/Permeabilization Solution. Cells were incubated with Permeabilization Buffer, washed twice and stained with anti-FoxP3 (FJK-16s).

Phosphorylation Assays. Thymocytes from Balb/c, TCRHA or TCRHAxIgHA mice were purified and stained according to Phosphoflow protocols (BD Biosciences). Briefly, cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and TCR-HA (6.5) for transgenic mice or CD25 for Balb/c mice. Cells were stimulated with sodium pervanadate (100 nM), PMA plus ionomycin (20ng/ml and 200ng/ml, respectively), anti-CD3 (10 μ g/ml) and anti-CD28 (10 μ g/ml). All stimulations were carried at 37 C. Time course experiments were performed to set up the optimal conditions for stimulation; 5 minutes for Erk, P38 and c-Cbl detection and 3 minutes for PI3K and Akt detection were chosen. After stimulation, cells were fixed with 300 μ l of Buffer and incubated with 200 μ l of Perm Buffer II. Cells were washed and incubated with Alexa 647 coupled pErk, P38, c-Cbl or purified pPI3K Lyse/Fix 1x and pAkt. For purified antibodies, cells were incubated with anti-mouse FITC-coupled and anti-rabbit-PE coupled secondary antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry in a FACS Aria and FACS Calibur (BD Biosciences). All data was analyzed with FlowJo[®] software.

Statistical Analysis

An unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to determine statistical significance. *p* values <0.05 were considered as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

FoxP3 Expression Increases on Thymocytes That Develop in the Presence of Agonist Ligand

In order to analyze the selection of antigen specific Tregs, we used a double transgenic mouse model in which thymocytes expressing a Class II-restricted

TCR specific for a peptide from the hemmagglutinin (HA) of the influenza virus (Kirberg et al., 1994), develop in the presence of the agonist ligand, expressed by thymic dendritic cells and epithelial cells (Apostolou et al., 2002; Lambolez et al., 2002).

We first determined the kinetics of development as well as the phenotype of FoxP3⁺ HA-specific (6.5⁺) thymocytes. As shown in Figure 1, the expression of the agonist ligand in the thymus of double transgenic mice induces a significant increase on the percentage of 6.5⁺ FoxP3⁺ cells in DP (2.8% vs 9.1%) and more particularly in CD4SP (1.4% vs 24.2%) thymocytes (Figure 1A). The increase in the percentage of FoxP3⁺ thymocytes was also described in another TCRHA transgenic model (Cabarrocas et al., 2006), and could be explained by induction of FoxP3 upon encounter with the agonist ligand, but also to a greater resistance of FoxP3 expressing cells to negative selection (van Santen et al., 2004).

We also detected a small percentage of DP thymocytes expressing FoxP3 in both single and double transgenic mice, independently of the transgenic TCR expression, as previously described for nTregs (Fontenot et al., 2003). This percentage was further increased in the CD4SP population, in both 6.5⁻ and 6.5⁺ thymocytes. To further characterize the FoxP3⁺ population, we also analyzed the expression of CD25, a marker typically expressed by “naturally occurring” regulatory T cells (Sakaguchi et al., 1995). As shown in Figures 1B and 1C, in single transgenic mice, FoxP3⁺ cells were exclusively detected within the CD25⁺ subpopulations of DP and CD4SP thymocytes.

However, analysis of TCRHAxIgHA mice, showed an increase in FoxP3⁺ cells also in the CD4SP CD25⁻ subpopulation (Figure 1C, right panel), similar to what was previously shown in peripheral Tregs from these mice (Apostolou et al., 2002). Such increase in the percentage of FoxP3 expressing cells among 6.5⁺ thymocytes, in the presence of their agonist ligand, was statistically significant (Figure 1D, upper panel). This also resulted in an increment of the absolute numbers, although the differences were much less pronounced due to increased negative selection occurring among DP and SP thymocytes of these mice (Figure 1D, bottom panel).

In contrast, CD25⁻ CD4SP thymocytes expressing FoxP3 are barely detectable in wt or single TCR transgenic mice but are clearly present in TCRHAxIgHA mice, as had previously been shown in double transgenic mice expressing HA under another promoter (Cabarrocas et al., 2006). These cells could be the result of high avidity interactions with HA-expressing thymic medullary epithelial cells (mTEC) or other cell types like thymic dendritic cells and macrophages (Lambolez et al., 2002; Cabarrocas et al., 2006). It remains to be determined whether these CD25⁻ FoxP3⁺ CD4 thymocytes represent a different lineage of Tregs than the CD25⁺ and whether they are the precursors of the CD25⁻ FoxP3⁺ cells found in the periphery of wt mice (Fontenot et al., 2005).

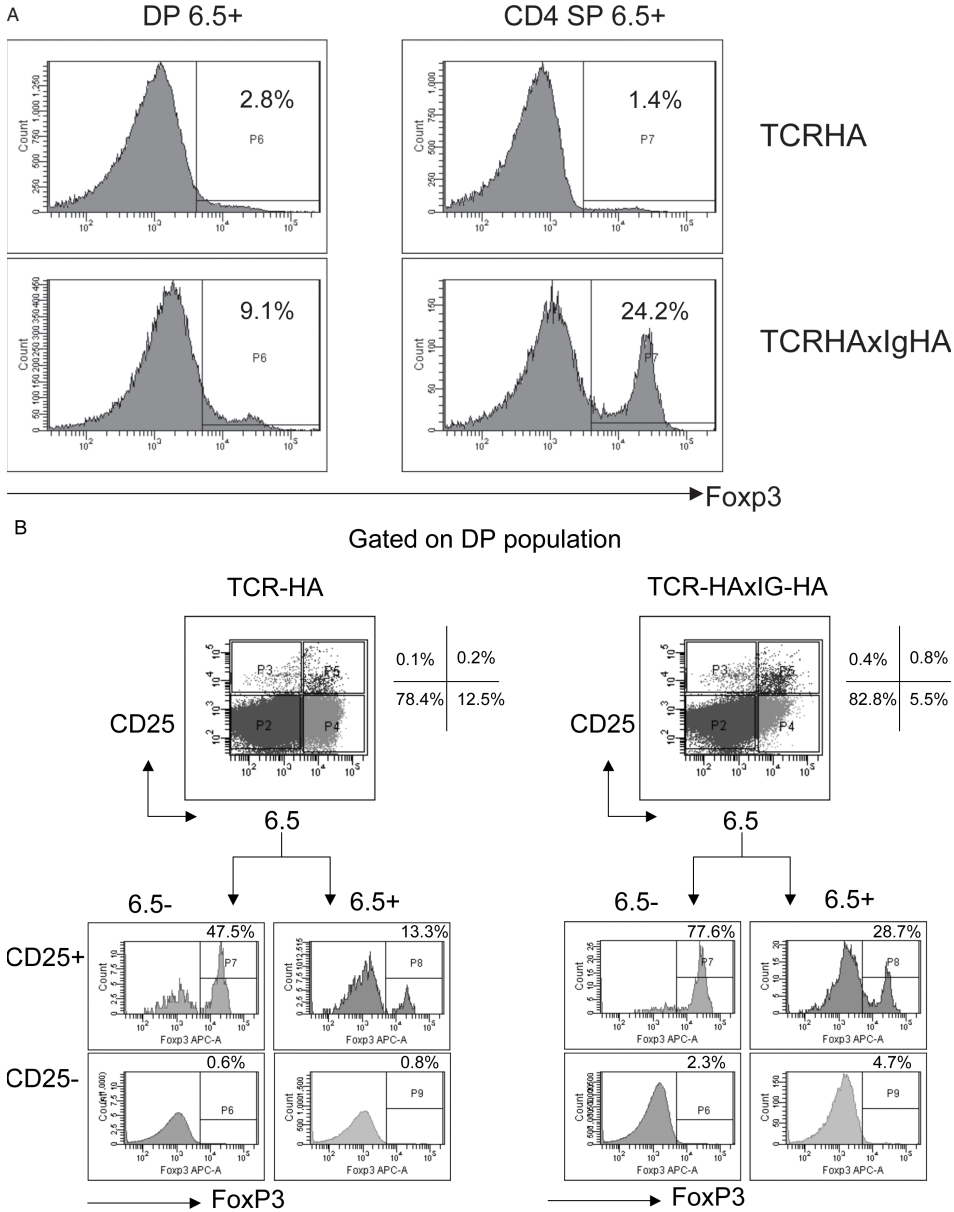


Figure 1: Expression of agonist ligand in the thymus increases the percentage of Foxp3⁺ DP and SP thymocytes. Total thymocytes from TCRHA or TCRHxIghHA mice were stained with CD4, CD8, 6.5, CD25 and Foxp3 antibodies. DP and CD4SP live cells were gated and analyzed for Foxp3 expression according to their CD25 and 6.5 expression. (A) One representative experiment (n = 4) is shown. (B) CD25⁺Foxp3⁺ thymocytes can be found among DP cells and are increased in mice expressing the agonist ligand in the thymus. (C) The percentage of Foxp3⁺ cells increases significantly among CD25⁺ and CD25⁻ thymocytes when the agonist ligand is present in the thymus. (D) The percentage and absolute numbers of Foxp3⁺ cells within 6.5⁺ cells from single and double transgenic mice was calculated. Data represent mean values ± SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate *p ≤ 0.1, **p ≤ 0.05, ***p < 0.01. (a color version of this figure appears in the online edition of this article.)

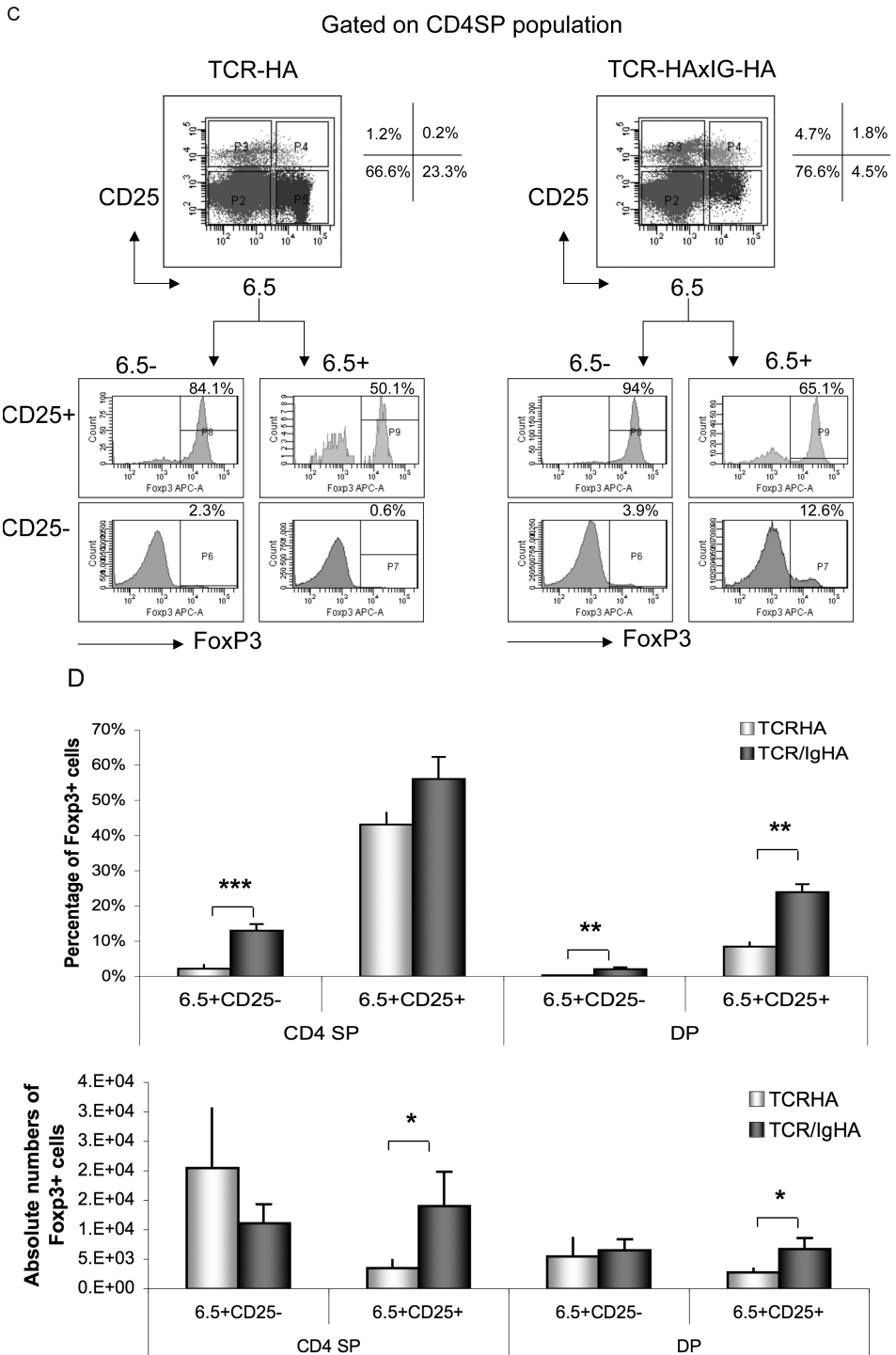


Figure 1: (Continued).

Altogether, these data indicate that high avidity interactions with cognate ligand, most likely expressed on cTECs, can enhance induction of FoxP3 among “self-reactive” DP thymocytes, which is supported by recent data showing that the cortex is sufficient for the generation of nTregs (Liston et al., 2008).

Analysis of intracellular signalling by flow cytometry is a successful tool that allows detection of the phosphorylation state of different molecules in complex and/or poorly-represented subpopulations (Crellin et al., 2007). In this work, we used this technology to determine the phosphorylation state of different molecules involved in TCR and CD28 signalling pathways in CD25⁺_{hi}, CD25⁻ or 6.5⁺ DP and CD4SP thymocytes from Balb/c and transgenic mice, respectively.

In order to determine the role of TCR-mediated signalling events in these HA-specific Tregs, we compared the phosphorylation “signature” of 6.5⁺ cells that develop in the absence (TCR-HA) or presence (TCRHxIgHA) of their agonist ligand in the thymus. We first investigated the phosphorylation state of the MAP kinases Erk 1/2 and P38, which have been implicated in positive and negative selection, respectively, reviewed in (Starr et al., 2003). In basal conditions, we did not find significant differences in phosphorylation of Erk1/2 and P38, between 6.5⁺ thymocytes from TCR-HA and TCRHxIgHA transgenic mice in neither DP nor CD4SP subpopulations (not shown). After CD3 cross-linking, DP thymocytes from single and double transgenic mice showed similar levels of phosphorylated Erk1/2. In contrast, 6.5⁺ CD4SP thymocytes from double transgenic mice showed impaired Erk 1/2 phosphorylation in response to anti-CD3 cross-linking compared to single transgenic mice (Figure 2D), while responses to PMA plus ionomycin were similar in both mice (Figure 2A, representative experiment).

This result suggests that the lack of response in thymocytes which are selected by high affinity ligands, could be due to defects in proximal TCR signalling, as has been reported for peripheral Tregs (Carson and Ziegler, 2007). In contrast to our results, analysis of peripheral human Treg cells showed increased TCR-induced Erk phosphorylation and diminished AKT response in FoxP3⁺ cells, when compared to effector T cells (Crellin et al., 2007). These differences in Erk phosphorylation may reflect differential signalling depending on the developmental stage (i.e. thymic versus peripheral Treg cells) or the duration of anti-CD3 cross-linking, since it has been reported that differential localization and temporal activation of Erk and P38 is induced during positive versus negative selection (Daniels et al., 2006). Therefore, further analysis is needed to clarify the role of developmental stage and stimulation time in the selection of Treg cells.

P38 phosphorylation after CD3 cross-linking, on the other hand, was slightly enhanced both in DP and CD4SP 6.5⁺ double transgenic thymocytes compared to single transgenic thymocytes (Figure 2B, representative experi-

Gated DP

Gated CD4SP

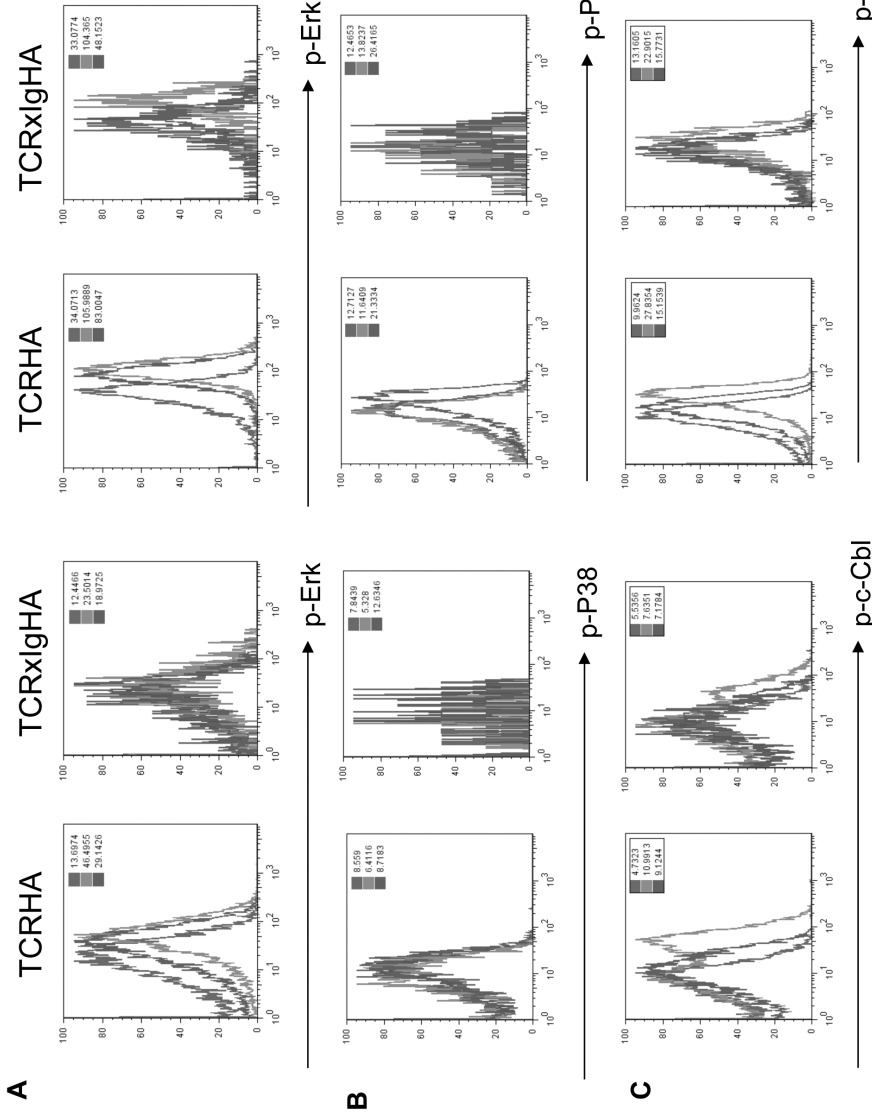


Figure 2: Decreased phosphorylation of Erk, c-Cbl and Akt but enhanced P38 response to anti-CD3 cross-linking in 6.5+ CD4SP thymocytes from TCRHA x IgHA mice. Erk1/2 (A,D), P38 (B,E), c-Cbl (C,F) and Akt (G) phosphorylation was determined in unstimulated or stimulated thymocytes by flow cytometry using 6.5, CD4 and CD8 antibodies in combination with antibodies to phosphoproteins. Figures A-C show phosphorylation in 6.5+ gated thymocytes from TCRHA or TCRxIgHA mice, stimulated with media (red line), with anti-CD3 cross-linking (blue line), or with PMA plus ionomycin (green line). In Figures D-E, Median Fluorescence Intensity (MFI) increment for basal conditions was calculated as follows: MFI = MFI from stained unstimulated samples-MFI from the same unstimulated sample. For stimulated conditions: MFI increment = MFI from stimulated samples/MFI from unstimulated samples. Mean values \pm SEM are shown (Erk: n = 5; P38 n = 3; c-Cbl n = 3; Akt n = 5). (A color version of this figure appears in the online edition of this article.)

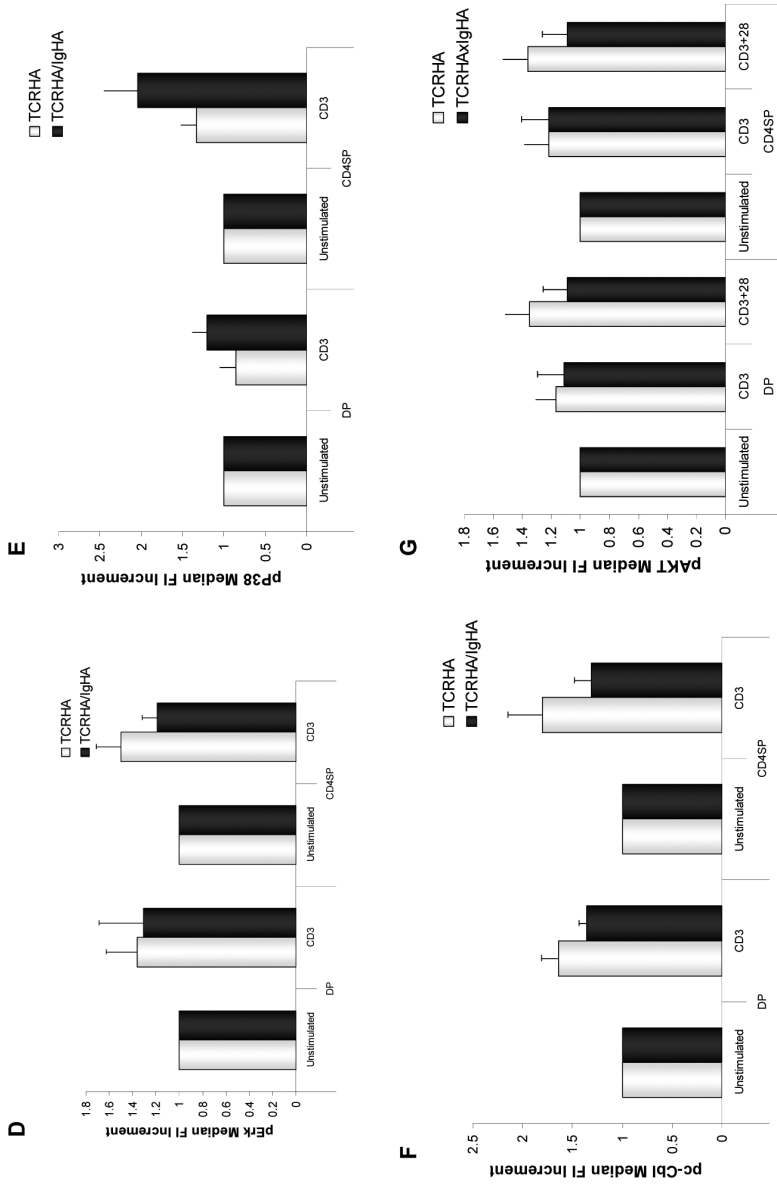


Figure 2: (Continued).

ment, and 2E). This unexpected result is specially interesting in the context of a recent report showing a role for P38 in thymocyte survival, through an Akt-independent mechanism that involves the inactivation of GSK3beta (Thornton et al., 2008). Moreover, our data showing a deficient Erk1/2 phosphorylation but increased P38 signalling fits with what has been described for peripheral anergic T cells (Adler and Steinbrink, 2008).

Since transgenic TCRs have a high affinity for their ligand, we expected to have an increased negative regulation of TCR-mediated signals, including the activation of c-Cbl, as has been published by other authors (Naramura et al., 2002; Thien et al., 2005). In addition, ubiquitin ligases are important for T cell anergy induction in the periphery as well as for the suppressive function of peripheral Tregs, reviewed in (Loeser and Penninger, 2007). Rather, unexpectedly, both DP and CD4SP thymocytes from TCRHxAIgHA mice showed slightly lower levels of phosphorylated c-Cbl upon anti-CD3 cross-linking (Figure 2C, representative experiment, and 2F), as well as in basal conditions (not shown).

As mentioned before, Akt activation has been related to Treg development and function (Crellin et al., 2007; Haxhinasto et al., 2008). As shown in Figure 2G, both DP and CD4SP 6.5⁺ thymocytes from TCRHA and TCRHxAIgHA transgenic mice induced similar Akt phosphorylation in response to CD3 cross-linking. However, only DP and CD4SP thymocytes from TCRHA single transgenic mice responded efficiently to CD3 + CD28 cross-linking, while TCRHxAIgHA double transgenic thymocytes appeared to be somewhat insensitive to CD28 costimulation.

Overall, these results suggest that Tregs generated in the thymus upon encounter with an agonist ligand might display a deficient proximal TCR mediated signalling. However, since the 6.5⁺ thymocytes from TCRHxAIGHA mice still contained a significant proportion of non Tregs, we attempted to validate these data in conventional naturally occurring Tregs.

Enhanced Basal Phosphorylation but Decreased TCR Mediated Signalling Among nTregs from Wild-Type Mice

To investigate the phosphorylation response of nTregs, we analyzed the CD25^{+hi} DP and CD4SP subpopulations, which we have previously demonstrated to contain >85-90% of FoxP3⁺ cells (not shown) and compared it to the CD25⁻ DP and CD4SP subpopulation.

As shown in Figure 3, CD25^{+hi} DP thymocytes showed increased basal levels of phosphorylated Erk and P38 compared to CD25⁻ thymocytes, while among CD4SP thymocytes Erk and P38 were also slightly increased, although the differences were not significant (Figure 3A and not shown). When we analyzed the phosphorylation of these MAP kinases in response to anti-CD3 cross-linking we found that CD25^{+hi} or CD25⁻ DP thymocytes responded similarly to

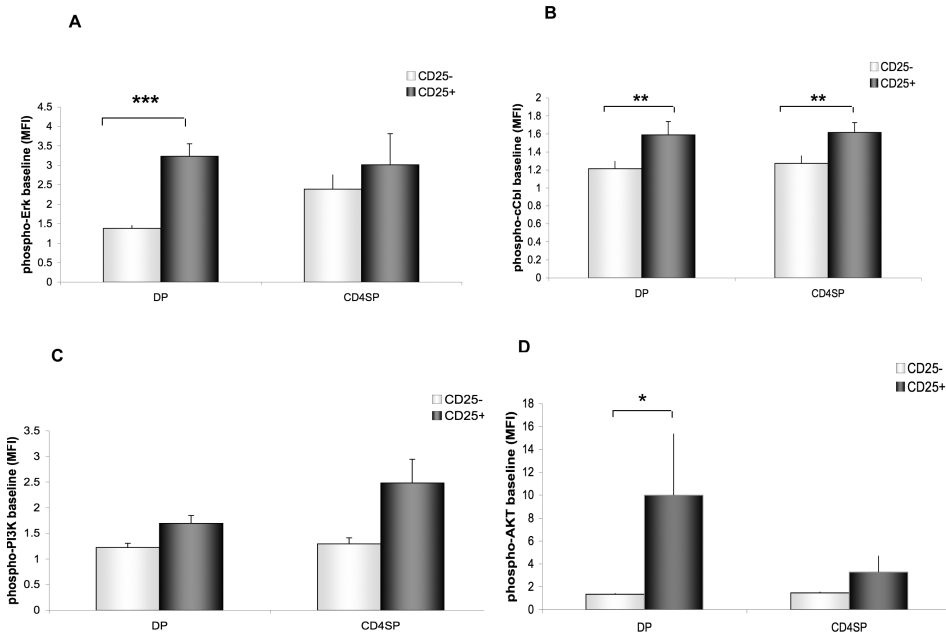


Figure 3: CD25^{+/hi} thymocytes show enhanced basal phosphorylation compared to CD25⁻ thymocytes. Analysis of Erk1/2 (A), P38 (B), PI3K (C) and Akt (D) phosphorylation in DP and CD4SP thymocytes from Balb/c mice. A) Median Fluorescence Intensity in basal conditions was calculated as before. Phosphorylation was determined by flow cytometry using CD4, CD8, and CD25 antibodies in combination with antibodies to phosphorylated proteins. Data represent mean values \pm SEM (Erk $n = 6$; P38 $n = 6$; c-Cbl $n = 5$). Statistically significant values are marked as *** $p \leq 0.01$. ** $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.1$.

anti-CD3, while the CD25^{+/hi} CD4SP subpopulation showed decreased Erk phosphorylation in response to anti-CD3 or anti-CD3 plus anti-CD28 compared to naive CD25⁻ thymocytes (Figure 4A and 4E).

Interestingly and similar to what was observed in antigen-specific Tregs, responses to PMA plus ionomycin were not significantly decreased in nTregs (Figure 4A, representative experiment), further suggesting a proximal signaling defect in this subpopulation. Phosphorylation of P38 was very weak in response to anti-CD3 and we did not find significant differences in the ability to respond between CD25^{+/hi} and CD25⁻ thymocytes (not shown).

When the ubiquitin ligase c-Cbl was analyzed in basal conditions, we found that DP CD25^{+/hi} and CD4SP CD25^{+/hi} showed a significant enhanced phosphorylation when compared with their CD25⁻ counterparts (Figure 3B). Interestingly, in response to CD3, we found that, similarly to what was observed in the double transgenic mice, CD4SP CD25^{+/hi} thymocytes were less responsive to anti-CD3 cross-linking than the CD25⁻ subpopulation, while the response to CD3 plus CD28 cross-linking was not different. (Figure 4B, representative experiment, and 4F).

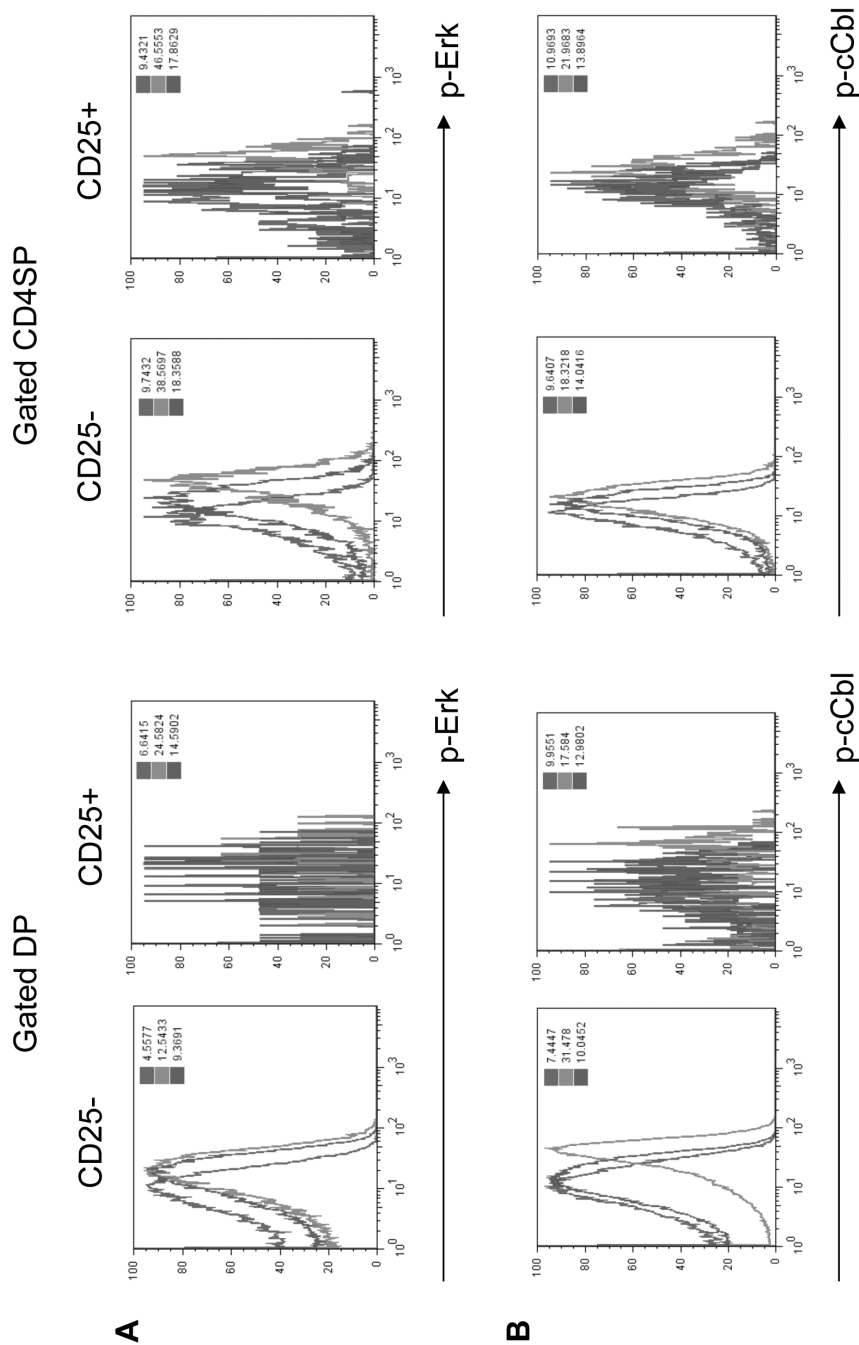


Figure 4: CD25⁺^{hi} thymocytes show and reduced phosphorylation responses after TCR cross-linking, compared to CD25⁻ thymocytes. Analysis of Erk (A, E), c-Cbl (B, F), PI3K (C, G) and Akt (D, H) phosphorylation in DP and CD4SP thymocytes from Balb/c mice in response to anti-CD3 ± CD28 cross-linking. Figures A-D: Analysis of phosphorylation in thymocytes from Balb/c mice stimulated with media (red line), with anti-CD3 cross-linking (blue line), or with PMA plus ionomycin (green line) was determined by flow cytometry using CD4, CD8, CD25 antibodies in combination with antibodies to phosphorylated Erk, c-Cbl, PI3K and Akt, respectively. In Figures E-H, Median fluorescence intensity increments were calculated as before. Data represent mean values ± SEM (Erk n = 10; c-Cbl n = 5; PI3K n = 8; Akt n = 8). Statistically significant values are marked as *p ≤ 0.1, **p < 0.05. (a color version of this figure appears in the online edition of this article.)

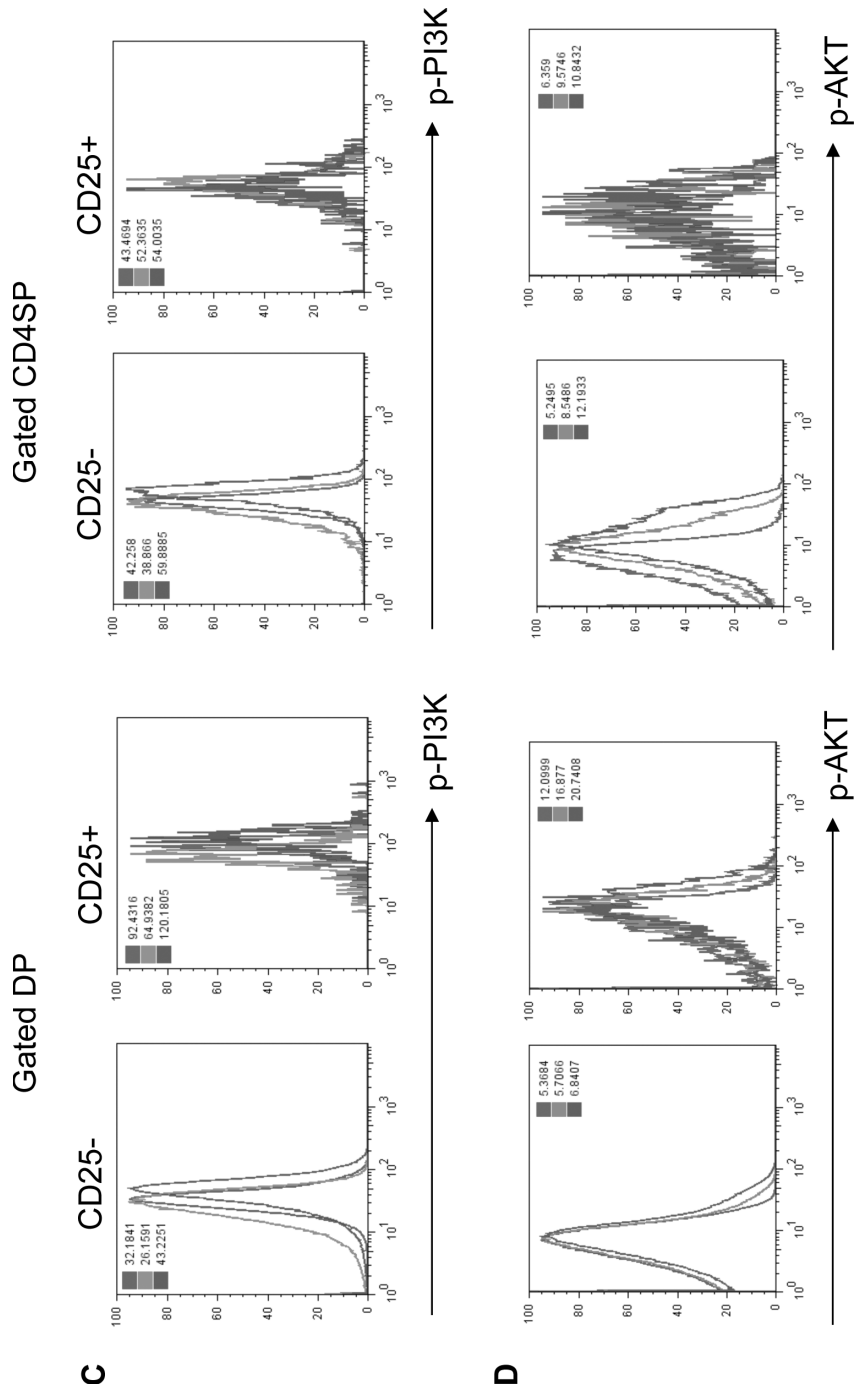


Figure 4: (Continued).

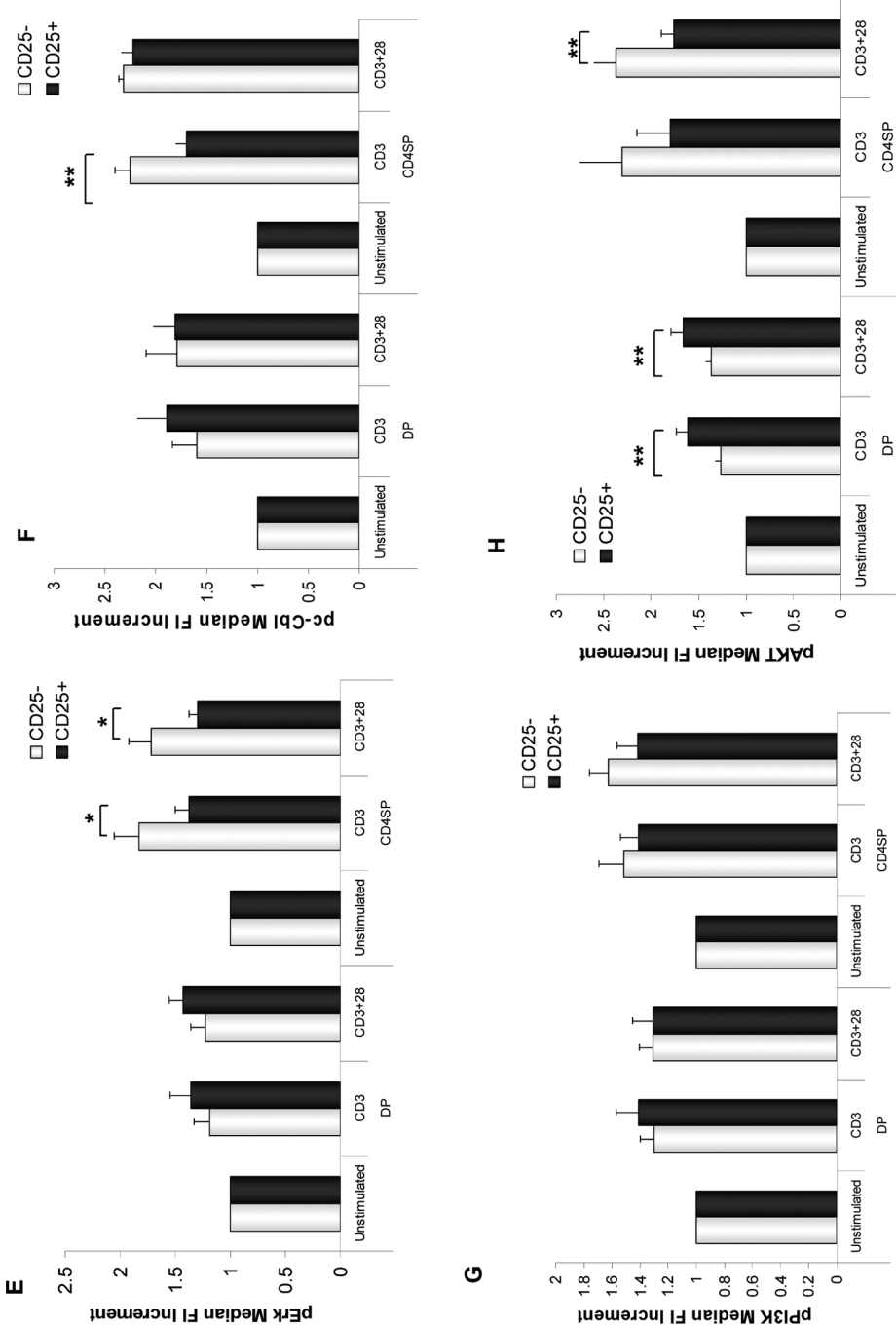


Figure 4: (Continued).

Finally, we also analyzed the phosphorylation of PI3K and AKT as markers of CD28-induced signalling and that have been involved to the generation of CD4⁺CD25^{+/hi} cells in wild-type mice (Bluestone and Tang, 2005). Interestingly, we found higher levels of basal phosphorylated PI3K and AKT in CD25^{+/hi} DP and CD4SP thymocytes, when compared to CD25⁻ cells (Figures 3C and 3D, respectively). This data agrees with the requirement for costimulation during nTreg selection (Salomon et al., 2000). Furthermore, this observation correlates with the enhanced basal phosphorylation of c-Cbl observed in wild type nTregs, since Cbl family could be involved in the activation and recruitment of PI3K to the TCR complex (Hunter et al., 1999; Thien et al., 2005).

However, when we stimulated these cells with anti-CD3 alone or with anti-CD28 antibodies, we found enhanced AKT phosphorylation among DP CD25⁺ cells but reduced phosphorylation of both PI3K and AKT in CD25⁺CD4SP nTregs (Figures 4C, G and D, H, respectively), confirming the results with the HA-specific Tregs. These results indicate that newly generated nTregs appear to be less sensitive to CD28-mediated costimulation.

In conclusion, we show here for the first time that, thymocytes developing in the presence of their agonist ligand showed reduced levels of Erk1/2, c-Cbl and Akt in response to TCR cross-linking, but increased phospho-P38. This impaired TCR signalling was confirmed for wild-type nTregs, which also showed enhanced basal phosphorylation of c-Cbl, Erk and PI3K. Therefore, Treg development can be defined by a specific “signalling signature” that suggests qualitative differences in TCR-mediated signalling that may not be explained merely by a higher TCR avidity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank QFB, Carlos Castellanos and Dr. Eduardo Infante (BD Biosciences) for technical assistance. We also thank MVZ Georgina Díaz and Jorge García for animal care assistance. This work was supported by Grants 42797-Q (GS) and 44212-Q (AS) from Conacyt, México, and from INSERM, France (AS). KN was supported by a fellowship from Conacyt (170032) and from DGEP, UNAM. DO was supported by a fellowship from DGEP, UNAM.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Adler, H. S. and Steinbrink, K. (2008). MAP kinase p38 and its relation to T cell anergy and suppressor function of regulatory T cells. *Cell Cycle* 7(2):1–7.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., et al. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3(8):756–763.

- Bluestone, J. A. and Tang, Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 17(6):638–642.
- Buer, J., Lanoue, A., et al. (1998). Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 187(2):177–183.
- Cabarrocas, J., Cassan, C., et al. (2006). Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(22):8453–8458.
- Carson, B. D. and Ziegler, S. F. (2007). Impaired T cell receptor signaling in Foxp3+ CD4 T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1103:167–178.
- Carter, J. D., Calabrese, G. M., et al. (2005). Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 174(11):6627–6638.
- Crellin, N. K., Garcia, R. V., et al. (2007). Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 109(5):2014–2022.
- Crellin, N. K., Garcia, R. V., et al. (2007). Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells. *J Immunol Methods* 324(1–2):92–104.
- Daniels, M. A., Teixeira, E., et al. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444(7120):724–729.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., et al. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4):330–336.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., et al. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6(11):1142–1151.
- Haxhinasto, S., Mathis, D., et al. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 205(3):565–574.
- Hori, S., Haurly, M., et al. (2002). Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):8213–8218.
- Hunter, S., Burton, E. A., et al. (1999). Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274(4):2097–2106.
- Kirberg, J., Baron, A., et al. (1994). Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180(1):25–34.
- Koonpaew, S., Shen, S., et al. (2006). LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203(1):119–129.
- Lambolez, F., Jooss, K., et al. (2002). Tolerance induction to self antigens by peripheral dendritic cells. *Eur J Immunol* 32(9):2588–2597.
- Lanoue, A., Bona, C., et al. (1997). Conditions that induce tolerance in mature CD4+ T cells. *J Exp Med* 185(3):405–414.
- Larkin, J., 3rd, Rankin, A. L., et al. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen. *J Immunol* 180(4):2149–2157.
- Liston, A., Nutsch, K. M., et al. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(33):11903–11908.

- Loeser, S. and Penninger, J. M. (2007). Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Semin Immunol* 19(3):206–214.
- Naramura, M., Jang, I. K., et al. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3(12):1192–1199.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., et al. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3):1151–1164.
- Salomon, B. and Bluestone, J. A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19:225–252.
- Salomon, B., Lenschow, D. J., et al. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12(4):431–440.
- Shevach, E. M. (2001). Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193(11):F41–46.
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., et al. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212:60–73.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., et al. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139–176.
- Thien, C. B., Blystad, F. D., et al. (2005). Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion. *Embo J* 24(21):3807–3819.
- Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., et al. (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320(5876):667–670.
- van Santen, H. M., Benoist, C., et al. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 200(10):1221–1230.
- Wan, Y. Y. and Flavell, R. A. (2006). The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212:114–130.
- Willoughby, J. E., Costello, P. S., et al. (2007). Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J Immunol* 179(10):683–644.