



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DE AKT DURANTE LA MIGRACIÓN
DE LOS LINFOCITOS T MEDIADA POR CCR7
DEPENDIENTE DE JAK3.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CARLOS ALBERTO MIER AGUILAR

MÉXICO, D.F.

AÑO 2010





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Fernando García Tamayo

VOCAL Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz

SECRETARIO: Profesor: María Gloria Soldevila Melgarejo

1er. SUPLENTE: Profesor: Constantino III Roberto López Macias

2° SUPLENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE
INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO



SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

SUSTENTANTE: CARLOS ALBERTO MIER AGUILAR

A MI MADRE

"Sería posible describir todo científicamente, pero no tendría ningún sentido; carecería de significado el que usted describiera a la sinfonía de Beethoven como una variación de la presión de la onda auditiva."

Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi madre que siempre ha estado allí para apoyarme en todo desde un principio y hasta el final. Sé que siempre, pase lo que pase estará ahí.

Gracias a Roxana por estar siempre ahí desde el principio de la carrera para apoyarme como mi compañera y mi amiga, por estar en todos los momentos buenos y malos y por dejarme estar en todo momento. Ya son casi 6 años de estar juntos. Sin ella no sería lo mismo estar aquí.

También le agradezco a todos mis amigos y compañeros que he conocido a lo largo de la carrera Gaby, Rubí, Karen, (todos los demás que falten de la facultad) y a mis amigos y compañeros de laboratorio, los cuales me han enseñado, han aprendido y con los cuales he reído y he discutido y por los cuales he crecido tanto personal como profesionalmente. Gracias Ramsés, Diana, Germán, Karen, Nelly, Xochitl, Ebza, Roxana, Horacio, Erika, y los que faltan.

Le doy gracias a la Dra. Gloria por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender todo lo que he aprendido, tanto profesional como personalmente y por arriesgarse a seguirme aguantando para el proceso de posgrado que se acerca. También agradezco al Dr. Eduardo por todos los consejos y críticas profesionales y personales que me ha dado a lo largo de este largo y difícil proceso.

Agradezco al Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos por el tipaje de los ratones JAK3 y por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

Finalmente agradezco a la UNAM por ser la máxima casa de estudios de este país y por cumplir los sueños de tantas personas y agradezco al tiempo por darme 10 años para recordar todo lo mejor que me dejó mi padre y por permitirme seguir adelante.

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	9
1.1. SISTEMA INMUNE	9
1.2. DESARROLLO DE LINFOCITOS T	11
1.2.1. MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T HACIA ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS	13
1.3. QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS	16
1.3.1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES VÍA PROTEINA Gi	18
1.3.2. CCR7 Y SUS LIGANDOS CCL19 Y CCL21	20
1.4. LAS CINASAS DE JANUS (JAKs), LAS PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATs) Y LA VÍA JAK/STAT	24
1.4.1. LAS CINASAS DE JANUS (JAKs)	24
1.4.2. LAS PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN	27
1.4.3. VÍA JAK/STAT	28
1.4.4. RELACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT CON RECEPTORES DE QUIMIOCINAS	29
1.5. JAK3 Y SU DEFICIENCIA	30
1.6. AKT Y SU RELACIÓN CON MIGRACIÓN	33
1.6.1. AKT Y MIGRACIÓN	35
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. MATERIALES	40
5.2. MÉTODOS	41
5.2.1. TIPAJE DE RATONES	41

5.2.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS	42
5.2.3. “PANNING”/SELECCIÓN DE LINFOCITOS T	42
5.2.4. ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN	43
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
6. RESULTADOS	49
6.1. TIPAJE DE RATONES	49
6.2. CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT EN RESPUESTA A CCL21.	50
6.3. COMPARATIVA DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT VS KO EN RESPESTA A CCL21	55
7. DISCUSIÓN	62
7.1. CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT EN RESPUESTA A CCL21.	62
7.2. COMPARATIVA DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT VS KO EN RESPESTA A CCL21	65
8. CONCLUSIONES	71
9. PERSPECTIVAS	71
10. BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXO I. REACTIVOS Y SOLUCIONES	78

ABREVIATURAS

Akt/PKB	Proteína Cinasa B
c-AMP	AMP cíclico
CCL19	Quimiocina ligando (C-C) 19
CCL21	Quimiocina ligando (C-C) 21
CCL25	Quimiocina ligando (C-C) 25
CCR7	Receptor Quimiocina (C-C) 7
CCR9	Receptor Quimiocina (C-C) 9
CXCL12	Quimiocina Ligando (CXC) 12
CXCR4	Receptor Quimiocina (CXC) 4
CD	Célula Dendrítica
c-GMP	GMP cíclico
GAG	Glicosaminoglicano
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
IL-2	Interleucina 2
IL-7	Interleucina 7
IP3	Inositol 3 fosfato
JAK	Cinasa de Janus
JAK3	Cinasa de Janus 3
KO	Knock Out
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
PI3K	Fosfoinositol 3 fosfato cinasa
PIP3	Fosfoinositol 3 fosfato
PTX	Toxina Pertussis
Rac	GTPasa
Rho	GTPasa
STAT	Proteína transductora y activadora de la transcripción
TCR	Receptor de linfocito T
WT	Silvestre o Wild Type

RESUMEN

El sistema inmune se encuentra altamente regulado y su adecuado funcionamiento es fundamental para el organismo. Entre los procesos más importantes de esta red se encuentra la migración celular.

Las vías de señalización a través de las cuales las diversas quimiocinas actúan, aún no se han logrado dilucidar por completo en la actualidad. Se sabe que en ratones deficientes de la proteína JAK3, los ganglios linfáticos carecen de linfocitos T, debido a una deficiencia en migración dirigida o "homing". Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que esta deficiencia se vincula con problemas en la vía CCR7, con la vía JAK/STAT y más recientemente, se han observado deficiencias en la dinámica del citoesqueleto.

Debido a que las moléculas que participan en la señalización vía CCR7 y que están involucradas con la señalización a través de JAK/STAT no se han descrito completamente, en este trabajo nos enfocamos en el estudio de AKT, una proteína cinasa, que se ha relacionado con los fenómenos de metástasis y migración en diversos tipos de cáncer y la cual parece tener una participación (vía PI3K) en la transducción de señales de la quimiocina CXCL12, en la cual participa la vía JAK/STAT. Para determinar la posible participación de AKT a través de CCR7 y su relación con la ruta JAK/STAT, se realizaron ensayos de fosforilación de esta molécula, en linfocitos T de ratones de la cepa C57BL/6 y en ratones deficientes para la proteína JAK3.

Los resultados obtenidos muestran que en el ratón C57BL/6, AKT se fosforila en respuesta al ligando de CCR7, CCL21 y que tiene un pico máximo de respuesta a los 30 seg; de la misma forma, en el ratón deficiente de la proteína JAK3 se observa fosforilación de la cinasa AKT a los 30 segundos, en respuesta a CCL21. Con estos resultados se determinó que la fosforilación de la cinasas AKT en respuesta a CCL21 no presenta diferencias entre el ratón WT y el ratón JAK3 KO, por lo que la fosforilación de AKT y sus efectos en migración, parece no verse afectada por la deficiencia de JAK3.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 SISTEMA INMUNE

La función principal del sistema inmune es protegernos contra agentes extraños, denominados patógenos; para poder llevar a cabo este proceso, es necesario que sea capaz de discriminar entre agentes propios y extraños. Todo este sistema se divide, conforme al tipo de respuesta en inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

Tanto en la respuesta inmune innata, como en la adaptativa, encontramos participación de diversos agentes solubles y de distintos tipos celulares. La inmunidad innata es llevada a cabo por: 1) barreras físicas y químicas (células y factores solubles); 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas); 3) proteínas de la sangre (complemento); 4) proteínas que son capaces de regular la respuesta inmune y que coordinan la forma en la que esta se lleva a cabo (citocinas y quimiocinas) [1]. Los mecanismos por los cuales la inmunidad innata reconoce a los patógenos son “inespecíficos”, pero a pesar de esto, son bastante conservados frente a estructuras que son comunes, a diversos grupos de microorganismos (patrones moleculares asociados a patógenos o “PAMPS”).

La inmunidad adaptativa se lleva a cabo por dos mecanismos distintos: 1) respuesta celular: Células Linfocíticas (Linfocitos B y T); 2) Respuesta Humoral: Proteínas Solubles (Anticuerpos). Las características que definen a este tipo de inmunidad son: especificidad por diversas moléculas (especificidad antigénica), y la capacidad de generar “memoria”, lo que permite al sistema inmune responder de manera más rápida y con mayor intensidad a un reto [2].

Para poder tener una respuesta “antígeno específica”, tanto los linfocitos T, como los linfocitos B requieren de un proceso adecuado de desarrollo. La homeostasis de los linfocitos se lleva a cabo en distintos compartimentos del sistema inmune, los cuales se denominan órganos linfoides (Fig 1). Los órganos linfoides se dividen en primarios y secundarios, siendo los primarios, aquellos

órganos en los cuales se lleva a cabo el desarrollo y/o maduración de las células, y los secundarios, aquellos en los cuales se promueve la activación y generación de una respuesta inmunológica.

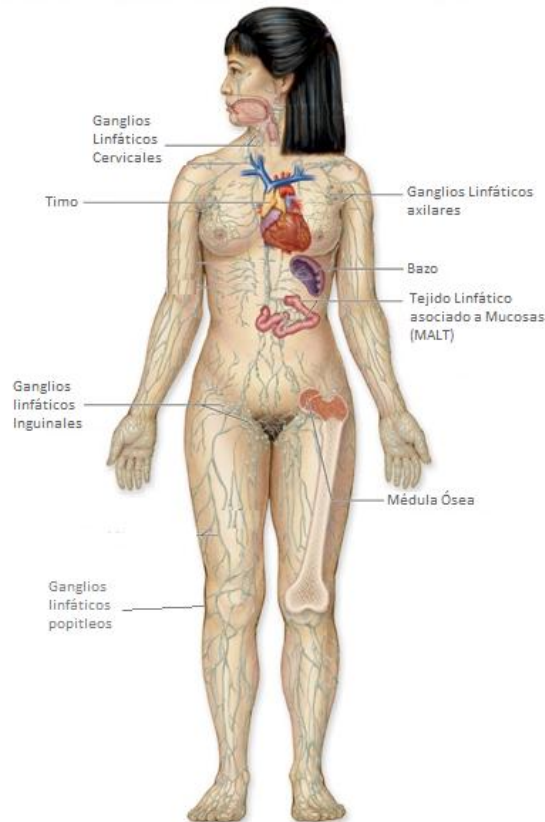


Fig 1. Distribución de los órganos linfoides en el cuerpo humano.

La parte humoral de la inmunidad adaptativa está determinada por los linfocitos B, ya que estos son los encargados de la producción de anticuerpos. En los mamíferos existen 5 tipos de anticuerpos distintos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Todos los anticuerpos se unen de manera específica a los antígenos contra los que están dirigidos, provocando varios tipos de respuestas, entre las cuales se encuentran la neutralización, opsonización, activación de complemento, etc [3].

La parte celular de la inmunidad adaptativa depende de los linfocitos T, cuyos precursores se generan en médula ósea y migran hacia el timo, donde concluyen su maduración, la cual incluye la expresión de receptores antigénicos altamente específicos.

1.2 DESARROLLO DE LINFOCITOS T

Los progenitores de los linfocitos T entran a timo como precursores linfoides, que aún no se encuentran comprometidos a linaje de T y debido a esto expresan receptores comunes a células progenitoras linfoides (Sca 1 y Ckit) [4], pero no expresan ningún receptor de linaje diferenciado como los correceptores CD4 y/o CD8 [5].

Para poder tener una respuesta adaptativa adecuada se requiere que el timo reclute periódicamente células a través de vénulas, que irrigan la corteza perimedular. Después que estos precursores linfoides entran al timo, siguen un curso a través del estroma tímico para poder llevar a cabo una maduración completa y adecuada [6]. Este recorrido se distingue por medio de marcadores expresados en la superficie de las células: los timocitos simples positivos (SP), que pueden ser CD4+ o CD8+; los timocitos dobles positivos (DP), que co-expresan CD4+ y CD8+; los timocitos dobles negativos DN, que a su vez, se pueden subdividir en DN1 (CD44+ CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44- CD25+) y DN4 (CD44- CD25-) [7]. (Fig. 2)

A lo largo del desarrollo en el timo, los timocitos se mueven en respuesta a diversos factores solubles como las quimiocinas CXCL12, CCL19, CCL21, CCL25. Además, las células en proceso de maduración reciben señales de sobrevivencia a través de receptores de membrana como Notch con su interacción con el ligando Delta, expresado en células estromales, en cooperación con la citocina IL-7 [8, 9] En la población DN2 se inicia el rearreglo de la cadena β del TCR y en el estadio DN3 los timocitos expresan la cadena β del TCR rearreglada (por lo cual se restringen al linaje T) asociada a una cadena pre-T α , para formar un complejo pre-TCR. Si el rearreglo de la cadena β es funcional entonces las células son

capaces de sobrevivir, en el caso contrario las células mueren por apoptosis. Después de sobrevivir a la selección de una cadena β funcional, las células expresan en el estadio DN4 (pre-DP) un TCR- $\alpha\beta$ funcional e inmediatamente incrementan sus niveles de CD4 y CD8, convirtiéndose así en timocitos DP [10].

Las células DP pasan por un proceso de selección conocido como selección positiva, el cual se lleva a cabo en corteza. Consiste en la presentación de antígenos propios a través del MHC y su reconocimiento por medio del TCR de los timocitos DP. En este proceso, los timocitos DP que son capaces de reconocer a estos péptidos-MHC sobreviven al proceso, mientras que aquellos que no son capaces de reconocer el complejo péptido-MHC mueren por “negligencia” mediante muerte celular programada o apoptosis [11].

Después de este proceso, los timocitos incrementan la expresión de CCR7 y responden eficientemente a los ligandos CCL19 y CCL21, los cuales se expresan en el epitelio cortico-medular y medular, permitiendo su movimiento de la corteza hacia la médula. En este punto, los linfocitos DP también disminuyen la expresión de uno de los dos correceptores (CD4 o CD8), lo cual genera la producción de timocitos SP, ya sean CD4+ o CD8+ [12].

En la región cortico-medular y en la médula los timocitos SP, tanto CD4+ o CD8+, sufren un segundo proceso importante, denominado selección negativa. En la selección negativa las células epiteliales de médula (mTEC) y las células dendríticas de médula (CD), con gran capacidad costimuladora, presentan péptidos propios a los timocitos, [11].

Al término de todos estos procesos de desarrollo, los timocitos SP maduros son capaces de salir del timo (mediante un proceso dependiente del receptor SIP1), y migrar hacia los órganos linfoides secundarios, por medio de la expresión del receptor CCR7 y la presencia de sus ligandos CCL19 y CCL21 en las HEVs (Vénulas del Endotelio Alto) [13, 14].

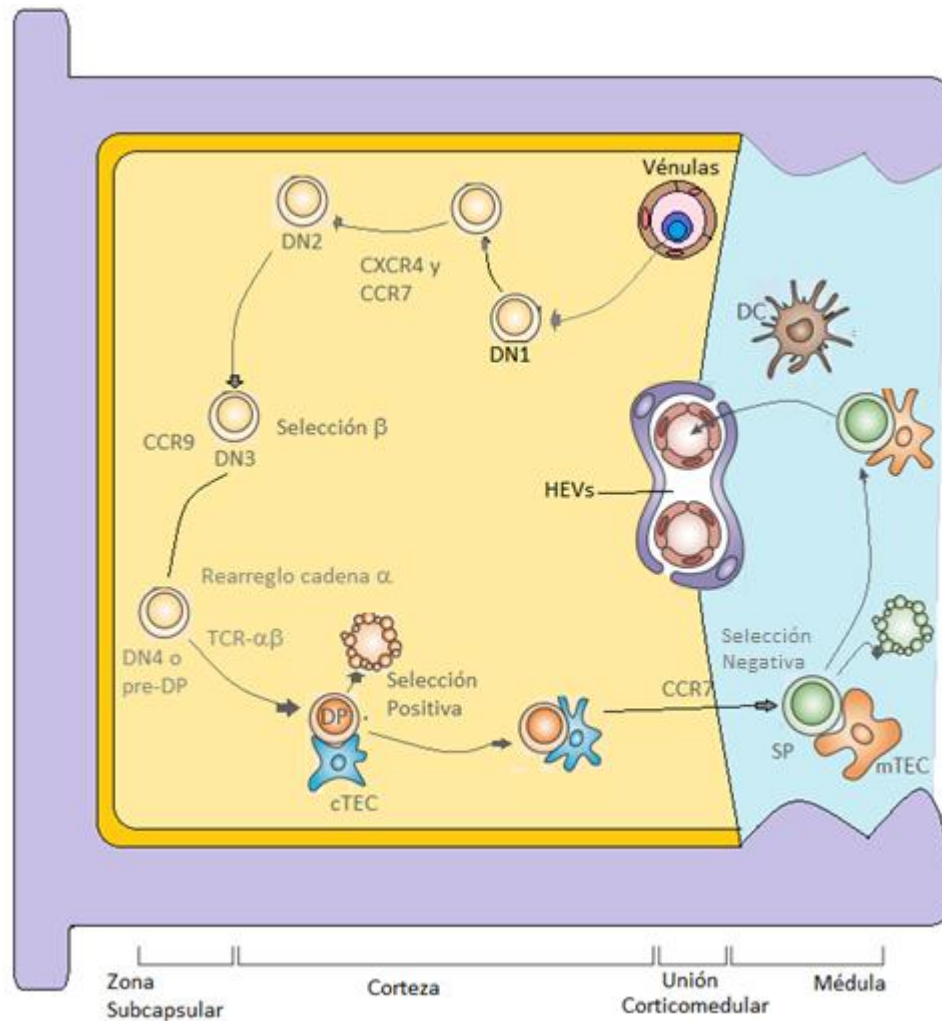


Figura 2. Desarrollo de Timocitos. Adaptado de Takahama. Nat. Rev. Immunol. 2006. [7]

1.2.1 MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T HACIA ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.

Los órganos linfoides secundarios son el sitio donde la respuesta inmune innata conduce a una respuesta inmune adaptativa. Para que los órganos linfoides secundarios ejerzan su función de manera eficiente, es necesaria la migración adecuada de todos los componentes del sistema inmune hacia ellos [15].

De los órganos linfoides secundarios, los que se encuentran en mayor proporción y con una distribución más amplia son los ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos son estructuras organizadas que se encuentran a lo largo del cuerpo. Existen distintos tipos: cervicales, axilares, mediastinales, mesentéricos, inguinales, popíteos, etc. Las principales funciones de estas estructuras son: 1) reclutar linfocitos T y B vírgenes o “naïve”, provenientes tanto de la sangre como del timo; 2) Colectar antígenos y reclutar CD4 para generar tolerancia antígeno-específica o bien; 3) Iniciar la activación de los linfocitos T/B y dirigir los linfocitos T/B efectoros a distintos tejidos.

La estructura de los ganglios linfáticos se puede dividir en 2 grandes zonas, corteza y médula. En la corteza se distinguen la zona de linfocitos T (paracorteza) y la zona de linfocitos B. La zona de linfocitos B es el lugar en donde se llevan a cabo las respuestas humorales, mientras que la Zona de T es la región en la cual entran la mayoría de los linfocitos T y donde los linfocitos T interactúan con las CD4. La médula es la región donde se encuentra una gran cantidad de capilares linfáticos, aunque su función no se conoce de manera clara [16]. (Fig. 3)

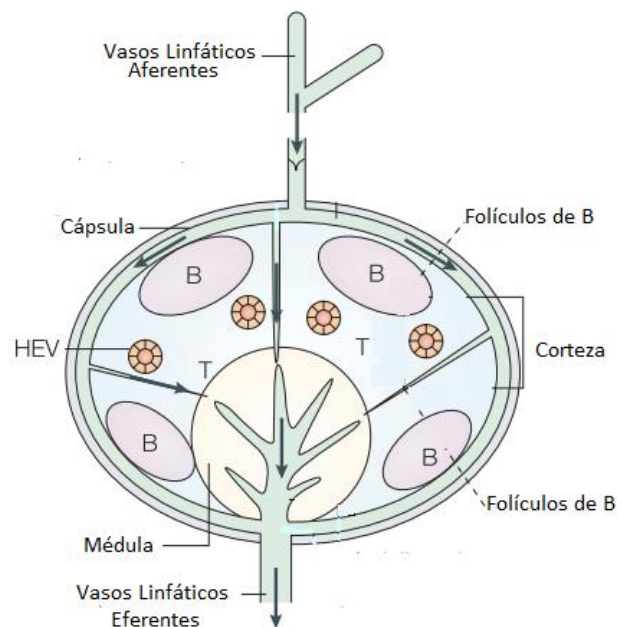


Figura 3. Estructura general de los ganglios linfáticos. Adaptado de H. Von Andrian et al. Nat. Rev. Immunol. 2003. [16]

Para que los linfocitos puedan llegar a los ganglios linfáticos se requieren de HEVs o de vías linfáticas aferentes. Los HEVs son vénulas que controlan la migración de linfocitos T por la expresión (CCL21) o reclutamiento de quimiocinas a ellas (CCL19). Además, expresan diversas moléculas de adhesión (MADCAM1 en neonatos y PNAD en adultos, ICAM1-2, VCAM1). La vía linfática se compone de vasos linfáticos, los cuales absorben fluido y células de la región intersticial de los tejidos y los conducen a los órganos linfoides secundarios (aferente), o conducen células y fluido de los órganos linfoides secundarios a la circulación sistémica (eferente).

La mayor parte de los linfocitos T y B entran a la región cortical y paracortical de los ganglios por medio de los HEVs y para esto requieren de una serie de interacciones. Estas interacciones son: 1) Unión y Rodamiento (Rolling) por medio CD62L (Ligando de PNAD). De manera general, el “rolling” se lleva a cabo debido a la polarización de la célula. Después de la adhesión de los linfocitos a las HEVs, estos se polarizan. Esto involucra la formación de polímeros de actina denominados “lamelipodia” en el frente de migración (leading edge) y también involucra la formación de polímeros de actina en la parte trasera de la célula (urópodo). El rodamiento es un proceso dinámico en el cual el frente de migración se une a la superficie de las HEVs por medio de moléculas de adhesión, mientras que el uropodo se despegas de la superficie y así consecutivamente; 2) Activación de integrinas LFA1, la cual interactúa con ICAM1-2, o de VCAM-1 [17]. Este punto es clave para la migración hacia ganglios linfáticos y requiere de la unión de CCL21 y/o CCL19 al receptor CCR7 expresado en linfocitos T vírgenes. CCL21 se expresa de manera constitutiva en HEVs, mientras que CCL19 se expresa en ganglios linfáticos o en el endotelio linfático y es capaz de transportarse a los HEVs. A diferencia de lo que sucede en humanos, CCL21 tiene 2 isoformas CCL21-Ser y CCL21-Leu, ratones deficientes de CCL21-Ser y CCL19 (plt/plt) tienen pocos linfocitos T en ganglios linfáticos [18, 19]. Finalmente; 3) Los linfocitos se arrestan por medio de las integrinas al endotelio de HEVs y ahí son capaces de transmigrar de las HEVs hacia los ganglios linfáticos, donde pueden realizar sus diversas funciones [16]. (Fig. 4)

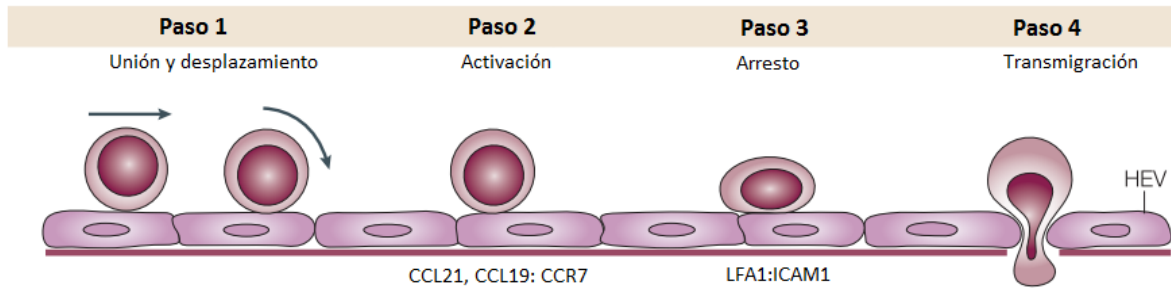


Figura 4. Movimiento de los Linfocitos T a través de HEVs. Adaptado de Kinashi. Nat. Rev.Immunol. 2005 [20]

1.3 QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son una familia de citocinas las cuales son secretadas por distintos tipos celulares. Se denominan quimiocinas por que son capaces de inducir quimiotaxis, ya sea a distintos sitios de inflamación o de manera homeostática.

La mayor parte de las quimiocinas son proteínas de aproximadamente 8-12 kDa y la homología entre ellas varía entre el 20-90%. Una característica básica de las quimiocinas, es la presencia de cuatro residuos de cisteína invariantes. Dependiendo del arreglo de las dos primeras cisteínas, las quimiocinas se pueden dividir en: a) CXC, b) CC, c) C y d) CX₃C, donde la C corresponde a un residuo de cisteína, y la X corresponde a algún otro aminoácido [21, 22].

A la fecha se conocen aproximadamente 50 quimiocinas humanas y 20 receptores (Fig. 5). En el año 2000 se introdujo un sistema que permite identificar a las quimiocinas y sus receptores por un número específico [23].

Receptor	Ligands
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1
CCX-CKR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

Figura 5. Receptores de Quimiocinas y sus ligandos. Tomado de Allen et al. Annu. Rev. Immunol. 2007. [24]

Muchas quimiocinas son capaces de formar dímeros u oligómeros de orden superior a 2. La funcionalidad de la oligomerización no está totalmente establecida, pero se sabe que podría relacionarse con la formación del gradiente quimiotáctico y la unión de quimiocinas a Glicosaminoglicanos (GAGs) [25]. La unión de quimiocinas a GAGs es fundamental, ya que en la actualidad se sabe que las células expuestas a concentraciones constantes de estas moléculas se mueven de manera aleatoria, mientras que se hipotetiza que cuando se unen a GAGs se establece un gradiente que genera la direccionalidad de las células. Estudios *in vitro* no han logrado demostrar la importancia de los GAGs, pero mutaciones de algunas quimiocinas, en sitios de unión a GAGs, han demostrado que las células que responden de manera normal a estas quimiocinas células no son capaces de migrar [25].

Los receptores de quimiocinas son proteínas con 7 dominios transmembranales (7TM). El dominio N-terminal y 3 loops se encuentran en la parte extracelular, mientras que el dominio C-Terminal y 3 loops se encuentran en

la región intracelular. Existen 2 tipos principales de receptores: los receptores que son capaces de señalizar (debido a la presencia de un motivo DRY) y los que no son capaces de señalizar [24].

Los receptores de quimiocinas son miembros conocidos de un grupo llamado GPCRs (G Protein Coupled receptors, o receptores acoplados a proteínas G). Este nombre se deriva de su vía de transducción de señales, la cual involucra a proteínas G heterotriméricas unidas a los loops intracelulares [26]. De manera general, cuando un ligando se une a un receptor de quimiocinas, se induce un cambio conformacional en el receptor que activa a la proteína G heterotrimérica, generando la disociación de GDP unido a la subunidad α y la unión de GTP a esta misma. Cuando se forma el complejo α -GTP, éste se disocia del receptor y del heterodimero $\beta\gamma$, provocando la activación de diversos efectores.

En la mayor parte de las células de origen hematopoyético, los GPCRs encargados de la respuesta quimiotáctica se encuentran asociados a proteínas G_i . Esto se sabe ya que casi todas las respuestas se encuentran abatidas por la utilización de Toxina Pertussis [27]. En la actualidad se sabe que en las células dendríticas, pero no en los linfocitos “vírgenes”, se puede activar una vía de transducción de señales dependiente de G_q , en respuesta a CXCR4 o CCR7, aunque no se sabe con certeza el mecanismo por el cual esto sucede [28]

1.3.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES VÍA PROTEÍNA G_i .

Esta vía de transducción de señales inicialmente se descubrió al comprobar que la subunidad $G_{\alpha i}$, tiene la capacidad de inhibir la actividad de la enzima adenilil ciclasa. Se sabe que en esta cascada de señales, después de disociarse tanto la subunidad α como la $\beta\gamma$, se pueden activar a diversas moléculas efectoras [29].

La subunidad $\beta\gamma$ es capaz de activar al menos 4 distintos efectores. Estos son: 1)MAPK. En esta vía se activan moléculas efectoras como p38 y ERK 1/2, las cuales pueden participar en diferenciación, proliferación, migración; 2) PI3K. En

esta vía PI3K (fosfatidil inositol 3 fosfato cinasa) puede fosforilar a IP3 (Inositol 3 fosfato), produciendo PIP3, la cual es capaz de activar a AKT (Protein Kinase B) y conducir a migración, activación de integrinas, reorganización de citoesqueleto, proliferación y supervivencia 3) Pyk2. Esta cinasa de adhesión focal es capaz de activar a FAK (cinasa de adhesión focal), la cual a su vez es capaz de activar a Paxilina, lo que conduce a activación de integrinas y adhesión; 4) PLC. Al activar PLC (fosfolipasa C) se produce IP3 (inositol 3 fosfato) y DAG (diacilglicerol) a partir de lípidos de membrana. La producción de IP3 soluble genera la liberación de Ca^{2+} por el RE (retículo endoplásmico). El incremento de la concentración de Ca^{2+} activa de manera indirecta varias vías de señalización entre las cuales destaca la activación de moléculas de adhesión, reorganización de citoesqueleto, etc.. [30]

La subunidad α de la proteína G_i , es capaz de activar a DOCK2, molécula que a su vez es capaz de activar a la familia de GTPasas Rac, que conduce a la formación del “frente de migración” de una célula. También es capaz de activar a PI3K la cual puede activar a PIP3 y AKT, que a su vez activa a otras GTPasas y permite la adhesión por medio de la activación de integrinas. Finalmente, también es capaz de activar a la familia RAP1 la cual es responsable de la polarización de la célula y también está involucrada en la activación de integrinas, adhesión y arresto celular [20]. (Fig. 6)

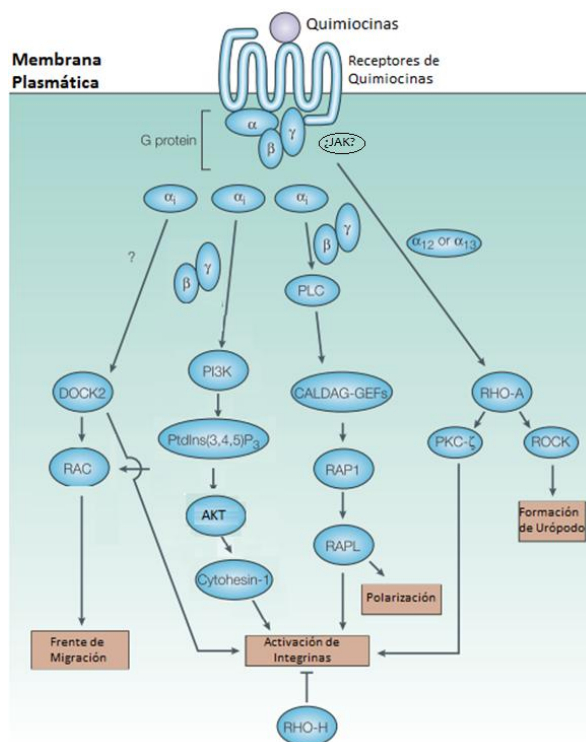


Fig 6. Activación de la vía Gi. Adaptado de Kinashi. Nat. Rev. Immunol. 2005 [20]

1.3.2 CCR7 Y SUS LIGANDOS CCL19 Y CCL21.

CCL19 y CCL21 son las únicas 2 quimiocinas ligandos de CCR7. A diferencia de la quimiocina CCL19, CCL21 contiene una región carboxi-terminal de 32 aminoácidos, 12 de los cuales son aminoácidos básicos y permiten la unión de esta quimiocina a GAGs [31]. Como se mencionó anteriormente, la unión a GAGs parece ser fundamental para la presentación y actividad de esta quimiocina.

Como resultado de duplicación génica, existen 2 genes en ratón que codifican para CCL21. CCL21-Leu, la cual contiene una Leucina en la posición 65 y se expresa en vasos linfáticos de tejidos no linfoides como el pulmón, colon, estómago, corazón y piel. Mientras que CCL21-Ser se expresa en órganos linfoides como el timo, ganglios linfáticos y bazo. De manera sorprendente e interesante la variante con la Ser no se expresa en humanos [19].

Existe una variante de ratones denominados “Paucity of Lymph Node T-Cells (plt/plt) mice”, la cual ocurre de manera natural y acarrea una mutación

autosómica recesiva. Esta cepa carece de un locus que codifica tanto para la quimiocina CCL19, como para la quimiocina CCL21-Ser, dejando solamente en locus que codifica para CCL21-Leu intacto. Los ganglios linfáticos de esta cepa tienen una cantidad muy baja de células en la Zona de T, mientras que la zona de B se encuentra afectada pero en menor cantidad. Esto sugiere que los linfocitos B y las células T de memoria pueden responder a distintas señales, las cuales pueden estar dictadas de manera diferencial por las variantes de CCL21 y por CCL19 [32].

En humanos y ratones la producción de CCL21 se da en fibroblastos reticulares de la zona de T y en ratones también se da en los vénulas de endotelio alto (HEVs) [33], mientras que la producción de CCL19 se da solamente en la zona de T [34]. Esto implica que para que las células respondan a CCL19 durante su migración a lo largo de las HEVs es necesario que CCL19 se transloque de los órganos linfoides a las HEVs. Es importante mencionar que toda esta producción se da de manera homeostática, ya que durante una respuesta inflamatoria la producción de CCL19 se ve afectada por la presencia de CDs en los órganos linfoides secundarios.

CCR7, de manera similar a la mayoría de los receptores de quimiocinas, es un receptor que contiene 7 dominios transmembranales y cuya señalización esta mediada por Proteínas G heterotriméricas. CCR7 se expresa en la superficie de CDs maduras e inmaduras, timocitos (en una subpoblacion transitoria en estadio DN2 e incrementa en la transición de DP a SP), linfocitos T y B naïve y una subpoblación de linfocitos T de memoria central [35, 36].

Las quimiocinas CCL19 y CCL21 tienen una afinidad similar por CCR7, pero a pesar de esto inducen distintas vías de transducción de señales, ya que a pesar de que ambas quimiocinas son capaces de activar la vía de transducción de señales dependiente de proteína G, solamente la quimiocina CCL19 es capaz de activar una vía dependiente de Arrestina 3, la cual induce la endocitosis y reciclaje de CCR7 [37].

CCR7 es un receptor que transduce señales que controlan la migración de linfocitos T a los órganos linfoides secundarios y que, además, permite el tráfico dentro de ellos para posicionarse en la zona adecuada para poder montar una respuesta inmune adecuada.

En el desarrollo tímico y entrada a timo de los precursores linfoides se ha postulado la necesidad de CCR7. En el caso de entrada al timo de progenitores linfoides se ha demostrado que durante la formación del primordio tímico este receptor y sus ligandos son muy importante [38]. Más recientemente se ha demostrado que en el caso de adultos se requiere de la acción coordinada de CCR7 y CCR9 para la entrada a timo de estos progenitores. En condiciones de transferencia competitiva en recipientes silvestres (Wild Type, WT) las células del ratón Doble KO para CCR7 y CCR9 están virtualmente ausentes de timo. Pero cuando se realiza una inyección intratímica de estas células, éstas son capaces de repoblar de manera adecuada el timo en el estadio DN3-DP [39, 40]. Se postula que esto se debe a una capacidad de proliferar más de estas células o que son menos susceptibles a la muerte. Estos datos son consistentes con publicaciones previas en las cuales se observaba que los ratones deficientes de CCR7 o CCR9 presentan poblaciones adultas tímicas similares a las de los ratones WT, ya que explican que a pesar del bajo reclutamiento de precursores CCR7 KO (por PSGL-1 o algún otro receptor de quimiocinas) [10, 38, 41], estas células son más capaces de proliferar. Concerniente al papel de CCR7 en el desarrollo intratímico se sabe que la subpoblación DN2 se puede arrestar parcialmente en la región cortico-medular en ausencia de CCR7 y también se sabe que la expresión de CCR7 es importante en las células DP para su movimiento de corteza a médula y que las células SP expresan altos niveles de CCR7 probablemente para poder permanecer en médula y terminar su maduración y para poder emigrar hacia órganos linfoides secundarios [6, 7].

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de los linfocitos T entran a los órganos linfoides secundarios a través de HEVs. Para determinar cual es el papel de CCR7 en la entrada de linfocitos a órganos linfoides secundarios se

utilizó una cepa deficiente de CCR7 (CCR7^{-/-}) [42]. Estos ratones presentan alteraciones en la composición de los órganos linfoides secundarios. Los ganglios linfáticos son linfopénicos y carentes de CD11c⁺ MHC^{hi} [42]. Adicionalmente a esto, algunos ratones CCR7^{-/-} no presentan ganglios linfáticos, pero presentan estructuras linfoides ectópicas en pulmón, estómago, intestinos. El mecanismo por el cual esto sucede es desconocido por el momento [43]. En experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos T de ratones CCR7^{-/-} a ratones silvestres (WT) se ha podido comprobar que estos linfocitos T tienen deficiencias severas en “homing” a órganos linfoides secundarios y esta deficiencia ocurrió tanto en la subpoblación CD4⁺ como CD8⁺ [44].

Las Células Dendríticas están consideradas centinelas de la piel y otras mucosas ya que son capaces de residir ahí, pero cuando reconocen algún estímulo infeccioso o inflamatorio, éstas “maduran”. En el proceso de “maduración”, estas células incrementan la expresión de moléculas de MHC Clase II, moléculas coestimuladoras como CD80, CD83, CD86, además de receptores de quimiocinas como CCR7. Se desconoce el mecanismo exacto a través del cual las células dendríticas entran a los ganglios linfáticos, pero se sabe que entran a estos por medio de los vasos linfáticos aferentes. Por medio de delección del locus de CCR7 se describió que los ratones CCR7^{-/-} tienen los mismos números de CDs en mucosas y tejidos, pero presentan una disminución considerable de CDs en los ganglios linfáticos [14]. Esto sugiere que CCR7 es importante para la llegada de las células dendríticas a los ganglios linfáticos, pero no para su establecimiento en mucosas y otros tejidos. Adicional a la función que ejerce CCR7 y sus ligandos sobre la migración de las células dendríticas a ganglios linfáticos, la unión de los ligandos de CCR7 a las CDs incrementa la capacidad de estas para capturar antígenos [45]. Recientemente, se ha reportado que CCL21, pero no CCL19, es indispensable para la migración de las CDs desde la piel hasta los ganglios linfáticos [46].

1.4 LAS CINASAS DE JANUS (JAKS), LAS PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATS) Y LA VÍA JAK/STAT

1.4.1 LAS CINASAS DE JANUS (JAKS)

Existen 4 miembros de la familia Janus los cuales pueden participar en desarrollo celular, sobrevivencia, desarrollo y diferenciación, entre otras actividades [47]. Diferentes datos experimentales muestran que las proteínas JAK pueden participar en diferentes eventos celulares en el sistema inmune, ya sea adaptativo o innato. Por ejemplo: deficiencias en JAK3 generan una enfermedad SCID en humanos [48], mientras que deficiencias en Tyk2 generan un síndrome de hiperglobulinemia E [49].

Las proteínas JAK forman parte de un grupo de proteínas denominadas cinasas de tirosina (PTK, Protein Tyrosine Kinase), de las cuales existen aproximadamente 500 en el genoma humano y que se pueden dividir en 2 grandes grupos:

- Receptores Cinasa de tirosina: Este tipo de receptores son receptores transmembranales que poseen una actividad tirosin cinasa en la porción intracelular. En respuesta a un ligando estos receptores son capaces de dimerizarse e inducir trans o cis- fosforilación.
- No receptores cinasas de tirosina: Estas moléculas se activan en respuesta a la unión de un ligando a su receptor, lo cual genera la activación de cinasas de tirosina asociadas.

Existen 4 miembros de la familia de cinasas de Janus. Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. Jak1 y 2 y Tyk2 se encuentran ampliamente distribuidos en distintos tipos celulares del sistema inmune, mientras que la expresión de Jak3 parece estar restringida a células de origen hematopoyético [47].

La mayor parte de las proteínas Jak se encuentran asociadas a receptores de citocinas (Fig. 7), aunque se ha comprobado que algunas de estas pueden

estar asociadas a otros receptores como son receptores de quimiocinas [Soldevila and García-Zepeda, Signal Transduction 2007].

Activación de Jaks por citocinas	
IFNs	
IFN α/β , IL-10	Jak1, Tyk2
IFN γ	Jak1, Jak2
Citocinas cuyos receptores comparten γc	
IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	Jak1, Jak3
IL-13 ^a	Jak1, Jak2, Tyk2
Citocinas cuyos receptores comparten βc	
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2
Citocinas cuyos receptores comparte gp130	
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2
IL-12	Jak2, Tyk2
Citocinas hormonales	
Growth hormone, Prolactin, EPO, TPO	Jak2

Figura 7. Señalización de citocinas a través de JAKs. Adaptado de Imada et al. Mol. Immunol. [50]

Debido a la asociación de Jak con los receptores de citocinas y la importancia de estas en la respuesta inmune, la participación de las proteínas Jak en la respuesta inmune es fundamental [50].

Algunas de las evidencias que demuestran la importancia de las Jaks en la respuesta inmune se incluyen en la siguiente tabla (Fig.8)

Función de Jaks

Gen	Fenotipo del ratón knockout	Citocinas que señalizan a través de esa proteína
<i>Jak1</i>	Viable pero presenta muerte postnatal temprana debido a defectos neurológicos; SCID	Familia de receptores que comparten γ c o gp130; IFNs
<i>Jak2</i>	Muerte del embrión debido a defectos en eritropoyesis	IL-3; familia de receptores que comparten gp130; IFN- γ ; citocinas hormonales (EPO, GH, PRL, TPO)
<i>Jak3</i>	SCID, viable y fértil	Familia de receptores que comparten γ c
<i>Tyk2</i>	Viable y fértil; susceptible a infección parasitaria; resistente a LPS	IL-12; LPS

Figura 8. Fenotipo de ratones deficientes de JAKs Adaptado. Adaptado de Imada et al. Mol. Immunol. [50]

Las proteínas Jak están conformadas por cerca de 1000 aminoácidos y pesan entre 120-140 kDA. La estructura de estas proteínas es conservada, ya que se han encontrado 7 dominios que van desde la región carboxilo hasta la región amino-terminal. La región JH1 es una región que posee una actividad de cinasa de tirosina; la región JH2 es una región adyacente a la región JH1 que posee una actividad de pseudo-cinasa. Se sabe que a pesar de que la región JH2 no posee una actividad catalítica, si posee una actividad regulatoria, ya que mutaciones en este dominio pueden incrementar la actividad de estas proteínas y en algunos casos pueden incrementar los basales de fosforilación; la región JH3-JH4 forma un dominio SH2, el cual le permite unirse a residuos de tirosina fosforilada; finalmente la región JH6-JH7 tiene un dominio FERM, el cual es de aproximadamente 300 aminoácidos y que está implicado en la interacción de las proteínas JAK a los receptores transmembranales.

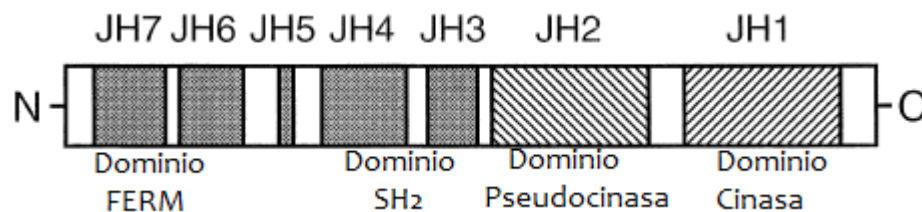


Figura 9. Dominios conservados de las proteínas JAK. Adaptado de Yamaoka et al. Genome. Biol. 2004. [47]

Después de la unión del ligando al receptor, estos se dimerizan promoviendo la fosforilación de JAKs, los cuales a su vez promueven la fosforilación del receptor y la activación de las proteínas STAT [51].

1.4.2 LAS PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATS)

Después de la activación de las proteínas JAK y la fosforilación del receptor, en la mayoría de los casos, es necesaria la participación de unas proteínas denominadas STATs [50]).

En la actualidad se han descrito 7 miembros de la familia STAT: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6. Los STATs son proteínas que comparten ciertos dominios estructurales y funcionales comunes. Entre ellos se destaca el dominio SH2, el cual es fundamental para que los STATs se puedan unir a los receptores y de esta manera, activarse. Se sabe que las variaciones de estos dominios entre los diferentes STATs pueden conferirles selectividad hacia diversos receptores. También se destaca una tirosina de los STATs, localizada aproximadamente a 700 aa de la región N-terminal, la cual es fosforilada por las proteínas JAK y permite la interacción de este residuo fosforilado con el dominio SH2 de otro STAT. De esta forma podemos observar que los STATs son proteínas que se estabilizan por medio de la dimerización.

Una vez dimerizadas estas proteínas son capaces de realizar la función de un factor de transcripción. Esta función se debe a que las proteínas STAT tienen un dominio de unión a DNA. Existen diversos sitios de unión de las proteínas STATs al DNA, la mayor parte de estos sitios se ha descrito para factores inducibles por IFNs, entre los que se encuentran los IFNs mismos y algunos otros genes que codifican para otras citocinas y proteínas. Se ha observado que las proteínas STATs presentan un dominio de oligomerización, el cual se ha demostrado que puede servir en la inducción de la transcripción de ciertos genes (STAT5 induce por medio de tetrámeros la producción de la cadena α del receptor de IL-2) [50, 52]. (Fig. 10)

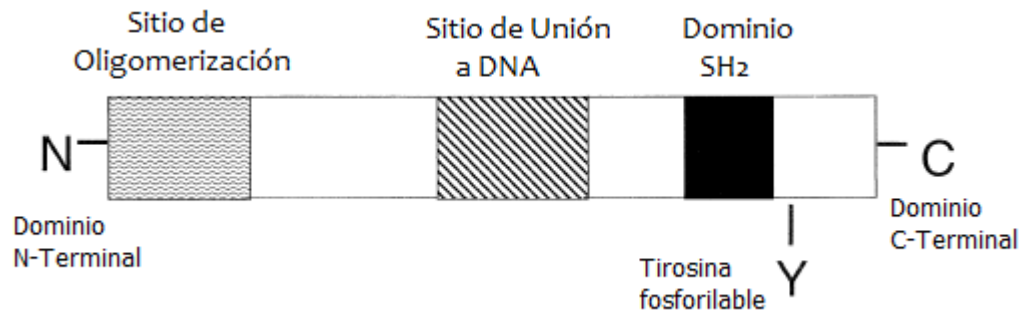


Figura 10. Estructura de las proteínas STAT. Adaptado de Imada et al. Mol. Immunol. 2000 [50]

1.4.3 VÍA JAK/STAT

Como se mencionó anteriormente la vía JAK/STAT es una vía que se encuentra asociada a receptores de citocinas, hormonas, quimiocinas y tiene como finalidad principal la activación de proteínas STAT, que funcionan como factores de transcripción, lo que permite la producción de diversas proteínas útiles de acuerdo al estímulo inicial. A pesar de que se sabe que existen distintas vías que se pueden activar a partir de JAK, existe una vía conocida como vía canónica. Esta vía inicia con la unión de un receptor a su ligando, lo que conlleva la activación de las proteínas JAK asociadas a estos por medio de fosforilación ya sea de manera autónoma o una transfosforilación (de una proteína JAK a otra). Después de la activación de las proteínas JAK, éstas fosforilan al receptor en un residuo de tirosina, lo que permite que las proteínas STAT que se encuentran en el citoplasma de la célula de manera basal, se recluten, activen y lleven a cabo sus funciones.

Como cualquier otra vía de transducción de señales, ésta requiere regulación. Para su apropiado control, existen diversos factores que regulan a las proteínas Jak, entre los que se encuentran unas proteínas denominadas proteínas supresoras de la señalización por citocinas (SOCS). Éstas, son capaces de unirse a los receptores asociados a JAKs para inhibir la activación de STAT. Además, se ha demostrado que estas proteínas son capaces de unirse a las JAKs para

marcarlas en un complejo de ubiquitinación que conlleva la degradación proteosomal [53]. Otros reguladores de esta vía son las proteínas inhibidoras de STATs activados (PIAS), las cuales son capaces de unirse a STATs impidiendo su unión a DNA. Se sabe que esta unión es dependiente de la metilación de los STATs, ya que cuando los STATs se encuentran metilados, las proteínas PIAS no pueden unirse, mientras que en ausencia de metilación estas proteínas son capaces de unirse libremente. Finalmente, el último grupo de proteínas que son capaces de regular esta vía son las fosfatasa de proteínas, entre las que se encuentran las proteínas SHP, CD45, PTP1B y TCPTP. Estas proteínas funcionan desfosforilando las proteínas JAK, regulando de esta manera la vía [51, 54, 55].

1.4.4 RELACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT CON RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

La vía JAK/STAT, como se mencionó antes, está relacionada principalmente con la señalización de receptores de citocinas. En la actualidad se sabe que esta vía puede estar involucrada en la señalización a través de GPCRs.

Existen diversas evidencias que apoyan el papel de esta vía en el caso de los receptores de quimiocinas (GPCRs) [Soldevila and García-Zepeda, Signal Transduction 2007]. Se sabe que la quimiocina MCP-1 (CCL2), es capaz de inducir fosforilación y asociación de JAK2 con CCR2 en células MAC1 y que esta activación es capaz de activar a la proteína efectora STAT3. De manera interesante, se encontró que esta asociación es independiente de la proteína Gi, ya que al tratar con PTX, la activación de JAK no se altera [56]. También existe evidencia de que, en respuesta a CCL2, el receptor CCR2 es capaz de dimerizarse favoreciendo la activación de JAK2, de manera similar a lo que sucede con los receptores de citocinas. Otro receptor en el que se ha mostrado la participación de la vía JAK/STAT, es el receptor CCR5. Este receptor, en respuesta a un estímulo CCL5 (RANTES) es capaz de activar STAT1 y STAT3. La unión de CCL3 a CCR5, es capaz de inducir la fosforilación de JAK2. De

manera interesante, se demostró que en este caso, la inhibición de JAK2 no impide la activación de $G\alpha_i$ y además, la activación de JAK2 no involucra la activación de STAT1, esto sugiere que el mismo receptor puede activar dos vías diferentes: una que depende de JAK/STATs y es independiente de $G\alpha_i$ y otra que activa a las proteínas G [57]. En el caso de la familia de quimiocinas CXC se ha demostrado que CXCR4 es capaz de inducir la fosforilación del receptor y la activación de JAK2 y JAK3 en respuesta a CXCL12 en las células MOLT4, en el caso de este receptor al tratar con PTX la activación del receptor no se ve afectada, pero los efectores “rio abajo” de JAK si se ven afectados. Esto demuestra que la activación y asociación de la proteína $G\alpha_i$ depende de la fosforilación de JAK y resulta en la activación de PLC y liberación de Ca^{2+} . [58]

En el caso de la asociación de JAK con receptores de quimiocinas en células primarias, se observó inicialmente que la utilización de un inhibidor para JAK2 y JAK3 era capaz de inhibir la activación de integrinas y adhesión dependiente de CCR7 [59]. Otra evidencia sobre la relación de JAK y quimiocinas se realizó en nuestro grupo de trabajo, el cual demostró que JAK3 se fosforila vía CCR7 cuando los linfocitos T de ratones B6 fueron estimulados con CCL19 y CCL21, mientras que los ratones inhibidos farmacológicamente para JAK3 y los ratones JAK3 KO muestran deficiencias en la migración de linfocitos T [44]. También se ha observado la fosforilación de JAK3 en respuesta a CCL25 y CXCL12 [60].

Existe evidencia directa de que las proteínas JAK, en respuesta a quimiocinas, son capaces de activar a PI3K y por ende AKT, FAK y Paxilina. En específico, se ha observado que a través de CXCR4, los progenitores hematopoyéticos son capaces de activar JAK2 y esta vía [53].

1.5 JAK3 Y SU DEFICIENCIA

JAK3 es la última proteína que fue identificada perteneciente a la familia de las tirosin cinasas JAK, el gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 19p13.1. Se sabe que JAK3 se encuentra asociada a la cadena

gamma común (γ_c) de los receptores de citocinas y que esta proteína está restringida a las células hematopoyéticas. Las citocinas que señalizan a través de esta cadena son IL-2, 4, 7, 9, 15, 21 [61].

Las Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) son un grupo de defectos en la inmunidad, heredados autosómicamente o alosoómicamente, que tienen como consecuencia un deficiente desarrollo de las células del sistema inmune y por consecuencia en su actividad. Los primeros casos de SCID se identificaron como ligados al cromosoma X (X-SCID), después de un tiempo se comprobó que la mayor parte de estos casos se deben a defectos en la señalización de γ_c (localizada en el cromosoma X). Cuando se comprobó que JAK3 se asociaba a la cadena γ_c , se sugirió que mutaciones en este gen podrían resultar en algún SCID. En la actualidad se sabe que las SCID debidas a problemas con JAK3 son aproximadamente 7-14%.

Los pacientes con SCID debida a mutaciones en JAK3 presentan un patrón celular característico (T-B+NK-). La mayor parte de estos defectos se pueden explicar considerando los problemas en la señalización via γ_c y principalmente con IL-7. Se sabe que los humanos y ratones que tienen mutaciones en el receptor de IL-7 presentan reducción en el número de linfocitos T [62]. Estos defectos se pueden corregir si se inhibe la molécula proapoptótica Bax o si se induce la expresión de la molécula antiapoptótica Bcl-2, sugiriendo que los defectos en la generación de linfocitos T en los pacientes con mutaciones en JAK3 se deben a la falta de señales mediadas por IL-7 (inducción de Bcl-2) [63]. El papel de otros receptores de citocinas también se ha relacionado con los problemas en el desarrollo de linfocitos T. Entre estos se destaca el receptor de IL-2, aunque se ha observado que ratones deficientes de IL-2 o IL-2R tienen un desarrollo de linfocitos T adecuado, el problema con estos linfocitos T es que presentan un desorden proliferativo. También se sabe que IL-2 juega un papel importante en el control de la tolerancia periférica [64]. El desarrollo de linfocitos B en pacientes con mutaciones en el receptor de IL-7 se ve afectado por la falta de señales de IL-7. La activación de linfocitos B y la deficiencia en el cambio de isotipo que pueden

presentar algunos LB se debe probablemente a deficiencias en la señalización de IL-4 e IL-21 [65].

Para entender mejor los mecanismos por los cuales la deficiencia de JAK3 genera un SCID en seres humanos, se decidió producir por medio de sustitución génica un ratón deficiente de JAK3 [66]. Estos ratones presentan problemas en el desarrollo de Linfocitos T y Linfocitos B. Se sabe que en estos ratones se presentan números similares de progenitores de médula ósea y que presentan poblaciones de células Pro-B similares a la de los ratones WT, mientras que estos ratones presentan números disminuidos de células Pre-B y células IgM+ maduras e inmaduras. En el caso de los linfocitos T se observó una marcada linfopenia en el timo, lo que tiene como consecuencia que los timos de los ratones KO tengan timos más pequeños. Las poblaciones tímicas de los ratones JAK3KO parecen no estar afectadas, aunque en algunos casos se observa un incremento en la proporción de CD4:CD8. Los bazos de estos ratones varían de tamaño y se encuentran unos cuyo tamaño se encuentra entre el 10-500% con respecto al ratón WT. En el bazo se encuentran números muy bajos de Linfocitos B IgM+, mientras que en la subpoblación de linfocitos T se encuentra un número mayor de CD4+ que de CD8+. También se ha observado que los linfocitos T de los bazos de los ratones JAK3 KO se encuentran con un fenotipo activado, es decir expresan altos niveles de CD25, CD44 y CD69, y bajos niveles de CD62L; no existe una explicación concreta del porque esta activación, pero se sugiere que durante su desarrollo los linfocitos reciben señales que inducen incrementos de estas moléculas, más debido a la falla en su transducción de señales no son capaces de regresar la expresión de estas moléculas a un "basal" [66, 67]. En estos ratones se observa que los linfocitos T son más susceptibles a apoptosis, debido a la falta de señalización vía IL-7 y la inducción de moléculas antiapoptóticas [68]. Una característica adicional de estos ratones es la ausencia de ganglios linfáticos.

Experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que la falta de ganglios linfáticos no se debe a un defecto en la generación del estroma de estos órganos (dependiente parcialmente de IL-7), sino de un defecto

intrínseco de los timocitos que les impide llegar a estos ganglios. Por medio de ensayos de transferencia de linfocitos T de ratones WT a KO, se observó que estos linfocitos WT si son capaces de repoblar los ganglios, mientras que al transferir linfocitos T de ratones KO a ratones WT se observa que estos no son capaces de llegar a los ganglios linfáticos. Interesantemente, se observó que al estimular los linfocitos T de ratones WT con CCL21 y CCL19 estos eran capaces de activar a JAK3 y de realizar quimiotaxis, mientras que al estimular los linfocitos T de ratones deficientes de JAK3 estos no eran capaces de realizar quimiotaxis. De manera similar, al inhibir JAK3 en estos linfocitos, disminuye la capacidad de estos para realizar quimiotaxis en respuesta a CCL21 y CCL19 [44].

1.6 AKT Y SU RELACIÓN CON MIGRACIÓN

AKT es una cinasa de serina y treonina que ha emergido como una proteína clave en la mayoría de las células eucariotas y la cual presenta una gran versatilidad. Existen 3 isoformas de AKT en los mamíferos: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ ; estas proteínas se encuentran codificadas por 3 distintos genes. Su estructura general consiste de: 1) Un dominio de homología a pleckstrina (PH) en la región N-terminal; 2) Un dominio con actividad cinasa en la región central; 3) El dominio regulador que posee el motivo hidrofóbico para la fosforilación y se encuentra cercano a la región C-terminal. El dominio cinasa y la región de fosforilación se encuentran altamente conservada en la familia de proteínas c-AMP, c-GMP, Proteína C [69].

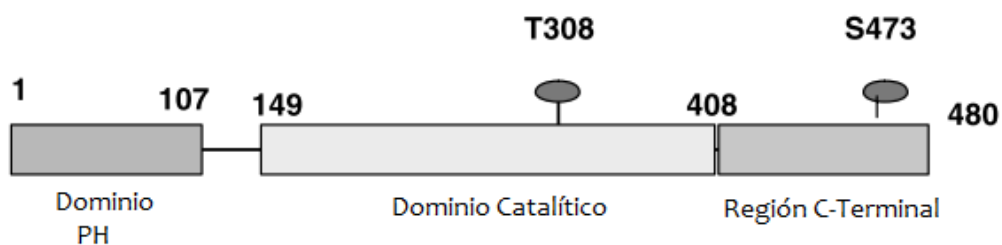


Figura 11. Estructura general de AKT. Adaptado de Kumar et al. Oncogene. 2005 [69]

AKT posee 2 residuos principales que son susceptibles de fosforilación. La activación de la proteína requiere de la fosforilación de ambos sitios. Estos sitios son una treonina en la posición 308 (T308) y una serina en la posición 473 (S473). La T308 es un sitio que se fosforila en respuesta a PI3K (cualquier isoforma). La activación de PI3K se puede dar por medio de muchos estímulos, ya sea por receptores cinasa de tirosina, o por GPCRs. Después de la activación de PI3K esta enzima fosforila al lípido de membrana PIP2 para producir PIP3. Esta fosforilación permite la translocación de la proteína AKT a la membrana y la unión de esta a PIP3 a través de su dominio PH. Una vez reclutada a membrana, esta proteína se fosforila por medio de una enzima denominada PDK1 (reclutada a membrana ya que posee un dominio PH) en el sitio treonina 308 (T308) [70]. Es también en este punto en donde la proteína AKT es fosforilada en la Serina 473 (S473). La enzima encargada de fosforilar a AKT en la S473 está formada por un complejo denominado mTorc2, cuya vía de activación es desconocida, pero se sabe que también se activa en respuesta a receptores cinasa de tirosina, como algunos receptores de factores de crecimiento (IGF-R). Es importante señalar que se ha propuesto la necesidad de un tercer sitio de fosforilación independiente de T308 y S473; este sitio es una Serina en la posición 129 y es activado por CK2. Al parecer, este sitio es requerido para poder darle una estabilidad a la proteína, ya que aún en su ausencia, la proteína AKT fosforilada en los otros sitios es activa, pero si es fosforilada su actividad parece incrementarse [71].

Después de ser activada, AKT es capaz de realizar distintas funciones. Entre estas funciones se destacan: 1) Supervivencia celular. Los mecanismos por los cuales esto se lleva a cabo son diversos. Por un lado, la capacidad de AKT de inhibir a miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, entre los que destaca a la proteína BAD. Además, Akt es capaz de fosforilar a miembros de la familia FOXO y a p53 para inhibir la transcripción de genes relacionados con apoptosis; por último, otra vía por la cual AKT regula la supervivencia celular es por medio de la familia de las proteínas GSK3; al fosforilar a los miembros de esta familia, éstos se vuelven inactivos e impiden la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2; 2) Crecimiento celular. La participación en esta vía parece deberse a

la activación del complejo mTorc1, el cual es un regulador de la traducción y de la biogénesis de ribosomas. También, AKT parece inhibir a TSC2, el cual es un regulador negativo de mTorc1; 3) Migración celular [72] (ver más adelante).

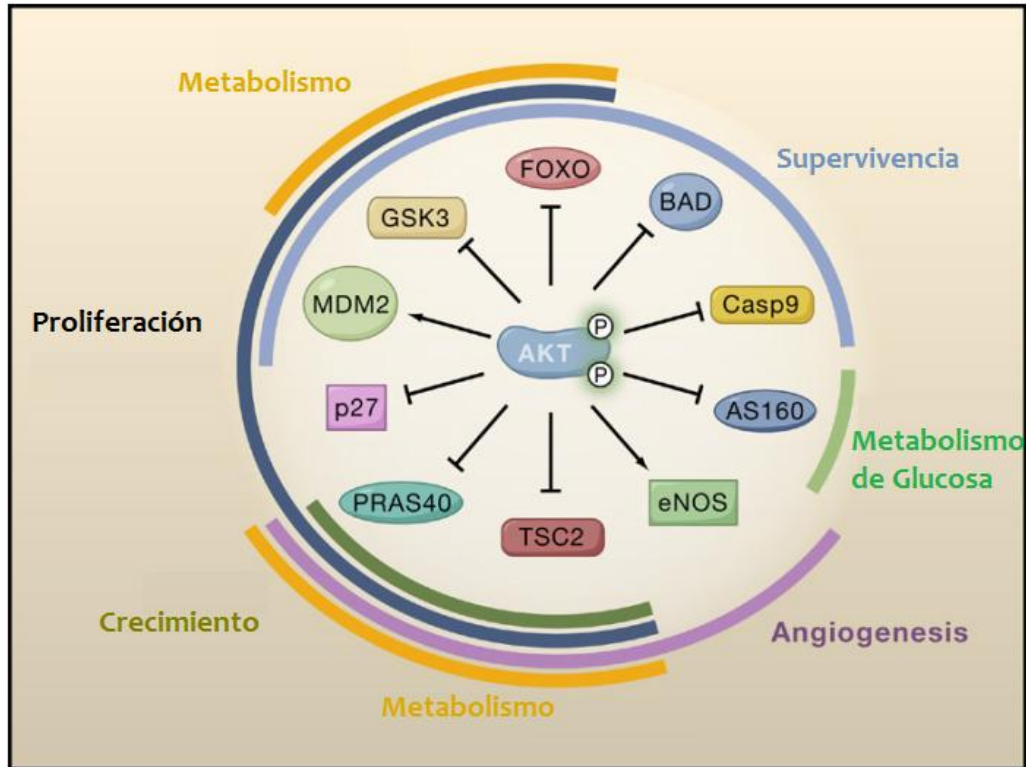


Figura 12. Actividad General de AKT. Adaptado de Manning et al. Cell. 2007 [72]

1.6.4 AKT Y MIGRACIÓN

A pesar de que AKT se ha relacionado principalmente con supervivencia y crecimiento celular, en la actualidad se sabe que también puede participar en migración. También, se sabe que la migración dependiente de AKT se relaciona de manera importante con las isoformas de esta proteína. Las dos isoformas que se relacionan con migración son AKT1 y AKT2 [73].

En general se han observado varios mecanismos por los cuales AKT parece participar en migración, ya sea como promotor o regulador negativo de ésta. Se ha observado que existe un substrato de AKT llamado Girdina, la cual

después de ser fosforilada por AKT se une a los filamentos de actina y facilita la formación de la lamelipodia [74]. Otro posible sustrato de AKT es ACAP1. Cuando ACAP1 es fosforilado por AKT, se promueve el reciclamiento de integrinas y se promueve la migración celular [75] Esto se debe a que durante la migración celular el reciclaje y transporte de integrinas del urópodo al “leading edge” es importante para la migración [73].

Como se mencionó anteriormente, las isoformas de AKT pueden ser importantes para migración. En el caso de AKT1 se postulan diversos mecanismos para promover migración, aunque la mayoría de estos se han estudiado en cáncer. AKT1 puede incrementar la actividad de la MMP2 en células epiteliales mamarias. Los mecanismos no se conocen de manera completa, pero se sabe que un mecanismo que podría incrementar la producción de MMP es la activación de NF-kB. Otro mecanismo postulado es la activación de las proteínas de la familia de las pequeñas GTP-asas, especialmente RAC, además se sabe que AKT puede fosforilar directamente a PAK [76]. Esta misma isoforma se ha descrito puede inhibir la migración celular, uno de los mecanismos descritos para esto es la degradación proteosomal de NFAT, por lo que algunos genes relacionados con migración no se transcriben, además, se ha observado que AKT puede disminuir las señales de la vía de las MAPK y que al igual que en crecimiento celular puede fosforilar e inactivar a TSC2, el cual participa en la polimerización de actina [77].

Para AKT2 se han descrito mecanismos similares y, además, se ha observado que cuando AKT es activado, ya sea por receptores de quimiocinas o factores de crecimiento, adicional a los mecanismos antes mencionados puede promover la activación de integrinas y transcripción de algunas proteínas, como son el VEGF, la cual en la célula diana activa a PI3K y subsecuentemente a AKT, promoviendo la activación de girdina y como consecuencia, migración y angiogénesis. [74]

Una de las preguntas que existen sobre AKT es si la fosforilación inicial de 1 sitio o ambos sitios tiene que ver más en su función sobre migración o sobre alguna otra función. En la actualidad no existe mucha evidencia sobre esto, mas si

existe. En un estudio realizado con linfocitos T se observó que al mutar PDK1, se activan de manera muy baja, pero estos linfocitos T aún son capaces de proliferar y no tienen afectada la apoptosis, mientras que no son capaces de migrar. Y en el caso de la activación total de PDK1, estos linfocitos son capaces de fosforilar AKT en la T308 y son capaces de migrar. Además, se muestra que AKT es requerido para regular la transcripción de genes relacionados con migración (mediante la inactivación de FOXO), entre los que se incluyen CD62L, CCR7. Con estos datos se observa que T308 parece tener un papel más importante en la actividad de AKT relacionada con migración [78].

La determinación de qué células requieren una u otra isoforma de AKT, o si ambas participan de manera redundante o contraria, no se ha dado por completo, por lo que todavía faltan profundizar acerca de AKT y su papel en migración.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la deficiencia de JAK3 genera un fenotipo SCID en los seres humanos. Junto con la deficiencia en γc , la deficiencia de JAK3 abarca casi el 75% de los casos de SCID en el mundo. Además, los ratones JAK3 KO, presentan deficiencias en el desarrollo y la función de los linfocitos T y B.

Se han descrito diversas causas que pueden explicar en parte los mecanismos por los cuales estos ratones presentan este fenotipo, aunque todavía faltan muchas más por conocer.

Sabiendo que AKT es una molécula que se ha relacionado de manera importante con migración, que la vía PI3K-AKT se ha relacionado de manera dependiente de JAK en receptores de quimiocinas y que una de las posibles causas por la cual el fenotipo SCID se presenta es la incapacidad migratoria de los linfocitos T mediada por CCR7 en respuesta a CCL19 y CCL21, consideramos importante ahondar en el estudio de los mecanismos moleculares que puedan afectar migración en estos linfocitos T deficientes de JAK3 por medio del estudio de la vía PI3K-AKT.

3. HIPÓTESIS

La vía PI3K-AKT activa migración en respuesta a JAKs en algunos receptores de quimiocinas; por lo tanto, la ausencia de JAK3 afectará la fosforilación de AKT en los linfocitos T de ratón, en respuesta a la quimiocina CCL21.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estudiar la participación de AKT en la señalización de CCR7 dependiente de JAK3 en los linfocitos T de ratón.

Objetivos Particulares:

- Determinar la cinética de fosforilación de AKT en respuesta a CCL21 en linfocitos T de ratones WT.
- Determinar la cinética de fosforilación de AKT en respuesta a CCL21 por subpoblaciones CD4 y CD8 en ratones WT.
- Determinar la fosforilación de AKT en respuesta a CCL21 en linfocitos T de JAK3 KO.
- Determinar la fosforilación de AKT en respuesta a CCL21 por subpoblaciones CD4 y CD8 en ratones JAK3 KO.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

Reactivos

Todos los reactivos y soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo I. Reactivos y soluciones.

Animales

Los ratones Jak3 ^{-/-} (B6.129S4-*Jak3*^{tm1Ljb} antes llamados C57BL/6-JAK3^{tm1Ljb}), referidos como Jak3 ^{-/-} fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA). Esta cepa se mantiene a cargo del laboratorio, por lo cual es necesario realizar el tipaje de las cruzas para asegurar su mantenimiento.

Se utilizaron linfocitos T vírgenes (naive) extraídos de bazo y ganglio de ratones Jak 3^{-/-} de 4 a 8 semanas de edad y como controles se utilizaron ratones C57BL/6 (Cepa Silvestre), referidos como Jak3 WT o Jak3 +. Estos linfocitos se seleccionaron por medio de los marcadores CD4, CD8 y CD25 en su superficie.

En todos los procedimientos realizados y que involucraron la participación de animales de experimentación se siguió la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los experimentos realizados incluyen datos obtenidos de grupos de al menos 5 ratones.

Todos los animales utilizados, se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con acceso a agua y alimento *ad libitum* hasta el día de la realización del experimento.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Tipaje de Ratones

Para asegurar que los ratones utilizados sean Jak3 ^{-/-} se debe realizar un tipaje por medio de PCR.

Después de realizar el destete de los ratones, (3-4 semana de nacimiento) estos se deben marcar en la oreja y se debe realizar un corte mínimo de la cola.

La fracción de cola cortada se debe resuspender en 500 μ L NaOH 50mM e incubar a una temperatura de 90-100 °C durante un periodo de tiempo de 45-90 min (dependiendo del tamaño); después de este tiempo, la suspensión obtenida debe incubarse durante 10 min a 4 °C. Al termino de los 10 min se necesita adicionar 50 μ L de Tris 1.0 M pH 8.0 a cada cola y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min. Finalizado el periodo de centrifugación se debe separar el sobrenadante (fase acuosa) y proceder a la extracción de DNA por medio de un fraccionamiento con fenol:cloroformo.

El sobrenadante obtenido después de la digestión de la cola con NaOH (~500 μ L) se debe mezclar con 500 μ L de fenol:cloroformo 1:1; después de realizar la mezcla, esta se centrifuga durante 10 min a 13000 rpm. Al finalizar el periodo de centrifugación se obtiene una fase acuosa (~450 μ L) y se necesita realizar una nueva extracción con la mezcla fenol:cloroformo. Terminada esta extracción se debe obtener una nueva fase acuosa (~400 μ L) y se debe mezclar con 500 μ L de cloroformo; después de realizar la mezcla, esta se debe centrifugar a 13000 rpm por 10 min. La fase acuosa se debe separar para realizar la PCR con ella.

Para realizar la PCR se preparan 2 mezclas de reacción distintas y se utilizan 2 protocolos de amplificación, de acuerdo al gen amplificado.

Al terminar la PCR se toman 10 μ L de la muestra y se mezclan con 10 μ L de buffer de carga, los cuales se cargan en un gel de Agarosa al 1%-Bromuro de Etidio diluida en TAE 1x, y se corrern por ~30 min a 100V.

Finalmente las fotografías de los geles se deben tomar en un transiluminador de luz UV. En el caso de esta tesis se utilizó el software Labworks. (UVP, Upland, CA, USA).

5.2.2 Obtención de Células.

Se deben extraer quirúrgicamente los ganglios inguinales, mesentéricos, axilares, cervicales y el bazo de los ratones Jak 3 + de 4 a 8 semanas y el bazo de los ratones Jak3 -/- de 4 a 8 semanas. El tejido se necesita disgregar mecánicamente utilizando dos membranas de nylon de 50 μ m, las cuales deben sumergirse en PBS 1x.

Las células obtenidas de ganglio, después de disgregarse, se deben lavar 2 veces en PBS 1x centrifugando a 2000 rpm por 5 min a 4° C. El botón celular se debe resuspender en RPMI, sin complementar con SFB, para realizar los ensayos de fosforilación.

Las células obtenidas de bazo, después de disgregarse, se deben centrifugar a 2000 rpm por 5 min a 4°C y se requiere descartar el sobrenadante. El botón obtenido se necesita resuspender en 1 mL de solución de Lisis ACT y se debe dejar por 5 min a T.A, finalizado este tiempo se agregan 4 mL de PBS 1x y se centrifugan a 2000 rpm por 5 min. Las células se lavan 1 vez más con 4 mL de PBS 1x. Finalizados los lavados, el botón debe resuspenderse en 1 mL de RPMI adicionado con 10% de SFB, para realizar el “panning”.

5.2.3 “Panning”/Selección de Linfocitos T

Antes de iniciar el panning de las células, las placas de cultivo utilizadas se deben sensibilizar con el anticuerpo B220 por un lapso de 60 min a 37°C. Después de este periodo, se debe recuperar el anticuerpo y se necesita colocar en otras placas. Las células de bazo, resuspendidas en RPMI 10% SFB, se colocan en las placas sensibilizadas; estas placas se incuban a 37 °C por 60 min de manera simultánea a las placas en las cuales se colocó el anticuerpo B220. Transcurridos los 60 min de incubación se retira el anticuerpo de las nuevas placas y se colocan

las células previamente incubadas con el anticuerpo y se incuban 60 min a 37 °C. Mientras tanto el anticuerpo B220 se guarda para su reutilización.

Al terminar la incubación de las células, éstas se recuperaron y centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. El pellet obtenido se resuspendió en RPMI 0% para realizar los ensayos de fosforilación.

5.2.4 Ensayos de fosforilación.

Cinética de la fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT en respuesta a CCL21

Después de obtener las células de ganglios de los ratones WT, se toman 2-3 millones de células y se colocaron en distintos tubos Eppendorf de la siguiente forma.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	13	14
Nombre	S/T	CD4 FITC	CD4 PE	CD8 CY	CD4 APC	TP	CP S/E	CP 15''	CP 30''	CP 45''	CP 1'	CP 3'	CP 5'	CP CD28	CP Perv.

Tabla1. Distribución en tubos de las células. Cinética de fosforilación de AKT.

Las células de los tubos 2,3,4,5 deben teñirse, durante 20 min a 4°C y en oscuridad, con los respectivos anticuerpos de superficie mencionados en la tabla 1. Mientras que del tubo 6 al tubo 14 deben teñirse con una combinación de anticuerpos anti-CD4PE, anti-CD8 Cy, antiCD3/CD25-FITC.

Transcurridos los 20 min de tinción todos los tubos se centrifugan a 2000 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante. Después se deben lavar una vez con 100 µL de RPMI sin SFB y se procede a estimularlos con 100 µL del compuesto en RPMI 0% durante 37°C, o en el caso de los tubos sin estímulo se mantienen en hielo y se les agrega RPMI sin SFB al termino del último tubo con estímulo. El protocolo de estimulación es el siguiente:

Tubo	Estímulo	Tiempo de Estimulación
1	Sin Estímulo	
2	Sin Estímulo	
3	Sin Estímulo	
4	Sin Estímulo	
5	Sin Estímulo	
6	Sin Estímulo	
7	Sin Estímulo	
8	CCL21 (100 ng/mL)	15 Segundos
9	CCL21 (100 ng/mL)	30 Segundos
10	CCL21 (100 ng/mL)	45 Segundos
11	CCL21 (100 ng/mL)	60 Segundos
12	CCL21 (100 ng/mL)	180 Segundos
13	CCL21 (100 ng/mL)	300 Segundos
14	CD3+CD28+Streptavidina (10 µg/mL+ 10 µg/mL + 40 µg/mL)	180 Segundos
15	Pervanadato (100 µM)	180 Segundos

Tabla 2. Protocolo de Estimulación para la Cinética de Fosforilación de AKT.

Al término del tiempo de estímulo de todos los tubos se agregan 300 μ L de Lyse/Fix Buffer 1X y se dejan 10 min a 37°C en oscuridad. Al concluir estos 10 min, el volumen total de los tubos eppendorf (400 μ L) debe transferirse a tubos falcon de 5 mL y centrifugarse a 1200 rpm por 5 min a 4°C. Los tubos se lavan una vez con 1 mL de Buffer de FACS.

Concluido el lavado, el botón celular de todos los tubos se resuspende en 100 μ L de Perm Buffer y los tubos se incuban durante 20 min a 4°C. Cuando finalice el tiempo de incubación, se debe agregar 1 mL de Buffer de FACS a todos los tubos y centrifugarlos a 1200 rpm durante 5 min a 4°C; se descarta el sobrenadante de todos los tubos y se lavan 1 vez más con 1 mL de Buffer de FACS.

Los botones celulares de todos los tubos, obtenidos en el punto anterior se resuspenden en 30 μ L de una dilución 1:200 de Fc Block en Buffer de FACS y se incuban a 4°C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se añade 1 mL de Buffer de FACS a todos los tubos y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min; se debe descartar el sobrenadante. El botón se resuspende en la cantidad residual de sobrenadante; se deben añadir 3 μ L de anticuerpo anti-Phospho AKT a los tubos 7 al 14 y todos los tubos se deben incubar a 4°C durante 30 min.

Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo se añade 1 mL de Buffer de FACS a todos los tubos y se centrifugan a 1200 rpm por 5 min. Se descarta el sobrenadante de todos los tubos y el botón celular se resuspende en 350 μ L de Paraformaldehído 0.5%.

Finalmente, después de fijar con paraformaldehído, todas las muestras se adquieren en un citómetro. En el caso de esta tesis se utilizó el citómetro FACSCalibur (BD Bioscences, San Jose, CA, EUA) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

La citometría de flujo es una técnica que permite distinguir a las células por su tamaño, granularidad y en el caso de que exista algún fluorocromo en su

superficie o en su interior, también es capaz de discriminar en base a estos parámetros. Esta técnica nos permite distinguir fácilmente a las poblaciones de ganglio en eritrocitos, linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Además, como se menciono anteriormente nos permiten distinguir a las poblaciones marcadas en su superficie.

Comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21

El protocolo utilizado para comparar la fosforilación de AKT en los linfocitos T de ratones WT vs KO fue el mismo que se utilizo en la cinética, con la excepción de que los tubos utilizados y el protocolo de estimulación usados fueron los siguientes:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	13
Nombre	S/T	CD4 FITC	CD4 PE	CD8 CY	CD4 APC	TP	CP S/E WT	CP 30" WT	CP CD28 WT	CP Perv WT	CP S/E KO	CP 30" KO	CP CD28 KO	CP Perv KO

Tabla 3. Distribución en tubos de las células. Comparativa de fosforilación de AKT.

Tubo	Estímulo	Tiempo de Estimulación
1	Sin Estímulo	
2	Sin Estímulo	
3	Sin Estímulo	
4	Sin Estímulo	
5	Sin Estímulo	
6	Sin Estímulo	
7	Sin Estímulo	
8	CCL21 (100 ng/mL)	30 Segundos
9	CD3+CD28+Streptavidina (10 µg/mL+ 10 µg/mL + 40 µg/mL)	180 Segundos
10	Pervanadato (100 µM)	180 Segundos
11	Sin Estímulo	
12	CCL21 (100 ng/mL)	30 Segundos
13	CD3+CD28+Streptavidina (10 µg/mL+ 10 µg/mL + 40 µg/mL)	180 Segundos
14	Pervanadato (100 µM)	180 Segundos

Tabla 4. Protocolo de Estimulación para la comparativa de fosforilación de AKT WT vs KO

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos experimentales fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación de los grupos se realizó a través de una prueba t de student no pareada. Los valores de $p \leq 0.05$ implicaron un rechazo de la hipótesis nula (H_0) y por tanto, indican que existe una diferencia significativa entre los grupos con al menos 95% de confianza.

6 RESULTADOS

6.1 Tipaje de ratones.

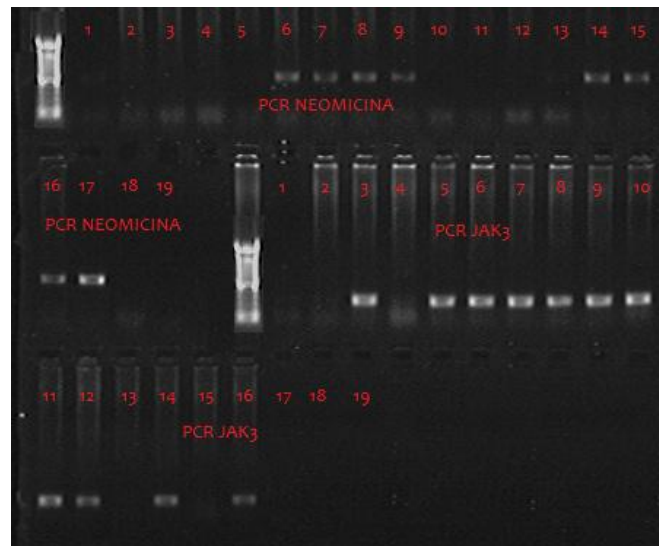


Figura 13. Imagen de un Gel de Acrimalida-Bromuro de Etidio de la PCR de JAK3 y Neomicina

En la figura 13 se muestra un gel de Acrilamida-Bromuro de Etidio en el cual se presenta la PCR realizada para amplificar el inserto de NEO y un fragmento del gen JAK3 de los ratones utilizado para los experimentos. Los ratones que presentan una banda después de realizar la PCR de Neomicina (~400 pb) y no presenta ninguna banda después de realizar la PCR de JAK3 (~390 pb) son ratones KO (ejemplo: carril 15), es decir, ambos alelos del gen JAK3 se encuentran sustituidos por un fragmento del gen que confiere resistencia a Neomicina. Los ratones que presentan una banda después de la PCR de Neomicina y también presentan una banda después de realizar la PCR de JAK3 son ratones Heterocigotos para el gen JAK3, es decir, solo poseen un alelo del gen JAK3 y poseen un alelo del gen que confiere resistencia a Neomicina. Finalmente los ratones que no presentan una banda después de realizar la PCR de Neomicina y presentan una banda después de realizar la PCR de JAK3 son ratones WT, es decir poseen ambos alelos del gen JAK3. Como controles se utilizo un vector que contiene el fragmento correspondiente al gen de resistencia a neomicina y solo se amplifica en la PCR de Neomicina (carril 17)

6.2 CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT EN RESPUESTA A CCL21

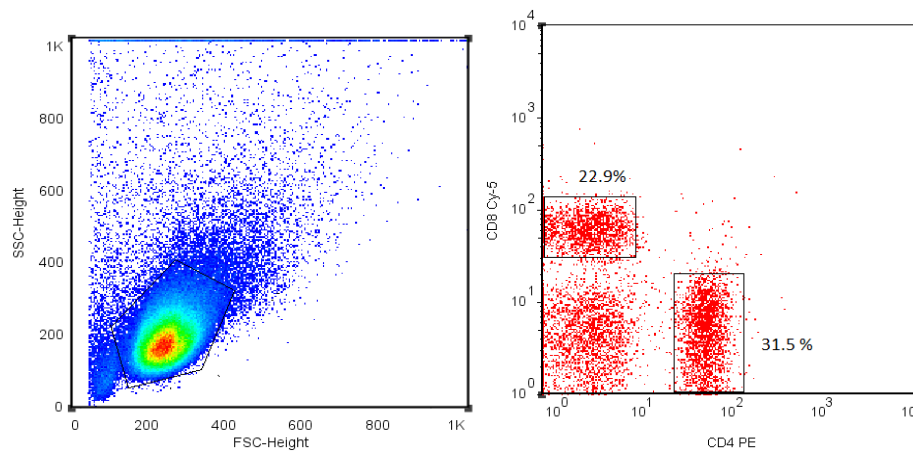


Figura 14. Selección de las poblaciones en ganglios de ratones WT. (n=5)

En la figura 14 se observa la representación gráfica de puntos (dotblot) donde se representan los parámetros de Granularidad (SSC-Height) versus Tamaño (FSC-Height) que se obtuvieron por citometría de flujo y se indica la región que contiene la población de linfocitos vivos, y que fue seleccionada para el análisis de la cinética de fosforilación. A partir de la región elegida de la gráfica FSC/SSC se analizó la expresión de CD4 y CD8 en superficie, y se calculó el porcentaje de las subpoblaciones CD4+ (31.5%) y CD8+ (22.9%).

Se analizó la fosforilación de la treonina 308 de Akt, en condiciones basales y en respuesta a estímulos de activación. Como controles de estimulación y para estandarizar la tinción intracelular de T308, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, para simular la activación a través del TCR y de la costimulación, así como pervanadato (inhibidor de fosfatasas) como respuesta máxima. En la figura 15 se muestran los histogramas correspondientes a los controles de estímulo utilizado en la curva para ambas subpoblaciones CD4 y CD8 mostradas en la figura 14. a) Estímulos con CD3 + CD28; b) Estímulos con pervanadato. También se muestran las gráficas del incremento relativo para cada población CD4 y CD8.

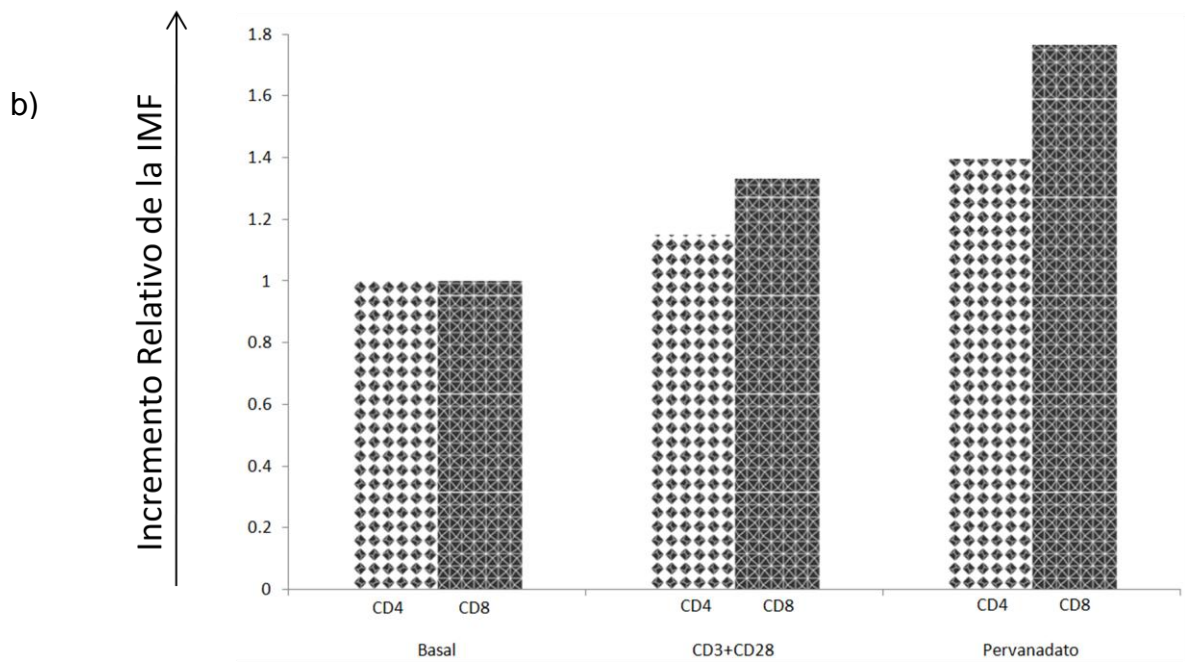
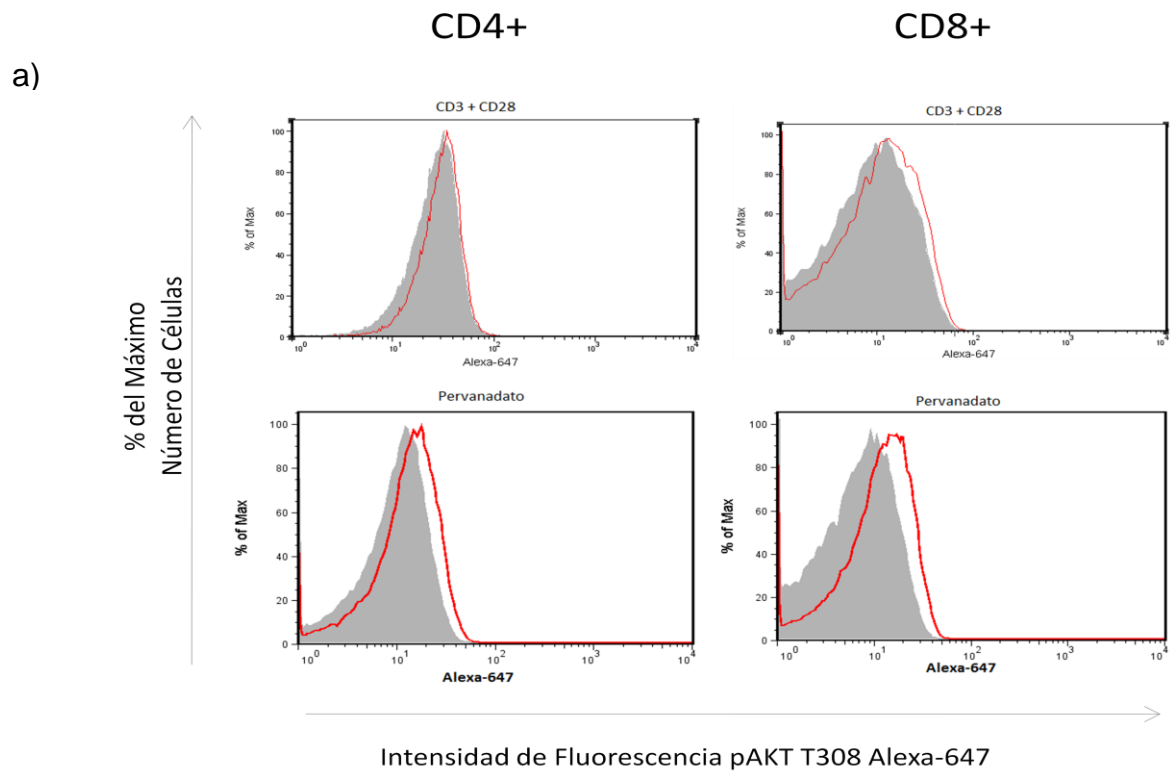


Figura 15. Controles de estimulación de la cinética de fosforilación de AKT en ganglios de ratones WT.

A continuación para analizar la fosforilación de Akt en respuesta a quimiocina, los linfocitos fueron estimulados a distintos tiempos (0 segundos- 5 minutos) con la quimiocina CCL21 (100ng/ml). La figura 16 muestra los histogramas que representan a la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las subpoblaciones CD8+ y CD4+ (seleccionadas en base a la figura 13). En gris se observan los histogramas correspondientes al basal, mientras que en rojo se observan los histogramas correspondientes a los estímulos con la quimiocina CCL21. a) 15 segundos de estímulo; b) 30 segundos de estímulo; c) 1 minuto de estímulo; d) 3 minutos de estímulo; e) 5 minutos de estímulo.

Como se observa en esta figura, la fosforilación de Akt muestra aparentemente dos pico de fosforilación: uno temprano, a los 30 segundos y uno más tardío, a los 3 minutos.

En la Figura 17 se observa la representación gráfica y el análisis estadístico correspondiente a los histogramas mostrados en la Figura 16. Esta gráfica muestra el incremento relativo de la Intensidad Media de la Fluorescencia en función del tiempo. Para la población CD4 existe diferencia significativa entre 30 segundos y el basal ($p \leq 0.05$), para la población CD8 existe una diferencia significativa entre 30 segundos y el basal y entre 3 minutos y el basal ($p \leq 0.05$).

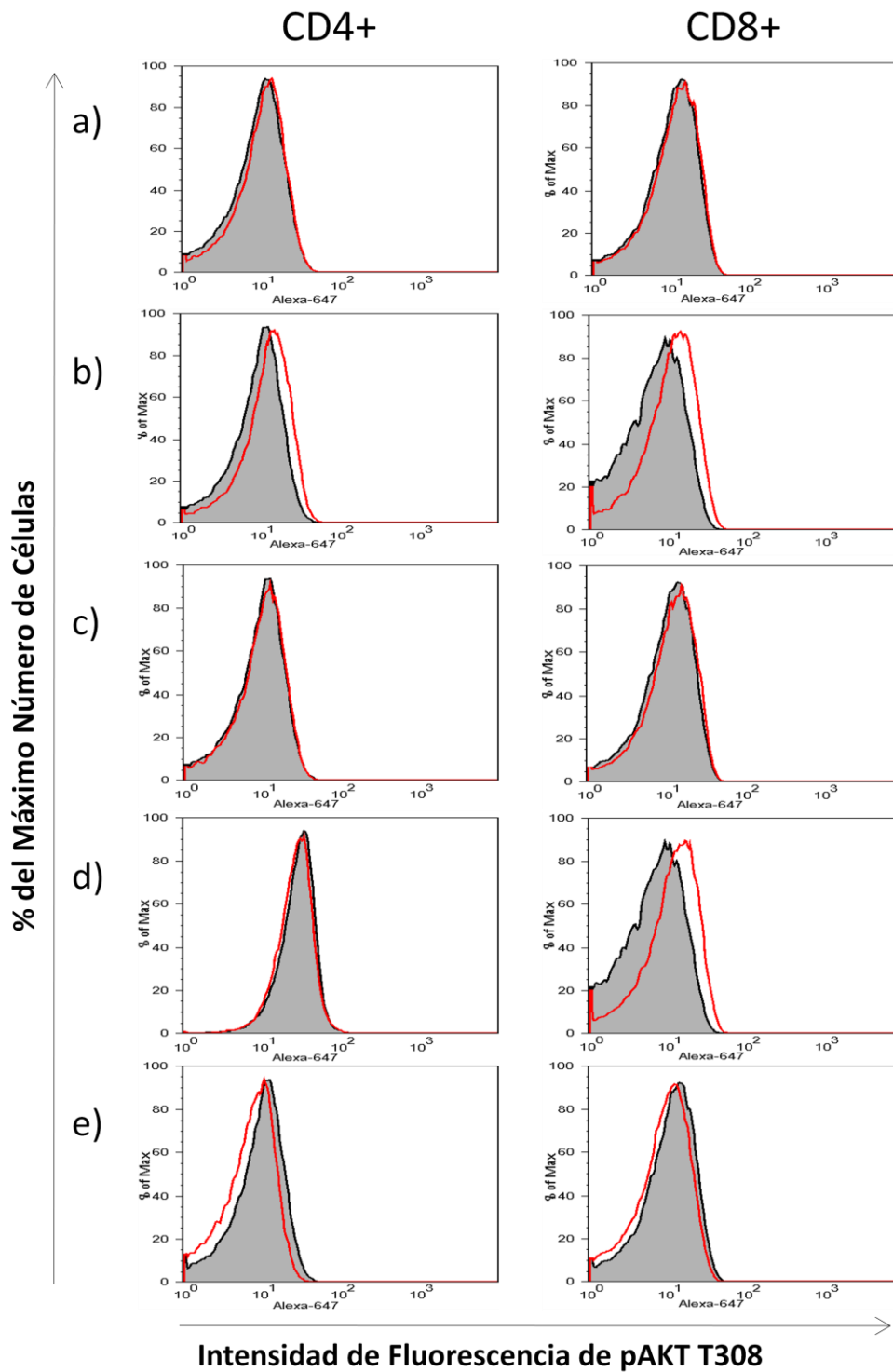


Figura 16. Histogramas que corresponden a la cinética de fosforilación de AKT en linfocitos T de ganglios en ratones WT. Representativo de n=5

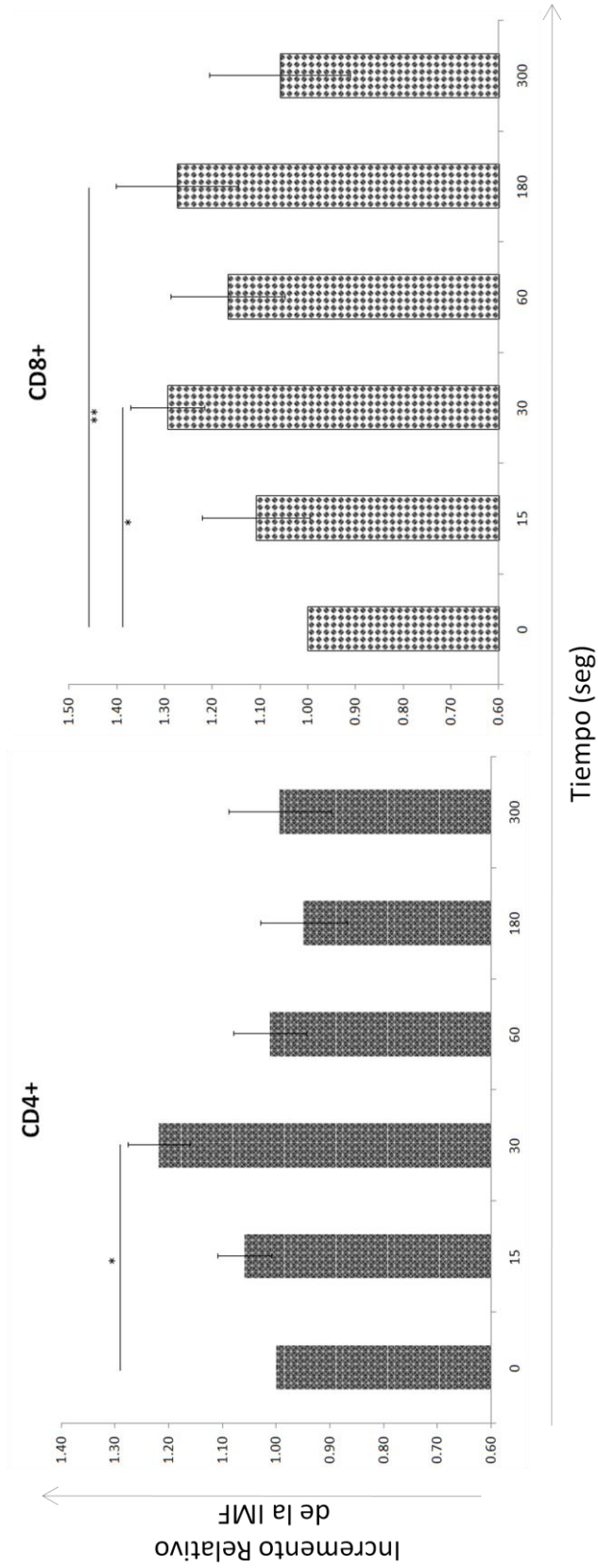


Figura 17. Análisis Estadístico y representación gráfica de la cinética de fosforilación de AKT en ganglios de ratones WT.

6.3 COMPARATIVA DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT VS KO EN RESPUESTA A CCL21

Una vez puesta a punto la cinética de fosforilación en respuesta a CCL21, investigamos las diferencias de esta respuesta entre linfocitos T de ratones silvestres (WT) y ratones deficientes para JAK3 (Jak 3^{-/-}).

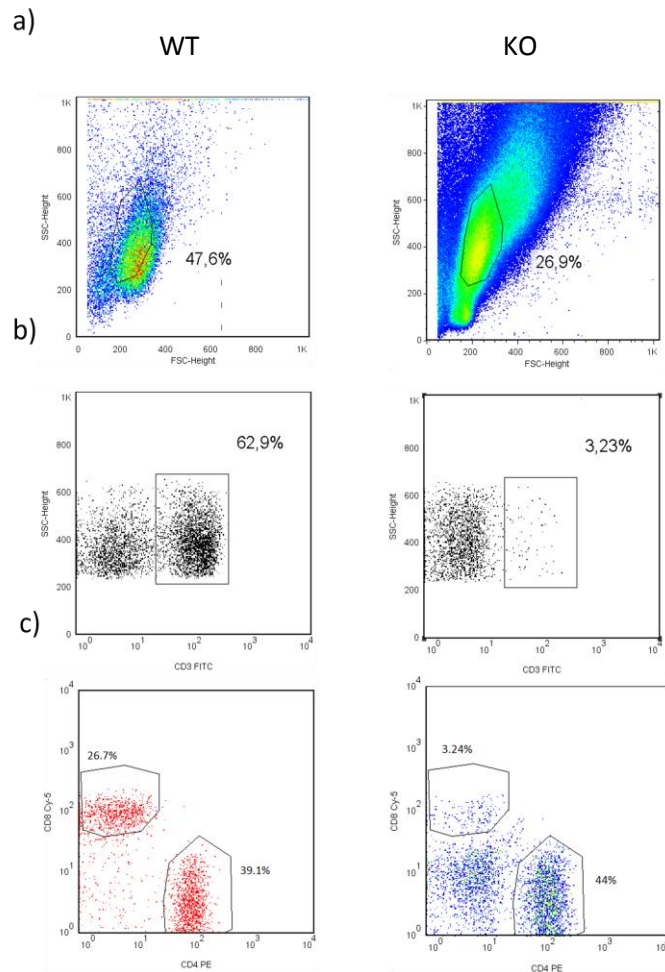


Figura 18. Selección de Poblaciones para la comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21.

Como se observa en las figuras 18 y 19, el diagrama de puntos FSC/SSC muestra una diferencia considerable en el patrón de distribución celular, con un mayor porcentaje de células más grandes y granulares en el ratón JAK3 KO, lo cual coincide con reportes previos [66]. Como se indica en los materiales y métodos, para enriquecer la población de linfocitos T del bazo, se realizó un “panning” con anticuerpos anti B220 para eliminar los linfocitos B. A pesar de ello, el porcentaje de células T del ratón JAK3 KO está muy reducido comparado con el ratón silvestre (figuras 18b y 19b). Además, cuando se realiza la caracterización de linfocitos T CD4 y CD8, el porcentaje de linfocitos CD8+ se ve selectivamente reducido (figuras 18c y 19c), en comparación con la subpoblación CD4+, coincidiendo con la reportada apoptosis incrementada de los CD8+ del ratón JAK3 KO [68].

Debido a que los linfocitos periféricos del ratón JAK3 KO muestran un fenotipo activado, y puesto que las células activadas pueden presentar niveles disminuidos de receptor CCR7 en superficie, decidimos utilizar el marcador CD25 para identificar aquellos linfocitos activados y excluirlos de nuestro análisis de fosforilación. Como se muestra en la figura 19, la mayoría de linfocitos T corresponden a células no activadas (puesto que se seleccionó una región muy restringida a células pequeñas y poco granulosas en base a el patrón de FSC versus SSC).

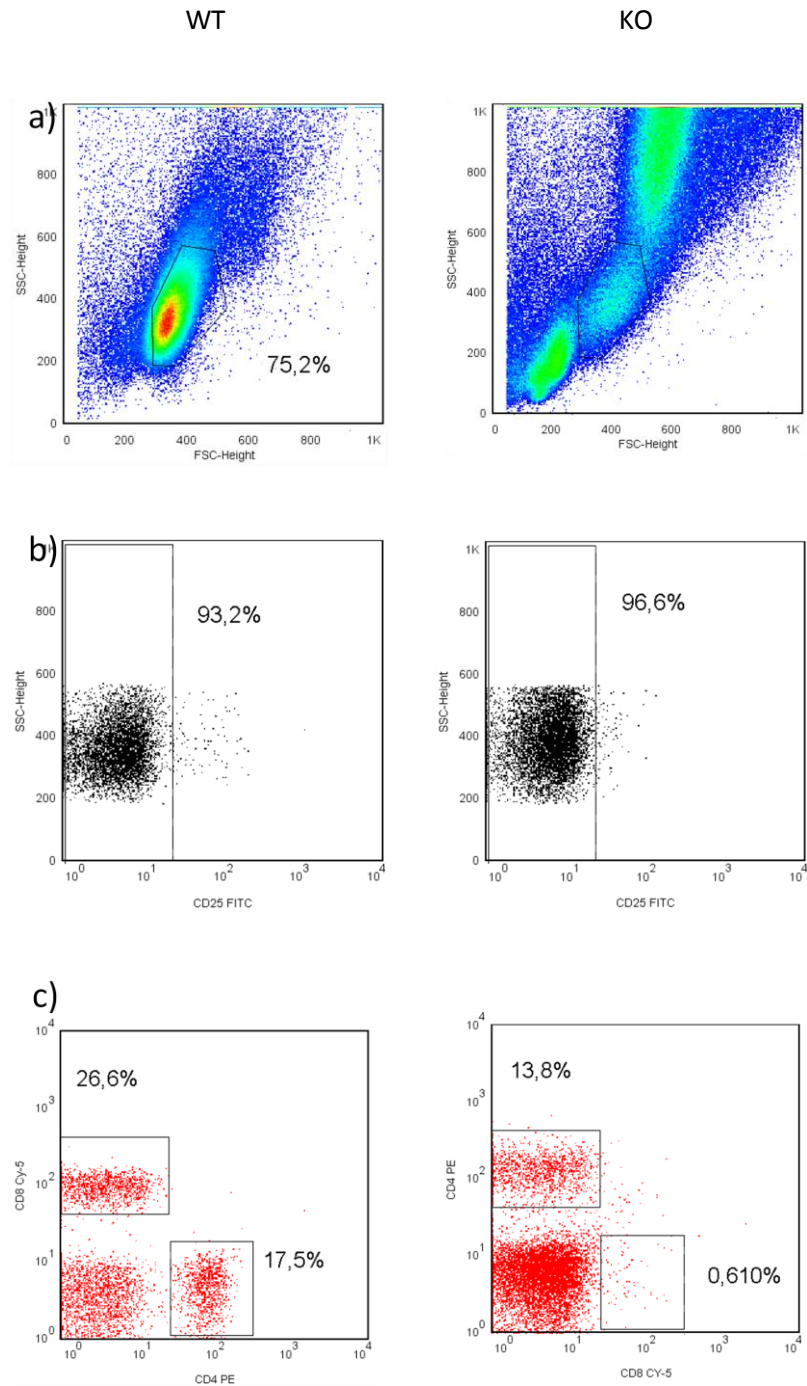


Figura 19. Selección de Poblaciones para la Comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21. Tinción con CD25.

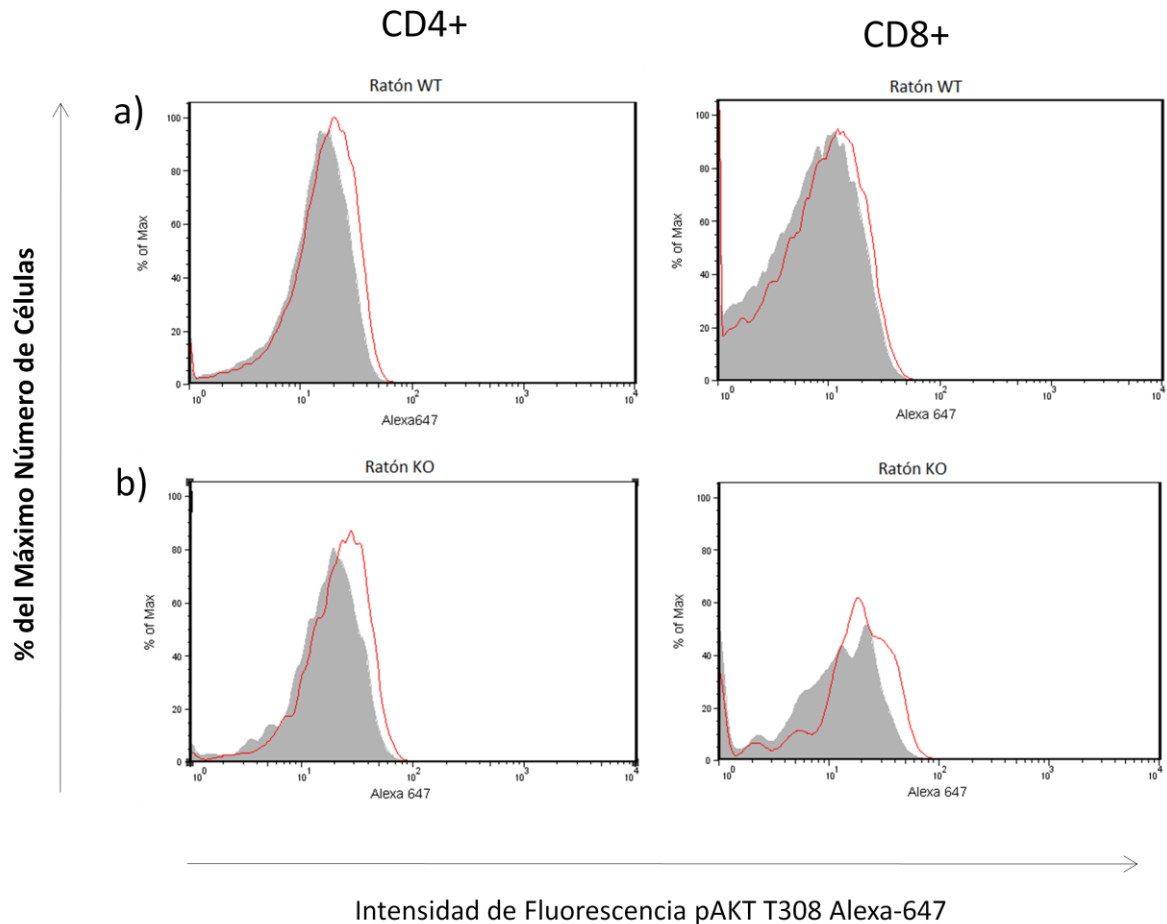


Figura 20. Histogramas que corresponden a la comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21. En gris se presentan los basales (tiempo 0) y en rojo se presentan los estímulos con CCL21 (100 ng/ml) durante 30 segundos. a. Muestra los estímulos en CD4 y CD8 en ratones WT. b. Muestra los estímulos en CD4 y CD8 de los ratones KO. (Representativo de n=5)

La figura 20 muestra los histogramas correspondientes a los estímulos con CCL21 (100ng/ml) de un experimento representativo (n=5). durante 30 segundos de los linfocitos T de bazo de ratones WT y KO. Como se observa, los linfocitos CD4 y CD8 de ratones WT y JAK3 KO, son capaces de inducir un incremento en la fosforilación similar de Akt en la T308 en respuesta a CCL21.

La figura 21 muestra el análisis estadístico y representación gráfica del resumen de experimentos realizados como se describe en la figura 20. Los datos se graficaron por subpoblaciones CD4 y CD8. Se observa diferencia significativa

en los incrementos relativos de la población CD4, entre el estímulo CCL21 y el basal tanto para los linfocitos T de ratones WT como de los linfocitos T de ratones KO ($p \leq 0.05$). Sin embargo no se observaron diferencias estadísticas entre los incrementos relativos de los linfocitos T de ratones WT vs KO. También, se observaron diferencias significativas en los incrementos relativos de la población CD8, entre el estímulo CCL21 y el basal para los linfocitos T de ratones WT ($p \leq 0.05$) pero no se observaron diferencias estadísticas entre el estímulo y el basal de los linfocitos T de ratones KO y tampoco entre los incrementos relativos de los linfocitos T de ratones WT vs KO.

La figura 22 muestra los controles de estímulo para las poblaciones CD4 y CD8 de linfocitos T de ratones WT y KO. De manera similar a los experimentos previamente descritos (figura 15) los estímulos utilizados fueron anti-CD3 + CD28 y Pervanadato. Como se observa en esta figura, los linfocitos T CD4 y CD8 del ratón JAK3 KO y del ratón WT parecen responder de manera similar a los estímulos de entrecruzamiento del TCR y al inhibidor de fosfatasa (pervanadato). Esto concuerda con algunos reportes en los cuales se observa que los linfocitos T de ratones deficientes de JAK3 tienen una señalización vía TCR similar a la de los ratones WT [79].

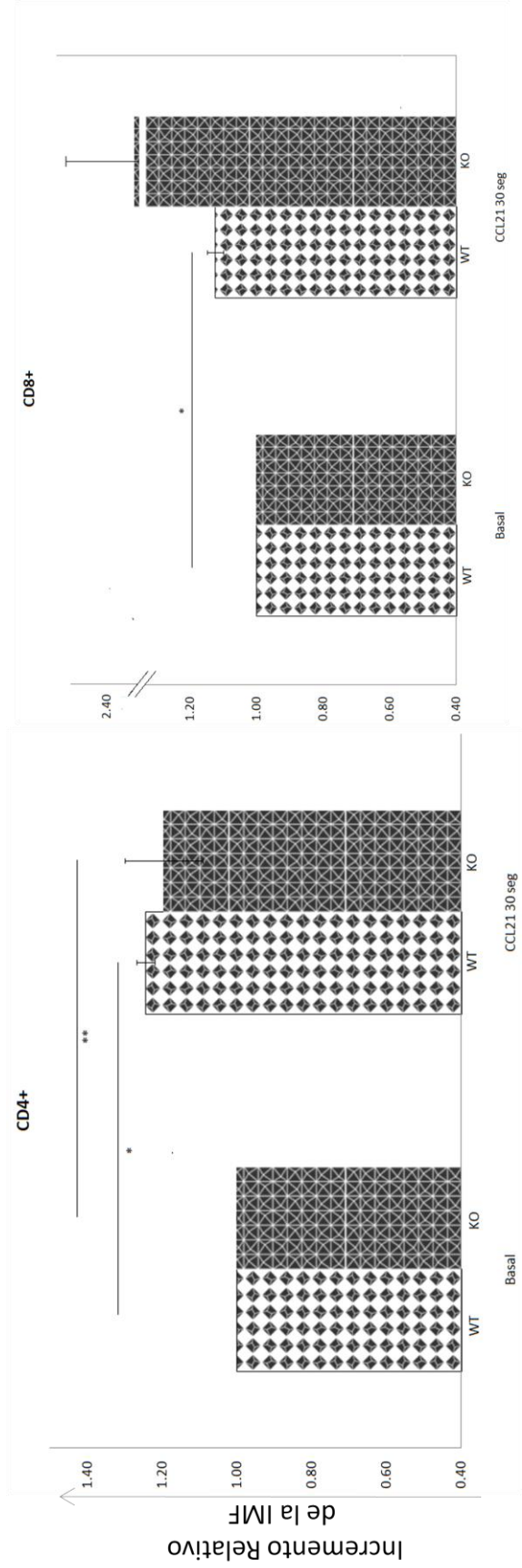


Figura 21. Análisis estadístico y representación gráfica de la comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21

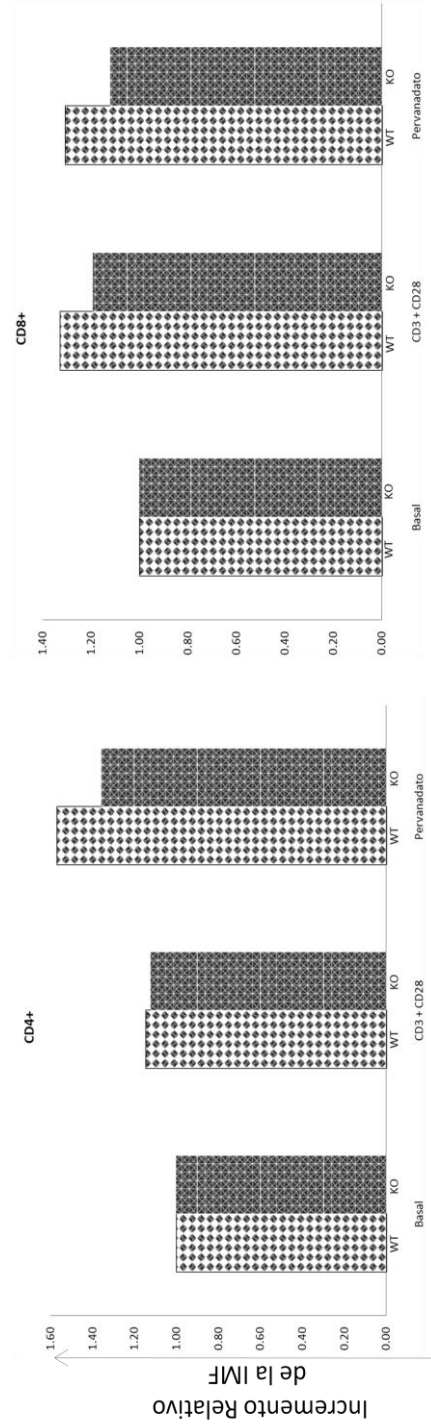


Figura 22. Controles de estimulación de la comparativa del patrón de fosforilación de AKT en linfocitos T de ratones WT vs KO en respuesta a CCL21

7 DISCUSIÓN

7.1 CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT EN RESPUESTA A CCL21

En la figura 14 se observa la selección de las poblaciones realizada para realizar el ensayo de fosforilación. La selección se dio en base al tamaño y granularidad característicos de los linfocitos T de ganglio (tamaño y granularidad media).

Para poder distinguir a los linfocitos T de los linfocitos B se utilizaron los marcadores CD4 y CD8, que definen las dos poblaciones mayoritarias de linfocitos T. Así, en ganglios linfáticos, podemos identificar a los linfocitos CD8+ y a los CD4+, mientras que las poblaciones negativas para CD4 y CD8, son mayoritariamente linfocitos B. A diferencia de lo que se observa en poblaciones tímicas, en órganos linfoides secundarios no se presenta una población DP significativa. Esto se debe a que un requisito para que los linfocitos T lleguen a los ganglios linfáticos es tener un adecuado desarrollo y este incluye la transición de las células DP a las células SP. Estos linfocitos son vírgenes (naive) ya que no han encontrado el antígeno que es capaz de activarlo pues los ratones utilizados se encuentran en condiciones asépticas en el bioterio.

La figura 16 presenta los histogramas que representan la intensidad de fluorescencia de la señal emitida por AKT acoplado a un fluorocromo. Akt se fosforila en dos residuos: Ser473 y Thr308. La razón por la cual se decidió utilizar un anticuerpo dirigido en contra del residuo T308 se basa en el antecedente en el cual se observa que la fosforilación de este residuo se encuentra más relacionado con migración, que con otras vías que conducen a otras respuestas tales como la sobrevivencia [72, 78]. Sin embargo, se ha demostrado, que ambos residuos tienen que ser fosforilados (no se sabe si al mismo tiempo) para obtener la forma activa de AKT [70].

Nuestros datos permiten observar que existe variación en la cantidad de AKT fosforilada por célula (amplitud del histograma), pero que la mayor parte de las células tienen una cantidad similar de pAKT. Al comparar los histogramas gris y rojo para cada estímulo y en cada subpoblación, podemos observar un claro incremento a los 30 segundos de estímulo tanto para CD4+ como para CD8+, mientras que se puede observar un claro incremento en la cantidad de pAKT a los 3 minutos en la población CD8+ pero no en la población CD4+. Al realizar el análisis estadístico (fig 17) se observa que solo estos 3 tiempos presentan un diferencia significativa con una $p \leq 0.05$

La fosforilación de AKT a un tiempo tan corto sugiere que esta molécula puede encontrarse al inicio de la vía en la cual participa. Sabiendo que tanto CD4+ y CD8+ naïve expresan CCR7, que como todo receptor de quimiocinas, se encuentra acoplado a proteína G heterotriméricas (GPCR), la fosforilación de Akt en respuesta a CCL21 pudiera explicarse por medio de una vía dependiente de proteína Gi. En esta vía, la subunidad $G\alpha_i$ y la subunidad $\beta\gamma$ pueden activar a p13K, y como se mencionó en el marco teórico, esta proteína puede activar a AKT al fosforilar a PIP2 y reclutarla por medio del dominio PH [58]. Sin embargo, el lugar concreto, dentro de la vía de señalización de CCR7, en el que JAK3 participa, y su requerimiento para activar las distintas vías de señalización involucradas en la migración inducida en respuesta a sus ligandos CCL19 y CCL21 aun no se ha dilucidado. Para investigar si JAK3 está río arriba o río abajo de la proteína Gi, es necesario analizar la fosforilación de distintos substratos inhibiendo específicamente JAK3 (WHI-P131) y/o $G\alpha_i$ (PTX).

En el caso de la fosforilación a 3 minutos observada únicamente en los linfocitos T CD8+, se sabe que en algunas células puede existir un “loop” de retroalimentación positiva entre PI3K y la proteína Rac (GTP-asa). Después de la activación de PI3K y su subsecuente fosforilación de PIP2, puede suceder que AKT se fosforile y/o que la proteína Rac se active. Al activarse, Rac puede llevar a cabo la polimerización de actina y puede promover la producción de PIP3. En el caso de la producción de PIP3, esto puede tener como consecuencia la

fosforilación de AKT de nuevo, explicando de esta forma porque, a dos tiempos distintos, AKT se puede fosforilar [80]. También, podría explicarse por un mecanismo que se da durante la polarización de la célula. Al formarse un polo delantero “leading-edge” y un polo trasero o “urópodo”, se requiere de una regulación por medio de la presencia de la proteína Rac al frente y la proteína Rho que se encuentra en el polo trasero. La proteína Rho es capaz de fosforilar y activar a PTEN (por medio de ROCK) generando la producción de PIP2, el cual por medio del “loop” de Rac o por PI3K, es capaz de fosforilarse a PIP3 y generar la activación de AKT [81]. Es importante señalar que AKT se puede fosforilar y activar no solo para mediar la migración, sino para llevar a cabo otros procesos, por lo que podrían existir otras vías relacionadas con su activación [72].

Para explicar porque los linfocitos CD8+ presentan este patrón de fosforilación y los linfocitos CD4+ no, parece no haber una explicación clara. Se sabe que CCR7 es un receptor que se relaciona con la selección de linaje (CD4 vs CD8), lo que sugiere que existen señales diferenciales a través de este receptor [82]. Además, existe una migración diferencial a través de CCR7 de los linfocitos CD4+ vs CD8+, la cual no puede ser explicada por la expresión de CCR7 en ambas poblaciones [83]. Además, se sabe que los patrones proliferativos, los cuales pueden relacionarse con AKT, de los linfocitos CD4+ vs CD8+ son diferentes [84]. De cualquier forma no existe una evidencia clara que pueda explicar porque la diferencia entre los patrones de fosforilación entre ambas poblaciones.

Finalmente, la figura 15 presenta los controles positivos de estímulo en poblaciones CD4 y CD8, la elección de CD3 y CD28 se da como necesidad de encontrar un estímulo “fisiológico” que fuera capaz de inducir la fosforilación de AKT de manera independiente a CCR7. CD28 se conoce como un coestímulo del TCR y regulador de la proliferación y supervivencia mediada por AKT [85]. El pervanadato es un estímulo inespecífico, ya que tiene la capacidad de inhibir a las fosfatasa de tirosina y a pesar de que AKT se fosforila en Serina y Treonina, las

proteínas que participan en su vía de activación (PI3K) si son susceptibles a la actividad de esta molécula.

7.2 COMPARATIVA DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE AKT EN LINFOCITOS T DE RATONES WT VS KO EN RESPUESTA A CCL21

En las figuras 18 y 19 se observa la comparación tanto del tamaño y granularidad de las poblaciones linfoides de los linfocitos WT vs KO. Como se ha reportado anteriormente, se observa que los linfocitos son más grandes que en el ratón WT. La razón por la cual se realizaron tinciones con CD25 y CD3 fue comparar el comportamiento de las poblaciones y seleccionar de manera adecuada la combinación de fluorocromos a utilizar en los experimentos, la selección con CD3 permite identificar a los linfocitos T, ya que estos expresan el complejo CD3-TCR, mientras que CD25 permite identificar a los linfocitos T que no están activados y por lo tanto no poseen la cadena α del receptor de IL-2. Esta tinción también obedece a la gran cantidad de linfocitos T/B y células de origen mieloide en los bazo tanto del ratón KO como WT, comparados con las células en ganglio y la necesidad de poder distinguir a los linfocitos T del resto de las poblaciones de bazo

En la figura 18 se observa la selección en base a CD3 que se realizó de los linfocitos T. Se eligió CD3 ya que la expresión de esta molécula se encuentra restringida a células del linaje T; esta molécula identifica la cadena ϵ del complejo CD3 (que se compone de un heterodímero ϵ, δ un heterodímero ϵ, γ y un homodímero ζ, ζ .) que se encuentra asociado al TCR. La cadena ϵ es requerida para la adecuada selección de las células T en el timo, ya que a través de ella el pre-TCR y el TCR son capaces de señalizar durante los procesos de selección y supervivencia. Como se observa en la figura 18 b, la proporción de linfocitos CD3+ en ratones WT es mayor que en el KO. Se sabe que en el ratón KO el número de linfocitos T en bazo no se ve afectado de manera significativa, esto se debe a que los linfocitos T de los ratones KO son capaces de proliferar con una velocidad

superior *in vivo* (probablemente al fenotipo activado), pero también son más susceptibles a apoptosis, lo que tiene como consecuencia números similares de linfocitos T en bazo a los del ratón WT [86]. Datos encontrados por nuestro grupo de laboratorio han comprobado esto, ya que el número de linfocitos T de los ratones KO capaces de establecerse en bazo no se ve tan afectado como en los ganglios [44]. Tomando en consideración estos datos y que los linfocitos T de ratón KO presentan un fenotipo activado (ver más adelante), una posible explicación para la disminución de linfocitos CD3+ en ratones es que durante el “panning” con B220 algunos linfocitos T son eliminados, ya que se ha observado que durante la activación de linfocitos T, estos son capaces de expresar la molécula B220 [87]. Para poder resolver esto a futuro podrían realizarse los pannings con CD19, la cual es una molécula expresada en linfocitos B de manera altamente específica.

Por otro lado, la tinción de CD4 vs CD8 mostrada en la figura 18 c muestra que las poblaciones de linfocitos T en el bazo de ratones WT es normal, mientras que en el ratón KO se observa una mayor cantidad de linfocitos T CD4+, consistente con los reportes, los cuales mencionan que en los ratones KO la cantidad de linfocitos T de bazo es similar a la de los WT, pero la proporción de CD4 es mayor [66].

En la figura 19 b, se observa la selección de los linfocitos T realizada por medio de la tinción de CD25. En este caso, contrario a la tinción de CD3 los linfocitos que se seleccionan son los CD25-. CD25 es la cadena α del receptor de IL-2 y su expresión está relacionada con el desarrollo de timocitos y con la activación de los linfocitos T. Dado que la población mayoritaria de linfocitos T que son capaces de emigrar hacia órganos linfoides (entre otros) secundarios son los linfocitos T “naive” o no activados (CD25-), se decidió utilizar este marcador de activación. La expresión de CD4 y CD8 es muy similar a la de los linfocitos seleccionados por medio de CD3, incluyendo la mayor proporción de linfocitos T CD4+ vs CD8+ (Fig. 19 c).

En el ratón JAK3 KO se ha reportado un fenotipo muy particular en las poblaciones de linfocitos T de bazo. Se ha observado que estas células expresan niveles elevados de CD69, bajos niveles de CD62L, niveles altos de CD44 y altos niveles de expresión de CD25. La expresión de CD3+ parece no estar afectada, al igual que la de CD28 [66].

Con todos los datos anteriores se decidió elegir a CD25 como un marcador para poder elegir adecuadamente a las poblaciones a analizar, ya que además de permitir la observación de las poblaciones CD4 vs CD8 de manera similar al marcaje con CD3, nos proporciona un elemento adecuado para discriminar entre los linfocitos activados y los “naive”.

Una vez elegidos los marcadores adecuados para realizar el análisis de los experimentos se procedió a realizar los experimentos en los cuales se pudiera comparar la fosforilación en los ratones deficientes de JAK3.

Se eligió el tiempo de 30 segundos tanto para el ratón WT como para el ratón KO con la finalidad de tener una respuesta homogénea en ambas poblaciones. Además, existen evidencias previas de que AKT se fosforila a tiempos cortos en respuesta a CCR7 en CDs [88].

Al realizar el análisis estadístico (fig 21) podemos observar que solamente existe diferencia estadística en la subpoblación CD4+ tanto de WT como del ratón KO, mientras que la diferencia entre la población CD8+ se da solamente entre el basal y el estímulo de los linfocitos T de los ratones WT. La razón por la cual a pesar de tener una media tan alta no se encuentran diferencias estadísticas entre el estímulo de los linfocitos T CD8+ y el basal de los ratones KO se debe a la gran variación en los datos. Esta variación es debida a la cantidad tan baja de linfocitos CD8+ en el ratón KO. Se han propuesto 2 modelos principales que pueden explicar la deficiencia de linfocitos T CD8+: 1) Deficiencias en la homeostasis y selección de linaje de los linfocitos T en ratones JAK3 KO. Existen evidencias de que CCR7 participa en la selección de linaje en los linfocitos T de los ratones WT [82] y además se han observado cambios en la homeostasis de CD4/CD8 en

ratones KO vs WT [89]; 2) Incremento en la apoptosis de los linfocitos T CD8+ de los ratones JAK3 KO. Se ha propuesto una vía dependiente de la cinasa p38 en la cual se observa que los linfocitos T CD8+ son más susceptibles a apoptosis, en este mismo artículo se postula que esta razón podría ser la que explique porque la variación de la proporción CD4/CD8 en los ratones JAK3 KO [90].

Las figuras 20 y 21 muestran que los incrementos de pAKT observados en linfocitos T de ratones JAK3 en respuesta a CCL21 no son significativamente distintos a los obtenidos en WT. Sin embargo los resultados no fueron consistentes puesto que algunos ratones KO, fueron incapaces de fosforilar AKT. Esto puede indicar que existe alguna variabilidad entre ratones KO, debida a algunas condiciones de higiene en el bioterio o a que algunos reportes mencionan que la mayoría de los ratones KO tienen un bazo de tamaño similar al WT, pero en algunos casos el tamaño puede ser menor o mayor y que por tanto requeriríamos incrementar el número de ratones para poder demostrar diferencias significativas respecto a los WT, o alternativamente, nuestros datos podrían sugerir que la vía por la cual AKT se esta encendiendo a través de CCR7, podría ser independiente de JAK3, la cual puede involucrar algunos mecanismos mencionados más adelante. Como se ha observado en los ratones KO los niveles de CCR7 son más elevados en comparación al ratón WT, por lo que todavía es necesaria correlacionar los niveles de expresión de CCR7 en los ratones KO, con la fosforilación de AKT para determinar la posible independencia de AKT y JAK3. Basándonos en estos datos podríamos especular que pueden existir diversas vías iniciadas por CCR7 capaces de activar Akt, sin la participación necesaria de JAK3.

Evidencias que soportan la fosforilación de AKT de manera independiente a JAK3 y estas son las siguientes. A pesar de que se ha demostrado que en algunos receptores de quimiocinas (CXCR4) JAK (JAK2) es capaz de activar la vía PI3K y la consecuente transducción de señales hasta citoesqueleto, también se ha demostrado que al inhibir con PTX, JAK permanece fosforilado al igual que el receptor [53] y en algunos casos se ha observado que aun al inhibir JAK la proteína G (Gi) puede activarse [57]. Esto sugiere que: 1) JAK participa activando

a una proteína G dependiente de PTX (Gi); 2) La proteína Gi puede activarse de manera independiente a JAK; 3) Existen vías independientes de Gi y de JAK que son capaces de activar a AKT en respuesta a CCR7; 4) Existen vías independientes de JAK y proteína G, que en respuesta a un GPCR sean capaces de fosforilar a AKT.

Como se mencionó anteriormente los datos sugieren que la fosforilación de AKT podría ser independiente de Jak3. En el caso de que la proteína Gi sea una de las causas se podría explicar porque la fosforilación a tiempos cortos se mantiene en el ratón KO. Como se mostró en el marco teórico la proteína Gi es capaz de activar a PI3K de manera directa ($\beta\gamma$ activa a PI3K γ , mientras que si puede activar a otras clases), además, en el caso de esta proteína, se puede activar el “loop” mencionado anteriormente, ya sea por activación de Ras o Rac [20]. Para determinar que esta vía de activación es dependiente de Proteína Gi, pero independiente de JAK3, es necesario realizar la inhibición de esta proteína Gi con PTX en los ratones JAK3 KO y determinar si aún existe la fosforilación de AKT.

Existe evidencia de la participación de otras vías independientes a proteína Gi en receptores de quimiocinas. Se ha observado que una proteína G13 se puede asociar a receptores de quimiocinas y que esta es capaz de activar a PI3K γ , con la consecuente activación de AKT y considerando que PI3K γ se puede encender de manera rápida por medio de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Gi, entonces se explicaría el tiempo tan rápido de fosforilación [91]. También se sabe que las proteínas G13 activan a miembros de la familia de las Rho-GTPasas que pueden inducir la activación de PI3K y de AKT.

También se han descrito vías activadas por GPCRs independientes de proteína G e independientes de JAK. Una de estas vías podría relacionarse con la vía PI3K. Se ha observado que los GPCRs pueden activar a β -arrestina, la cual participa en endocitosis y reciclaje de receptores, pero también se sabe que puede participar en la activación de las proteínas de la familia Src. Estas proteínas activan a la vía de las MAPK/ERK y tienen como consecuencia activación de

proliferación, crecimiento, supervivencia, pero también se ha observado que los miembros de la familia Src pueden activar a PI3K o a Ras-PI3K y por consecuencia activar a AKT [92].

Finalmente, si suponemos que la fosforilación de AKT en CD8+ es real podemos explicar esta activación por medio de todos los mecanismos mencionados y además la hiperfosforilación de AKT podría deberse a un mecanismo por el cual los linfocitos CD8+ que son más susceptibles a apoptosis intenten sobrevivir activando AKT. Para determinar con certeza si estos linfocitos T CD8+ presentan más fosforilación que los linfocitos CD8+ del ratón WT, es necesario inhibir con WHIP-131 (específico de JAK3) y observar la fosforilación de AKT en estos linfocitos T.

Los controles mostrados en la figura 22 se utilizan con la finalidad de mostrar que tanto las células del ratón WT, como las células del ratón KO son capaces de responder a estímulos “fisiológicos” independientes de JAK. Aparentemente hay una ligera disminución en la fosforilación de AKT en los ratones KO, pero no parece presentar una diferencia con respecto al ratón WT, esto coincide con reportes de algunos autores, los cuales mencionan que al estimular con CD3 y un coestímulo, la activación de señales vía TCR es muy similar a la del WT [93].

Es importante señalar que todas estas posibles vías de activación de AKT independientes de JAK pueden contribuir en algún punto de la migración (polarización, formación de protrusiones, “leading-edge”, uropodo), pero que a pesar de esta contribución, la participación de JAK3 y la vía que esta molécula es capaz de activar, es fundamental para poder tener un fenotipo migratorio completo y adecuado en los linfocitos T de ratones. A pesar de esto, para demostrar la independencia o dependencia de la fosforilación de AKT con respecto a JAK3, es necesario realizar diversos experimentos con inhibidores tanto de proteínas G (PTX), como de JAK3 (WHIP-131) y realizar experimentos en células no activadas (timo de KO) tanto con inhibidores como sin estos.

8. CONCLUSIONES

1. Los linfocitos T de ratones WT o JAK3 KO son capaces de fosforilar Akt (T308) en respuesta a CCL21.
2. El incremento en la fosforilación de Akt en linfocitos CD4+ y CD8+ del ratón JAK3 KO, no es significativamente distinto al de los linfocitos de ratones WT.
3. La fosforilación de Akt es moderada y no consistente en los linfocitos T de ratones JAK3 KO, lo que podría estar explicado por niveles distintos de CCR7 en superficie.
4. Los datos obtenidos sugieren que la fosforilación de Akt en respuesta a CCL21 en los linfocitos T “naive” podría ser independiente de JAK3.

9. PERSPECTIVAS

Considerando que existen evidencias de la activación de vías distintas por medio de CCL19 y CCL21, es necesario realizar estos experimentos en respuesta a CCL19.

Así mismo, es necesario determinar tanto para los estímulos con CCL19 como para los estímulos con CCL21, si la posible vía “independiente de JAK3” es dependiente de proteína Gi o de alguna otra proteína G, y para determinar ésto es necesario realizar ensayos inhibiendo con PTX.

La variabilidad de respuesta de fosforilación de Akt en linfocitos T de ratones Jak 3 ko, sugieren diferencias en el fenotipo “activado” de los linfocitos periféricos en los distintos ratones analizados. Es necesario correlacionar la respuesta de fosforilación con los niveles de CCR7 en superficie para poder concluir si la respuesta de Akt depende o no de la expresión de este receptor.

Para evitar estas variaciones de los linfocitos en periferia, se realizarán experimentos con timocitos CD4 SP y CD8SP aislados del timo de ratones WT y JAK3 KO. Experimentos publicados han demostrado que los timocitos JAK3 KO, expresan incluso niveles superiores de CCR7 y en cambio son incapaces de migrar en respuesta a CCL21.

Finalmente para determinar si las diferencias entre la fosforilación de AKT en los linfocitos T CD8+ de los ratones KO es debido a problemas en la señalización y no a problemas con el escaso número de éstos, es necesario realizar estos ensayos inhibiendo específicamente JAK3 en los linfocitos T de los ratones WT, mediante la utilización de la droga WHI-P131, que ya hemos demostrado que es efectiva en la inhibición de la migración en respuesta a CCL19 y CCL21.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy, K.P. et al., *Janeway's immunobiology*, Ed. 7th. Garland Science, New York, 2008.
2. Kindt, T.J. et al., *Kuby immunology*, Ed. 6th. W.H. Freeman, New York, 2007.
3. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S., *Cellular and molecular immunology*, Ed. 6th. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
4. Spangrude, G.J., Heimfeld, S. and Weissman, I.L., *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. *Science*, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
5. Izon, D.J., *T-cell development: thymus-settling progenitors: settled?* *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(7): p. 552-553.
6. Bhandoola, A. and Sambandam, A., *From stem cell to T cell: one route or many?* *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(2): p. 117-126.
7. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(2): p. 127-135.
8. Maillard, I., Adler, S.H. and Pear, W.S., *Notch and the immune system*. *Immunity*, 2003. **19**(6): p. 781-791.
9. Magri, M. et al., *Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(5): p. 1231-1240.
10. Petrie, H.T. and Zuniga-Pflucker, J.C., *Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 649-679.
11. Starr, T.K., Jameson, S.C. and Hogquist, K.A., *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-176.
12. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(5): p. 309-322.
13. Bromley, S.K., Thomas, S.Y. and Luster, A.D., *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(9): p. 895-901.
14. Forster, R., Davalos-Missslitz, A.C. and Rot, A., *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 362-371.
15. Randall, T.D., Carragher, D.M. and Rangel-Moreno, J., *Development of secondary lymphoid organs*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 627-650.
16. von Andrian, U.H. and Mempel, T.R., *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-878.
17. Warnock, R.A. et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes*. *J Exp Med*, 1998. **187**(2): p. 205-216.
18. Nakano, H. and Gunn, M.D., *Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the *plt* mutation*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 361-369.

19. Vassileva, G. et al., *The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1183-1188.
20. Kinashi, T., *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 546-559.
21. Fernandez, E.J. and Lolis, E., *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-499.
22. Laing, K.J. and Secombes, C.J., *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-460.
23. Bacon, K. et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-1068.
24. Allen, S.J., Crown, S.E. and Handel, T.M., *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
25. Proudfoot, A.E. et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-1890.
26. Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J., *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-650.
27. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-134.
28. Shi, G. et al., *Identification of an alternative G{alpha}q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2705-2718.
29. Thelen, M. and Stein, J.V., *How chemokines invite leukocytes to dance*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 953-959.
30. Williams, C. and Hill, S.J., *GPCR signaling: understanding the pathway to successful drug discovery*. Methods Mol Biol, 2009. **552**: p. 39-50.
31. Yoshida, R. et al., *Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 7118-7122.
32. Luther, S.A. et al., *Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12694-12699.
33. Carlsen, H.S. et al., *Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules*. Blood, 2005. **106**(2): p. 444-446.
34. Link, A. et al., *Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1255-1265.
35. Misslitz, A. et al., *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 481-491.
36. Sallusto, F. et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-712.
37. Byers, M.A. et al., *Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4723-4732.
38. Liu, C. et al., *The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi*. Blood, 2005. **105**(1): p. 31-39.

39. Zlotoff, D.A. et al., *CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1897-1905.
40. Krueger, A. et al., *CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1906-1912.
41. Wurbel, M.A. et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2626-2632.
42. Forster, R. et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
43. Hopken, U.E. et al., *CCR7 deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity*. Blood, 2007. **109**(3): p. 886-895.
44. Garcia-Zepeda, E.A. et al., *Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs*. Immunology, 2007. **122**(2): p. 247-260.
45. Yanagawa, Y. and Onoe, K., *CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4923-4929.
46. Britschgi, M.R., Favre, S. and Luther, S.A., *CCL21 is sufficient to mediate DC migration, maturation and function in the absence of CCL19*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1266-1271.
47. Yamaoka, K. et al., *The Janus kinases (Jaks)*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. 253.
48. Russell, S.M. et al., *Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development*. Science, 1995. **270**(5237): p. 797-800.
49. Minegishi, Y. and Karasuyama, H., *Hyperimmunoglobulin E syndrome and tyrosine kinase 2 deficiency*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. **7**(6): p. 506-509.
50. Imada, K. and Leonard, W.J., *The Jak-STAT pathway*. Mol Immunol, 2000. **37**(1-2): p. 1-11.
51. Ghoreschi, K., Laurence, A. and O'Shea, J.J., *Janus kinases in immune cell signaling*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 273-287.
52. Aaronson, D.S. and Horvath, C.M., *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1653-1655.
53. Zhang, X.F. et al., *Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3342-3348.
54. Shuai, K. and Liu, B., *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-911.
55. Wormald, S. and Hilton, D.J., *Inhibitors of cytokine signal transduction*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 821-824.
56. Mellado, M. et al., *The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 805-813.

57. Mueller, A. and Strange, P.G., *CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins*. FEBS Lett, 2004. **570**(1-3): p. 126-132.
58. Vila-Coro, A.J. et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1699-1710.
59. Stein, J.V. et al., *CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway*. Blood, 2003. **101**(1): p. 38-44.
60. Soldevila, G. et al., *Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3*. Immunology, 2004. **112**(2): p. 191-200.
61. O'Shea, J.J. et al., *Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 727-737.
62. Candeias, S. et al., *Defective T-cell receptor gamma gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice*. Immunol Lett, 1997. **57**(1-3): p. 9-14.
63. Akashi, K. et al., *Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1033-1041.
64. Refaeli, Y., Van Parijs, L. and Abbas, A.K., *Genetic models of abnormal apoptosis in lymphocytes*. Immunol Rev, 1999. **169**: p. 273-282.
65. Ozaki, K. et al., *A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production*. Science, 2002. **298**(5598): p. 1630-1634.
66. Thomis, D.C. et al., *Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 794-797.
67. Nosaka, T. et al., *Defective lymphoid development in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 800-802.
68. Suzuki, K. et al., *Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 123-132.
69. Kumar, C.C. and Madison, V., *AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7493-7501.
70. Fayard, E. et al., *Protein kinase B/Akt at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 24): p. 5675-5678.
71. Ikenoue, T. et al., *Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling*. EMBO J, 2008. **27**(14): p. 1919-1931.
72. Manning, B.D. and Cantley, L.C., *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
73. Stambolic, V. and Woodgett, J.R., *Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(9): p. 461-466.
74. Enomoto, A. et al., *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 389-402.
75. Li, J. et al., *Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 663-673.

76. Zhou, G.L. et al., *Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8058-8069.
77. McKenna, L.B., Zhou, G.L. and Field, J., *Isoform-specific functions of Akt in cell motility*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(21): p. 2723-2725.
78. Waugh, C. et al., *Phosphoinositide (3,4,5)-triphosphate binding to phosphoinositide-dependent kinase 1 regulates a protein kinase B/Akt signaling threshold that dictates T-cell migration, not proliferation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(21): p. 5952-5962.
79. Thomis, D.C., Lee, W. and Berg, L.J., *T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4708-4719.
80. Weiner, O.D. et al., *A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 509-513.
81. Meili, R., Sasaki, A.T. and Firtel, R.A., *Rho Rocks PTEN*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 334-335.
82. Yin, X. et al., *CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7358-7364.
83. Debes, G.F. et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-894.
84. Foulds, K.E. et al., *Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1528-1532.
85. Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B., *PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 317-330.
86. Baird, A.M., Thomis, D.C. and Berg, L.J., *T cell development and activation in Jak3-deficient mice*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 669-677.
87. Poppema, S. et al., *CD45 (leucocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets*. Leuk Lymphoma, 1996. **20**(3-4): p. 217-222.
88. Sanchez-Sanchez, N. et al., *Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells*. Blood, 2004. **104**(3): p. 619-625.
89. Sohn, S.J. et al., *Requirement for Jak3 in mature T cells: its role in regulation of T cell homeostasis*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2130-2138.
90. Merritt, C. et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 936-946.
91. Monterrubio, M. et al., *PI3Kgamma activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 199-204.
92. Seta, K. et al., *AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9268-9277.
93. Tomita, K. et al., *Cytokine-independent Jak3 activation upon T cell receptor (TCR) stimulation through direct association of Jak3 and the TCR complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25378-25385.

ANEXO I. REACTIVOS Y SOLUCIONES

REACTIVOS

- Ácido Acético, Glacial (Cat. 9507-02, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Agarosa Ultrapura (Cat. 15510-027, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Antibiotic-Antimycotic (100x) líquido (Cat. 15240-112, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Azida de Sodio (Cat. S-2002, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Azul de Bromofenol (Cat. 161-0404, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)
- Bicarbonato de Sodio, Polvo (Cat. 3506-01, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Bromuro de Etidio Sol. (10 mg/mL) (Cat. 161-0433, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)
- Cloroformo (Cat. 9180-02, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Cloruro de Amonio/ NH_4Cl (Cat. 0660-01, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- EDTA (Cat. 3002E, Research Organics, OH, EUA)
- Fenol Ultrapuro (Cat. 15513-047, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Fosfato Dibásico de Sodio Heptahidratad ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Cat. 3824, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Fosfato Monobásico de Sodio Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Cat. 3818, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Glicerol Anhidro (Cat. 2136-03, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)

- HEPES Buffer Solution (1M) (Cat. 15630-080, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Hidróxido de Sodio/NaOH(Cat. 3722, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- L-Glutamine-200 mM (100x) liquid (Cat. 25030-081, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Lyse/Fix Buffer 5x (Cat. 558049, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA)
- Paraformaldehído (Cat. P6148-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Perm Buffer II (Cat. 558052, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA)
- RPMI (Cat. 31800-022, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Suero Fetal Bovino/SFB (Cat. 16000-044, GIBCO-Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Tris base (Cat. 161-0719, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)
- Xylene Cyanol (Cat. 161-0423, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA)

REACTIVOS BIOLÓGICOS

- Anticuerpo B220 fue proporcionado por el Dr. Leopoldo Santos Argumedo (Investigador del CINVESTAV, D.F., Mex).
- Anticuerpo FITC Hamster a-mouse CD3e (Cat. 553061, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- Anticuerpo FITC Rat a-mouse CD4 (Cat. 553047, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- Anticuerpo FITC Rat a-mouse CD25 (Cat. 553072, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)

- Anticuerpo PE a-mouse CD4 (Cat. 553653, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- Anticuerpo PECy-5 a-mouse CD8a (Cat. 553034, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- Anticuerpo APCa-mouse CD4 (Cat. 553051, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)
- Anticuerpo Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) Rabbit mAb (Alexa Fluor(R) 647 Conjugate) (Cat. 3375, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA)
- dNTPs Mix (Cat. 10297-018, Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Kit Taq DNA Polymerase (Cat. 11615-010, Invitrogen, Ben Harbor, ME, EUA)
- Oligonucleótidos. Sintetizados bajo pedido por Invitrogen (Ben Harbor, ME, EUA):
 - NEO1 (Casette de Neomicina) hebra sentido
5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'
 - NEO2 (Casette de Neomicina) hebra antisentido
3'-GTACGTGCTCGCTCGATGCG-5'
 - JAK3 hebra sentido
5'-GGCAACTTTGGCAGCGTGGAGCTGTGCCGC-3'
 - JAK3 hebra antisentido
3'-CTGGCCCATAGCTGACTCCCCGGTACTTGA-5'.
- Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) (Cat. 553141, BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA)

- Quimiocina recombinante murina, Exodus-2/CCL21 (Cat. 250-13, PEPROTECH, New Jersey, NJ, EUA)

SOLUCIONES

Mezcla de Reacción PCR NEO

MgCl ₂ (Kit)	1 µL
Buffer 10X (Kit)	2.5 µL
dNTPs 2.5 mM	0.25 µL
Oligonucleotido Hebra Sentido (100 ng/µL)	0.35 µL
Oligonucleotido Hebra Antisentido (100 ng/µL)	0.35 µL
H ₂ O bidestilada y estéril	19.55 µL
Taq Polymerase (Kit)	0.08 µL
DNA obtenido de la extracción	1 µL

Mezcla de Reacción PCR JAK3

MgCl ₂ (Kit)	1 µL
Buffer 10X (Kit)	2.5 µL
dNTPs 2.5 mM	0.25 µL
Mix Oligonucleotidos JAK3 sentido y Antisentido (100 ng/µL)	0.35 µL
H ₂ O bidestilada y estéril	19.90 µL
Taq Polymerase (Kit)	0.08 µL

DNA obtenido de la extracción	1 μ L
-------------------------------	-----------

Buffer de Carga

Azul de Bromofenol	0.25% (p/v)
--------------------	-------------

Xylene Cyanol	0.25% (p/v)
---------------	-------------

Glicerol	30% (p/v)
----------	-----------

Geles de Agarosa-Bromuro de Etidio

Agarosa	1% (p/v)
---------	----------

Bromuro de Etidio	0.1 μ g/mL
-------------------	----------------

TAE 50x

Tris base	242 g
-----------	-------

EDTA 0.5 M	100 mL
------------	--------

Ácido Acético	57.1 g
---------------	--------

Se ajusta el pH a 8.5 y se afora a 1 L con H₂O bidestilada. Para preparar **TAE 1X**, se diluye 50 veces en H₂O bidestilada

PBS 10X

Fosfato Monobásico de Sodio-Monohidratado	1.28 g
---	--------

Fosfato Dibásico de Sodio de Sodio-Heptahidratado 11.24 g

Cloruro de Sodio 48.33 g

Ajustar pH 7.3 y aforar a 500 mL con H₂O bidestilada

Para preparar PBS 1X se diluye 10 veces en H₂O bidestilada

Buffer de Lisis ACT

Solución A

Cloruro de Amonio 8.3 g

H₂O bidestilada 1000 mL

Solución B

Tris base 2.06 g

H₂O bidestilada 100 mL

Para preparar el ACT se mezcla 1 volumen de la Solución B con 10 volúmenes de la Solución A

RPMI sin SFB

RPMI 1 sobre

Antibiotic-Antimycotic (100x) 10 mL

L-Glutamina 200 mM 10 mL

Bicarbonato de Sodio, Polvo 2 g

HEPES Buffer Solution (1M) 12.5 mL

H₂O bidestilada 1000 mL

Para preparar el RPMI 10% de SFB (v/v) se añaden 100 mL de SFB por cada 1000 mL de RPMI.

Buffer de FACS

Azida de Sodio	0.02 % (p/v)
PBS 1X	500 mL
SFB	10 mL

Paraformaldehído 0.5%

Paraformaldehído	500 mg
PBS 1x	1000 mL