

## Tesis de Posgrado

# El rol de las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk en la activación de las células T: Estudios preclínicos de terapia génica para la deficiencia en ZAP- 70

Steinberg, Marcos Wenceslao

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Steinberg, Marcos Wenceslao. (2003). El rol de las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk en la activación de las células T: Estudios preclínicos de terapia génica para la deficiencia en ZAP-70. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3600\\_Steinberg.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3600_Steinberg.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Steinberg, Marcos Wenceslao. "El rol de las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk en la activación de las células T: Estudios preclínicos de terapia génica para la deficiencia en ZAP-70". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3600\\_Steinberg.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3600_Steinberg.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

---

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**El rol de las proteínas tirosina quinasas  
ZAP-70 y Syk en la activación de las células T:  
Estudios preclínicos de terapia génica para la  
deficiencia en ZAP-70.**

**Lic. Marcos Wenceslao Steinberg**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Director: Dra. Naomi Taylor  
Director asistente: Dra. Nelly Noraz  
Consejero: Dr. Osvaldo Podhajcer**

**- 2003 -**

---

---

*La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.*

***Ruy Perez Tamayo***

---

## **Agradecimientos**

---

A Naomi, mi directora de Tesis. Difícilmente podré expresar toda mi gratificación para contigo en unas pocas líneas. Te agradezco infinitamente haberme dado la posibilidad de integrar tu laboratorio y haber confiado en mí. Gracias también por haberme enseñado un poco más el arte de hacer ciencia, contagiándome tu pasión y tu entusiasmo. Finalmente, gracias por tus valores humanos, sin duda tu cualidad la más elogiada y la que indiscutiblemente ha contribuido a que estos 5 años en tu laboratorio hayan sido extraordinarios. Gracias.

A Nelly, aussi ma directrice ou ma co-directrice; enfin, peu importe. Ce qu'est vraiment important c'est-ce que t'as été présente á mon côté pendant toute cette Thèse. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité, pour la manière dans le qu'elle tu m'as appris chaque une de manip, pour être une conseillère permanente tout au long de cette Thèse. Merci beaucoup Nell.

A los señores miembros del jurado, por su tiempo y su dedicación para la corrección de esta Tesis.

A Osvaldo, por haberme recibido en Campomar cada vez que pasé por Buenos Aires. Por tus consejos y tu buena voluntad para responder a cada una de mis inquietudes.

A la Fundación YPF, especialmente a Julia Buta. Por ocuparse con mucha dedicación y una gran responsabilidad de la gestión de mi beca de postgrado, sin la cual no hubiera podido realizar esta Tesis.

A mes étudiants Mia et Ludivine, et á mes collègues du labo Louise et Cosette, par son contribution au long de mon travail de Thèse.

Aux autres collègues du labo: Cédric, Sandrina, Fred, Isaure, Laure, Javi, Sharan, Matthieu, Mathilde, et d'autres personnes que j'oublie et qui sont passées par le labo NTL.

A tous mes collègues de l'IGMM, spécialement a c'eux qui font un travail constant pour que les choses fonctionnent bien. Merci á vous tous.

A Ana, por su inagotable gentileza para asesorarme en la dura tarea de hacer que todo lo respectivo a la Tesis este en regla al momento de la defensa, sobre todo cuando uno vive a 14000km de Exactas y la secretaria del Depto de Ciencias Biológicas queda un poco lejos.

A Elsa y Ju, por haberme apoyado siempre, por haberme dado la libertad de decidir respetando mis decisiones. Por aceptar la distancia y las raras oportunidades para estar reunidos en familia. Porque siempre la hemos peleado juntos, en las buenas y en las malas. Por estar!

A mi gran amigo Estani. Fuiste un poco el que provocó me ida a Montpellier, con aquel primer mail "...te interesaría una Tesis en Francia?". Luego fueron cinco años de los más maravillosos de mi vida, lo cual no hubiera sido así sin tu presencia. Gracias hermano!

A otro gran amigo. Marc, de la misma manera que Stani t'as été une des principales causes de tout le bonheur que j'ai eu pendant ces cinq années à Montpellier. Merci pour toute l'affection que tu m'as fait sentir. J'emporterai cette amitié par tout et je la garderai à perpétuité. Infinitas gracias mon ami!

A mes amis Magali et Sylvain ; Xavi, Mire et Laia ; Yan ; Claire ; et Valérie. Combien des souvenirs ensembles ; combien des rigolades, des fêtes, des Châteauneuf du Pape, Pomerol, Saint Emilion. Inoubliable!. Vous êtes des Grands cru classés!.

A Sara, minha amiga da vida. Por tudo este tempo juntos, as sorrisas, brincadeiras y todos tus contagiosos desejos de vivir plenamente. Brigado pur tudo isso. Sempre serás una de meus amigas da mais apreciadas.

A Martín, Susana y Gabi, por este corto tiempo compartido y por mucho tiempo más de amistad.

A Mariana, por tu compu, pero mucho más porque sos una mujer genial. Unos pocos meses me fueron suficientes para hoy tenerte muchísimo afecto.

A Alberto, por tus consejos y por tu generosidad. A Ana, Patty, Fede, Jérôme, Micky, Rosean, Sara, Erick, Viqui, pour partager au tan des bons moments avec nous.

A mis amigos de Argentina, Lucas, Dani, Fer, Diego, Guille, Bárbara, Agueda. A pesar de la distancia y de los mails demasiado esporádicos, siempre han estado presentes durante todos estos años.

A Claudia, por tu amistad incondicional, por tu tiempo y tu consejos. Gracias Piscui!

A todos mis familiares, especialmente a vos Poro. Porque para mi eres sabia, por tu sencillez y porque en 83 años no has hecho más que dar amor.

A Silvia y Goyo. Porque los siento también mi familia y por que los quiero de verdad!

Por último, gracias a ti amor. Por tu paciencia, tu ganas de escucharme, tus consejos, tus críticas. Gracias por haber decidido compartir tus sueños con los míos. Gracias por tu amor!

## Resumen

---

Las proteínas ZAP-70 y Syk componen la familia *Syk* de tirosina quinasas. Estas dos proteínas presentan secuencias de amino ácidos y estructuras similares, sin embargo ZAP-70 y Syk son reguladas diferentemente en términos de expresión y probablemente de función. En los linfocitos T, estas quinasas intervienen en la diferenciación y la activación celular mediada por el receptor de células T (TCR). En este trabajo hemos sido capaces de realizar un estudio comparativo del rol de ZAP-70 y de Syk en los eventos precoces de señalización vía el TCR, utilizando células T primarias y líneas celulares T transformadas expresando separadamente niveles equivalentes de ZAP-70 y de Syk. En dicho estudio demostramos que ZAP-70 y Syk contribuyen de manera diferencial a la señalización vía el TCR, en particular a la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del receptor. Además, Syk es menos eficaz que ZAP-70 para asociarse al TCR. Nuestro estudio demuestra que Syk funciona de manera diferente a ZAP-70 en la señalización precoz vía el TCR.

La deficiencia humana en ZAP-70 constituye una forma rara de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) caracterizada por la ausencia de células T CD8<sup>+</sup> y la presencia de células T CD4<sup>+</sup> anormales. Utilizando la terapia génica basada en la transferencia de genes mediada por un vector retroviral, en este trabajo hemos sido capaces introducir el gen *wild-type* de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> primarias aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70. En las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes transducidas, la expresión ectópica de ZAP-70 fue suficiente para reconstituir las funciones defectuosas de las mismas. Además, la introducción del gen *wild-type* de ZAP-70 dentro de células progenitoras de la médula ósea "lin<sup>-</sup>", aisladas de ratones ZAP-70 KO, y su posterior trasplante en estos mismos ratones, resultó en la reconstitución del desarrollo y las funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Nuestros descubrimientos proporcionan una importante información para el establecimiento de protocolos de terapia génica, no solo para la inmunodeficiencia en ZAP-70 sino también para diferentes tipos de inmunodeficiencias primarias.

## Abstract

---

The ZAP-70 and Syk proteins are the two members of the Syk family of protein tyrosine kinase. These two proteins share important similarities of sequence and structure, however, ZAP-70 and Syk differ in terms of expression and probably of function. In T lymphocytes, these kinases are involved in cellular differentiation and activation. In this work, we have been able to compare both tyrosine kinases participation in TCR signaling pathway in human primary T cells obtained from ZAP-70 deficient patients, which expressed important levels of Syk in absence of ZAP-70. In addition, we performed the same study in transformed-T cell lines expressing stable equivalent levels of ZAP-70 and/or Syk. These results demonstrate that upon TCR stimulation, ZAP-70 and Syk differ in their capacity to support  $\zeta$ -chain phosphorylation. Moreover, we have shown that Syk is less efficient than ZAP-70 in the association to the TCR. Our results suggest a differential role for ZAP-70 and Syk in the early signaling events after TCR stimulation.

The human ZAP-70 deficiency is a rare severe combined immunodeficiency (SCID), characterized by a selective inability to produce CD8<sup>+</sup> single positive T cells and a signal transduction defect in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. A gene therapy approach may prove to be an alternative treatment for ZAP-70-deficient patients. In the present study we have been able to successfully introduce the wild-type ZAP-70 gene into primary T cells from ZAP-70-deficient infants with a reconstitution of T cell function. Moreover, introduction of the wild-type ZAP-70 gene was into murine ZAP-70<sup>-/-</sup> hematopoietic stem cells and subsequent ZAP-70-transduced bone marrow cells transplantation, restored the development and function of CD4 and CD8 T lymphocytes. Altogether, our studies offer important information to the establishment of new gene therapy-based protocols as an alternative treatment for ZAP-70 and other immunodeficient patients.

## Publicaciones

---

### Relacionadas con el tema de Tesis:

- 1- Noraz, N., Schwarz, K., **Steinberg, M.**, Dardalhon, V., Rebouissou, C., Hipkind, R., Friedrich, W., Yssel, H., and N. Taylor. *Activation of an alternative TCR signaling cascade in T cells derived from ZAP-70-deficient patients expressing increased levels of Syk.* **J. Biol. Chem.** 2000; 275:15832-15838
- 2- **M. Steinberg**, L. Swainson., K. Schwarz., W. Friedrich., N. Taylor and N Noraz. *Retroviral-mediated transduction of primary ZAP-70-deficient human T cells results in the selective growth advantage of gene-corrected cells: Implication for gene therapy.* **Gene Therapy** 2000; 7:1392-1400
- 3- **M. Steinberg\***, M. Otsu\*, C. Ferrand, P. Merida, C. Rebouissou, P. Tiberghien, N. Taylor, F. Candotti and N. Noraz. *Reconstitution of lymphoid development and function in ZAP-70-deficient mice after stem cell gene therapy.* **Blood** 2002; 100:1248-1256 (\* equal contribution)
- 4- **M. Steinberg**, O. Adjali, P. Merida, L. Swainson, L. Pelletier, N Taylor and N. Noraz. *ZAP-70 and Syk differ with respect to their capacities to support the phosphorylation of the TCR- $\zeta$  chain.* 2003 (Manuscrito enviado).

### No relacionadas con el tema de Tesis:

- 5- V. Dardalhon, S. Jaleco, S. Kinet, B. Herpers, **M. Steinberg**, C. Ferrand, D. Froger, C. Leveau, P. Tiberghien, P. Charneau, N. Noraz and N. Taylor. *IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2001; 98(16):9277-82
- 6- Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, Lamy L, **Steinberg M**, Bernard, A and Deckert M. *Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration.* **Blood** 2002; 99: 3111-3118
- 7- Kinet, S., Bernard, F., Jaleco, S., Dardalhon, V., **Steinberg, M.**, Yssel, H., Noraz, N., and N. Taylor. *Ex vivo isolation protocols differentially affect the phenotype of human CD4+ T cells.* **J. Immunol. Methods** 2002; 271: 99-106.

---

Esta Tesis fue realizada en el “Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier” UMR5535, en Montpellier, FRANCIA, con el apoyo de los siguientes organismos: Association Française contre les Myopathies; March of Dimes grant 6-FY99-406; Association France-Israel pour la Recherche en Science et Technologie; Immunodeficiency Foundation; Association pour la Recherche contre le Cancer; INSERM; CNRS y NIH.

Durante los tres primeros años de esta Tesis, el tesista fue integralmente financiado por la beca “José A Estenssoro” otorgada por la fundación YPF de Argentina, y en el cuarto y último año de trabajo, por la beca de ayuda a los estudiantes de la Association Française contre les Myopathies.

## Abreviaturas

---

|                                                           |                                                               |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| - : negativo/a                                            | <b>GEM</b> : Glycolipids-Enriched Membrane                    |
| $[Ca^{2+}]_i$ : concentración de calcio intracelular      | <b>gpEnv</b> : glicoproteína de la envoltura                  |
| + : positivo/a                                            | <b>Grb-2</b> : Growth factor receptor binding-2               |
| <b>5-FU</b> : 5-Fluorouracilo                             | <b>GTP</b> : guanine trisphosphate                            |
| <b>AAV</b> : adeno-associated virus                       | <b>GvHD</b> : graft-vs-host-disease                           |
| <b>ADA</b> : Adenosina Deaminasa                          | <b>HIV</b> : Human Immunodeficiency Virus                     |
| <b>ADN</b> : ácido desoxiribonucleico                     | <b>HIV-1</b> : HIV de tipo 1                                  |
| <b>ADNc</b> : ADN copia                                   | <b>HLA</b> : human leukocyte antigen                          |
| <b>AP-1</b> : Activator protein 1                         | <b>HSC</b> : Stem Cell hematopoyética                         |
| <b>APC</b> : Célula Presentadora de Antígenos             | <b>HTLV-1</b> : human T cell leukemia virus                   |
| <b>ARN</b> : ácido ribonucleico                           | <b>IFN</b> : interferón                                       |
| <b>ARNm</b> : ARN mensajero                               | <b>IL</b> : interleuquina                                     |
| <b>ARNt</b> : ARN de transferencia                        | <b>IN</b> : integrasa (proteína)                              |
| <b>BCR</b> : receptor de células B                        | <b>IP</b> : Inositolfosfolípidos                              |
| <b>CA</b> : cápside (proteína)                            | <b>IRES</b> : Internal Ribosome Entry Site                    |
| <b>Cbl</b> : Casitas B-lineage lymphoma protein           | <b>ITAM</b> : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs |
| <b>CD</b> : cluster of differentiation                    | <b>Itk</b> : Inducible T cell kinase                          |
| <b>ConA</b> : Concanavalina A                             | <b>JAK</b> : Janus Kinase                                     |
| <b>Csk</b> : C-terminal Src kinase                        | <b>kD</b> : Kilodaltons                                       |
| <b>cSMAC</b> : central Supramolecular Activation Clusters | <b>KO</b> : Knockout                                          |
| <b>DAG</b> : diacilglicerol                               | <b>LAT</b> : linker for activation of T cells                 |
| <b>DIG</b> : Detergent-Insoluble Glycolipid structures    | <b>LFA-1</b> : Lymphocyte Function Associated protein 1       |
| <b>DLS</b> : Dimer Linkage Structure                      | <b>LPS</b> : lipopolisacáridos                                |
| <b>DN</b> : doble negativo (timocitos)                    | <b>LTR</b> : Long Terminal Repeats                            |
| <b>DP</b> : doble positivo (timocitos)                    | <b>MA</b> : matriz (proteína)                                 |
| <b>EGFP</b> : Enhanced Green Fluorescent Protein          | <b>mAb</b> : anticuerpo monoclonal                            |
| <b>Erk</b> : extracellular signal-regulated kinase        | <b>MAPK</b> : Mitogen Activating Protein Kinase               |
| <b>FCS</b> : suero fetal bovino                           | <b>MFI</b> : intensidad media de fluorescencia                |
| <b>Gads</b> : Grb-2-related adapter downstream of Shc     | <b>MHC</b> : Complejo Mayor de Histocompatibilidad            |
| <b>GALV</b> : Gibbon Ape Leukemia Virus                   | <b>MLV</b> : Murine Leukemia Virus                            |
| <b>GEF</b> : Guanine nucleotide exchange factor           | <b>MoMLV</b> : Moloney MLV                                    |

|                                                                  |                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NC</b> : nucleocápside (proteína)                             | <b>TAR</b> : Trans-Activation Response element                                  |
| <b>NCR</b> : negative control region                             | <b>Tc</b> : linfocito T citotóxico                                              |
| <b>Nef</b> : Negative Factor                                     | <b>TCR</b> : Receptor de células T                                              |
| <b>NF-AT</b> : Nuclear Factor Activated T cells                  | <b>Th</b> : linfocito T helper                                                  |
| <b>NF-kB</b> : Nuclear Factor kB                                 | <b>TM</b> : proteína transmembrana                                              |
| <b>NK</b> : células Natural Killer                               | <b>TN</b> : triple negativo (timocitos)                                         |
| <b>NLS</b> : Nuclear Localisation Signal                         | <b>Tr</b> : linfocito T regulador                                               |
| <b>p.i./ml</b> : partículas infecciosas por mililitro            | <b>U</b> : unidades                                                             |
| <b>PAG</b> : Protein Associated with GEMs                        | <b>Vif</b> : Virion Infectivity Factor                                          |
| <b>pb</b> : pares de bases                                       | <b>Vpr</b> : Viral Protein R                                                    |
| <b>PBS</b> : Primer Binding Site                                 | <b>Vpu</b> : Viral Protein U                                                    |
| <b>PEG</b> : polyethileneglycol                                  | <b>VSV-G</b> : glicoproteína G del rabdovirus de la estomatitis vesicular       |
| <b>PHA</b> : Fitohemaglutinina                                   | <b>WPRe</b> : Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element |
| <b>PI-3K</b> : phosphatidylinositol 3 kinase                     | <b>WT</b> : Wild-type                                                           |
| <b>PIC</b> : complejo de pre-integración                         | <b>X-SCID</b> : X-linked SCID                                                   |
| <b>PKC</b> : Protein Kinase C                                    | <b>ZAP-70</b> : Zeta( $\zeta$ ) chain-Associated Protein kinase of 70 kD        |
| <b>PLC-<math>\gamma</math>1</b> : Phospholipase- $\gamma$ -1     | <b><math>\alpha</math></b> : anti                                               |
| <b>PMA</b> : Phorbol myristol acetate                            |                                                                                 |
| <b>PPT</b> : Polypurine Tract                                    |                                                                                 |
| <b>PR</b> : proteasa (proteína)                                  |                                                                                 |
| <b>pSMAC</b> : peripheral SMAC                                   |                                                                                 |
| <b>RAG</b> : Recombinasion Activating Gene                       |                                                                                 |
| <b>RE</b> : retículo endoplásmico                                |                                                                                 |
| <b>RRE</b> : Rev Responsive Element                              |                                                                                 |
| <b>RT</b> : transcriptasa inversa (proteína)                     |                                                                                 |
| <b>SA/SD</b> : acceptor / donor splicing sites                   |                                                                                 |
| <b>SCF</b> : stem cell factor                                    |                                                                                 |
| <b>SCID</b> : Severe Combined Immunodeficiency                   |                                                                                 |
| <b>SH2</b> : Src Homology type 2 domain                          |                                                                                 |
| <b>SH3</b> : Src Homology type 3 domain                          |                                                                                 |
| <b>Shc</b> : Src Homologous and Collagen-like                    |                                                                                 |
| <b>SIN</b> : self-inactivating                                   |                                                                                 |
| <b>SLAP</b> : Src-like associated protein                        |                                                                                 |
| <b>SLP-76</b> : SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD |                                                                                 |
| <b>SP</b> : simple positivo (timocitos)                          |                                                                                 |
| <b>SU</b> : glicoproteína de superficie                          |                                                                                 |
| <b>Syk</b> : spleen tyrosine kinase                              |                                                                                 |

# Índice

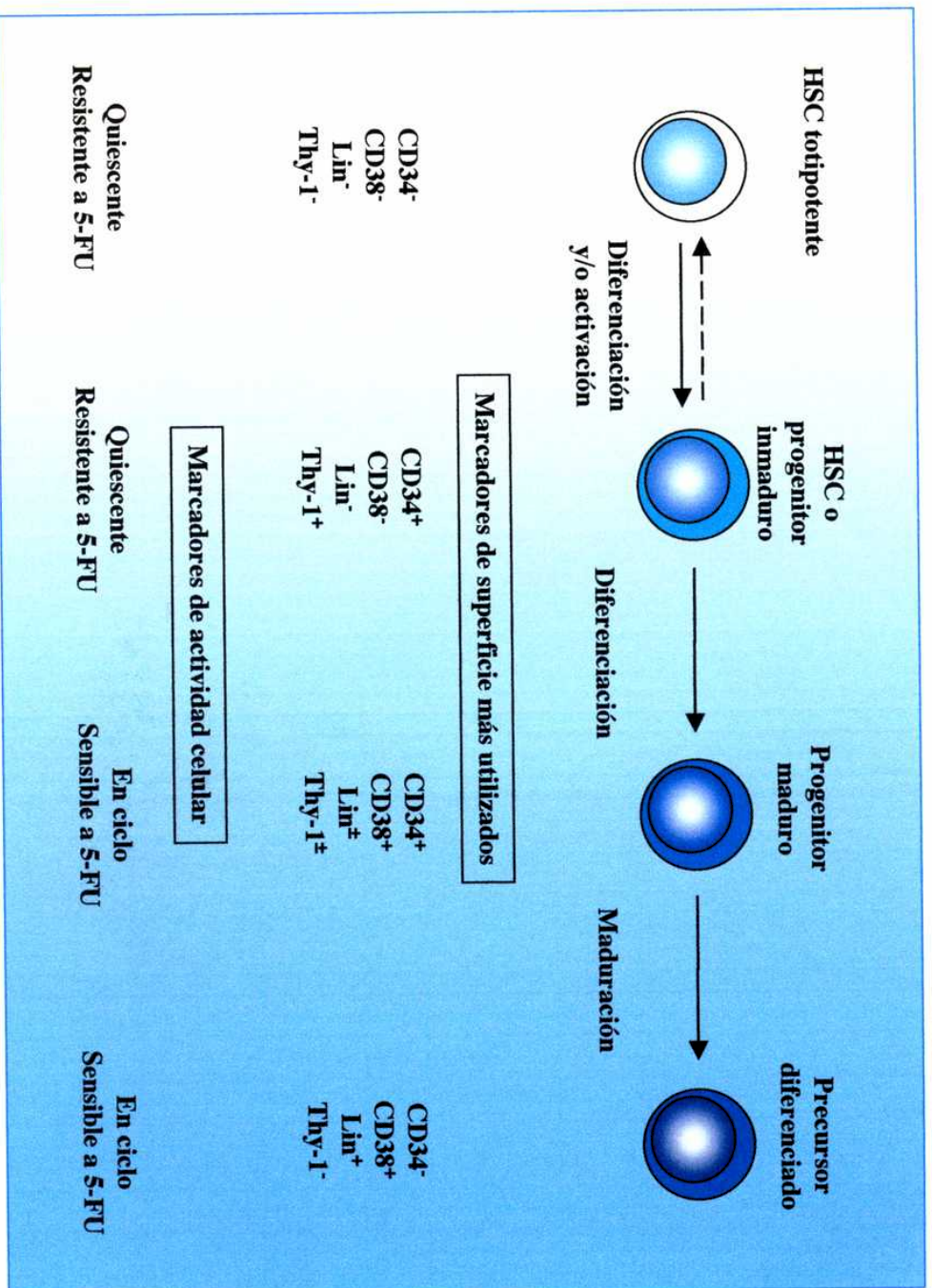
|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>CAPITULO I: ORIGEN Y FUNCION DE LOS LINFOCITOS T .....</b>                                                    | <b>1</b>  |
| I. <i>Origen de los linfocitos T.....</i>                                                                        | <i>1</i>  |
| I.1.    El despertar de una “stem cell” .....                                                                    | 1         |
| I.2.    La diferenciación en el timo .....                                                                       | 2         |
| I.3.    Los procesos de selección de los timocitos antes del pasaje a la periferia .....                         | 3         |
| I.4.    La migración hacia la periferia .....                                                                    | 4         |
| II <i>Características de los linfocitos T .....</i>                                                              | <i>4</i>  |
| II.1.    Poblaciones de linfocitos T.....                                                                        | 4         |
| II.1.1    Las células T $\alpha\beta$ pueden clasificarse según su función.....                                  | 5         |
| II.2.    Función de los linfocitos T .....                                                                       | 5         |
| <b>CAPITULO II: ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T .....</b>                                                         | <b>7</b>  |
| I. <i>El complejo TCR.....</i>                                                                                   | <i>7</i>  |
| II. <i>Los receptores de co-estimulación.....</i>                                                                | <i>8</i>  |
| III. <i>Señalización intracelular bajo activación del TCR.....</i>                                               | <i>9</i>  |
| III. 1.    Fase inicial de activación de las quinasas de la familia Src.....                                     | 9         |
| III.2.    La fosforilación de los ITAMs.....                                                                     | 11        |
| III.3    Las proteínas ZAP-70 y Syk en la señalización vía el TCR.....                                           | 13        |
| III.3.1.    Estructura de ZAP-70 y Syk .....                                                                     | 13        |
| III.3.1.a.    Dominios SH2 en tandem .....                                                                       | 13        |
| III.3.1.b.    El interdominio A .....                                                                            | 14        |
| III. 3.1.c.    El interdominio B.....                                                                            | 14        |
| III.3.1.d.    El dominio quinasa .....                                                                           | 14        |
| III.3.2.    Interacción de ZAP-70/Syk con los ITAMs.....                                                         | 15        |
| III.3.3.    Fosforilación de ZAP-70 y Syk.....                                                                   | 15        |
| III.3.4.    La regulación de la actividad quinasa de ZAP-70 y de Syk .....                                       | 16        |
| III.3.5.    Sustratos y proteínas que interactúan con ZAP-70 y Syk.....                                          | 19        |
| IV. <i>Formación de la sinapsis inmunológica por activación del TCR.....</i>                                     | <i>20</i> |
| V. <i>Proteínas adaptadoras implicadas en la señalización vía el TCR .....</i>                                   | <i>22</i> |
| VI. <i>Cascadas de señalización “downstream” en la activación vía el TCR.....</i>                                | <i>23</i> |
| VI.1.    Renovación de inositolfosfolípidos, flujo de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y activación de PKC ..... | 23        |
| VI.2.    Regulación de P21ras y de la cascada de las MAPKs.....                                                  | 24        |
| VI.3.    Regulación de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B.....                        | 25        |
| VII <i>Estudios in vitro de activación y señalización en células T .....</i>                                     | <i>26</i> |
| VII.1.    Activación de las células T con anticuerpos monoclonales $\alpha$ -CD3.....                            | 26        |
| VII.2.    Co-estimulación <i>in vitro</i> de las células T.....                                                  | 27        |
| VII.3.    Activación de las células T con mitógenos.....                                                         | 28        |
| VII.4.    Activación de las células T por pervanadato (VO <sub>i</sub> ).....                                    | 28        |
| <b>CAPITULO III: DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE ZAP-70 Y SYK .....</b>                                            | <b>29</b> |
| I. <i>Diferencias en la expresión de ZAP-70 y de Syk.....</i>                                                    | <i>29</i> |

|                                             |                                                                                         |           |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.                                         | <i>Diferentes fenotipos de ratones "knockout" para ZAP-70 y/o Syk</i>                   | 30        |
| III.                                        | <i>Diferentes requerimientos de activación de ZAP-70 y de Syk</i>                       | 31        |
| III.1.                                      | Dependencia de las quinasas Src                                                         | 31        |
| III.2.                                      | Diferencias funcionales entre ZAP-70 y Syk                                              | 32        |
| CAPITULO IV: LA INMUNODEFICIENCIA EN ZAP-70 |                                                                                         | 34        |
| I.                                          | <i>La deficiencia en ZAP-70: una forma de SCID</i>                                      | 34        |
| II.                                         | <i>Desórdenes genéticos responsables de la deficiencia en ZAP-70</i>                    | 35        |
| III.                                        | <i>Características clínicas de la deficiencia en ZAP-70</i>                             | 36        |
| IV.                                         | <i>Tratamiento de los pacientes deficientes en ZAP-70</i>                               | 36        |
| V.                                          | <i>Modelos animales para el estudio de la deficiencia en ZAP-70</i>                     | 38        |
| CAPITULO V: LA TERAPIA GENICA               |                                                                                         | 39        |
| I.                                          | <i>Vectores retrovirales para la transferencia de genes terapéuticos</i>                | 41        |
| I.1.                                        | Una revisión sobre los retrovirus                                                       | 41        |
| I.1.1.                                      | El genoma retroviral                                                                    | 42        |
| I.1.2.                                      | El ciclo retroviral                                                                     | 44        |
| I.1.3.                                      | Las proteínas de la partícula viral                                                     | 46        |
| I.1.4.                                      | El tropismo                                                                             | 47        |
| I.2.                                        | Los vectores retrovirales                                                               | 48        |
| I.2.1.                                      | Construcción de vectores retrovirales                                                   | 49        |
| I.2.1.a.                                    | Vectores derivados de MLV                                                               | 49        |
| I.2.1.b.                                    | Vectores derivados de HIV-1                                                             | 51        |
| I.2.2.                                      | Producción de partículas retrovirales                                                   | 52        |
| I.2.2.a.                                    | Líneas de empaquetaje y producción de vectores derivados de MLV                         | 52        |
| I.2.2.b.                                    | Producción de vectores derivados de HIV-1                                               | 53        |
| II.                                         | <i>Historia y actualidad de la terapia génica</i>                                       | 53        |
| II.1.                                       | Más de una década no solo de progresos                                                  | 53        |
| II.2.                                       | La terapia génica en números                                                            | 55        |
| II.3.                                       | La terapia génica hoy                                                                   | 55        |
| II.3.1.                                     | Las enfermedades implicadas en ensayos clínicos                                         | 55        |
| II.4.                                       | La terapia génica para las SCIDs                                                        | 56        |
| II.4.1.                                     | La terapia génica para la deficiencia en ADA                                            | 57        |
| II.4.2.                                     | La terapia génica para la X-SCID                                                        | 59        |
| II.4.2.a.                                   | Ultimo momento ...                                                                      | 61        |
| <b>OBJETIVOS</b>                            |                                                                                         | <b>64</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>                 |                                                                                         | <b>66</b> |
| I.                                          | <i>Células T primarias humanas deficientes en ZAP-70</i>                                | 66        |
| II.                                         | <i>Líneas celulares T</i>                                                               | 66        |
| III.                                        | <i>Construcción de los vectores retrovirales y líneas de empaquetaje</i>                | 67        |
| IV.                                         | <i>Transducción de los linfocitos T primarios y de las líneas celulares T</i>           | 68        |
| V.                                          | <i>Aislamiento, transducción y transplante de las células murinas de la médula ósea</i> | 69        |
| VI.                                         | <i>Aislamiento por FACS de las células EGFP*</i>                                        | 69        |
| VII.                                        | <i>Anticuerpos y detección de marcadores de superficie</i>                              | 70        |
| VIII.                                       | <i>Estimulación de las células T</i>                                                    | 70        |
| IX.                                         | <i>Inmunoprecipitación e inmunoblots</i>                                                | 71        |

|                                                                                      |                                                                                                                                                                                                     |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| X.                                                                                   | <i>Determinación de la proliferación de los linfocitos y de la secreción de citoquinas</i>                                                                                                          | 71         |
| XI.                                                                                  | <i>Ensayo in vitro de conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas</i>                                                                                                                           | 72         |
| XII.                                                                                 | <i>Análisis del repertorio del TCR de las células T</i>                                                                                                                                             | 72         |
| XIII.                                                                                | <i>Análisis estadísticos</i>                                                                                                                                                                        | 73         |
| <b>RESULTADOS PARTE I</b>                                                            |                                                                                                                                                                                                     | <b>74</b>  |
| ROL DE LAS PROTEÍNAS TIROSINA QUINASA ZAP-70 Y SYK EN LA SEÑALIZACIÓN VÍA EL TCR.... |                                                                                                                                                                                                     | 74         |
| A-                                                                                   | <i>“ZAP-70 y Syk regulan de manera diferencial los eventos precoces de señalización vía el TCR en células T primarias CD4<sup>+</sup> humanas y en líneas celulares T”</i>                          | 74         |
|                                                                                      | Introducción.....                                                                                                                                                                                   | 74         |
|                                                                                      | Resultados .....                                                                                                                                                                                    | 75         |
| B-                                                                                   | <i>Discusión</i> .....                                                                                                                                                                              | 92         |
| <b>RESULTADOS PARTE II</b> .....                                                     |                                                                                                                                                                                                     | <b>101</b> |
| ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA PARA LA INMUNODEFICIENCIA EN ZAP-70 .....     |                                                                                                                                                                                                     | 101        |
| A-                                                                                   | <i>“Reconstitución de células T primarias humanas deficientes en ZAP-70”</i> .....                                                                                                                  | 101        |
|                                                                                      | Introducción.....                                                                                                                                                                                   | 101        |
|                                                                                      | Resultados .....                                                                                                                                                                                    | 102        |
| B-                                                                                   | <i>“Reconstitución del desarrollo y la función linfóide T en ratones deficientes en ZAP-70 luego del trasplante de células progenitoras de la médula ósea transducidas con el gen ZAP-70”</i> ..... | 108        |
|                                                                                      | Introducción.....                                                                                                                                                                                   | 108        |
|                                                                                      | Resultados .....                                                                                                                                                                                    | 109        |
| C-                                                                                   | <i>Discusión</i> .....                                                                                                                                                                              | 117        |
| <b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....                                                      |                                                                                                                                                                                                     | <b>126</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....                                                            |                                                                                                                                                                                                     | <b>132</b> |

# *Introducción General*

**Figura 1** Diferentes estadios de diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas



## Introducción General

---

### **CAPITULO I: ORIGEN Y FUNCION DE LOS LINFOCITOS T**

#### **I. Origen de los linfocitos T**

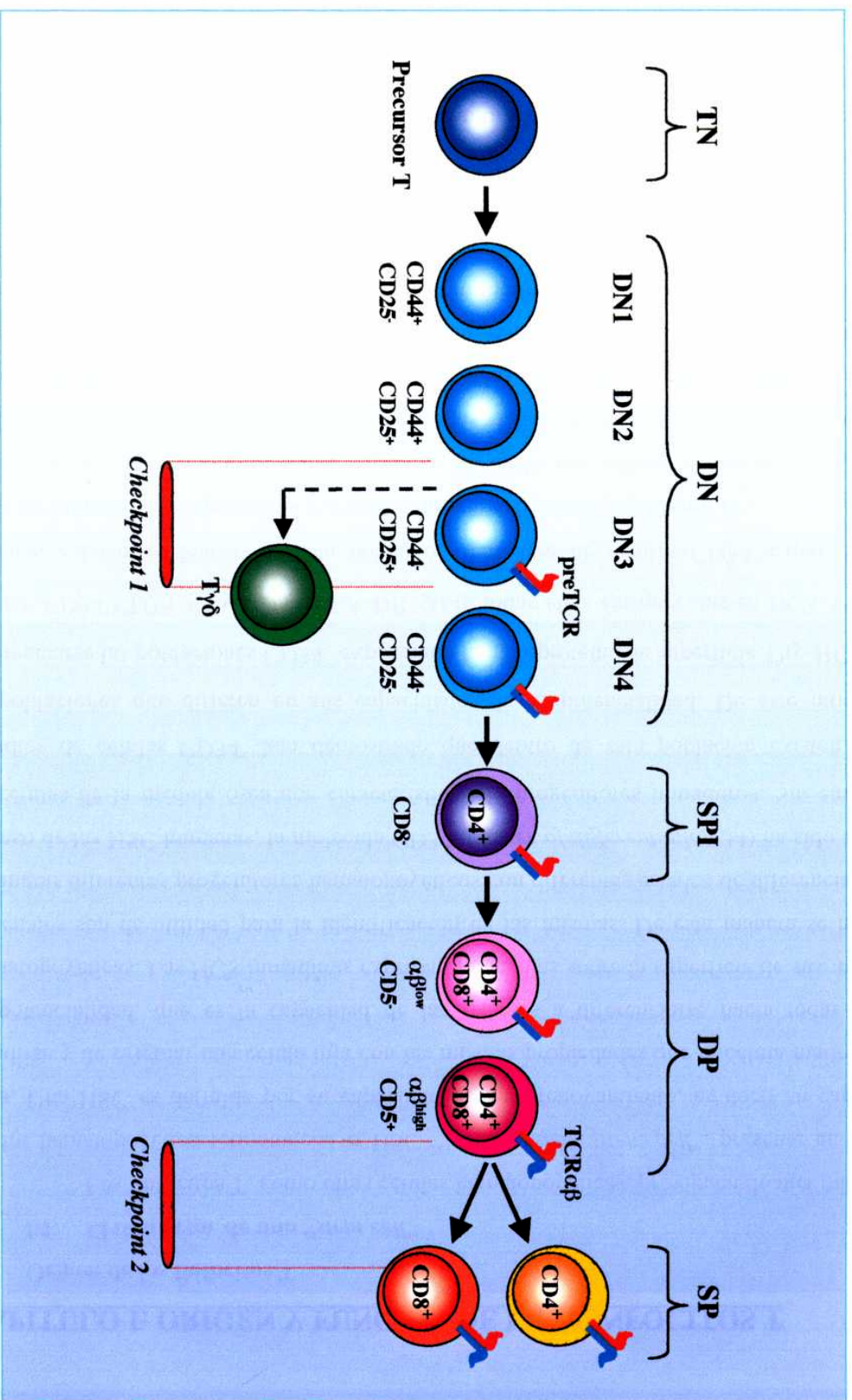
##### **I.1. El despertar de una “stem cell”**

Los linfocitos T, como otras células hematopoyéticas, provienen de una misma célula madre hematopoyética totipotencial o HSC “*hematopoietic stem cell*”, presente en la médula ósea. Una HSC es definida por su capacidad de auto-renovamiento, es decir su capacidad de dividirse y de originar una célula hija con las mismas propiedades que la célula madre, y por su totipotencialidad, que es la capacidad de las mismas a diferenciarse hacia todas las líneas hematopoyéticas. Las HCS inmaduras expresan moléculas sobre la superficie de sus membranas, las cuales son de utilidad para la identificación de las mismas. De esta manera se han podido distinguir diferentes progenitores hematopoyéticos con diferentes estados de diferenciación. Para el caso de las HSC humanas, la molécula CD34 (*cluster of differentiation 34*) ha sido encontrada en células de la médula ósea con características de progenitores inmaduros. Sin embargo, los estudios de células CD34<sup>+</sup> han demostrado que dentro de esta población existen diferentes subpoblaciones que difieren en sus capacidades de totipotencialidad. De este modo pueden diferenciarse las poblaciones CD34<sup>+</sup> expresando la glicoproteína de superficie Thy-1 (CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>) [1], CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [2] y CD34<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> [3, 4], todas ellas enriquecidas en HCS. Finalmente, también existen evidencias de una población inmadura de células CD34<sup>+</sup> capaz de generar múltiples líneas hematopoyéticas en ratones inmunodeficientes [5] (Figura 1).

Durante los procesos de diferenciación las diferentes células progenitoras pluripotentes derivadas de una HSC e implicadas en las distintas vías de maduración (mieloides, linfoides, etc.) se separan. En el caso de la línea linfoide, las células progenitoras migran desde la médula ósea hacia el seno de un órgano especializado, el timo. Allí dichas células sufrirán varios eventos de transformación para finalmente dar lugar a un linfocito T maduro. La migración de las células pluripotentes hacia el timo no es un proceso aleatorio sino que está dirigido por la emisión de señales quimiotácticas provenientes del mismo timo en formación.

Algunos autores sugieren que la diferenciación hacia la línea linfoide T comienza antes del establecimiento de la célula progenitora en el timo. En particular, un equipo ha demostrado la

**Figura 2** La diferenciación en el timo de los linfocitos T



presencia de células progenitoras T en la sangre de fetos de ratón, antes de que el timo se haya desarrollado [6]. Otro laboratorio ha igualmente demostrado la presencia de este tipo de células progenitoras T en la sangre de cordón umbilical de humanos [7]. En contradicción con estos descubrimientos, otros autores sostienen que el timo es indispensable para el “compromiso” de una célula progenitora hacia la diferenciación linfoide T [8].

Actualmente existen muchos interrogantes acerca de la biología de una verdadera célula madre totipotencial y sobre cuales son los criterios a tener en cuenta para identificar a las mismas. Numerosos laboratorios en el mundo reúnen sus esfuerzos para progresar en el conocimiento de estas células.

## 1.2. La diferenciación en el timo

Una vez en el timo, las células progenitoras pluripotenciales comienzan a diferenciarse a linfocitos del timo (llamados timocitos) en el córtex de este órgano y sobre la influencia de un micro-ambiente determinado por células epiteliales. Durante el proceso de maduración, los timocitos van a migrar progresivamente a través del córtex para alcanzar la médula del timo al final de la diferenciación. El proceso de maduración intra-tímico ha sido relativamente bien caracterizado y solamente describiré las etapas mas importantes de dicho proceso (para una revisión [9, 10]). Estas etapas pueden definirse en función de la expresión de ciertos receptores sobre la superficie celular (CD3, CD4, CD8...), los cuales han sido utilizados como marcadores específicos. Del mismo modo, la recombinación de ciertos genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que componen el receptor de las células T (TCR) también permite diferenciar distintos estadios de maduración. Las células más inmaduras presentes en el timo son triple-negativas (TN), es decir que no expresan los receptores CD3, CD4 y CD8. Estas células también son denominadas doble negativas (DN)  $CD4^-CD8^-$  y las mismas son  $CD34^+$ . Durante el estadio DN varias etapas han sido caracterizadas sobre la base de la expresión de los marcadores CD44 (*cluster of differentiation* 44) y CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de la interleuquina-2). De esta manera las células DN pueden ser  $CD44^+CD25^-(DN1)$ ,  $CD44^+CD25^+(DN2)$ ,  $CD44^-CD25^+(DN3)$  y  $CD44^-CD25^-(DN4)$  (Figura 2). Durante el desarrollo de los linfocitos dos importantes “*checkpoints*” que dependen de señales mediadas por receptores controlan la progresión de los timocitos. El primero de estos “*checkpoints*” tiene lugar en el estadio DN3 y es conocido como selección  $\beta$ . Esta etapa está marcada por la recombinación de los genes que codifican para las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$  del TCR. Los timocitos DN donde la recombinación de la

cadena  $\beta$  ha sido realizada con éxito no morirán y continuarán con el programa de diferenciación. Una población de timocitos que no expresan la cadena  $\beta$  también serán capaces de continuar con la diferenciación. Estos timocitos son los que expresan el TCR con las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  y los mismos representan solo el 20% de las células DN. Esta población será capaz de diferenciarse de manera independiente a la de timocitos expresando la cadena  $\beta$  y darán origen a la línea linfocítica T  $\gamma\delta$ . En los timocitos expresando  $\beta$ , la unión de la misma con una cadena pre- $\alpha$  da lugar al pre-TCR que al interactuar con las subunidades TCR/ $\zeta$  y CD3 constituye el complejo pre-TCR (Figura 2).

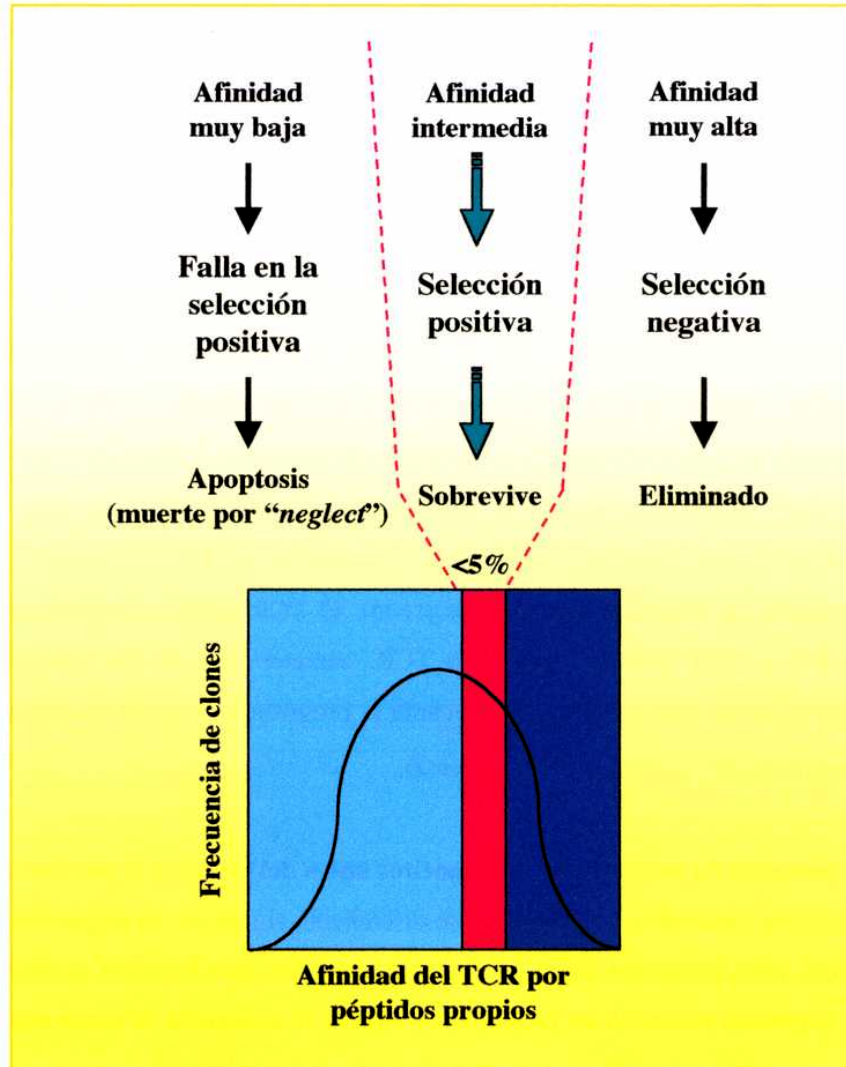
Durante el estadio siguiente DN4, las señales recibidas por el complejo pre-TCR podrán inducir el proceso de recombinación del gen de  $\alpha$  y la formación del complejo TCR $\alpha\beta$ . En ese momento los timocitos se encuentran en un estadio llamado simple positivo inmaduro (SPI). Las células SPI son CD4<sup>+</sup> y posteriormente expresan también el CD8 dando origen al estadio doble positivo (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. En estas células el receptor TCR $\alpha\beta$  madura completamente y se expresa fuertemente sobre la superficie de los timocitos. En este estadio, la fuerte expresión del TCR suele ser utilizada para referirse a los timocitos DP maduros (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>hi</sup>). Esta expresión del TCR $\alpha\beta$  induce la expresión de otras moléculas también utilizadas para determinar el estado de madurez de los timocitos y entre ellas se encuentra la CD5 (antígeno-T1) la cual es fuertemente expresada en timocitos DP maduros [11-13]. El TCR maduro en asociación con las subunidades TCR/ $\zeta$  y CD3 forma el complejo TCR, característico de los linfocitos T. Los timocitos DP que expresen este complejo continuarán la progresión de la diferenciación hacia el estadio simple positivo (SP) CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Figura 2).

### **I.3. Los procesos de selección de los timocitos antes del pasaje a la periferia**

Durante su desarrollo, los timocitos se diferencian siguiendo su migración en el seno del timo. En efecto, ellos progresan desde las regiones corticales para terminar su maduración en la médula. Esta migración parecería ser primordial y sugiere la existencia de zonas especializadas en el timo para ciertas etapas de diferenciación y selección de las células T.

Una vez que el TCR $\alpha\beta$  es expresado sobre la superficie de los timocitos DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> las señales transmitidas a través del mismo determinarán el segundo “*checkpoint*” para la continuidad de la diferenciación hacia el estadio SP CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Figura 2). En esta etapa, el destino de los timocitos se determina según la especificidad de sus TCR $\alpha\beta$  en el contexto epitelial tímico, mediante una estrategia de selección positiva y negativa (educación tímica). De este modo, los timocitos que no reconozcan o que reconozcan con fuerte avidéz y afinidad los

**Figura 3** Procesos de selección de los timocitos



péptidos propios presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), entrarán respectivamente en apoptosis (muerte por “*neglect*”) o en una fase de muerte inducida por la activación (selección negativa) (Figura 3). Este es un paso importante en la diferenciación de las timocitos ya que impide la producción de células T autoreactivas y de células T no funcionales. La minoría de los timocitos (< 5%), poseen un TCR capaz de reconocer los péptidos propios presentados por los complejos MHC con una avidez y afinidad moderadas, y los mismos serán capaces de diferenciarse al estadio SP (selección positiva) (Figura 3). Finalmente, estos timocitos rigurosamente seleccionados y capaces de tolerar los péptidos propios migrarán del timo hacia la periferia.

#### **I.4. La migración hacia la periferia**

Posteriormente, las células T seleccionadas en el timo dejarán este órgano para entrar en el sistema periférico. La totalidad de las células T maduras CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> presentes en la sangre y en los tejidos de un individuo, constituirán la reserva de linfocitos T periféricos. Estos linfocitos podrán circular a través de los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos y mucosa de tejidos linfáticos) con el fin de encontrar un antígeno específico.

Para conservar una inmunocompetencia es primordial el mantenimiento del número y de la proporción de las diferentes poblaciones de linfocitos T. La composición y el tamaño del compartimiento periférico serán regulados rigurosamente a lo largo de toda la vida de un individuo. Esta regulación es conocida con el nombre de “homeostasis”.

## **II Características de los linfocitos T**

### **II.1. Poblaciones de linfocitos T**

Los linfocitos T, al igual que otros tipos celulares, expresan un gran número de moléculas sobre sus membranas, incluyendo receptores, coreceptores, integrinas, etc. La expresión del receptor TCR sobre la superficie de los linfocitos T es la característica principal de estas células y las mismas guardarán este receptor mientras circulen en la periferia. Como se mencionó anteriormente existen dos tipos de TCR; uno formado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , y otro por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . Aproximadamente un 90-95% de los linfocitos T de la sangre son células T  $\alpha\beta$  y el resto, es decir 5 a 10% de las células T periféricas corresponden a los linfocitos T  $\gamma\delta$ .

### II.1.1 Las células $T\alpha\beta$ pueden clasificarse según su función

Los linfocitos  $T\alpha\beta$  desempeñan diferentes funciones en la respuesta inmune y de acuerdo a esas funciones los mismos pueden separarse en diferentes poblaciones celulares. De este modo pueden diferenciarse dos grandes poblaciones de células T, los linfocitos T “naive” y los linfocitos T de memoria. Un linfocito T “naive” es aquel que nunca ha encontrado un antígeno pero que es capaz de reconocerlos en cuanto aparezca uno nuevo participando así en la respuesta primaria. Una vez que las células naive son activadas por un antígeno, las mismas cambian su fenotipo y se convierten en células T de memoria. La expresión de la proteína de membrana CD45 permite diferenciar entre estas dos poblaciones. CD45 es una fosfatasa de membrana y varias isoformas de la misma son producidas por el “*splicing*” alternativo de 3 exones consecutivos en el dominio extracelular de la proteína [14]. Este “*splicing*” alternativo es finamente regulado dependiendo del tipo de célula hematopoyética. Las isoformas CD45RA y CD45RO son las que permiten distinguir entre las células T “naive” y de memoria, respectivamente. Una vez que las células T CD45RA son activadas por el antígeno, las mismas se convierten en células T de memoria CD45RO gracias a un “*splicing*” diferente de CD45 inducido por la activación [15].

Como hemos visto anteriormente, las células T  $\alpha\beta$  pueden ser  $CD4^+$  o  $CD8^+$ . Las CD4 contribuyen a la inducción de la respuesta inmune y son llamadas linfocitos T “*helpers*” (Th). Las CD8 participan en la respuesta citotóxica y se conocen con el nombre de linfocitos T citotóxicos (Tc). Dentro de cada una de estas poblaciones de células T pueden distinguirse distintas subpoblaciones que presentan diferencias funcionales. Entre las células Th dos grupos de linfocitos pueden ser identificados, las células Th1 y Th2, las cuales secretan diferentes tipos de citoquinas [16, 17]. Una heterogeneidad similar también fue identificada en la población de células Tc  $CD8^+$ . En efecto, de acuerdo a sus diferentes funciones en la respuesta citotóxica se identificaron las células Tc1 y Tc2 [18, 19]. Por último, una pequeña población de células T representando menos del 3% del total de células T periféricas también fue identificada. La misma está conformada por linfocitos T  $CD4^+CD25^+$  denominados linfocitos T reguladores (Tr), los cuales participan en la regulación de la homeostasis de las células T [20, 21].

## II.2. Función de los linfocitos T

Los linfocitos son las células responsables por excelencia del reconocimiento específico de patógenos y ellos inician las respuestas inmunológicas. Como ha sido explicado,

**Figura 4** Características funcionales de los linfocitos T

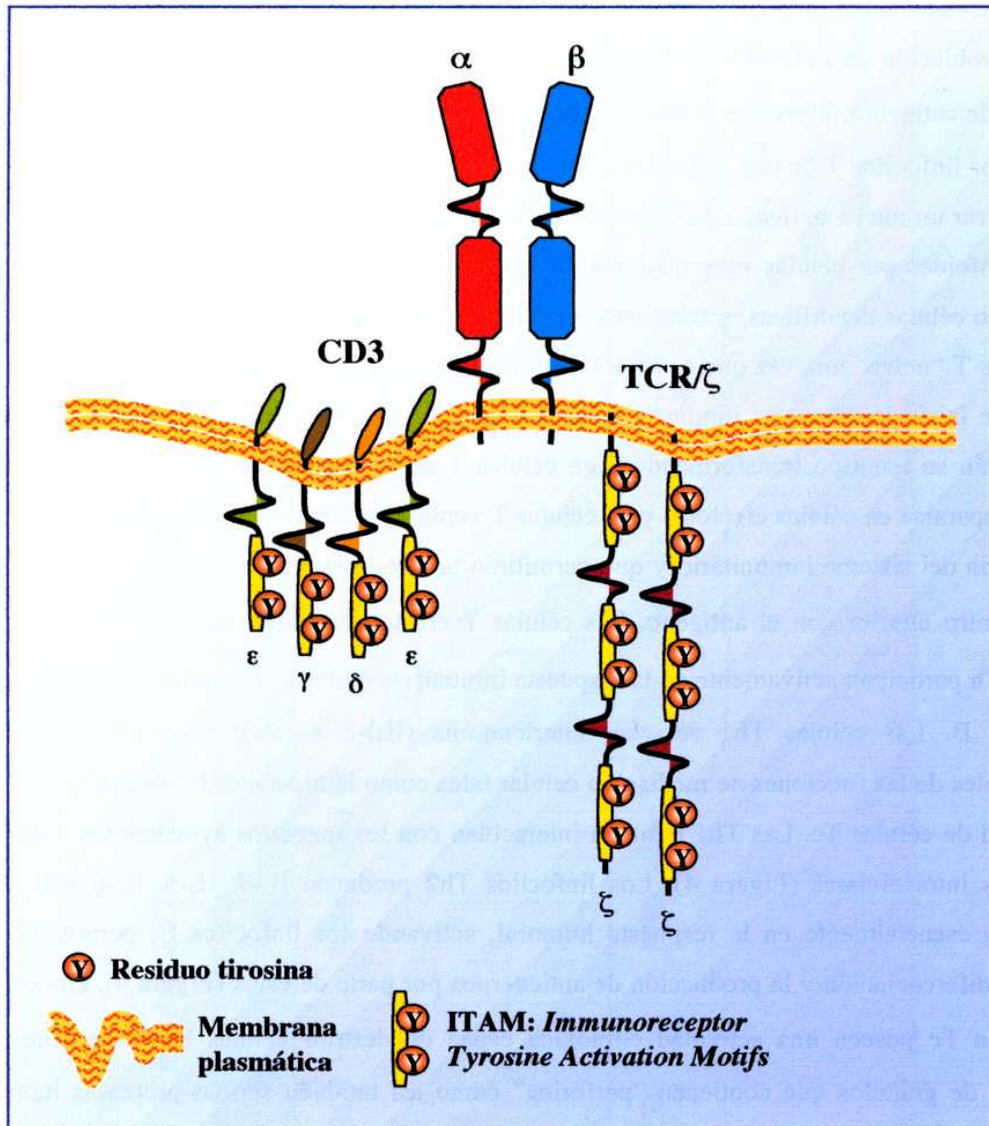
| Tipo celular                     | Co-receptor | Reconoce MHC | Sub-población | Citoquinas                    | Función                                                                                                   |
|----------------------------------|-------------|--------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Células T “helper”<br>(Th)       | CD4         | MHC clase II | Th1           | IL-2<br>IFN- $\gamma$         | Asistencia a células B<br>Asistencia a células CD8<br>Activación de macrófagos<br>Secreción de citoquinas |
|                                  |             |              | Th2           | IL-4<br>IL-5<br>IL-6<br>IL-10 |                                                                                                           |
|                                  |             |              |               |                               |                                                                                                           |
| Células T<br>citotóxicas<br>(Tc) | CD8         | MHC clase I  | Tc1           | IL-2<br>IFN- $\gamma$         | Eliminan células<br>infectadas con virus                                                                  |
|                                  |             |              | Tc2           | IL-4<br>IL-5<br>IL-6<br>IL-10 | ? Eliminarían células<br>cancerosas<br>Secreción de citoquinas                                            |
|                                  |             |              |               |                               |                                                                                                           |

existen diferentes tipos de células T, y las mismas son capaces de ejercer una variedad de funciones. A través de su TCR estas células pueden reconocer los antígenos presentados por las moléculas del MHC. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos presentados por el MHC de clase II, mientras que las células T CD8<sup>+</sup> lo hacen con antígenos presentados por el MHC de clase I. De esta manera y gracias a la diversidad de TCR adquirida durante la diferenciación en el timo, la población de linfocitos T de un individuo es capaz de proteger al mismo de una gran cantidad de antígenos diferentes la cual ha sido estimada a más de 10<sup>9</sup>.

Los linfocitos T "naive" circulan a través de los órganos linfoides secundarios con el fin de encontrar un nuevo antígeno. Los nuevos antígenos son primeramente transportados hasta los tejidos linfoides por células presentadoras de antígenos (APC por "*antigen presenting cells*") tales como células dendríticas, macrófagos y células B. Allí, estos antígenos son reconocidos por las células T "naive" una vez que se ha efectuado el contacto de la célula T con la APC. De esta manera se inicia la respuesta inmune primaria. Luego de este encuentro, las células T "naive" modificarán su fenotipo transformándose en células T de memoria. Las células T de memoria pueden separarse en células efectoras y en células T verdaderamente de memoria que constituyen la memoria del sistema inmunitario y que permitirán una respuesta más rápida y eficaz frente a un encuentro ulterior con el antígeno. Las células T efectoras pueden ser CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Las CD4<sup>+</sup> o Th participan activamente en la respuesta inmune secretando citoquinas para asistir a los linfocitos B. Las células Th1 secretan interleuquina (IL)-2 e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y son responsables de las funciones de mediación celular tales como la hipersensibilidad retardada o la activación de células Tc. Las Th1 también interactúan con los fagocitos ayudándolos a destruir patógenos intracelulares (Figura 4). Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y participan esencialmente en la respuesta humoral, activando los linfocitos B, permitiendo su división, diferenciación y la producción de anticuerpos por parte de estos (Figura 4). Las células T CD8<sup>+</sup> o Tc poseen una actividad citotóxica capaz de destruir células blanco gracias a la secreción de gránulos que contienen "perforina" como así también serinas-proteasas llamadas "granzimas". Además de sus capacidades citotóxicas, los linfocitos Tc1 y Tc2 secretan diferentes citoquinas. De manera similar a las células Th1, los linfocitos Tc1 secretan IL-2 e IFN- $\gamma$ , en tanto que los Tc2 se asemejan a los Th2 produciendo IL-4, IL-5 e IL-10 [22] (Figura 4).

Todas estas poblaciones de linfocitos T poseen funciones complementarias indispensables para el mantenimiento de una respuesta inmune eficaz.

**Figura 5** Representación del complejo TCR



## **CAPITULO II: ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T**

La activación coordinada de las células T producida por los antígenos conduce a la expansión clonal, diferenciación, actividad citotóxica, o muerte celular programada. La activación de las células T es iniciada por el TCR, el cual es capaz de unirse con los ligandos específicos [23, 24]. El ligando fisiológico para el TCR es un péptido unido al MHC expresado en las APC [25, 26].

La señalización del TCR comienza con una primera ola de actividad quinasas, mediada por las quinasas de las familias Src, Syk (*spleen tyrosine kinase*) y Tec [27, 28]. Esta primera ola de fosforilación sobre residuos tirosinas de las proteínas conduce a la activación de vías de señalización mas tardías, incluyendo cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), en la activación de PKC (*Protein Kinase C*) y de las MAPK (*Ras-mitogen-activated protein kinase*) [29, 30]. Estas vías activan factores de transcripción como por ejemplo NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) que finalmente regularán la expresión de genes que controlan respuestas celulares específicas [31, 32].

La estimulación del TCR también conduce a la activación de diferentes proteínas que actúan como reguladores negativos de la transmisión de las señales. Entre estos reguladores se encuentran diferentes proteínas fosfatasas capaces de mantener un balance entre las actividades quinasas y fosfatasas presentes en la célula durante y luego de la activación [33].

### **I. El complejo TCR**

El receptor TCR es un complejo oligomérico que puede ser separado en dos unidades funcionales, la unidad de unión al ligando y la unidad de transducción de la señal [24]. La de unión al ligando está constituida por el heterodímero de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  capaz de reconocer péptidos antigénicos unidos a los MHC [27]. La de transducción de la señal está representada por dos subunidades CD3 y TCR/ $\zeta$ , constituidas por las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon_2$  y por un homodímero de la cadena  $\zeta$ , respectivamente [34] (Figura 5). Ambas subunidades están asociadas de manera no covalente a las cadenas  $\alpha\beta$ . Las cadenas que componen estas subunidades presentan motivos de secuencia particulares, los cuales han sido denominados ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Estos motivos contienen repeticiones de los amino ácidos tirosina (Y) y leucina (L), separados por seis a ocho amino ácidos diferentes ( $YxxLx_{(6-8)}YxxL$ ). Cada cadena

CD3 contiene un solo ITAM mientras que cada cadena  $\zeta$  tiene tres (Figura 5). De esta manera diez motivos ITAMs están presentes en un solo complejo TCR. Una vez que el TCR haya sido estimulado por un antígeno, la función principal de los ITAMs es interactuar con moléculas de señalización intracelular [27].

## II. Los receptores de co-estimulación

Aunque las señales generadas por el TCR determinan la especificidad de la respuesta al antígeno, los receptores de unión a ligandos también llamados co-receptores y ciertas integrinas, contribuyen considerablemente a la transmisión de la señal modulando su respuesta. Algunos de estos receptores son el CD4, CD8, CD28 (*cluster of differentiation 28*) [35, 36].

Los co-receptores CD4 y CD8 son dos glicoproteínas presentes sobre la membrana plasmática celular. Como ha sido dicho anteriormente, el CD4 de los linfocitos T interactúa con las moléculas del MHC de clase II, mientras que el CD8 de las células Tc lo hace con las moléculas del MHC de clase I. Estos co-receptores poseen estructuras similares excepto los dominios capaces de unirse a las moléculas del MHC. El CD4 es un homodímero que presenta 4 dominios de inmunoglobulinas análogos externos a la célula y una región citoplasmática la cual sirve de sitio de unión con la proteína tirosina quinasa Lck, importante en la activación de las células T (ver más adelante). El CD8 es un heterodímero compuesto por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas entre si por puentes disulfuro, y de la misma manera que el CD4, es capaz de unirse con la Lck.

Estos co-receptores son sumamente importantes desde el punto de vista funcional. Es importante remarcar que en ambos, los sitios de unión a las moléculas del MHC son diferentes a aquellos del TCR. Esto permite que una misma molécula del MHC pueda unirse a la vez con el TCR y un co-receptor, lo cual aumenta considerablemente la sensibilidad de la célula T hacia el antígeno [37]. Este aumento de sensibilidad es provocado por dos razones: *a*) la unión del CD4 o CD8 con las moléculas del MHC estabiliza la interacción del TCR con el antígeno, permitiendo una señalización más duradera [38-40]; *b*) la unión de los co-receptores con el MHC favorece el acercamiento de la proteína Lck hacia el TCR, permitiendo una mejor fosforilación del receptor [24] (ver ítem III.1. de este capítulo).

Otro importante co-receptor presente en las células T es el CD28. El CD28 se encuentra en el 80% de las células T de la sangre periférica humana, distribuyéndose en el 95% de los linfocitos T CD4 y 50% de los CD8. Su expresión aumenta a medida que las células T maduran en el timo, variando del 5% en los timocitos inmaduros hasta virtualmente todos los timocitos SP

[41]. Esta molécula situada en la membrana celular interactúa con sus dos ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), ambos expresados sobre las membranas de las APC. Estos ligandos son denominados moléculas accesorias y el contacto de los mismos con el CD28 induce una serie de señales intracelulares. Aunque estas señales son relativamente débiles, el efecto mayor de la co-estimulación del CD28 es el de incrementar la fosforilación de proteínas inducida por el TCR [42, 43].

Otras moléculas de co-estimulación son el CD2 (*cluster of differentiation 2*), el CD40L (*cluster of differentiation 40 ligand*), y diferentes integrinas entre las cuales se pueden citar VLA-4 y LFA-1 (*lymphocyte function associated protein 1*). Todas estas moléculas se encuentran sobre la membrana de las células T y participan en la interacción con las APCs.

### III. Señalización intracelular bajo activación del TCR

#### III. 1. Fase inicial de activación de las quinasas de la familia Src

Los receptores inmunológicos como el TCR no poseen una actividad quinasa intrínseca y para transmitir las señales hacia el citoplasma y al núcleo celular, deben servirse de la intervención de diferentes proteínas tirosina quinasas. Uno de los primeros eventos que pueden reconocerse después de la unión del TCR con un ligando es la inducción de la fosforilación de las proteínas tirosina quinasas Src [24, 27, 29]. En los mamíferos, la familia Src se compone de 8 miembros: Src, Blk, Fyn, Hck, Lck, Lyn y Yes [44]. Lck y Fyn son las principales Src quinasas expresadas en linfocitos T [45, 46]. Dos formas de la Lck pueden ser detectadas según su movilidad electroforética: una de 56 kD (p56lck) y otra de 59 kD (p59lck) [47, 48]. La forma p56lck está asociada de manera no covalente al CD4 o al CD8, y es responsable de la fosforilación de los ITAMs del TCR. La forma p59lck es producto de la fosforilación de la serina 59 y dicha fosforilación modula la capacidad de la Lck a interactuar con ciertas proteínas [48]. Aunque la proteína es capaz de asociarse con ambos receptores, en timocitos de ratón se observó que la cantidad de Lck asociada al CD4 fue mayor a la asociada al CD8. Sin embargo, mientras que entre un 50 a 90% de la proteína se asoció con el CD4, solo un 10 y 25% lo hizo con el CD8 [49-52]. En células T no estimuladas, el complejo CD3/TCR/ $\zeta$  se encuentra a proximidad física de los "rafts" lipídicos (ver ítem IV), donde Lck está confinada en asociación con el CD4 o con el CD8 [53]. En estas células, los motivos ITAMs están expuestos a un ciclo de fosforilación/defosforilación en el cual prevalece este último estado [30].

La actividad de las Src quinasas en las células T está controlada a nivel de dos tirosinas: la tirosina (Y) 505 situada en la posición C-terminal, y la Y394 en el dominio catalítico de la



proteína. Mientras que la Y394 es un sitio activador y sensible a la auto-fosforilación [54], la fosforilación de la Y505 es inhibitoria y la sustitución de la misma por fenilalanina conduce a la activación constitutiva de la Lck [55]. La activación de las Src quinasas necesita de un cambio conformacional de la proteína, ya que la asociación intramolecular que implica la Y505, crea una conformación cerrada donde el dominio catalítico es inaccesible. Luego de la defosforilación de la Y505, la proteína se despliega permitiendo la auto-fosforilación de la Y394 y adquiriendo la máxima actividad quinasa (Figura 6).

La fosforilación/defosforilación de la Y505 es regulada por la acción de la fosfatasa CD45 y la proteína tirosina quinasa Csk. En forma de dímero CD45 es inactiva debido a que el dominio catalítico de la misma interviene en la interacción intramolecular [56]. Como un monómero CD45 es capaz de defosforilar la Y505 de la Lck, permitiendo la activación de esta proteína. Así, CD45 es considerada como un regulador positivo de la activación de las Src quinasas. Sin embargo, observaciones *in vitro* efectuadas en ciertas líneas celulares CD45<sup>-/-</sup>, e *in vivo* en ratones donde el gen de CD45 fue inactivado, contradicen esta última afirmación [57, 58]. En ratones CD45 "knockout", Lck y Fyn son fuertemente fosforiladas y su actividad catalítica basal aumenta considerablemente [59]. En timocitos de estos ratones, las Y505 e Y394 de Lck están hiperfosforiladas [60], y la actividad quinasa de la proteína aumenta de 2 a 5 veces [55]. Finalmente, los trabajos realizados por D'Oro *et al* demostraron que además de la defosforilación de la Y505, CD45 puede defosforilar la tirosina activadora Y394 e inhibir la actividad catalítica de la Lck [61]. Estos resultados muestran que esta fosfatasa jugaría más bien un rol supresor, regulando negativamente la actividad catalítica de las Src quinasas. En ausencia de CD45, la hiperfosforilación de la Y394 provoca un aumento de actividad quinasa independientemente del efecto inhibitorio de la hiperfosforilación de la Y505 [62]. Por un mecanismo aún sin elucidar, el efecto de la fosforilación de la Y394 supera al de la fosforilación de la Y505.

La quinasa Csk fosforila la Y505 reprimiendo la actividad quinasa de las Src. En células T en proliferación, el aumento en la actividad de Csk correlaciona con la disminución en las actividades catalíticas de Lck y Fyn [63, 64]. Csk interactúa con la forma fosforilada sobre Y394 de la Lck, y esta interacción permite la fosforilación de la Y505 provocando el plegamiento de la Lck y el regreso a la conformación inactiva [65]. Datos obtenidos recientemente involucran la proteína residente en los "rafts" PAG (*protein associated with GEMs*), la cual se asocia con Csk [66, 67]. En células T donde el TCR no es estimulado, PAG es fosforilada constitutivamente por las Src y es capaz de secuestrar Csk hacia los "rafts". Csk una vez activada controla la actividad de las Src creando así un "loop" de auto-regulación. Cuando la célula T ha sido estimulada vía el

TCR, PAG es defosforilada y pierde la capacidad de asociarse con Csk, lo cual resulta en una disminución de la actividad Csk y en el aumento de la actividad de las Src quinasas [66].

En conclusión, la actividad quinasa de las proteínas Src depende del balance entre las fosforilaciones activadoras o inhibidoras de las tirosinas 505 y 394. El control del estado de fosforilación de estas tirosinas dependerá del balance entre actividades quinasa y fosfatasa.

### III.2. La fosforilación de los ITAMs

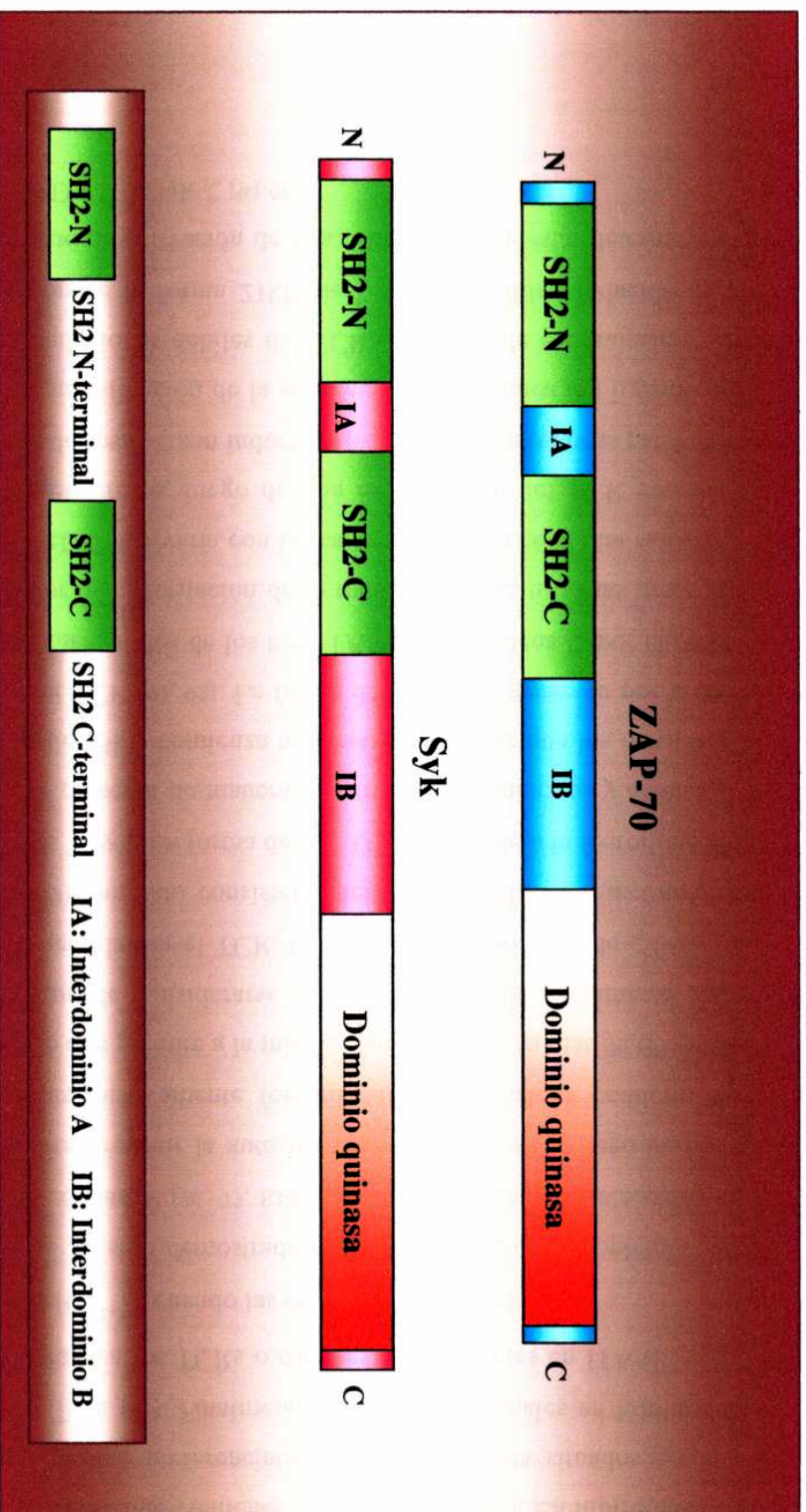
Cada uno de los motivos ITAMs presentes en las cadenas que conforman el complejo TCR posee dos tirosinas que son requeridas para la actividad funcional [24]. Una vez que la célula T ha sido activada, estas tirosinas son rápidamente fosforiladas por las quinasas Lck y/o Fyn. Los ITAMs fosforilados servirán como sitios de unión para las proteínas quinasa de la familia Syk, ZAP-70 (*ζ chain-associated protein kinase of 70 kD*) y Syk, las cuales contienen dominios SH2 (*Src homology type 2 domain*) (ver ítem III.3.1. de este capítulo). Estos dominios median las interacciones entre proteínas a través del reconocimiento específico de residuos tirosina fosforilados [68, 69]. La unión de ZAP-70 y/o Syk a los ITAMs permite el inicio de los eventos de señalización intracelular que conducen a la activación de numerosas proteínas [70].

Los ITAMs son indispensables en la activación de la célula T ya que ITAMs troncados o mutados son incapaces de mediar la activación de la célula [71-75]. Debido a la estructura del complejo TCR, un total de 10 ITAMs pueden encontrarse entre las diferentes cadenas que componen el complejo. Actualmente existen ciertos interrogantes sobre la finalidad de tantos motivos ITAMs en un solo complejo TCR; a su vez, la abundancia de ITAMs en este receptor aún no ha sido aclarada. Una hipótesis sostiene que una cierta cantidad de ITAMs es necesaria para desencadenar la señalización intracelular. El TCR es un receptor relativamente poco abundante en la célula, y las interacciones que forma con el MHC son de baja afinidad, es por ello que la presencia de múltiples ITAMs podría ser necesaria para amplificar las señales del receptor. Algunas evidencias experimentales sostienen esta hipótesis. Ratones deficientes en la cadena  $\zeta$  del TCR (6 ITAMs ausentes sobre 10) reconstituidos con 0, 1 ó 3 ITAMs presentaron una maduración normal de timocitos [76, 77]. En estos ratones, los linfocitos T fueron capaces de responder a una activación del TCR y migrar hacia los órganos linfoides secundarios. Además, el *pattern* de fosforilación sobre tirosina de proteínas implicadas en la señalización fue esencialmente normal, independientemente del número de ITAMs presentes [78]. Una segunda hipótesis sostiene que diferentes ITAMs pueden acoplarse con distintas moléculas de señalización, proporcionando así diferentes señales a la célula T. El tipo de señal transmitida por

el TCR (agonista, agonista parcial o antagonista) puede determinar el estado de fosforilación de ITAMs específicos, los cuales se asociarían luego con diferentes proteínas [79]. Algunos estudios también sostienen esta hipótesis. Por ejemplo, secuencias ITAMs sintéticas son capaces de unirse a diversas proteínas que contienen dominios SH2 [80]. En hibridomas de células T, la actina del citoesqueleto se une preferencialmente a los ITAMs situados en la parte C-terminal de las cadenas  $\zeta$  del TCR [81]. Finalmente, estudios funcionales en hibridomas de células T BW5147 transfectadas con varios TCRs o cadenas  $\zeta$  deficientes en ITAMs, mostraron una movilización diferencial del  $[Ca^{2+}]_i$ , cuando las células eran activadas [82].

Aunque ha sido demostrado que la cadena  $\zeta$  del complejo TCR no es requerida para el desarrollo de células T [76, 77, 83-86],  $\zeta$  es crítica para la selección positiva y negativa de los timocitos y para prevenir la auto-inmunidad [77, 87, 88]. Luego de la estimulación del TCR, la cadena  $\zeta$  es exhaustivamente fosforilada. Dicha cadena contiene seis sitios potenciales de fosforilación lo que permite a la misma transformarse en más de 60 variantes fosforiladas [89]. De este modo,  $\zeta$  puede considerarse como una molécula sumamente importante para procesar la información recibida por el TCR. Dos formas mayoritarias de  $\zeta$  fosforilada (masas moleculares de 21 y 23 kD) han sido consistentemente observadas en timocitos, linfocitos T periféricos y líneas celulares T [90]. La forma de 21 kD corresponde a la fosforilación basal sobre tirosina de  $\zeta$  y se encuentra presente de manera constitutiva en timocitos y células T periféricas murinas [91, 92]. La forma de 23kD comienza a detectarse una vez que los timocitos o las células T han sido activadas vía el TCR [91, 92]. La forma de 21 kD es generada por la fosforilación selectiva de 4 tirosinas presentes en dos de los tres ITAMs de la cadena  $\zeta$ , por el contrario, la forma de 23 kD es generada por la fosforilación de la totalidad de las tirosinas presentes en los ITAMs [93]. La proporción 21kD/23kD varía con la manera en que la célula ha sido activada y con la naturaleza del antígeno. En efecto, luego de una estimulación del TCR con un péptido agonista fuerte, ambas formas de fosfo- $\zeta$  son inducidas [90]. Péptidos agonistas parciales o antagonistas del TCR, obtenidos por modificación de la secuencia aminoacídica del ligando específico, son capaces de producir estimulaciones débiles del TCR. Este tipo de estimulación resulta predominantemente en la formación de la forma 21kD de  $\zeta$  y una cantidad reducida de la forma 23kD. De esta manera el estado de activación de una célula T puede estar determinado por la proporción entre las formas 21kD y 23kD de  $\zeta$  [94-98].

**Figura 7** Estructura de las proteínas tirosina quinasa ZAP-70 y Syk



### III.3 Las proteínas ZAP-70 y Syk en la señalización vía el TCR

La familia de proteínas tirosina quinasas Syk interviene en los eventos proximales de la activación del TCR. ZAP-70, Syk y SykB son los únicos miembros que componen esta familia. ZAP-70 posee una masa molecular de 70kD y Syk una de 72kD. SykB es una isoforma natural que ha sido detectada en ratones, ratas y en humanos [99-101]. Las Syk quinasas son responsables de la amplificación de las señales iniciadas por la unión del TCR con el ligando y la acción de la Lck y Fyn [27, 46, 102]. En efecto, gracias a sus dominios SH2, ZAP-70 y Syk son capaces de unirse a los ITAMs fosforilados, y una vez activadas pueden interactuar con numerosas proteínas quinasas, adaptadoras y del citoesqueleto.

#### III.3.1. Estructura de ZAP-70 y Syk

ZAP-70 y Syk comparten entre sí varias características estructurales y de secuencia. Estas dos proteínas están compuestas de dos dominios SH2 en "tándem", separados entre si por un interdominio A y ubicados en la parte amino-terminal (N-terminal) de la proteína. Seguido a los dominios SH2 se localiza el interdominio B y después de este, el dominio catalítico o dominio quinasa responsable de la actividad de las proteínas [27]. La estructura de estas dos proteínas son ilustradas en la figura 7.

##### III.3.1.a. Dominios SH2 en tandem

Los dominios SH2 son dominios globulares de unos 100 amino ácidos [69]. Cada uno puede funcionar independientemente y unirse a proteínas fosforiladas sobre tirosina utilizando dos sitios de unión adyacentes: un sitio une la tirosina fosforilada y el otro determina la especificidad uniéndose a residuos cercanos. Las bases moleculares por las cuales los dominios SH2 pueden unirse a los ITAMs fosforilados han sido establecidas gracias a la cristalización de los SH2 de ZAP-70 unidos la cadena  $\zeta$  del TCR [103]. Así se pudo determinar que los dominios SH2 de ZAP-70 son capaces de formar sitios específicos de interacción con tirosinas fosforiladas. La zona de unión a fosfo-tirosinas del SH2 N-terminal necesita de la contribución de amino ácidos provistos por el SH2 carboxi-terminal(C-terminal) adyacente [103, 104]. De esta manera, los dominios SH2 de ZAP-70 son capaces de unirse de manera cooperativa a los ITAMs fosforilados, y esto es una característica de las más distintivas de ZAP-70 [103-106]. Los dominios SH2 de ZAP-70 y Syk son semejantes y los mismos presentan una similitud de secuencia de más de 56%. Al igual que ZAP-70, Syk posee dos dominios SH2 en "tandem" y las secuencias críticas son conservadas, incluyendo los residuos de unión a las tirosinas fosforiladas

[103, 107]. La unión cooperativa de los dominios SH2 de Syk con los fosfo-ITAMs ha sido demostrada, y aunque la estructura cristalizada de los mismos aún no ha sido obtenida es posible que el SH2 C-terminal de Syk contribuya con la estructura del SH2 N-terminal [105, 106].

### **III.3.1.b. El interdominio A**

Entre los dos dominios SH2 se encuentra una secuencia denominada interdominio A. Esta secuencia es la región más conservada entre ZAP-70 y Syk, con más de 65% de amino ácidos idénticos [27]. En ZAP-70, el interdominio A forma una estructura plegada que estabiliza la interacción del dominio SH2 C-terminal con el SH2 N-terminal [103]. El interdominio A también podría ser importante en las interacciones inter- o intramoleculares que regulan la actividad quinasa de ZAP-70, la dimerización durante la unión con el TCR, o la asociación con otras proteínas celulares [103].

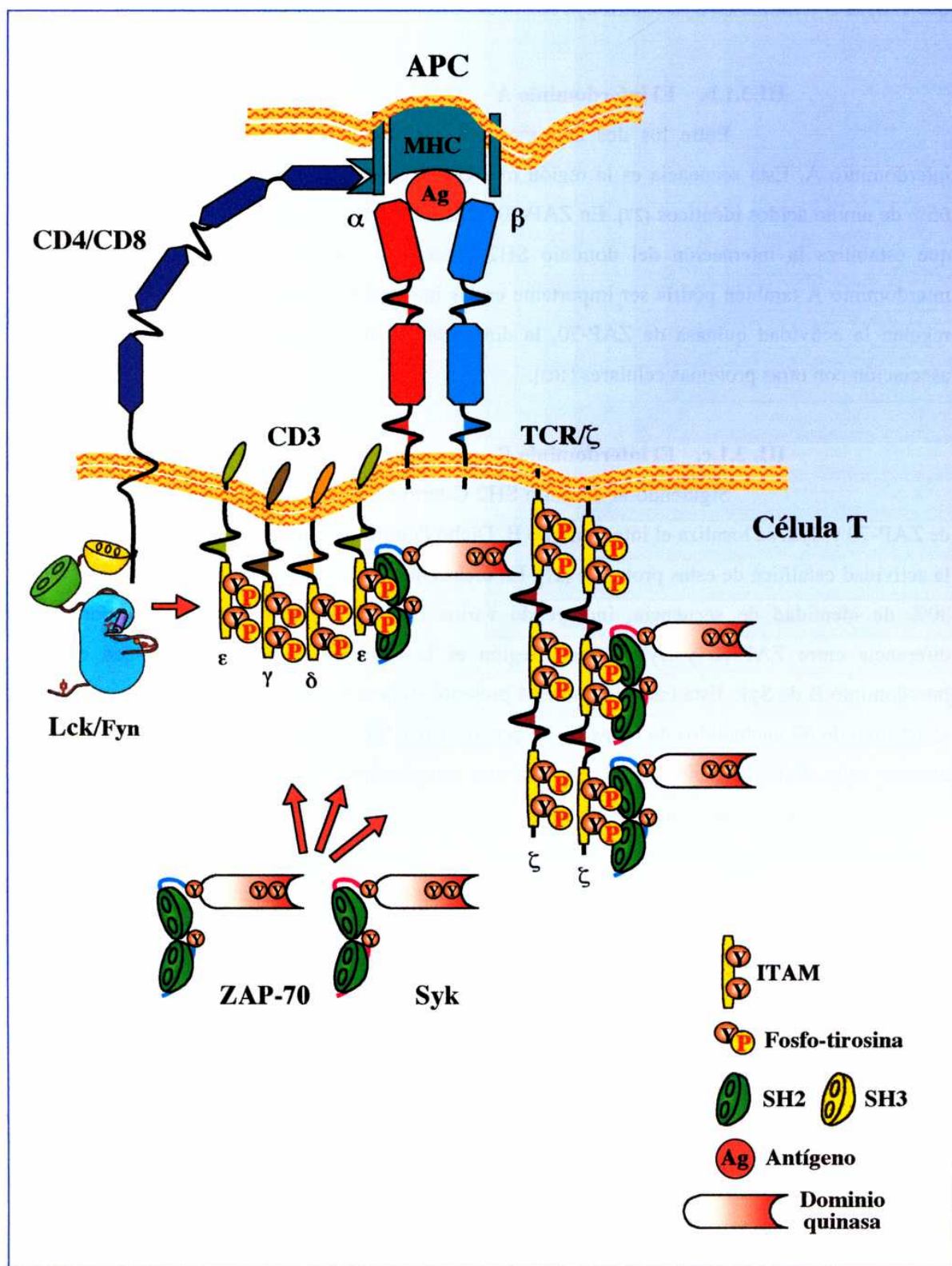
### **III. 3.1.c. El interdominio B**

Siguiendo al dominio SH2 C-terminal y precediendo al dominio quinasa de ZAP-70 y Syk, se localiza el interdominio B. Dicho dominio es importante en la regulación de la actividad catalítica de estas proteínas [27]. En dichas quinasas, el interdominio B presenta solo 30% de identidad de secuencia, incluyendo varios residuos tirosina [108]. Una importante diferencia entre ZAP-70 y Syk en esta región es la inserción de 23 amino ácidos en el interdominio B de Syk. Esta inserción no está presente en la isoforma SykB debido al "*splicing*" alternativo de 69 nucleótidos de un exón del gen *syk* [100]. Sin embargo en todas estas proteínas, muchos sitios de fosforilación sobre tirosina están conservados y pueden desempeñar funciones similares [27]. Las tirosinas presentes en este interdominio pueden regular de manera positiva o negativa la actividad quinasa de ZAP-70 y Syk, y como veremos más tarde, el estado de las mismas será importante para la interacción con diferentes moléculas de señalización.

### **III.3.1.d. El dominio quinasa**

El dominio quinasa se sitúa antes del extremo C-terminal de las proteínas ZAP-70 y Syk. El mismo es activado por la fosforilación de las tirosinas comprendidas en su secuencia. Los dominios quinasa de ZAP-70 y Syk son muy similares, con 60% de identidad de secuencia, incluyendo los sitios de fosforilación. El alto grado de conservación de las tirosinas presentes en este dominio sugiere que en estas dos proteínas la actividad catalítica es regulada de manera similar.

**Figura 8** Interacción de ZAP-70 y de Syk con los ITAMs fosforilados durante la activación del TCR



### III.3.2. Interacción de ZAP-70/Syk con los ITAMs

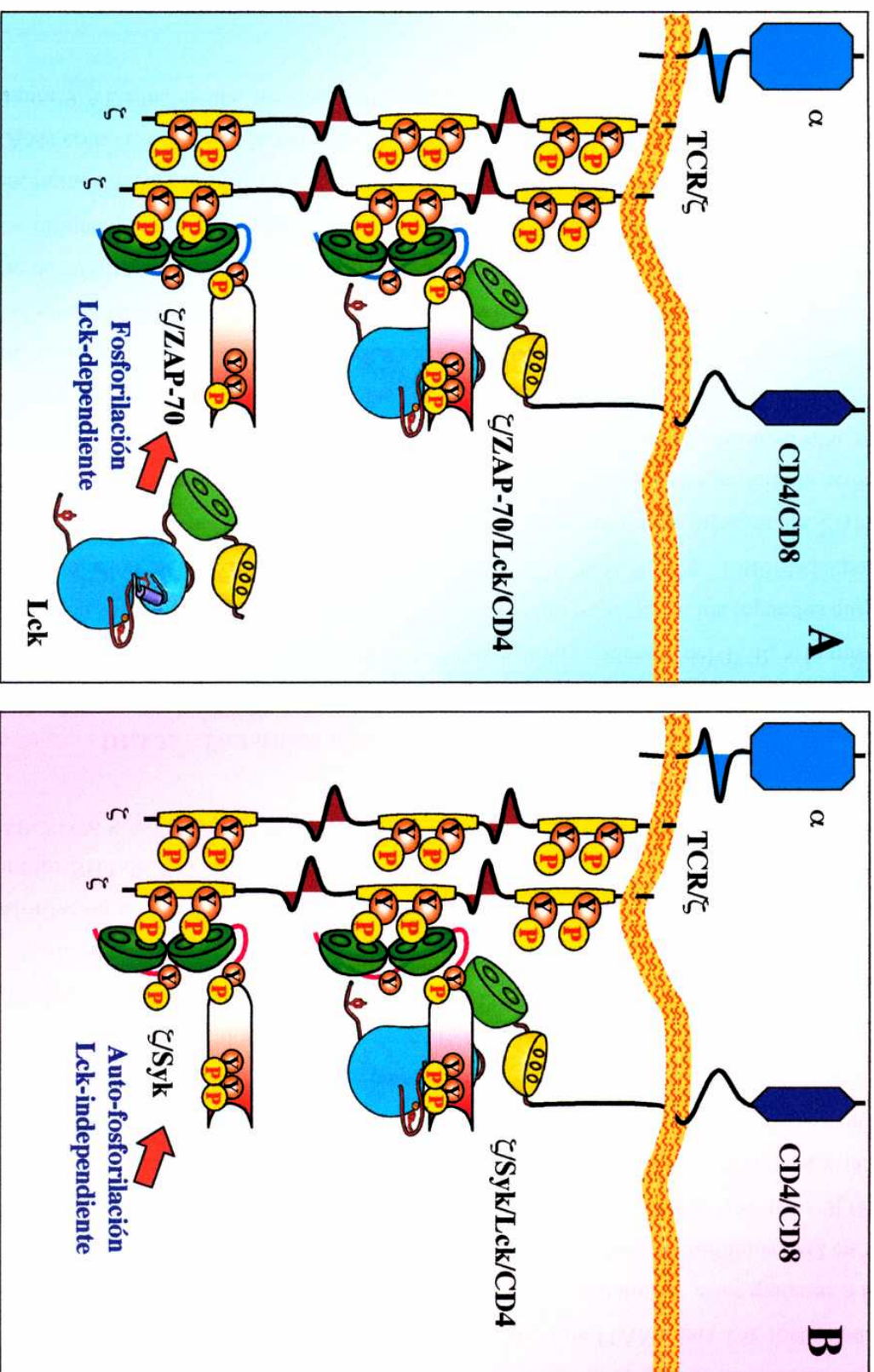
Como ha sido descrito anteriormente, uno de los pasos iniciales durante la activación del TCR es la fosforilación de los ITAMs. Los ITAMs una vez fosforilados sirven como sitios de unión para las proteínas ZAP-70 y/o Syk. La unión de estas quinasas a los fosfo-ITAMs se efectúa mediante una interacción de gran afinidad entre los dominios SH2 en "tándem" de ZAP-70/Syk y las dos tirosinas fosforiladas presentes en cada ITAM [104, 109-113] (Figura 8). Las afinidades de ZAP-70 y Syk para unirse a los ITAMs *in vitro* son similares y las mismas oscilan entre 10 y 50 nM [106, 110, 114]. La separación existente entre dos ITAMs presentes en una misma cadena del TCR es importante para que la interacción sea óptima [103]. La unión requiere la presencia de los dos dominios SH2 de ZAP-70 y Syk, ya que los dominios SH2 N-terminal y C-terminal solos son incapaces de unirse a los ITAMs fosforilados [115].

Como vimos anteriormente, la naturaleza del antígeno puede determinar el grado de fosforilación de los ITAMs del TCR, y sus diferentes formas crean diversas opciones de unión para los SH2 de ZAP-70 y Syk. La naturaleza de estas uniones determinará la conformación de ZAP-70 y/o Syk y regulará de manera indirecta el estado de activación de las mismas [116].

### III.3.3. Fosforilación de ZAP-70 y Syk

En diferentes poblaciones de células T incluyendo timocitos, linfocitos y líneas celulares T, ZAP-70 esta asociada constitutivamente con la cadena  $\zeta$  del TCR, y la misma no es fosforilada sobre tirosina hasta que el TCR sea estimulado [92, 117]. En los segundos que siguen a la estimulación del TCR, ZAP-70 asociada a  $\zeta$  (ZAP-70/TCR/ $\zeta$ ) es fosforilada por la Lck presumiblemente sobre la Y493, aunque no se descarta que otras tirosinas de ZAP-70 sean fosforiladas en esta instancia (Figura 9-A). La fosforilación de la Y493 permite la activación de ZAP-70 proporcionándole además la capacidad de autofosforilarse y transfosforilar moléculas cercanas, incluyendo otras moléculas de ZAP-70 asociadas a los ITAMs [118]. Casi simultáneamente a esta primera fosforilación se produce la fosforilación de las tirosinas presentes en el interdominio B de ZAP-70, y entre las más relevantes, la fosforilación de la Y319 que es un sitio de interacción con el dominio SH2 de la Lck. Esta fosforilación favorece el reclutamiento de esta última quinasa al complejo ZAP-70/TCR/  $\zeta$  (Figura 9-A). De esta manera, una mayor concentración de Lck asociada a este complejo hace posible la fosforilación completa de los ITAMs como así también la unión al TCR y fosforilación de nuevas moléculas de ZAP-70 [119] (Figura 9-A). Finalmente, tirosinas que regulan negativamente la actividad de ZAP-70 también

**Figura 9** Mecanismos de fosforilación de ZAP-70 y de Syk



son fosforiladas precozmente y las mismas interactúan con diferentes sustratos modulando la intensidad de la respuesta al antígeno (ver ítem III.3.4. de este capítulo).

La fosforilación y activación de Syk en células T primarias ha sido menos estudiada, en gran parte dado a la escasa expresión de la proteína en estas células. No obstante se sabe que solo la unión de sus dominios SH2 con los ITAMs fosforilados es suficiente para que la proteína sea fosforilada [110, 120], independientemente de la participación de la Lck [121-125] (Figura 9-B). Esta propiedad de Syk se debería a su habilidad para fosforilar la cadena  $\zeta$  del TCR [126], lo cual permitiría su posterior reclutamiento y auto- o trans-fosforilación presumiblemente sobre su tirosina 526 [123, 127]. Sin embargo, la capacidad de Syk para fosforilar  $\zeta$  es motivo de controversia dado que otros grupos han demostrado que los ITAMs no son buenos sustratos *in vitro* de las Syk quinasas (Weiss A datos sin publicar y [123]). Si bien la proteína puede activarse sin la intervención de la Lck, es claro que esta última ejerce un efecto muy positivo sobre el estado de fosforilación de Syk [128]. Por último, la secuencia de eventos posteriores a la fosforilación de la Y526 serían similares a los descritos para ZAP-70.

En conclusión, la activación de ZAP-70 y/o Syk vía el TCR requiere la presencia de ITAMs fosforilados y la actividad de las Src quinasas. Estas dos familias de tirosinas quinasas, asociadas al complejo TCR, proveen el sitio de anclaje para numerosas moléculas implicadas en la transducción de señales. Una vez fosforiladas, ZAP-70 y/o Syk pueden asociarse a diversas proteínas que contengan dominios SH2, permitiendo la activación de las mismas y la continuidad de la cascada de transducción de señales.

### III.3.4. La regulación de la actividad quinasa de ZAP-70 y de Syk

La actividad quinasa de ZAP-70 y Syk esta determinada por la fosforilación de tirosinas presentes en sus diferentes dominios, las cuales pueden regular positiva o negativamente la actividad catalítica de estas quinasas. Estas tirosinas como así también sus posiciones en los diferentes dominios de ZAP-70 y de Syk son ilustradas en la figura 10.

En el interdominio A de las Syk quinasas se localiza una tirosina conservada la cual sería un importante regulador de la estabilidad de los dominios SH2 en tandem. Dicho residuo es la Y126 de ZAP-70 y la Y130 de Syk [129]. A partir de la estructura cristalizada de los SH2 de ZAP-70 unidos a la cadena  $\zeta$  del TCR se pudo determinar que estas tirosinas se localizan en la parte central del interdominio A, lo que les permite quedar bien expuestas y accesibles a la acción de otras proteínas tirosina quinasas [103]. En el caso de Syk, la sustitución de la Y130 por fenilalanina (F) o ácido glutámico (E) afecta la activación y la unión de la proteína con los

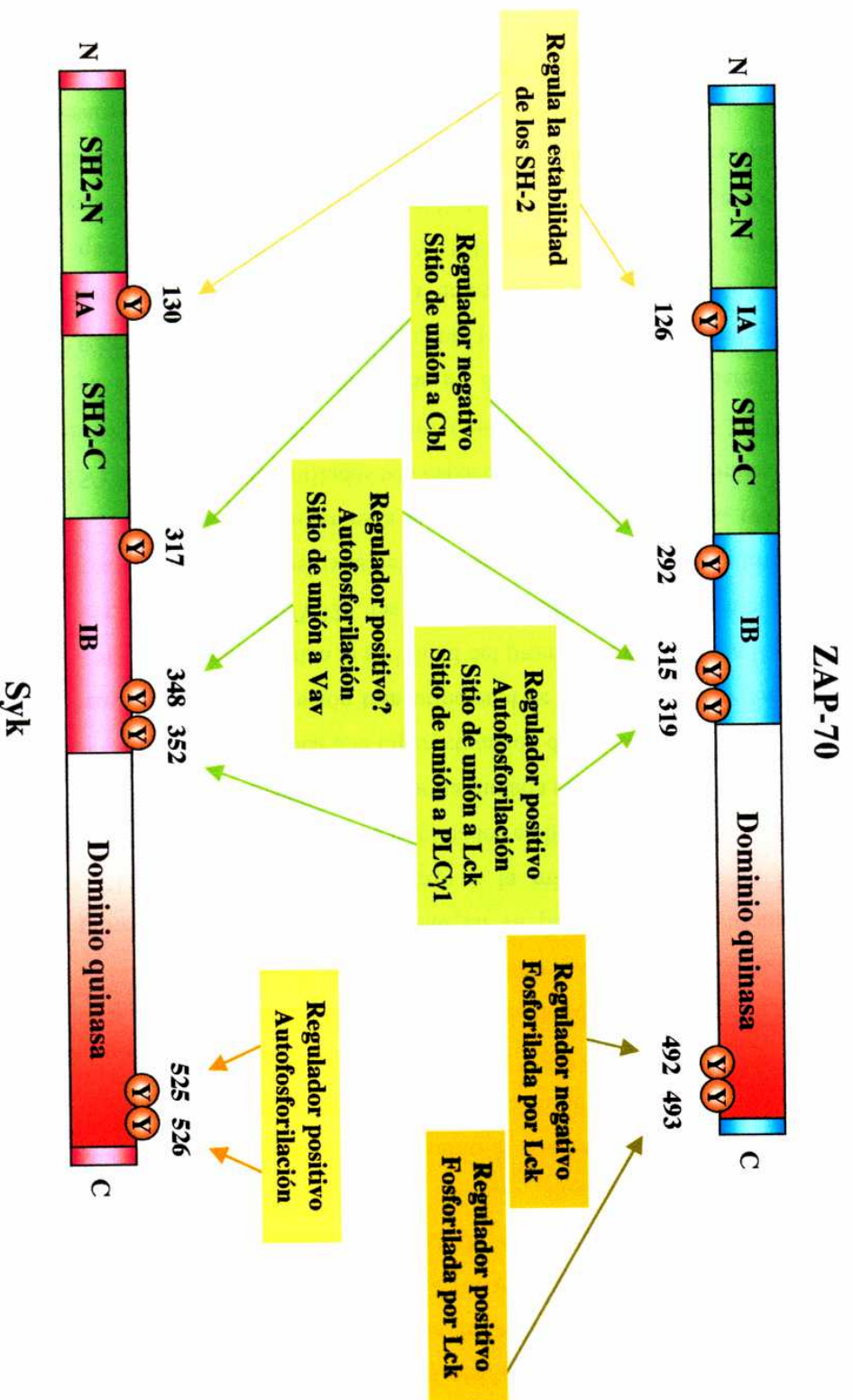
ITAMs [129]. Estos datos sugieren que estas tirosinas pueden determinar el estado de plegamiento del interdominio A, regulando de esta manera la unión de los dominio SH2 a los ITAMs fosforilados.

En el interdominio B se localizan tres residuos tirosina sumamente importantes para la regulación de la actividad de las Syk quinasas. En experimentos realizados con una mutante de ZAP-70 donde la mayor parte del interdominio fue eliminada, se demostró que si bien éste no es requerido para la señalización mediada por ZAP-70, su presencia regula la actividad de la quinasa [130].

Las tirosinas presentes en el interdominio B son rápidamente fosforiladas luego de la activación del TCR, y las mismas permiten la interacción de ZAP-70 y/o Syk con moléculas que contienen dominios SH2. Una de estas tirosinas es la Y292 de ZAP-70, la cual corresponde a la Y323 de Syk. Una vez fosforilada, Y292/Y323 actúa como un regulador negativo de la activación y es capaz de unirse a la proteína cbl (*Casitas B-lineage lymphoma protein*) [131-135]. Cbl es una proteína adaptadora que contiene en su parte N-terminal dominios de unión a fosfotirosinas PTB (*Phosphotyrosine Binding*) y la misma interviene en la ubiquitinación, internalización y procesamiento lisosomal implicados en la degradación de receptores y proteínas [136, 137]. La expresión en células T de una forma mutada de ZAP-70 donde la Y292 es sustituida por F292 (ZAP-70-Y292F), provoca una hiperactivación de la célula en respuesta al estímulo del TCR, con un aumento en la activación transcripcional de NF-AT (*Nuclear factor of activated T cells*), y de los elementos que regulan la actividad del promotor del gen de la IL-2 [132, 133, 135].

Contrariamente a la Y292/Y323, las otras dos tirosinas presentes en el interdominio B de ZAP-70 y Syk son reguladores positivos de la activación vía el TCR. Estas tirosinas son la Y315 y la Y319 de ZAP-70, correspondientes a la Y348 y a la Y352 de Syk, respectivamente. Las tirosinas Y315/Y348 una vez fosforiladas son capaces de unirse a los dominios SH2 de la PLC- $\gamma$ 1 (*Phospholipase- $\gamma$  1*) y de Vav [138-140]. El rol funcional de la Y315 de ZAP-70 es motivo de controversia ya que los resultados obtenidos en diferentes líneas celulares transfectadas con mutantes ZAP-70-Y315F son confusos [130, 140-143]. Recientemente, trabajos realizados con ratones transgénicos llevando en sus células T una variante única del TCR (TCR H-Y) [144, 145] demostraron que la expresión de ZAP-70-Y315F reduce la selección positiva y retarda la selección negativa durante el desarrollo de los linfocitos T [146, 147]. Sin embargo, cuando estos autores estudiaron los efectos de ZAP-70-Y315F en otras líneas de ratones con un TCR diferente al H-Y, el desarrollo de las células T no fue afectado [146, 147]. No obstante, en los timocitos de estos animales se observaron defectos en la activación inducida por el TCR de la quinasa Erk

**Figura 10** Tirosinas reguladoras homólogas en ZAP-70 y en Syk



(*extracellular signal-regulated kinase*) y una disminución en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ . Además se demostró que la afinidad de la Y315F de ZAP-70 para unirse con los ITAMs fue inferior a la de la forma "wild-type" de la proteína, sin que su actividad quinasa se viera afectada [146-148]. Estos resultados sugieren que la Y315 de ZAP-70 (y probablemente la Y348 de Syk) desempeñarían un rol selectivo sobre los dominios SH2 de estas proteínas [148].

La Y319 de ZAP-70 y su correspondiente Y352 de Syk, regulan positivamente la activación de la célula T. La función más importante que se le atribuye a estas tirosinas es la de unirse con el dominio SH2 de las Src quinasas. En efecto, ZAP-70 y Syk son capaces de formar un complejo estable con la Lck, luego de la estimulación del TCR [119, 149]. La mutación Y319F en ZAP-70 conduce a una drástica reducción de la fosforilación y consecuente activación de la proteína [120, 141]. Además, la sobre-expresión de ZAP-70-Y319F en células T reduce severamente la fosforilación de los sustratos de ZAP-70, LAT (*linker for activation of T cells*) y SLP-76 (*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD*), y la activación dependiente del TCR de NF-AT como así también la producción de IL-2 [141]. El hecho que la mutación Y319F provoque una importante disminución de las funciones de ZAP-70 y que la interacción Lck-ZAP-70 desempeñe un rol crítico en la señalización vía el TCR sugiere que la Y319 es un sitio de unión a la Lck. Esta posibilidad fue confirmada por Pelosi *et al*, al descubrir que efectivamente la Y319 de ZAP-70 se une al dominio SH2 de Lck, posibilitando el acceso de la Lck al dominio quinasa de ZAP-70 y la fosforilación de las tirosinas activadoras localizadas en el mismo [150]. Finalmente, los trabajos realizados en ratones transgénicos ZAP-70<sup>-/-</sup> + ZAP-70-Y319F confirman la importancia de esta tirosina en la función de ZAP-70. En estos ratones se observó que un bloqueo parcial en la maduración de los timocitos a nivel del estadio DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> [146].

El dominio quinasa de ZAP-70 y Syk contiene sitios de regulación bien conservados, los cuales se localizan en el "loop" de activación. Estos sitios corresponden a los residuos tirosina Y492/Y493 de ZAP-70 y los residuos Y525/Y526 de Syk. En la literatura estas dos últimas tirosinas pueden encontrarse como Y519/Y520 (Syk murina) o Y518/Y519 (Syk porcina) [151]. Estos residuos tirosina presentes en el dominio quinasa de ZAP-70 y Syk son fosforilados por las Src quinasas o por auto-fosforilación en el caso de Syk, una vez que la célula ha sido activada [120, 127]. La mutación de la Y525F y/o Y526F reduce considerablemente la actividad de Syk, indicando que estas dos tirosinas son críticas para las funciones de esta proteína. En linfocitos B estimulados vía el receptor de células B (BCR), las tirosinas Y525 e Y526 de Syk son rápidamente fosforiladas y las mismas sirven como sitios de interacción de proteínas que poseen

dominios SH2 [105]. En un trabajo reciente se demostró que las Y525 e Y526 también son esenciales para la activación de la fosfolipasa D (PLD) [152]. La fosforilación de las tirosinas 492 y 493 de ZAP-70 regula la actividad catalítica de la proteína, y la mutación de las mismas afecta múltiples señales provistas por el TCR [153]. Las mutantes ZAP-70-Y492F y ZAP-70Y493F son capaces de asociarse a los ITAMs fosforilados, indicando que las mismas no son esenciales para la asociación de ZAP-70 con el TCR [153]. La fosforilación de las tirosinas 492 y 493 ocurre de manera secuencial. La Y493 es fosforilada en primer lugar y su fosforilación es necesaria para la activación y función ZAP-70. En efecto, ZAP-70-Y493F es incapaz de reconstituir la señalización vía el BCR en la línea celular B "avaria" DT40, deficiente en Syk [120]. La fosforilación de la Y492 ocurre después y la misma regula negativamente la actividad de ZAP-70. Este descubrimiento se obtuvo de experimentos realizados con la mutante ZAP-70-Y492F, que demostraron que esta mutación aumenta la activación de ZAP-70 y provoca un considerable incremento en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ , en la acumulación de IP1, IP2 e IP3, en la actividad transcripcional de AP-1 (*Activator protein 1*), y en la actividad del promotor de la IL-2 [120, 132].

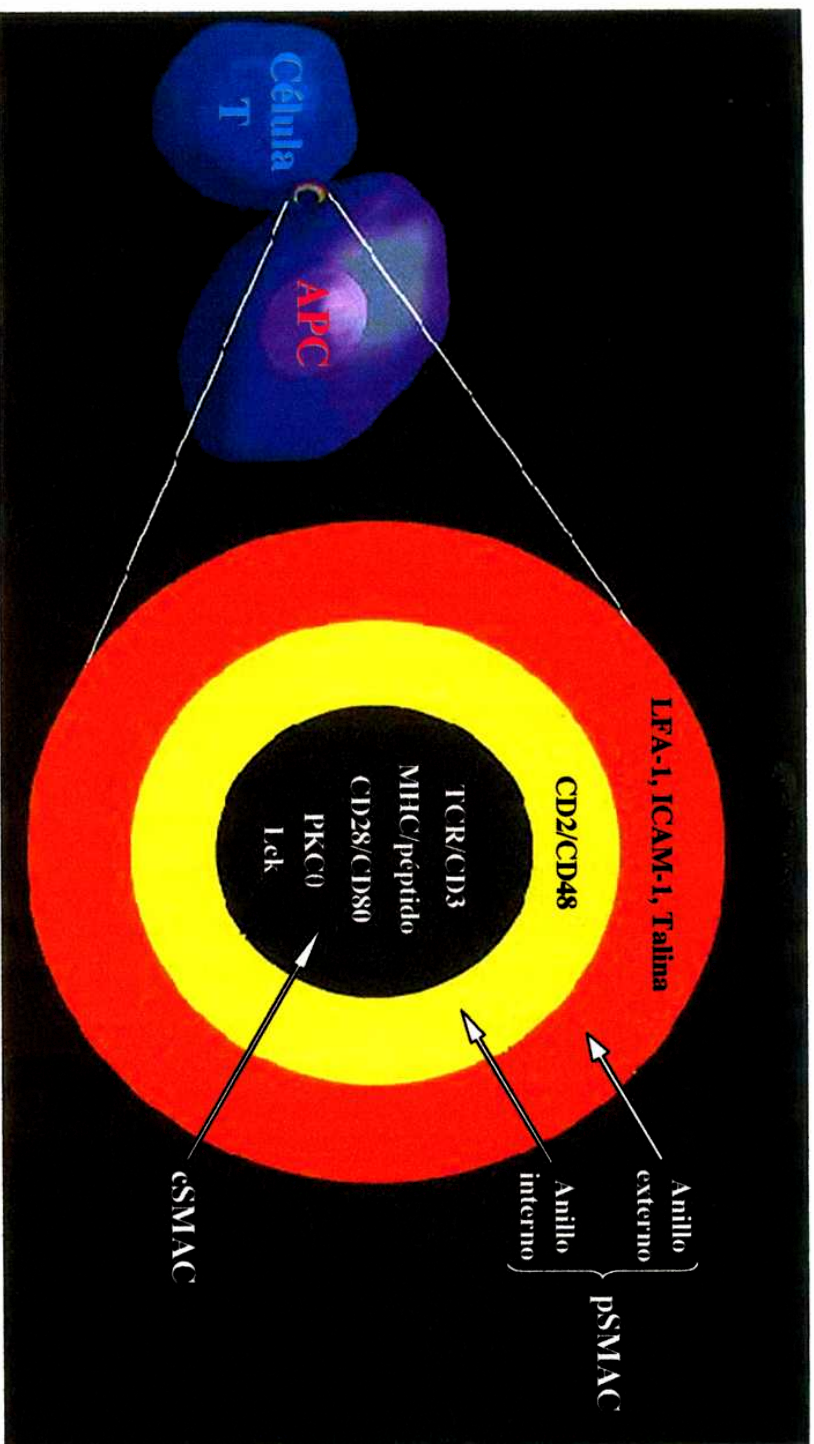
En conclusión, los diferentes residuos tirosinas presentes en los diversos dominios de ZAP-70 y Syk median la activación y regulan positiva o negativamente las funciones de estas proteínas en la diferenciación y activación de los linfocitos T.

### III.3.5. Sustratos y proteínas que interactúan con ZAP-70 y Syk

La fosforilación de ZAP-70 y/o Syk sobre las distintas tirosinas que forman parte de sus secuencias, permite a estas quinasas interactuar con múltiples moléculas implicadas en la transducción de señales y fosforilarlas. Dos de los más importantes sustratos de ZAP-70/Syk son los adaptadores LAT y SLP-76, que son importantes organizadores de la transducción de señales vía el TCR [24, 154] (ver ítem V. de este capítulo). Una vez que ZAP-70/Syk han sido activadas, LAT es fosforilada sobre tirosina y se convierte en un sitio de unión clave para múltiples proteínas importantes en la señalización [155]. Por su parte, la fosforilación de SLP-76 por ZAP-70/Syk hace posible que este adaptador interactúe con Vav, Gads (*Grb-2-related adapter downstream of Shc*), Itk (*inducible T cell kinase*), LAT y Grb-2 (*Growth factor receptor binding-2*) [156].

Otro importante sustrato de ZAP-70/Syk es la PLC- $\gamma$ 1. Al interactuar con LAT fosforilada, esta quinasa queda expuesta y accesible para que ZAP-70/Syk pueda unirse. Luego de que esta interacción ha tenido lugar la PLC- $\gamma$ 1 es activada por ZAP-70/Syk y probablemente

**Figura 11** Esquema de un corte transversal de la región de contacto entre la célula T y la APC durante la sinapsis inmunológica



*Adaptación realizada a partir de Nel AE., 2002a.*

por la acción de las quinasas Tec. La fosforilación de la PLC- $\gamma$ 1 es indispensable para activar la cascada de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

ZAP-70 y Syk pueden unirse con la proteína cbl y fosforilarla por acción de sus dominios quinasas [131-135]. Este evento de fosforilación regula negativamente la transducción de las señales vía el TCR [134, 157-160]. También ZAP-70 y Syk una vez fosforiladas son capaces de unirse al dominio SH2 de Vav y de fosforilar la proteína [139, 140, 161]. Vav una vez fosforilada, interviene en la activación de la cascada de las JNK quinasas y en la reorganización de la actina del citoesqueleto [162].

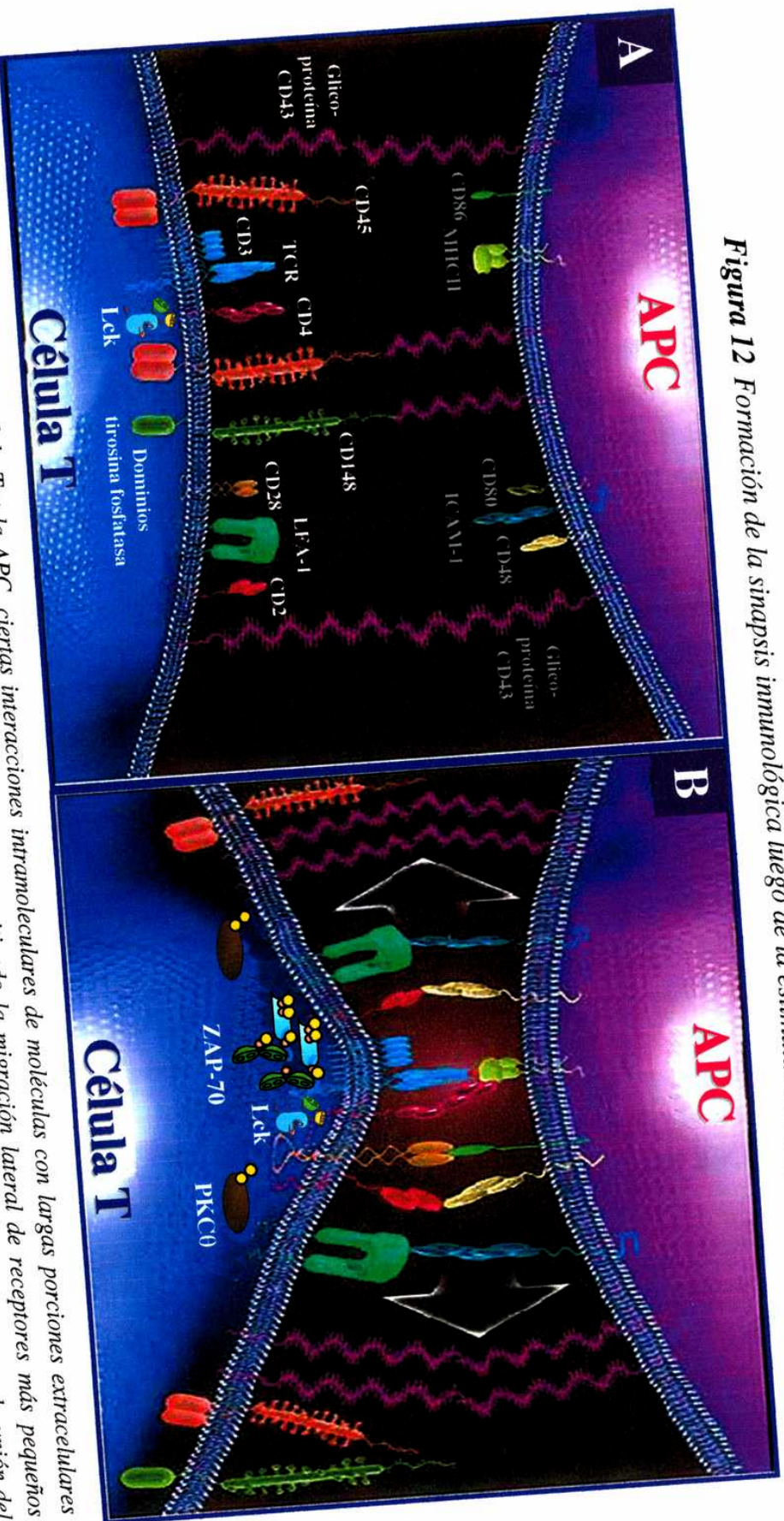
Aunque muchos otros sustratos sensibles a ser fosforilados por ZAP-70 y/o Syk *in vivo* aún no han sido bien caracterizados, un número considerable de moléculas son fosforiladas por estas dos quinasas *in vitro*. Los sustratos *in vitro* son: MBP (*myelin basic protein*), band 3 (*erythrocyte band 3 protein*), tubulina, y la histona H2B, entre otros [151].

Muchas otras moléculas implicadas en la transducción de señales del TCR han sido vinculadas con las quinasas Syk, algunas como blancos de fosforilación y otras de interacción, sin embargo, aún quedan muchos interrogantes por dilucidar cuales son los sustratos directos de ZAP-70 y Syk en las células T.

#### IV. Formación de la sinapsis inmunológica por activación del TCR

La activación de una célula T madura requiere la interacción del TCR y las moléculas del MHC, en el contexto de una unión organizada y especializada entre la célula T y una APC. Esta unión ha sido llamada "sinapsis inmunológica" [163, 164]. Concomitante con la activación, el área en la que se establece la unión se transforma en una plataforma altamente organizada que favorecerá la transmisión de las señales [165]. Receptores y proteínas intracelulares van a reagruparse en la zona de contacto entre la célula T y la APC, dentro de dos diferentes dominios organizados espacialmente llamados cSMAC (*central Supramolecular Activation Clusters*) y pSMAC (*peripheral SMAC*) [165]. El cSMAC presenta una importante concentración de TCRs y de las moléculas de co-estimulación CD2 y CD28. En el pSMAC se localizan integrinas tales como LFA-1 y proteínas del citoesqueleto como por ejemplo la talina [166] (Figura 11). La formación de estas dos zonas comienza a detectarse pasados los 5 minutos de iniciado el contacto entre la célula T y la APC [167]. Antes de la formación de esta estructura, una serie de eventos de señalización tales como un aumento en la fosforilación sobre tirosina de proteínas intracelulares, un incremento en las niveles de  $([\text{Ca}^{2+}]_i)$ , una defosforilación de moesina y cambios a nivel del

**Figura 12** Formación de la sinapsis inmunológica luego de la estimulación del TCR



**A-** Previo al contacto entre la célula T y la APC, ciertas interacciones intramoleculares de moléculas con largas porciones extracelulares (fosfatasa y glicoproteínas) proporcionan un espacio entre las dos células permitiendo la migración lateral de receptores más pequeños (ubiquados en la membrana, los cuales pueden agruparse entre sí. **B-** Cuando la célula T entra en contacto con la APC gracias a la unión del TCR y del CD4 con el antígeno presentado por el MHCII de la APC, las fosfatasa con porciones extracelulares largas (ej: CD45), son excluidas de la zona de contacto permitiendo la interacción entre integrinas, receptores y coreceptores presentes en ambas células. Estas nuevas interacciones favorecen el surgimiento de una actividad quínasa predominante en la región del contacto, lo cual desencadena la activación de diferentes moléculas de señalización (ej: ZAP-70, PKC $\theta$ , etc) y la formación de los SMACs. (Adaptación a partir de Nel AE..2002a)

citoesqueleto pueden ser detectados en las células T en los segundos que siguen al estímulo recibido por el TCR [168-171]. Varios trabajos han demostrado que durante el inicio de la sinapsis, los TCRs son capaces de agruparse en un pequeño "cluster", en la periferia de la zona de contacto entre la célula T y la APC [172-174]. Recientemente se demostró que estos "clusters" son sumamente dinámicos y agrupan diversas proteínas implicadas en la señalización vía este receptor, entre las cuales se citan ZAP-70, LAT, Grb-2, Gads y SLP-76 [175]. Estas estructuras de señalización conforman una protosinapsis previa a la formación de los SMAC y al establecimiento de la sinapsis inmunológica [175].

La formación y organización de la sinapsis inmunológica, incluido el establecimiento de los SMACs, requiere la participación de receptores de coestimulación y de proteínas del citoesqueleto [165, 176, 177] (Figura 12-A). Las interacciones entre las moléculas de las células T CD28, CD2 y LFA-1 con sus ligandos presentes en las APCs, CD80, CD48/LFA-3 e ICAM-1, respectivamente, estabilizan la unión del TCR con el antígeno y provocan la eliminación de la zona de contacto de proteínas con regiones extracelulares largas [53]. Entre 5 y 10 minutos luego del contacto con la APC, moléculas como la glicoproteína CD43 o la fosfatasa CD45 son excluidas del cSMAC [178, 179]. Esta exclusión de CD45 favorece un aumento de la fosforilación de proteínas en el seno de la sinapsis, como por ejemplo ZAP-70 y PKC $\theta$  [180] (Figura 12-B).

Los "rafts" lipídicos también participan en la sinapsis inmunológica y los mismos han sido implicados en la adhesión celular y en la señalización. Estas estructuras también llamadas GEMs (*Glycolipid-enriched membranes*) o DIGs (*Detergent-insoluble glycolipid structures*) son microdominios de membrana ricos en glicoesfingolípidos y colesterol, y bioquímicamente se definen como una fase lipídica organizada insoluble en bajas concentraciones de detergentes no iónicos a 4 °C [181]. Una importante cantidad de proteínas miristiladas, palmitoladas, acetiladas y unidas a fosfatidilinositol se localizan en los "rafts" y participan en eventos celulares como la traducción de señales [182]. Como fue mencionado anteriormente, Lck es una de ellas y reside en los "rafts" asociada con los coreceptores CD4 y CD8. Cuando esta proteína no es correctamente palmitoilada, no se localiza en los "rafts" y la señalización inducida por el TCR es defectuosa [183]. De manera similar, la localización en estas estructuras de LAT también es requerida para la transducción de las señales [184]. Otra proteína residente de los "rafts" es PAG, la cual desempeña un rol importante en la activación de las quinasas Src [66, 67].

Los "rafts" son recrutados hacia la sinapsis inmunológica gracias a la interacción del complejo TCR con el ligando, y a la participación de las moléculas CD28, CD2, CD5 y LFA-1 [177, 183, 185, 186]. Todas estas interacciones y cambios estructurales en el contexto de los SMACs

inducen una reorganización dinámica del citoesqueleto cortical [187, 188]. De este modo, la actina del citoesqueleto es polimerizada en la región de contacto del TCR, permitiendo la co-localización de proteínas citoesqueléticas [189]. El citoesqueleto desempeña un papel importante en el mantenimiento de la zona de contacto entre la célula T y la APC [188]. Además, el mismo juega un rol activo en la transducción de las señales, lo cual ha sido confirmado por el hecho que ciertas drogas que inhiben la polimerización de la actina interfieren en la activación de la célula T [190].

La formación de la sinapsis del TCR, incluyendo los dominios SMAC, proporciona una estructura estable la cual es utilizada por el TCR como un "andamio" para la activación de la célula T [165, 176, 191]. Este "andamio" permitirá una señalización sostenida y una transducción de señales coordinada que determinará el estado de activación de la célula T [192].

## V. Proteínas adaptadoras implicadas en la señalización vía el TCR

El proceso de activación de la célula T puede dividirse en dos etapas principales: *a*) una primera etapa en la cual transcurren los eventos iniciales de señalización que conducen a la fosforilación de las familias de proteínas tirosina quinasas Src y Syk y a la asociación de las mismas con el complejo TCR/CD3/ $\zeta$ ; *b*) una segunda etapa donde tienen lugar los eventos de señalización "downstream" los cuales finalizan con la activación de genes de diferentes citoquinas [193]. La expresión de inmunoreceptores y de las quinasas Src y Syk en células no linfoides no es suficiente para inducir la activación de otras moléculas que participan en la transducción de las señales, o para producir el aumento en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ . Estos defectos son debidos a la ausencia de ciertas proteínas capaces de conectar las señales precoces producidas por la estimulación del receptor y aquellas que ocurren tardíamente en la cascada de señalización [193]. Estas proteínas conocidas como "adaptadores" o "proteínas adaptadoras" no poseen dominios catalíticos o transcripcionales pero en cambio contienen múltiples motivos y dominios entre los que se encuentran los SH2, que permiten la interacción con diversas proteínas [156]. Gracias a esta característica las proteínas adaptadoras son capaces de crear diferentes combinaciones de complejos multiproteicos esenciales para transmitir las señales procedentes de los receptores periféricos [193]. Algunas de las proteínas adaptadoras implicadas en la transducción de señales de las células T son LAT, SLP-76, Grb-2, Gads, Cbl, Shc (*Src Homologous and Collagen-like*) y SLAP (*Src-like associated protein*), entre otras [156].

LAT desempeña un papel preponderante en la señalización vía el TCR. Este adaptador es una proteína transmembrana de 36kD, que posee una pequeña parte extracelular y una importante

región citoplásmica que contiene 9 motivos ricos en tirosina [155, 194]. LAT es fosforilada por ZAP-70 y/o Syk y es un sitio de unión para múltiples proteínas que poseen dominios SH2 [155]. LAT una vez fosforilada une a SLP-76 creando un complejo que sirve como sitio de anclaje para numerosas proteínas de señalización, permitiéndole a las mismas interactuar unas con otras en un contexto espacial definido [53].

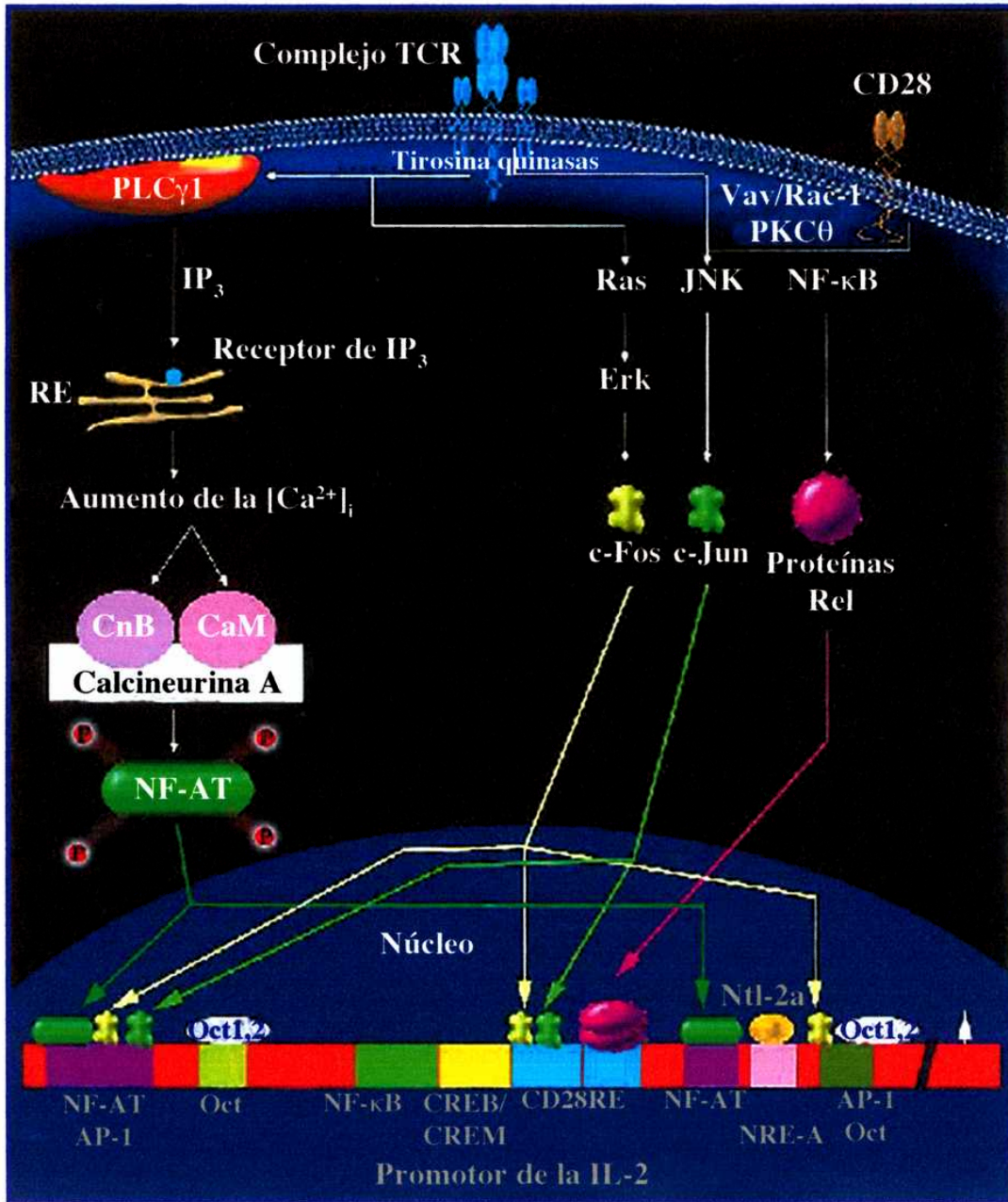
## VI. Cascadas de señalización “downstream” en la activación vía el TCR

Los eventos iniciales de señalización y el aumento en la actividad de diferentes quinasas conducen al reclutamiento, cambios conformacionales y activación de diferentes moléculas de señalización en la cercanía de la zona de contacto entre el TCR y el antígeno [30]. Los eventos de señalización más tardíos o “downstream” incluyen las familias de GTPasas Ras y Rho, las MAPK, la PI-3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*), las PKCs, las cascadas de señalización dependientes de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ , los inositolfosfolípidos (IP) y diversos factores de transcripción. La suma de los efectos causados por todos estos eventos provocará la activación de diferentes genes importantes para la célula T. Todas estas señales determinarán el destino de la misma, induciendo la apoptosis, la proliferación o bien un estado anérgico de estos linfocitos.

### VI.1. Renovación de inositolfosfolípidos, flujo de $[Ca^{2+}]_i$ y activación de PKC

La fosforilación de la proteína PLC- $\gamma$ 1 es uno de los mayores determinantes para la señalización intracelular por el  $Ca^{2+}$ , y las quinasas Lck, ZAP-70 y también miembros de la familia Tec de proteínas tirosina quinasa son responsables de dicha fosforilación [195]. Las proteínas adaptadoras LAT y SLP-76 contribuyen a la formación de un módulo de señalización donde la PLC- $\gamma$ 1 es reclutada y fosforilada [194, 195]. Mientras que LAT permite el reclutamiento de la proteína, SLP-76 posibilita el acercamiento de las quinasas Tec que ulteriormente junto con las Syk fosforilarán la PLC- $\gamma$ 1. Al mismo tiempo, el adaptador Gads se une a LAT y a SLP-76 estabilizando la unión entre estos adaptadores, las quinasas Tec y la PLC- $\gamma$ 1 [195]. La fosforilación de la PLC- $\gamma$ 1 conduce a su activación catalítica y al clivaje del fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PI-4,5- $P_2$ ) localizado a nivel de la membrana plasmática. Este clivaje genera inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), el cual induce la liberación de  $Ca^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico (RE). Una vez que el  $Ca^{2+}$  ha sido liberado completamente, canales de  $Ca^{2+}$  localizados en la membrana permiten el influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular [196]. La liberación secuencial de  $Ca^{2+}$  a partir de reservorios intra y/o extracelulares produce una aumentación constante de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que es

**Figura 13** Cascadas de señalización « downstream » durante la activación del TCR



Adaptación a partir de Nel AE, 2002a.

un importante inductor de la actividad transcripcional en el núcleo [31, 197]. El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es crítico para la activación dependiente de calcineurina A del promotor de la IL-2 [31, 197]. El  $Ca^{2+}$  activa la calcineurina A, que es una serina fosfatasa dependiente de calcio-calmodulina, capaz de defosforilar NF-AT [197, 198]. Luego NF-AT es translocado hacia el núcleo y se une a secuencias reguladoras situadas en el promotor de la IL-2 [31] (Figura 13).

Además de la PLC- $\gamma$ 1, otras proteínas tirosina quinasas regulan la renovación de IPs. Una de estas proteínas es la PI-3K, la cual esta compuesta por una sub-unidad reguladora de 85kD (p85) y una catalítica de 110kD (p110) [199-201]. A través de sus dominios SH2 presentes en la sub-unidad p85, la PI-3 quinasa es recrutada por LAT y por otras moléculas adaptadoras asociadas al TCR [199, 201]. Esta quinasa una vez activa fosforila los PI-4,5- $P_2$  y PI-4-P convirtiéndolos en PI-1,4,5- $P_3$  y PI-4,5- $P_2$ , respectivamente [202]. Estos IPs fosforilados localizados en la membrana plasmática sirven como sitios de unión para diversas proteínas, como por ejemplo PLC- $\gamma$ 1 y Tec, contribuyendo igualmente a la regulación de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  [203]. Por otra parte, la PI-3K es también responsable de la activación de la quinasa de serina y treonina akt (también conocida como proteína quinasa B), que juega un importante rol en la supervivencia celular y en el control del ciclo celular [204, 205].

## VI.2. Regulación de P21ras y de la cascada de las MAPKs

La proteína Ras juega un rol esencial en la activación del gen de la IL-2 y en la proliferación celular [206]. La estimulación del TCR conduce a una rápida acumulación de la forma activa de Ras la cual se encuentra unida a GTP (*guanine trisphosphate*) en la vecindad de la membrana plasmática [207, 208]. El ciclo de unión de Ras al nucleótido guanina es controlado por los factores GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) y por proteínas activadoras de GTPasas. Los GEFs inducen la activación de Ras mientras que las activadoras de GTPasas estimulan la actividad GTPasa intrínseca a esta proteína. Esta actividad cataliza la hidrólisis de GTP y los productos de la misma inducirán la inactivación de Ras [207, 208]. De las diferentes vías de activación de Ras en células T, la mejor caracterizada es la que incluye a la proteína adaptadora Grb-2 y al GEF SOS (*Son and Sevenless*) [209]. Grb-2 se une a LAT por medio de sus dominios SH2, mientras que por el otro extremo interactúa con SOS. El complejo LAT/Grb-2/SOS estabiliza la interacción, permitiendo al factor SOS activar Ras. Esta última una vez activada interviene en múltiples vías efectoras incluyendo la activación de la cascada de las MAPKs y la interacción con las Rho-GTPasas [206, 210]. La activación de la MAPK Erk

comprende la serina-treonina quinasa Raf-1 y las quinasas MEK [210, 211]. Ras interactúa directamente con Raf-1 activándola y de manera compleja Erk es fosforilada y activada. Una vez activa, Erk juega un papel esencial sobre la activación de los factores de transcripción AP-1, c-Fos y c-myc [211]. Estos factores regulan la actividad del promotor del gen de la IL-2, como así también la de otros promotores presentes en genes de varias citoquinas (Figura 13).

Otras proteínas pertenecientes a las MAPKs son p38 y las quinasas JNK. De igual manera que Erk, las vías de señalización que implican p38 y JNK también intervienen en la transducción de señales del TCR [211-213]. Estas MAPKs son activadas por señales provenientes de la estimulación del TCR, pero su activación también es dependiente del co-receptor CD28. La activación de este último permite la creación de sitios de unión para la PI-3 quinasa y para Grb-2, como así también para el reclutamiento de JNK [214]. El mecanismo de activación de JNK no es bien conocido pero se piensa que la activación ocurre en la vecindad de la sinapsis del complejo TCR/CD28, por la acción de quinasas localizadas en este complejo. La Lck y la proteína Rac-1 son algunos de los candidatos que llevarían a cabo la activación de las JNKs [192]. JNK es requerida para la activación del promotor de la IL-2, en particular del elemento de respuesta a CD28, CD28RE (*CD28 response element*) [212, 213] (Figura 13). Estudios realizados en ratones demostraron que el blanco principal de la isoforma JNK2 de esta quinasa es el gen del INF- $\gamma$ , y la ausencia de esta MAPK impide el desarrollo de las células Th1 [215]. La isoforma JNK1 interfiere en el desarrollo de las células Th2. Esto ha quedado demostrado en estudios realizados en ratones JNK1-/- los cuales presentaron un incremento en la producción de IL-4 y IL-5 [216]. Esto puede ser explicado por la habilidad de JNK1 a incrementar la eliminación del núcleo de NF-AT, el cual es requerido para la activación del promotor de la IL-4 [216]. La quinasa p38 por su parte, también regula la expresión del gen de INF- $\gamma$  en las células Th1, sin embargo parecería no afectar a las células Th2 [211]. Esta MAPK desempeña un importante rol en la inducción de la apoptosis en las células Tc [211].

### VI.3. Regulación de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B

La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B son dímeros conformados por NF- $\kappa$ B y las proteínas rel. La molécula canónica de NF- $\kappa$ B consiste en un heterodímero formado por las subunidades p50 y p65/c-Rel o Rel-A. En células sin estimular, estos dímeros son secuestrados en el citoplasma por miembros catalíticamente activos de la familia de quinasas IKKs (*IKappaB Kinase*), I $\kappa$ B, impidiendo la localización nuclear de NF- $\kappa$ B. Cuando la célula es estimulada, las

proteínas I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  son fosforiladas sobre serina y treonina, ubiquitinadas y degradadas, lo que permite la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B [217, 218].

De manera similar a las quinasas JNK, la activación de NF- $\kappa$ B requiere de la participación del co-receptor CD28. El mecanismo de activación del NF- $\kappa$ B en las células T aún no ha sido bien clarificado, pero se sabe que la PKC $\theta$  participa en la fosforilación de las quinasas IKK [219-221] (Figura 13). Recientes descubrimientos han demostrado que esta isoforma de la PKC es capaz de asociarse con el TCR luego de la estimulación del receptor, y la misma puede ser detectada en el cSMAC durante la formación de la sinapsis inmunológica (Monks CR et al., 1998). Esta localización de PKC $\theta$  requiere de la participación de la proteína Vav, un factor de intercambio del nucleótido guanina que activa las Rho-GTPasas y que desempeña una importante función en la organización del citoesqueleto [220].

Una vez en el núcleo los componentes de NF $\kappa$ B inducen la activación transcripcional de genes que controlan la proliferación y la supervivencia celular [217, 218, 222]. El elemento CD28RE situado en el promotor del gen de la IL-2 es un blanco potencial de c-Rel, lo cual demuestra que NF $\kappa$ B también modula la expresión de esta citoquina [223]. Otro importante promotor sensible a la regulación por NF $\kappa$ B es el del gen bcl-x<sub>L</sub> [219]. bcl-x<sub>L</sub> es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, y la misma desempeñan un importante papel en el control de la apoptosis [224].

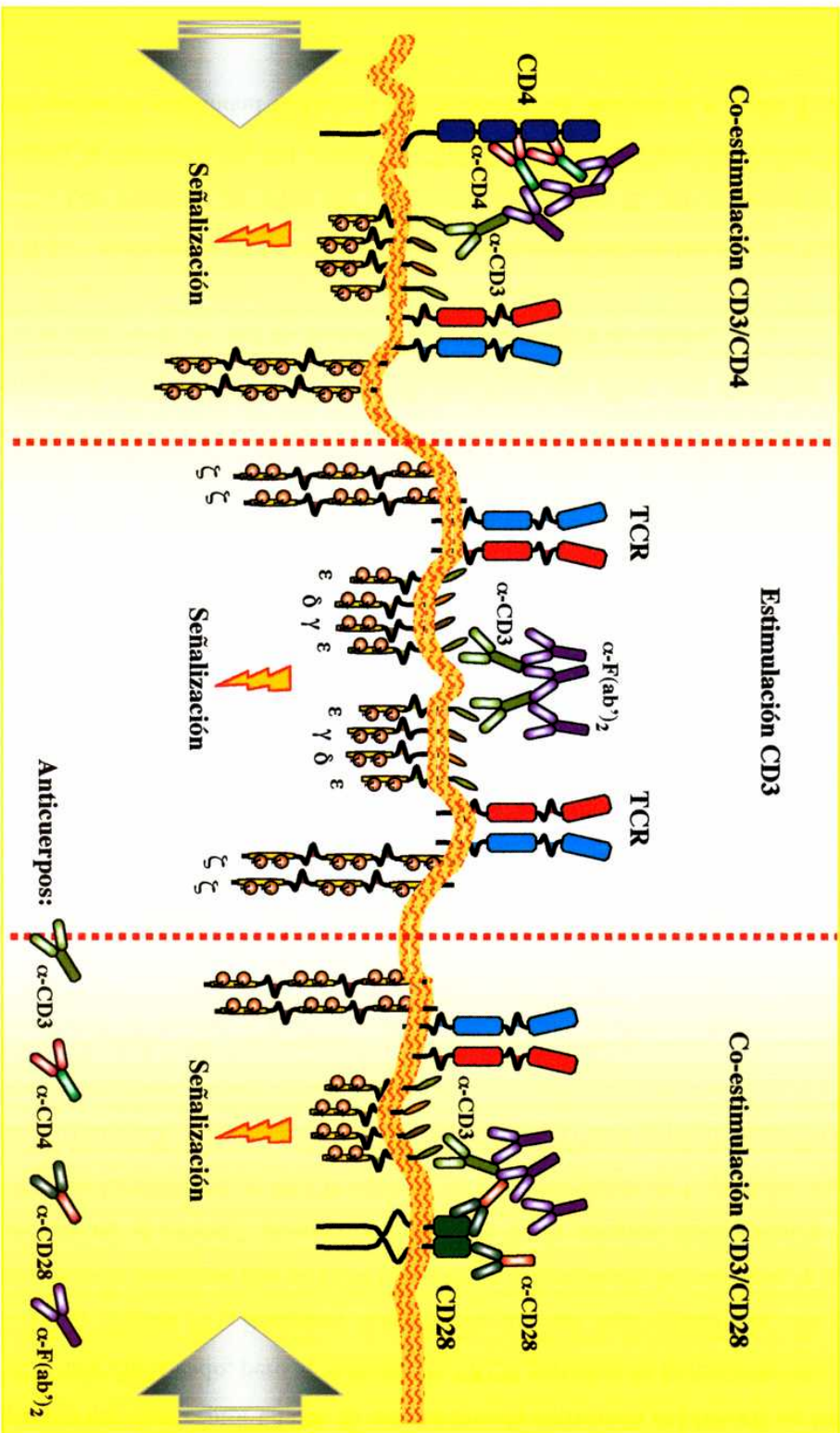
## VII Estudios *in vitro* de activación y señalización en células T

En respuesta a la invasión por patógenos, el individuo infectado es capaz de responder vigorosamente al mismo, a través de su sistema inmune. Cuando se consideran todas las interacciones entre los diferentes tipos de células que participan en la respuesta inmune, se puede afirmar que dicho sistema es sumamente complejo. Dentro de esta enorme red inmunológica, las respuestas que dependen de las células T han sido sujeto de intensas investigaciones. En un intento de simplificar estos complicados mecanismos, modelos experimentales *in vitro* han sido frecuentemente utilizados para el estudio de estos eventos. Aquí solo describiré algunos de los modelos de activación *in vitro* de células T más comúnmente utilizados.

### VII.1. Activación de las células T con anticuerpos monoclonales $\alpha$ -CD3

Los estudios *in vitro* de activación de células T, en la mayoría de los casos, comprenden la estimulación del complejo CD3/TCR/ $\zeta$  con anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra la subunidad CD3 ( $\alpha$ -CD3) o contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR ( $\alpha$ -T $\alpha\beta$ ). La

**Figura 14** Estimulación y co-estimulación de células *T* in vitro, utilizando anticuerpos monoclonales



unión del  $\alpha$ -CD3 con el complejo TCR imita a la que ocurre *in vivo* con los antígenos, y la misma resulta en la activación de la célula T. Sin embargo, el  $\alpha$ -CD3 solo no es suficiente para provocar una activación óptima de estos linfocitos. Para ello los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 unidos al TCR durante la activación deben ser reagrupados unos con otros por medio del “*crosslinking*” con un segundo anticuerpo capaz de reconocer la cadena constante Fc de las inmunoglobulinas ( $\alpha$ -F(ab')<sub>2</sub>). Este efecto provocado por el anticuerpo secundario reproduce la acción *in vivo* de los monocitos, permitiendo el reagrupamiento de los complejos CD3/TCR/ $\zeta$  entre sí (Figura 14).

Diferentes clones de mAb  $\alpha$ -CD3 son ofrecidos por varias compañías especializadas en la obtención y venta de los mismos. Dos clones frecuentemente utilizados son el OKT3 y el UCH T1, ambos capaces de producir una buena activación de células T. La activación *in vitro* con el  $\alpha$ -CD3 seguido del “*crosslinking*” resulta en la activación de proteínas tirosina quinasa, en un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , en la generación de diacilglicerol (DAG) y activación de PKC, y en la activación de diferentes factores de transcripción [225].

## VII.2. Co-estimulación *in vitro* de las células T

Como hemos visto anteriormente, los co-receptores CD4 y CD8 son sumamente importantes desde el punto de vista funcional. Ambos son capaces de interactuar con las moléculas del MHC de las APCs, aumentando considerablemente la sensibilidad de la célula T hacia el antígeno. (ver ítem II de este capítulo). Gracias a la disponibilidad de mAbs  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -CD8 comerciales, el proceso de co-estimulación *in vivo* producido por el contacto de las APCs con las células T puede ser imitado *in vitro*. Estos anticuerpos de co-estimulación son utilizados conjuntamente con los  $\alpha$ -CD3, permitiendo la estimulación simultánea del complejo TCR y de los co-receptores CD4 y CD8. De la misma manera que para la estimulación simple con el  $\alpha$ -CD3, la co-estimulación requiere del “*crosslinking*” con un segundo anticuerpo  $\alpha$ -F(ab')<sub>2</sub> que permite la co-agregación de los complejos TCRs con los CD4 y/o CD8 (Figura 14). Esta co-agregación optimiza la activación de la célula T, produciendo señales más potentes que cuando el TCR es estimulado individualmente. Esto es válido para las células T primarias, sin embargo, este efecto de la coestimulación es menos evidente en las líneas células T. La estimulación del CD4 solo, sin “*crosslinking*” conduce a la producción de señales inhibitorias, capaces de regular negativamente aquellas producidas por la activación del TCR [226, 227].

Otro co-receptor que actúa sinérgicamente con el TCR y que puede ser estimulado *in vitro*, es el CD28 (Figura 14). La co-estimulación del CD28 con mAbs  $\alpha$ -CD28 y su posterior

"crosslinking", induce señales que actúan sinérgicamente con aquellas provenientes del TCR, y además posibilita la activación de cascadas de señalización adicionales como la de las MAPKs, principalmente JNK y p38, las cuales activan los factores de transcripción.

### VII.3. Activación de las células T con mitógenos

Los mitógenos son sustancias de carácter proteico derivadas de las plantas y bacterias. Actúan a través de los determinantes de hidratos de carbono de la membrana celular de los linfocitos, produciéndoles un fenómeno de activación. Los más frecuentemente utilizados para la activación de los linfocitos T son: la Fitohemaglutinina (PHA) y la Concanavalina A (Con-A). Algunos lipopolisacáridos (LPS) también suelen ser utilizados, sin embargo este compuesto activa preferencialmente los linfocitos B. La Con-A estimula la multiplicación y la diferenciación de casi todos los linfocitos T, independientemente de la especificidad de sus receptores. Los mismos resultados se pueden obtener utilizando PHA.

Los ésteres de forbol tales como PMA (*Phorbol myristol acetate*) y los ionóforos de calcio como por ejemplo la ionomicina, son otras sustancias que también pueden estimular inespecíficamente los linfocitos T *in vitro*.

### VII.4. Activación de las células T por pervanadato ( $\text{VO}_2$ )

La mezcla de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_2\text{VO}_4$ ) tiene la particularidad de ser un potente agente oxidante y al mismo tiempo un inhibidor de fosfatasas. La combinación de estos dos compuestos genera peróxidos derivados de pervanadato ( $\text{VO}_2$ ), los cuales son responsables de la actividad "insulinomimética" de esta mezcla [228, 229].

Numerosos estudios de señalización en células T se han llevado a cabo utilizando el pervanadato como activador, ya que el mismo induce señales similares a aquellas producidas por la estimulación del TCR. Sin embargo, estas señales ocurren de manera independiente al TCR [230]. La acción del pervanadato sobre células T provoca la fosforilación sobre tirosina de un cierto número de proteínas quinasas, inhibe la actividad de fosfatasas intracelulares e induce la asociación de proteínas intracelulares que poseen dominios SH2 o SH3, incluyendo asociaciones no detectadas bajo estimulación del TCR [230]. Al mismo tiempo, el ortovanadato junto con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son capaces de inducir la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana, la activación del promotor del gen de la IL-2, el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la activación del NF- $\kappa\text{B}$  y del factor AP-1 [230-232].

Los mecanismos por los cuales el pervanadato estimula las células T no han sido muy bien caracterizados, sin embargo, el efecto inhibitor de este compuesto sobre la actividad catalítica de múltiples fosfatasa es claro y ello podría explicar un aumento general de la actividad quinasa intracelular [230].

### **CAPITULO III: DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE ZAP-70 Y SYK**

Las quinasas ZAP-70 y Syk pertenecen a la misma familia de proteínas tirosina quinasas. Estas dos proteínas comparten importante similitudes estructurales y de secuencia (ver ítem III.3.1. del capítulo II). Sin embargo, numerosas evidencias indican que ZAP-70 y Syk difieren en sus mecanismos de activación y sugieren que ambas proteínas funcionan de modo diferente en la traducción de las señales vía el TCR.

#### **I. Diferencias en la expresión de ZAP-70 y de Syk**

Las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk han sido asociadas con células de origen hematopoyético. Los ARNm de ZAP-70 fueron detectados unicamente en el bazo, nódulos linfáticos y en el timo [233]. En efecto, ZAP-70 se expresa en todas las poblaciones de timocitos, en células T maduras  $CD4^+$  o  $CD8^+$ , y en células NK (*natural killer*). Su expresión es practicamente estable durante todo el desarrollo de los linfocitos T, aunque la cantidad de ZAP-70 en los timocitos DN sería algo inferior a la observada en otras poblaciones de células T. Syk por su parte, es expresada fuertemente en timocitos y su nivel de expresión decrece drasticamente en las células T periféricas, donde la cantidad de proteína detectada es inferior a la observada en los timocitos [233]. Sin embargo, existiría una pequeña subpoblación de células T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  que expresan Syk, pero la misma aún no ha sido bien caracterizada [27]. La expresión de Syk también ha sido notificada en otros tipos de células hematopoyéticas incluyendo linfocitos B [233, 234], mastocitos [121, 235], neutrófilos [236], macrófagos [237], eritrocitos [238] y plaquetas [239]. Recientemente se demostró que la presencia de Syk no se limita solo a células hematopoyéticas. Diferentes trabajos han demostrado que Syk es expresada en células epiteliales, en hepatocitos, en fibroblastos, en células nerviosas y en células de los tejidos del seno [239-243].

La activación de la célula T vía el TCR no modifica el nivel de expresión de ZAP-70 y Syk, aún cuando las células fueron estimuladas durante 48 horas, en presencia del antígeno [233]. En contradicción con esto, Orchansky y colaboradores demostraron que Syk fue expresada en

células T “naive” pero no en células T en fase de proliferación, y que su nivel de expresión disminuyó únicamente cuando las células fueron activadas por periodos superiores a 48 horas [244].

## II. Diferentes fenotipos de ratones “*knockout*” para ZAP-70 y/o Syk

Independientemente de la similitud estructural entre ZAP-70 y Syk, estas dos proteínas son reguladas diferentemente, no solo en términos de expresión sino también de la actividad quinasa de las mismas. Unos 10 años atrás, algunos autores sostenían que ZAP-70 y Syk tenían funciones redundantes, lo cual se fundamentaba en la importante homología de secuencia y de estructura entre ambas, y en la capacidad de cada una de ellas de reconstituir la señalización en la línea DT40 Syk<sup>-</sup> [113]. Experiencias realizadas en ratones deficientes en ZAP-70 demostraron que la expresión de Syk era suficiente para reconstituir el fenotipo defectuoso de los mismos [245]. Además, ratones doble “*knockout*” ZAP<sup>-/-</sup>/Syk<sup>-/-</sup> presentaron un bloqueo en el desarrollo de los timocitos en el estadio DN [246], el cual no fue observado ni en los simple “*knockout*” Syk, ni en los simple “*knockout*” ZAP-70 [247-249]. Estos descubrimientos sugieren que la presencia de una de las dos quinasas podría compensar la ausencia de la otra. Sin embargo, los fenotipos de los ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> y Syk<sup>-/-</sup> son bien diferentes uno de otro. En efecto, los animales ZAP-70<sup>-/-</sup> presentan un bloqueo en el desarrollo de los timocitos, a nivel del estadio DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRC<sup>low</sup>, y en consecuencia estos ratones carecen de células T periféricas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [248]. En estos animales, el número de células Tγδ y de linfocitos B presentes en el bazo es normal [248].

Los ratones Syk “*knockout*” presentan un fenotipo letal, asociado con petequias severas, hemorragias difusas y ascitis, debidas a un defecto mayor en la activación de las plaquetas en ausencia de Syk [247, 249]. No obstante, en los fetos de estos ratones se observó que la deficiencia en Syk inhibe la diferenciación de las células pro-B, debido al bloqueo de la señalización vía el pre-receptor de células B (pre-BCR) [247]. Para estudiar la importancia de Syk en el desarrollo linfoide, ratones irradiados fueron reconstituídos con células progenitoras linfohematopoyéticas derivadas del hígado y deficientes en Syk [249]. En estos animales, la ontogenia de las células B fue bloqueada durante los estadios precoces de diferenciación. Por el contrario, el desarrollo los linfocitos Tαβ fue completamente normal [249]. La ausencia de Syk también provocó fallas en el desarrollo de los linfocitos Tγδ [249, 250]. Por otra parte, la deficiencia en Syk también provoca anomalías importantes en la activación de mastocitos y macrófagos [251, 252].

Las diferencias en los fenotipos de las deficiencias en ZAP-70 y Syk ponen de manifiesto una vez más que estas quinasas desempeñan roles diferentes en los eventos de activación y diferenciación de numerosas poblaciones de células hematopoyéticas. Mientras que Syk es crucial en la regulación del desarrollo y la diferenciación de los linfocitos B, ZAP-70 es primordial para la ontogenia y la activación de las células T $\alpha\beta$ .

### III. Diferentes requerimientos de activación de ZAP-70 y de Syk

#### III.1. Dependencia de las quinasas Src

Las diferencias en los requerimientos de activación de ZAP-70 y Syk ha sido puestas en evidencia gracias a la utilización de líneas celulares hematopoyéticas de origen animal o humano, establecidas en diferentes laboratorios para los estudios de señalización vía los receptores de antígenos. La utilización de la línea celular T Jurkat, como así también de sus líneas derivadas, se ha convertido en un clásico para el estudio de la señalización vía el TCR. Las células Jurkat fueron establecidas a partir de células T leucémicas humanas aisladas a partir de un paciente con leucemia. Diferentes variantes de las mismas fueron progresivamente seleccionadas ya sea por mutagénesis o bien como producto del cultivo de las células.

La dependencia de la Lck para la activación de Syk y de ZAP-70 fue estudiada en detalle en las líneas celulares J45-07 y JS-7. Estas dos líneas celulares son diferentes variantes de las células T Jurkat, y ambas son deficientes en la fosfatasa CD45. Por consecuencia, la activación de las Src quinasas en estas líneas es defectuosa [253-258]. Mientras que en la J45-07 la señalización vía el TCR no es funcional, en la línea JS-7 la señalización vía este receptor funciona [259]. En ambas líneas celulares ZAP-70 es expresada a niveles equivalentes [123], en cambio la expresión de Syk solo es observada en las células JS-7 [255]. Cuando Syk fue expresada en la línea J45-01, la señalización vía el TCR fue restituida y el "*pattern*" de proteínas fosforiladas sobre tirosina fue casi idéntico al observado en la línea JS-7 [123]. Esto demuestra que en estas células Syk es capaz de funcionar en ausencia de CD45, es decir de activarse independientemente de la actividad de la Lck.

La capacidad de Syk de fosforilarse y activarse de modo independiente de las Src quinasas también fue observada en otra líneas celulares T. Experimentos realizados en la línea T JCam1.6, deficiente en Lck, demostraron que la sobre-expresión de Syk fue suficiente para reconstituir la transducción de señales vía el TCR. Este efecto fue específico de Syk ya que la sobre-expresión de cantidades equivalentes de ZAP-70 no restauró la señalización [123, 125]. Couture y colaboradores también propusieron que Syk es capaz de transactivar la Lck, sin embargo, estos

resultados no son del todo convincentes ya que los mismos fueron obtenidos de experimentos realizados en las células JCam1.6 que no expresan la proteína Syk, al menos que la misma sea expresada ectopicamente [125, 260].

Resultados similares que demuestran que Syk es capaz de activarse de manera independiente de la Lck han sido obtenidos en estudios realizados en células COS. Estas células son fibroblastos de riñón del mono verde africano, transformadas por el virus de simios SV40 (*simian virus 40*) [261]. Estos experimentos fueron realizados sobre-expresando en las COS quimeras conteniendo ZAP-70 o Syk. Estas quimeras fueron construidas con la molécula CD16 (*cluster of defferentiation 16*), una porción de la molécula CD7 (*cluster of differentiation 7*), y ZAP-70 o Syk (CD16/CD7/ZAP-70 o /Syk) [262]. Este tipo de quimera imita un receptor a antígenos ya que contiene una parte extracelular que corresponde a la molécula CD16 que es un componente extracelular del receptor de baja afinidad FcγRIII, una parte transmembrana correspondiente a la CD7, y una parte intracelular conformada por Syk o por ZAP-70 [262-264]. En las células COS conteniendo la quimera Syk, la estimulación de la molécula CD16 condujo a un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , inversamente, en la células conteniendo la quimera ZAP-70 la estimulación del CD16 no fue suficiente para provocar la movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  y para que ello ocurra fue necesaria la co-transfección de una quinasa Src [262].

En conclusión, todos estos resultados demuestran que Syk es capaz de funcionar en ausencia de las Src quinasas, mientras que ZAP-70 es completamente dependiente de las mismas. Esto demuestra claramente que ZAP-70 y Syk poseen diferentes requerimientos para sus activaciones.

### III.2. Diferencias funcionales entre ZAP-70 y Syk

Un número importante de trabajos realizados en líneas celulares y células COS han puesto de manifiesto las diferencias funcionales entre ZAP-70 y Syk. Uno de ellos fue el realizado por Williams y colaboradores en la línea celular T P116 [265]. El clon P116 fue aislado a partir de la línea celular T E6.1, deficiente en Syk, establecida anteriormente [260]. Las células P116 presentan importantes defectos en la transducción de señales y la característica de no incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  luego de la estimulación del TCR [265]. Estudios detallados de este clon demostraron que las células P116 tampoco expresan ZAP-70 y que las mismas presentan anomalías en la fosforilación de proteínas y en la activación del promotor del gen de la IL-2 [265]. De esta manera, la línea P116 deficiente en ZAP-70 y Syk, paso a constituir un importante

modelo celular para el estudio de la función de estas dos quinasas en la señalización vía el TCR. Cuando ZAP-70 y Syk fueron expresadas ectópicamente en esta línea celular, las funciones defectuosas de la misma fueron revertidas. Sin embargo, ZAP-70 y Syk modularon diferentemente la respuesta a la estimulación del TCR [265]. Las células que expresaron Syk presentaron un nivel de activación basal superior al observado en las células expresando ZAP-70, aún cuando el TCR no fue estimulado. En esta condición, la presencia de Syk indujo una importante activación del promotor del gen del NF-AT, efecto que no fue provocado por la expresión de ZAP-70 [265]. Sin embargo, estos efectos de Syk solo pudieron ser observados expresando la proteína de manera transitoria con un sistema de expresión derivado del virus de la vaccinia. La obtención de células P116 expresando Syk de manera estable no pudo realizarse [265]. Esto fue atribuido a un efecto citotóxico de Syk debido a su fuerte nivel de activación basal. A diferencia de Syk, la expresión estable de ZAP-70 fue tolerada por la línea P116 [265].

Una importante diferencia entre las células que expresaron ZAP-70 y aquellas que expresaron Syk, fue el nivel de fosforilación de la cadena  $\zeta$  luego de la estimulación del TCR. En las células P116 sin transfectar, el nivel de fosforilación de  $\zeta$  aumentó debilmente con la estimulación del TCR, y dicho efecto fue completamente revertido solo cuando ZAP-70 fue expresada [265]. Inversamente, la expresión de Syk no modificó el nivel de fosforilación de  $\zeta$  observado en las células P116 sin transfectar. Este descubrimiento sugiere que ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades para interactuar con los ITAMs fosforilados *in vivo* [265]. Sin embargo, Latour y colaboradores demostraron que Syk era capaz de unirse a los ITAMs del TCR de manera más eficaz que ZAP-70 [266]. Además este autor demostró que en el hibridoma T murino BI-141, Syk es capaz de fosforilar la cadena  $\zeta$  del TCR [126]. Otras experiencias realizadas en células COS transfectadas de manera "transitoria" muestran que Syk, pero no ZAP-70, es capaz de fosforilar péptidos derivados de la cadena  $\zeta$  en ausencia de las Src quinasas [267]. Por último, cuando ZAP-70 y/o Syk fueron sobre-expresadas en estos fibroblastos, la actividad específica de Syk fue 100 veces superior a la de ZAP-70, según sus capacidades a fosforilar el sustrato band 3 *in vitro* [101]. Si bien estos resultados indican que Syk interviene en la fosforilación de los ITAMs, otros han mostrado que los ITAMs del TCR no son buenos sustratos de Syk en ensayos quinasas efectuados *in vitro* (Weiss A, datos sin publicar; [123]).

Estos descubrimientos demuestran que ZAP-70 y Syk funcionan de manera diferente en los eventos de señalización vía el TCR, y sugieren que Syk podría funcionar mejor que ZAP-70 en la fosforilación del TCR y en la activación de NF-AT. Sin embargo, existen datos que

discrepan con estas apreciaciones y para clarificar las diferencias entre estas dos quinasas es necesaria la realización de nuevos estudios.

## **CAPITULO IV: LA INMUNODEFICIENCIA EN ZAP-70**

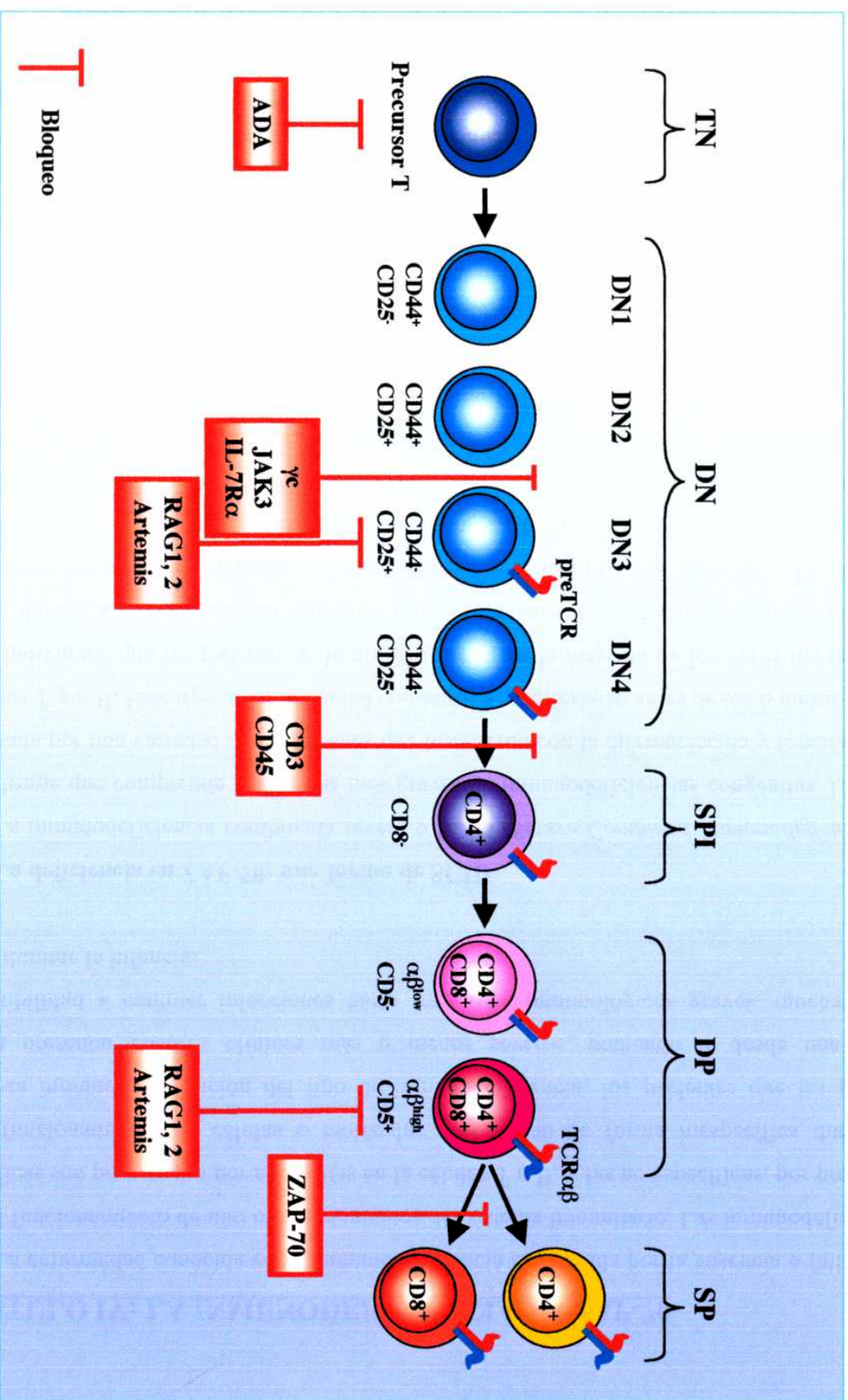
La enfermedad conocida como inmunodeficiencia es causada por la ausencia o fallas en el normal funcionamiento de uno o más elementos del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias específicas son provocadas por anomalías en la células T o B, y las no específicas, por problemas en el funcionamiento de células o moléculas que actúan de forma inespecífica durante la respuesta inmune. En función del tipo de inmunodeficiencia, los pacientes que las padecen pueden presentar cuadros clínicos más o menos severos, pudiendo ir desde una mayor susceptibilidad a contraer infecciones hasta trastornos inmunológicos graves, muchas veces letales durante la infancia.

### **I. La deficiencia en ZAP-70: una forma de SCID**

La inmunodeficiencia combinada severa o SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es un síndrome que comprende las formas más graves de inmunodeficiencias congénitas. La SCID es causada por una variedad de mutaciones que interfieren con la diferenciación y función de los linfocitos T y/o B. Este tipo de enfermedad comienza a manifestarse antes de los 6 meses de vida en los individuos que las padecen, y de no ser tratada, en la mayoría de los casos los pacientes mueren debido a infecciones con múltiples microorganismos [268]. Estas infecciones provocan importantes daños en los órganos, principalmente en el hígado y los pulmones. El patógeno *Pneumocystis carinii* es el principal responsable de las afecciones pulmonares. Otros microorganismos como *Aspergillus*, y los patógenos intracelulares *listeria* y *legionella* son la causa de infecciones devastadoras para los pacientes. Los niños enfermos también desarrollan diarreas crónicas y candidiasis persistentes. Para evitar todas estas afecciones, los pacientes están condenados a vivir en ambientes sin patógenos y aislados de cualquier contacto con el exterior. Muchos niños con una SCID viven en espacios estériles reducidos, en una suerte de burbuja donde el aire está libre de microorganismos. Por este hecho, los niños que padecen una SCID frecuentemente son llamados "los bebés burbuja".

Una SCID puede originarse por mutaciones en diferentes genes con funciones bien diversas. Un cierto número de mutaciones naturales que conducen a la SCID han sido descritas y bien caracterizadas en humanos. Las mismas bloquean la diferenciación de células T, y directa o

**Figura 15** Inmunodeficiencias humanas responsables del bloqueo en el desarrollo de los linfocitos T $\alpha\beta$



Adaptación realizada a partir de Fischer A et al., 2002

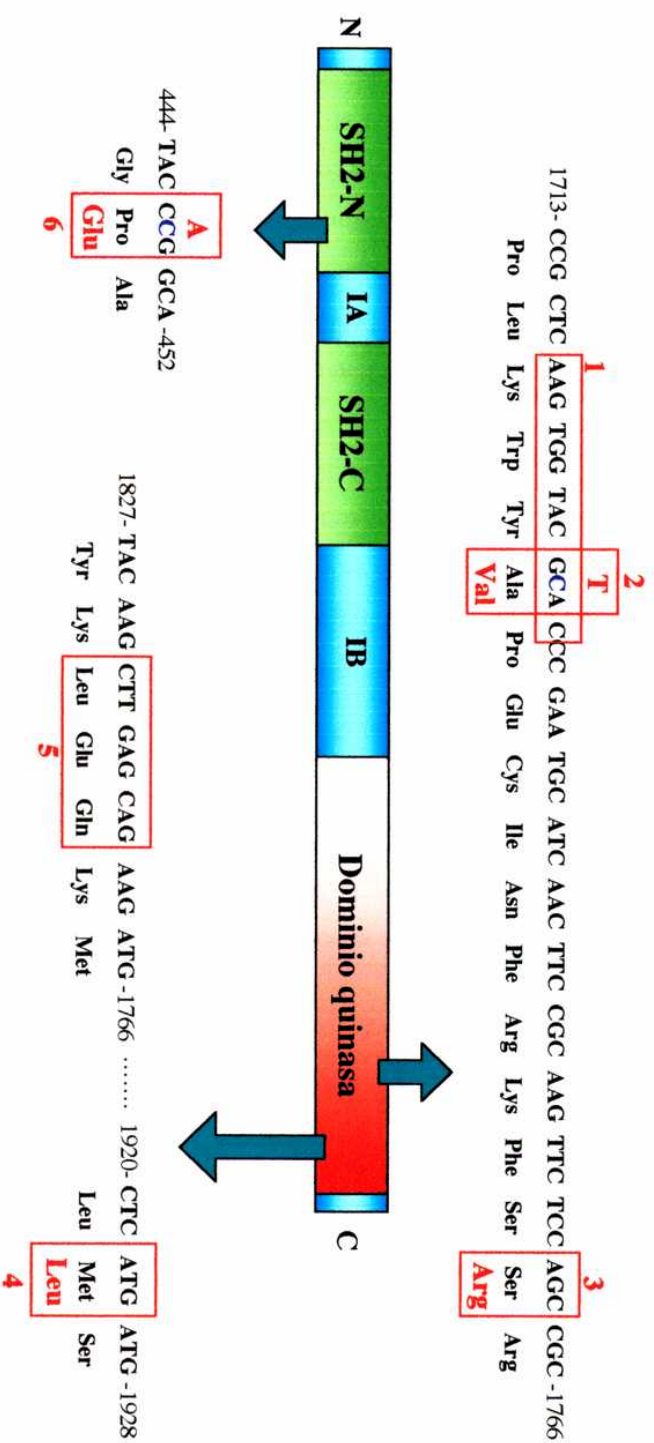
indirectamente también pueden afectar la inmunidad asociada a los linfocitos B. Estas mutaciones afectan a proteínas que controlan pasos críticos en la maduración de los timocitos y entre las cuales pueden citarse: la cadena  $\gamma$  común a los receptores de citoquinas ( $\gamma c$ ), las recombinasas RAG1 y RAG2 (*recombination-activating gene*), Artemis, la quinasa JAK3 (*Janus kinase 3*), la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-7 (IL7R $\alpha$ ), la adenosina deaminasa (ADA), la cadena  $\epsilon$  y la  $\gamma$  del CD3, la fosfatasa CD45 y la tirosina quinasa ZAP-70 [268]. En la figura 15 se especifica en que estadio de la diferenciación tímica estas proteínas ejercen sus funciones.

La inmunodeficiencia asociada a ZAP-70 es una forma extremadamente rara de SCID y es una enfermedad autosómica y recesiva. Solo unos 15 casos han sido repertoriados en el mundo y en la mayoría de ellos, los niños que padecen la enfermedad son el fruto de relaciones consanguíneas. Esta SCID es caracterizada por la ausencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por la presencia de células T CD4<sup>+</sup> no funcionales. La ausencia de células T CD8<sup>+</sup> es provocada por el bloqueo del desarrollo de los linfocitos T a nivel del timo, específicamente durante la diferenciación de los timocitos DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> a timocitos SP CD8<sup>+</sup> [233, 269, 270] (Figura 15). El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en la sangre periférica de los pacientes es normal o ligeramente elevado, y si bien las células expresan marcadores de superficie de linfocitos T maduros, las mismas responden de manera defectuosa a la estimulación del TCR. En efecto, estas células presentan una reducción de la proliferación y de la secreción de IL-2 bajo activación de este receptor [233, 269, 270]. Estos defectos en las funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también conducen al disfuncionamiento de las células B, las cuales al no recibir la asistencia de las citoquinas producidas por las T, son incapaces de fabricar los anticuerpos específicos y sintetizar las inmunoglobulinas [271, 272]. No obstante, algunos pacientes tienen niveles normales o elevados de inmunoglobulinas séricas [273, 274].

## II. Desórdenes genéticos responsables de la deficiencia en ZAP-70

La totalidad de casos de inmunodeficiencia en ZAP-70 reportados corresponden a pacientes que provienen de diferentes familias algunas de las cuales pertenecen a comunidades aisladas genéticamente (*ZAP70base* <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/ZAP70base/>). El gen de ZAP-70 se localiza en el cromosoma 2q12 en humanos, y en la mayoría de los pacientes, las mutaciones en este gen provocan la desestabilización y degradación de la proteína o de los ARNm de ZAP-70 [233, 269, 270]. En muchos de los casos repertoriados, las mutaciones responsables de la ausencia de ZAP-70 se localizan en una pequeña región del dominio quinasa de la proteína. Entre los

**Figura 16** Esquema de la estructura de ZAP-70 con la posición de las diferentes mutaciones responsables de la inmunodeficiencia humana en dicha proteína



- 1:** Delección de 13 pb
- 2:** Sustitución de C por T que provoca una conversión de Ala a Val
- 3:** Mutación puntual que provoca una conversión de Ser a Arg
- 4:** Mutación puntual temperatura-sensible que provoca una conversión de Met a Leu
- 5:** Inserción de 9 pb
- 6:** Sustitución de C por A que provoca una conversión de Pro a Gln. Mutación temperatura-sensible

misimos se incluyen pacientes no relacionados con: 1) una delección de 13pb que resulta en un corrimiento del marco de lectura a partir del residuo 503 y en una terminación prematura en el amino ácido 538 [269]; 2-3) dos conversiones de amino ácidos, Ala-507-Val [275] y Ser-518-Arg [233]; 4) una mutación puntual temperatura-sensible en el par de bases 1923 que provoca la conversión de un residuo Met a uno Leu en la posición 572 [276] y 5) un error de *splicing* que introduce los amino ácidos Leu-Glu-Gln luego del residuo 54 de la proteína [233, 272] (Figura 16). Excepcionalmente, dos pacientes presentan mutaciones fuera del dominio quinasa de ZAP-70. En uno de ellos los ARNm de ZAP-70 no fueron detectados y aunque la mutación aún no ha sido identificada se sabe que la misma no se localiza en el dominio quinasa [272]. El otro paciente presenta una mutación temperatura-sensible debida a la sustitución aminoacídica Pro-80-Glu [276] (Figura 16, (6)). Recientemente se ha identificado un nuevo paciente con una mutación Arg-465-Cys que afecta la actividad quinasa de la proteína sin alterar el nivel de expresión de la misma [277]. De manera interesante, esta mutación había sido previamente detectada en ratones con un fenotipo ZAP-70 “*knockout*” (ZAP-70 KO) [278]. La mutación en ratones provoca efectos similares sobre la actividad quinasa de ZAP-70 a los observados en el paciente, sin embargo, los fenotipos del paciente y de los ratones difieren marcadamente (ver ítem V de este capítulo).

### III. Características clínicas de la deficiencia en ZAP-70

La inmunodeficiencia en ZAP-70, como las otras formas de SCID, se caracteriza por un cuadro clínico grave causado por la presencia de infecciones oportunistas que culminan con la muerte del paciente durante la infancia. Un solo caso en particular ha sido reportado en donde el paciente presentó lesiones infiltrativas en la piel, ocasionadas por la acumulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autoreactivos [279].

El diagnóstico de la inmunodeficiencia en ZAP-70 se efectúa si el paciente presenta algunos de los síntomas descritos, asociados con la ausencia de linfocitos CD8<sup>+</sup> en la sangre periférica. Sin embargo el diagnóstico definitivo requiere la demostración de la ausencia de la proteína o de la actividad quinasa de la misma mediante experiencias de “*western blot*” o de ensayos quinasa *in vitro*, y/o la identificación de defectos en el gen que codifica para la misma.

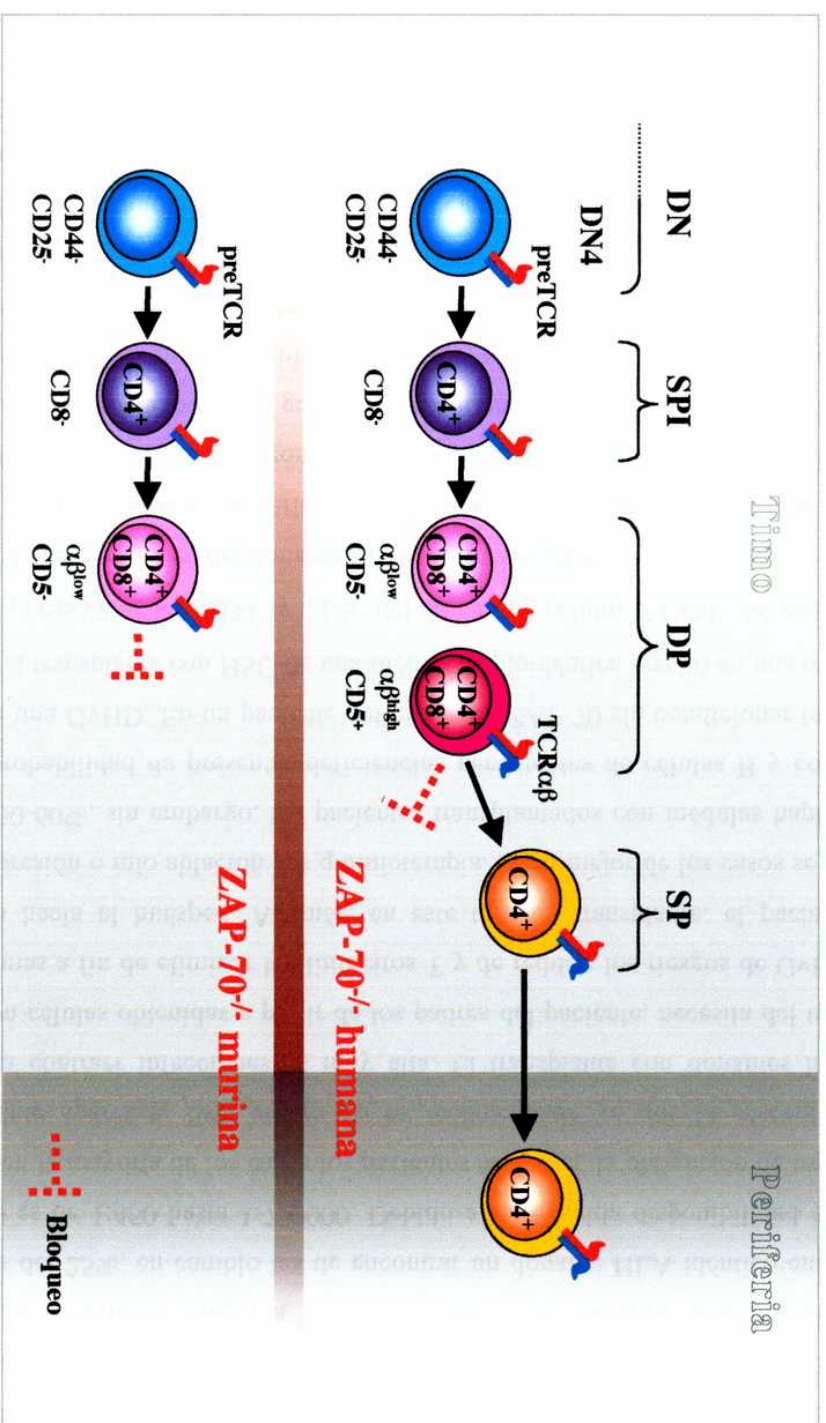
### IV Tratamiento de los pacientes deficientes en ZAP-70

La deficiencia en ZAP-70 conduce a la muerte de los pacientes que la padecen durante el primer año de vida. Hasta el momento el único tratamiento para estos niños es el trasplante de

HSC provenientes de la médula ósea o de sangre de cordón umbilical. El trasplante a partir de donantes HLA (*human leukocyte antigen*) idénticos, en general un hermano del paciente, se caracteriza por una rápida reconstitución de los linfocitos T seguido de una expansión de células T de memoria originadas a partir del donante. Este tipo de trasplante no requiere mielo ablación o inmunosupresión para que el injerto funcione. Las nuevas células T generadas en los pacientes transplantados comienzan a detectarse 2 meses luego de realizado el mismo. En este caso la probabilidad de éxito es mayor a 70%. Las chances de encontrar dos hermanos con un HLA idéntico es del 25%, en cambio las de encontrar un donante HLA idéntico entre individuos sin parentesco es de 1:450 hasta 1:750000. Debido a la reducida disponibilidad de donantes HLA idénticos, en la mayoría de los casos los pacientes se ven en la obligación de esperar hasta que el buen donante aparezca. Esta espera no es recomendada ya que la susceptibilidad de estos pacientes a contraer infecciones es muy alta. El trasplante con donantes haplo idénticos, en general con células obtenidas a partir de los padres del paciente, necesita del tratamiento previo de las mismas a fin de eliminar los linfocitos T y de reducir los riesgos de GvHD o enfermedad del injerto hacia el huésped. Además, en este tipo de trasplante, el paciente requiere una inmunosupresión o mielo ablación por quimioterapia. En el mejor de los casos se puede esperar un éxito del 50-60%, sin embargo, los pacientes transplantados con médulas haplo idénticas tienen una alta probabilidad de presentar deficiencias persistentes de células B y corren el riesgo de desarrollar una GvHD. En un paciente deficiente en ZAP-70 sin condicionar (ausencia de mielo ablación), el trasplante con HSC de una médula haplo idéntica resultó en una quimerización T-T entre unas pocas células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del donante y células T CD4<sup>+</sup> del paciente, donde solo las células T que provienen del donante son funcionales [280].

En los últimos años una serie de ensayos clínicos de terapia génica para el tratamiento de inmunodeficiencias primarias fueron puestos en práctica en diferentes países. Esta terapia permite reemplazar el gen mutado por un gen sano, restaurando la función biológica del mismo. Aunque este tipo de tratamiento no ha sido nunca ensayado en pacientes deficientes en ZAP-70, los estudios pre-clínicos de terapia génica que son presentados en este trabajo (ver resultados, parte II), y los resultados obtenidos en los ensayos clínicos para el tratamiento de otras inmunodeficiencias similares (ver ítem II.4. del capítulo V), proporcionan una buena base para el establecimiento de un protocolo para el tratamiento por terapia génica de los pacientes deficientes en ZAP-70.

*Figura 17 Diferente fenotipo de las deficiencias en ZAP-70 humana y murina*



## V Modelos animales para el estudio de la deficiencia en ZAP-70

Una gran parte de los conocimientos actuales sobre el funcionamiento de ZAP-70 en el desarrollo y activación de las células T, provienen de experimentos realizados en ratones deficientes en dicha proteína, creados en laboratorios. Estos ratones fueron creados mediante recombinación homóloga de la región codante de ZAP-70, con una importante delección en su secuencia. El vector conteniendo la secuencia mutada de ZAP-70 fue transfectado dentro de células madre embrionarias (ES) de ratones C129, y los clones positivos fueron inyectados en blastocistos de ratones C57BL/6 para generar quimeras. Los machos quimeras fueron cruzados con hembras C57BL/6 y luego los heterocigotas de la descendencia fueron cruzados entre sí para obtener los mutantes homocigotas ZAP-70<sup>-/-</sup> [248, 278, 281].

En condiciones de crecimiento libres de patógenos o SPF (*specific-pathogen free*), estos ratones presentan un buen estado sanitario y son fértiles hasta al menos 10 meses de edad. Sin embargo, los mismos desarrollan una SCID similar a la observada en pacientes deficientes en ZAP-70, pero con un fenotipo diferente del observado en humanos. En el bazo de estos animales, el número de esplenocitos disminuye cerca de un 30%, con una ausencia completa de células T  $\alpha\beta$  y un incremento en la proporción de células B. La médula del timo es rudimentaria y la corteza un tanto expandida. Aunque los ratones presentan un número normal de timocitos, las poblaciones SP CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no se detectan. En efecto, el bloqueo en la diferenciación de los timocitos ocurre de manera más precoz que en los pacientes deficientes en ZAP-70, y en consecuencia los animales ZAP-70<sup>-/-</sup> no tienen células T, ni CD4<sup>+</sup> ni CD8<sup>+</sup> (Figura 17). Aunque las causas de las diferencias observadas entre el fenotipo de ratones y humanos deficientes en ZAP-70 aún no han sido determinadas, es probable que en los pacientes existan mecanismos de compensación que permiten el desarrollo y la migración a la periferia de las células T CD4<sup>+</sup> [248]. Dado que la deficiencia en la proteína homóloga Syk presenta un fenotipo diferente a la de ZAP-70, es posible que un nivel de expresión más elevado Syk en las células T humanas comparado con las de ratones, sea la causa del mecanismo de compensación existente en humanos [247-249, 277].

A pesar de los diferentes fenotipos entre los pacientes deficientes en ZAP-70 y los ratones ZAP-70 KO, estos últimos recapitulan muchas de las anormalidades observadas en los pacientes y por lo tanto son un buen modelo para el estudio de la enfermedad y para la realización de ensayos pre-clínicos de terapia génica para esta inmunodeficiencia.

## **CAPITULO V: LA TERAPIA GENICA**

La terapia génica puede ser definida como la transferencia de un nuevo material genético (transgén) a las células de un individuo, con el objetivo de conferirle un beneficio terapéutico [282, 283]. La primera transferencia de un gen en el hombre fue realizada a comienzos de los 90 [284], y la primera tentativa de corregir un déficit genético fue hace ya unos 12 años [285]. Actualmente, la terapia génica es una de las áreas de investigación médica que se desarrolla más rápidamente y promete en el futuro el tratamiento de una gran variedad de enfermedades y trastornos graves. Esta nueva tecnología presenta varias ventajas sobre los tratamientos tradicionales que utilizan diferentes drogas. Mientras que estos últimos necesitan de la administración de compuestos químicos que ha sido fabricados fuera del cuerpo humano, la terapia génica permite a las células del propio paciente producir y liberar el agente terapéutico. El éxito potencial de la terapia génica no solo depende de la transferencia del transgén dentro de las células blanco apropiadas. Una variedad de criterios deben ser tenidos en cuenta para que esta tecnología funcione correctamente. Estos criterios incluyen:

**a) El sistema de transferencia del gen terapéutico:** Existen dos categorías principales: los vectores no virales y los vectores virales. Los vectores no virales están constituidos esencialmente por ADN, en forma de plásmido purificado. Este ADN puede ser suministrado como ADN desnudo o bien vehiculizado mediante la utilización de diferentes técnicas. Entre las más utilizadas se encuentran la electroporación y la transfección con precipitados de fosfato de calcio. También el ADN puede ser encapsulado en liposomas o en polímeros policationicos que incrementan su estabilidad y mejoran la eficacia de la técnica de transferencia. Finalmente la estrategia del cañón génico (*gene gun*) también puede ser utilizada para vehiculizar el ADN. Mientras que las estrategias basadas en vectores no virales son poco utilizadas en terapia génica, los vectores virales son ampliamente utilizados en la transferencia de genes. Numerosos vectores virales han sido desarrollados y cada uno de ellos posee características propias en términos de la capacidad de clonado, de regulación, de estabilidad de expresión, que deben ser tenidas en cuenta a la hora de elegir el vector más apropiado para una cierta utilización. Todos los vectores virales provienen de virus que han sido adaptados, modificando o eliminando algunos de los genes que confieren la patogenicidad al mismo. Los diferentes vectores virales incluyen: los adenovirus, los adenovirus asociados (AAV), los virus herpéticos, los poxivirus y los retrovirus (oncoretrovirus y lentivirus). En este manuscrito solo describiré los vectores retrovirales, en particular aquellos

basados en el MLV (*Murine Leukemia Virus*) y en el HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus type-1*). Los mismos se detallan en el ítem I.2. de este capítulo.

**b) El modo de administración del transgén:** La mayoría de los protocolos clínicos en curso o en evaluación utilizan la estrategia de modificación genética de las células *ex vivo* y reimplantación de las mismas en el paciente. En otras palabras, las células del paciente portando un gen defectuoso, son aisladas del mismo y dicho gen es reemplazado por uno sano. Luego las células reparadas son reimplantadas de manera autóloga en el mismo paciente. La inyección directa de los vectores en los pacientes también parece ser una muy buena alternativa para la administración de genes terapéuticos. Esta estrategia conocida como administración *in vivo* es menos utilizada, pero numerosos esfuerzos están siendo realizados para su optimización.

**c) El tipo celular en el cual se quiere transferir el gen:** En la mayoría de los casos se intenta expresar el gen terapéutico en aquellas células que presentan una patología determinada. En otros, se busca transferir el gen en células que actuarán como “ fábricas de producción” de proteínas terapéuticas. Estas podrán ejercer su efecto a distancia sobre células u órganos defectuosos, o neutralizando virus presentes en la vía sistémica (anticuerpos). Probablemente el tipo celular más adecuado para la transferencia del transgén sean las células madres o “*stem cells*”. La introducción del gen sano dentro de una stem cell no solo permitirá reparar los defectos genéticos de esta, sino también de todas aquellas células que deriven de la misma, independientemente de la vía de diferenciación en la cual se comprometerán. Además, gracias a los importantes avances realizados en el campo de las stem cells, hoy es posible identificar diferentes poblaciones de células progenitoras obtenidas de distintos órganos o tejidos. En la actualidad es posible transferir un transgén dentro de una célula progenitora hematopoyética que dará origen a una población de células sanguíneas portadoras del mismo; o dentro de una célula progenitora muscular que originará diferentes células musculares donde el gen terapéutico podrá expresarse.

**d) El efecto buscado:** Según el efecto que se busque, las estrategias pueden ser diversas. En el caso en que se quieran eliminar las células genéticamente modificadas, el transgén podría ser un gen “suicida” el cual en presencia de un compuesto aportado de manera exógena es capaz de volverse tóxico. Algunos de los genes suicidas utilizados en la actualidad son el de la HSV-TK (*Herpes Simplex Virus - Thymidine Kinase*) el cual se vuelve tóxico en presencia de la droga ganciclovir eliminando las células que lo expresan [286]. Este tipo de estrategia es utilizada para la eliminación de ciertas células cancerosas y células que se encuentran a proximidad de tumores [287, 288], o para el control de la GvDH en transplantes de médula ósea haploideénticas [289-291].

Otro caso es cuando se desea expresar el transgén solo en un tipo determinado de células o tejidos. Para ello se pueden crear vectores que contienen el transgén regulado por un promotor tejido específico. De esta manera, si el transgén está regulado por un promotor que es activo solo en células musculares, el producto del mismo solo será detectado en miocitos, fibras y otras células que forman parte de este tejido. También puede buscarse efectos bien localizados, en un órgano en particular y no en otros. En tal caso puede optarse por la aplicación directa del gen terapéutico en dicho órgano. Por ejemplo, en ciertas patologías que afectan el sistema nervioso y en particular ciertas regiones del cerebro, la inyección *in situ* de neuronas o stem cells nerviosas modificadas genéticamente permite tener un efecto bien localizado en el sitio donde se realizó la aplicación.

**e) El tiempo de expresión del transgén:** Por último, según el efecto deseado, la expresión del transgén podrá ser transitoria, por ejemplo algunas horas o unos pocos días pueden ser suficientes para eliminar células tumorales. En estos casos es apropiado utilizar vectores adenovirales o sintéticos. Contrariamente, si se quiere corregir un déficit genético o si se trata de un tratamiento antiviral, solo la expresión durante largos períodos de tiempo es eficaz. Para este último caso, los vectores retrovirales son actualmente los más apropiados.

## **I. Vectores retrovirales para la transferencia de genes terapéuticos**

La transferencia del gen terapéutico dentro de un cierto tipo celular y la regulación de la expresión del mismo estarán fuertemente determinadas por el tipo de vector que se utilice. Actualmente los mejores resultados en transferencia de genes se obtienen con los vectores adenovirales. Sin embargo, los más utilizados son los retrovirales, empleados en 34% de los protocolos clínicos, luego le siguen los adenovirales utilizados en 27% de los mismos (*The Journal of Gene Medicine database* <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/>). Cada vector tiene sus características propias, con sus ventajas e inconvenientes según la finalidad terapéutica.

### **I.1. Una revisión sobre los retrovirus**

En 1911, Peyton Rous aísla el primer virus perteneciente a la familia de los retrovirus, el RSV (*Rous Sarcoma Virus*), como el factor causante de los sarcomas del pollo. Después, un gran número de otros retrovirus fueron descubiertos, esencialmente en el ratón y el pollo, pero los mecanismos de acción de estos se conocieron mucho más tarde. En efecto, fue necesario esperar hasta los años 60 para que Howard Temin descubriera que el genoma retroviral

está compuesto por ARN. Temin observó que la replicación de estos virus necesita de la síntesis de ADN y propuso el concepto de transcripción inversa. Más tarde, en 1969, Huebner y Todaro formulan la hipótesis oncogénica para explicar la aparición de cáncer luego de una infección por oncoretrovirus: “el tumor es el resultado de la transmisión de información genética del virus que ocasiona la síntesis de oncogenes celulares”. Finalmente en los años 80 se aisló el primer retrovirus humano: el HTLV-1 (*human T cell leukemia virus*), que induce leucemias en el hombre. En 1983 se aísla el HIV (*human immunodeficiency virus*), agente infeccioso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Debido a que este síndrome se ha transformado en un problema mayor de salud pública mundial, numerosos esfuerzos han sido realizados para el mejor conocimiento de este virus, con la finalidad de encontrar un posible tratamiento para las miles de personas que padecen la enfermedad. Esto ha permitido que los conocimientos sobre el HIV se hayan incrementado considerablemente en los últimos años.

Los retrovirus son virus con envoltura donde el genoma está constituido por ARN simple cadena codificante, y pueden agruparse en tres sub-familias: oncoretrovirus, lentivirus y spumavirus. A pesar de la diversidad de huéspedes que infectan y de las patologías que inducen, los retrovirus conservan una gran homología a nivel de la organización de su genoma, de la estructura del virión o del modo en como se replican.

### **I.1.1. El genoma retroviral**

Los retrovirus son los únicos virus completamente diploides. En efecto, en las partículas retrovirales, el genoma se encuentra bajo la forma de dos ARNs codificantes idénticos. Una vez que la infección ha tenido lugar estos ARNs son utilizados como molde para la síntesis del ADNc viral que después es integrado en el genoma celular como un provirus. El genoma de todos los retrovirus replicativos contiene las secuencias codantes de tres genes llamados *gag*, *pol* y *env*, que permiten la síntesis de las proteínas de la cápside (*gag*), de las enzimas virales (*pol*) y de las proteínas de la envoltura (*env*). El genoma retroviral también contiene múltiples secuencias reguladoras localizadas entre los genes *gag*, *pol* y *env*. En los extremos de dicho genoma se localizan la LTR (*Long Terminal Repeats*) 5' y la 3'. Estas secuencias tienen un largo de unos 600 nucleótidos y las mismas son idénticas [292]. Cada LTR está compuesta por las regiones U3, R y U5, las cuales juegan un rol esencial en la transcripción inversa del ARN genómico viral en ADN proviral, y en la transcripción de ARNm a partir del provirus integrado (Figura 18). La región U5 sirve de matriz para el comienzo de la transcripción inversa y posee en su extremidad 3' una secuencia repetida IR, que constituye junto a la IR presente en la región U3, el sitio de

integración del provirus al ADN celular. La región R (*redundancy element*) permite el primer salto replicativo durante la transcripción inversa y contiene la señal de poliadenilación AAUAAA, que es silenciosa en posición 5' del genoma viral. La región U3 contiene las secuencias que controlan la expresión del provirus (secuencias *enhancers* que responden a numerosos activadores celulares de la transcripción y secuencias promotoras como CAAT y TATAbox).

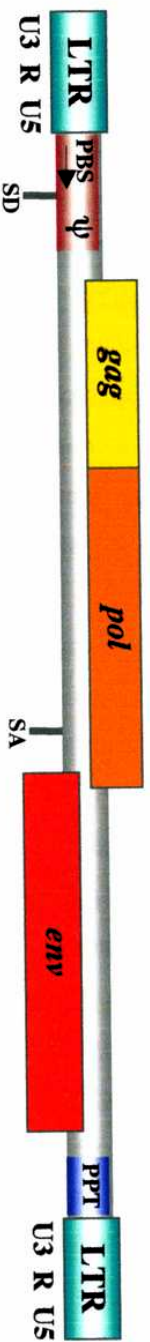
La región no codificante que sigue a la LTR5' denominada *leader*, comienza con una secuencia de 18 nucleótidos que constituye la PBS (*primer binding site*). La secuencia PBS permite el acoplamiento del ARN viral con la transcriptasa inversa (RT) y un ARNt que funciona como "*primer*" para el inicio de la transcripción inversa [292]. A 200 nucleótidos de la PBS, dentro de la secuencia *leader*, se encuentran el sitio dador de *splicing* (SD), seguido por la secuencia  $\psi$  (psi) la cual comprende la DLS (*dimer-linkage structure*) y que permite la encapsidación del ARN viral dentro de las partículas en formación. La DLS hace posible la dimerización de los ARNs virales dentro de dichas partículas [292]. El sitio SD, en asociación con el sitio SA (*splicing acceptor*) presente en la región 3' del gen *pol*, permite la generación de los ARNm que codifican para la glicoproteína de la envoltura (Figura 18).

En la otra extremidad del genoma viral, siguiendo los genes *gag*, *pol* y *env*, y precediendo a la LTR3', se localiza la secuencia PPT (*polypurin tract*) que sirve como "*primer*" para la elongación de la segunda hebra de ADN(+), y la misma es capaz de resistir a la actividad RNasa H de la transcriptasa inversa.

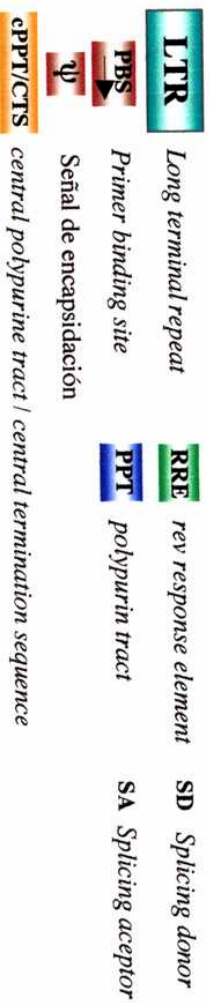
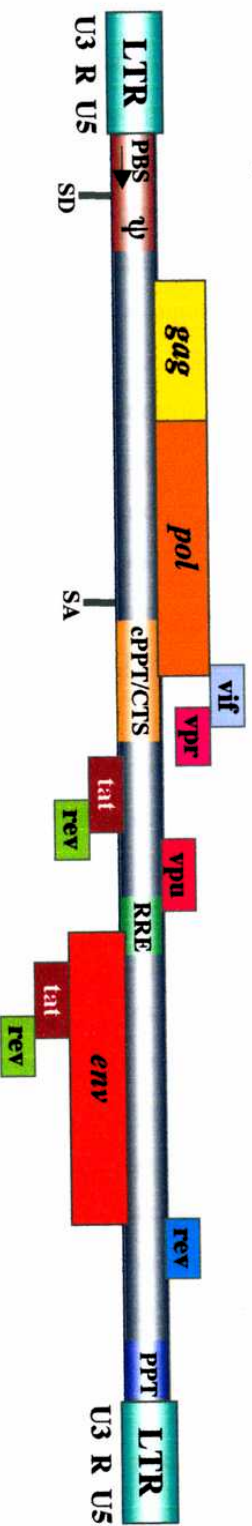
Ciertos retrovirus como los lentivirus, además de tener todas las secuencias que vienen de citarse, también poseen secuencias suplementarias que codifican para proteínas accesorias reguladoras del ciclo retroviral. En el caso de HIV-1 las mismas son: Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef. Este virus también contiene secuencias nucleotídicas capaces de interactuar con ciertas proteínas virales: la secuencia TAR (*trans-activation response element*), interactúa con la proteína Tat, que es un fuerte trans-activador de la transcripción del ADN proviral integrado en el genoma celular; la secuencia RRE (*rev response element*) al interactuar con la proteína Rev permite la exportación de ARNm virales hacia el citoplasma celular; finalmente la secuencia cPPT/CTS (*central polypurine tract / central termination sequence*) constituye un segundo sitio de iniciación de la síntesis del ADN(+) durante la transcripción inversa (Figura 18). Al final de este proceso, esta secuencia contribuye a la formación de una estructura de ADN triple, llamada "*central DNA flap*", implicada en la replicación del virus, en la capacidad del mismo para transducir células en estado quiescente, y en la importación nuclear del complejo de

**Figura 18** Representación del genoma de los retrovirus murino MLV, y humano HIV, con sus poliproteínas específicas

### MLVs (oncoretrovirus)



### HIV-1 (lentivirus)



preintegración (PIC) de HIV [293, 294]. No obstante, publicaciones recientes sugieren que la secuencia cPPT/CTS no sería necesaria para el ingreso del PIC al núcleo de las células infectadas [295, 296].

### I.1.2. El ciclo retroviral

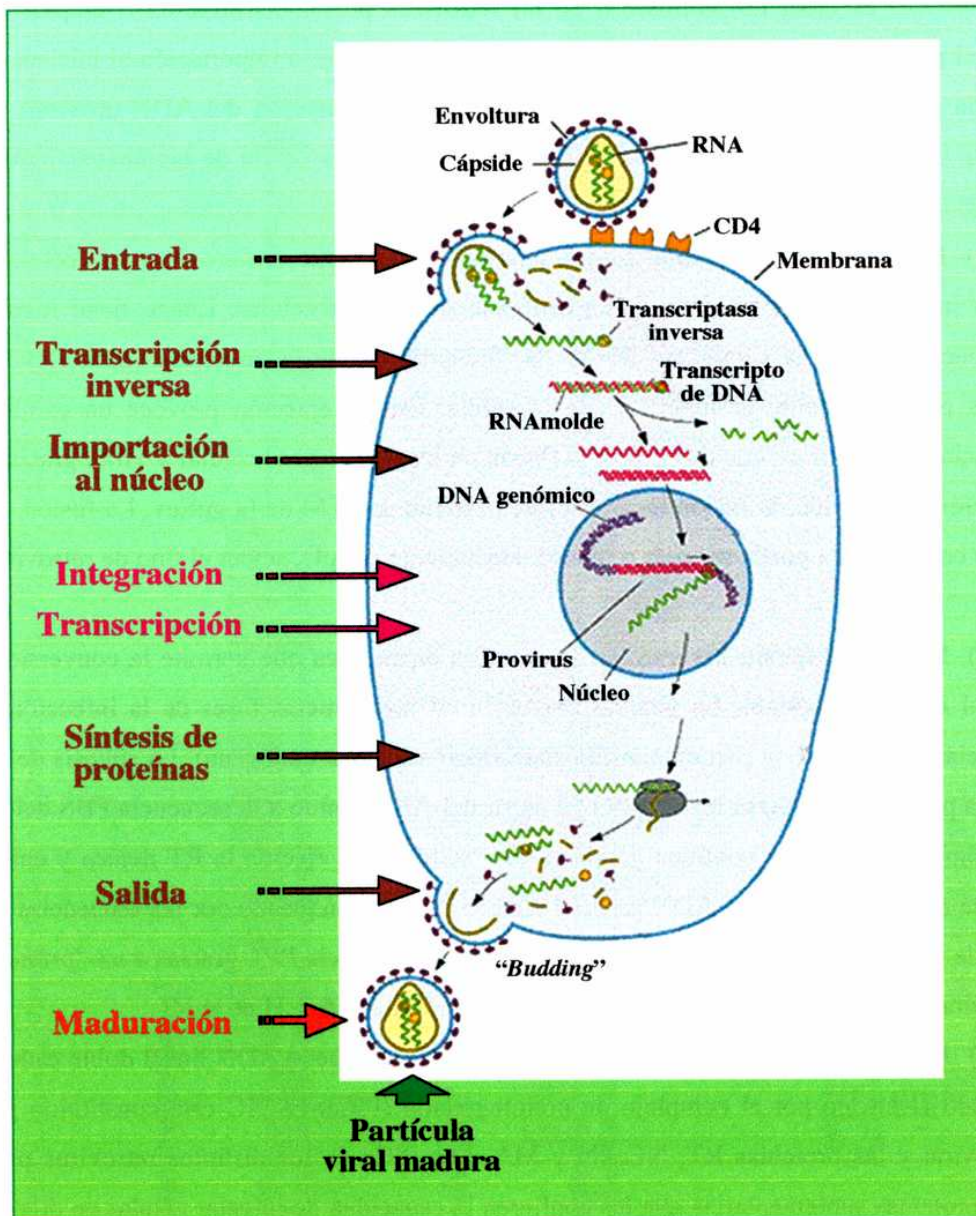
El ciclo de replicación de un retrovirus puede dividirse en 8 etapas: (1) la entrada del retrovirus a la célula; (2) la transcripción inversa; (3) la importación al núcleo; (4) la integración del ADN proviral al genoma celular; (5) la transcripción del ADN proviral; (6) la síntesis de las proteínas virales; (7) la formación y salida de la célula de las nuevas partículas virales; (8) la maduración de las partículas [297] (Figura 19).

(1) **La entrada en la célula:** La primera interacción entre el retrovirus y la célula es la absorción inespecífica del primero a la membrana plasmática celular. Luego tiene lugar una unión específica entre la subunidad SU de la glicoproteína de la envoltura (gpEnv) y el/los receptores presentes sobre la superficie de la célula. Esta interacción provoca un cambio de conformación de la gpEnv que conduce a la fusión de las membranas celular y viral, gracias a la participación del péptido de fusión localizado en la subunidad TM de la gpEnv. La fusión de los retrovirus con la célula puede ser más o menos dependiente del pH, según el tipo de retrovirus en cuestión.

(2) **La transcripción inversa:** Es la reacción enzimática que permite la conversión del ARN viral en ADN proviral. En general comienza en las primeras fases de la infección pero puede iniciarse dentro de la partícula viral (transcripción inversa endógena). La síntesis de ADN es iniciada por la transcriptasa inversa (RT) a partir del ARNt unido a la secuencia PBS del ARN viral genómico. La síntesis continua gracias a los "saltos" que efectúa la RT dentro y entre las cadenas de ARN, formando un ADN proviral simple cadena flanqueado por las secuencias LTR. La segunda cadena de ADN(+) es iniciada a partir de la secuencia PPT gracias a un "*primer*" de ARN resultante de la degradación del ARNt por la actividad RNasa H de la RT.

(3) **La importación del ADN proviral al núcleo:** El nuevo ADN lineal doble cadena es transportado al núcleo por el complejo de preintegración (PIC). El PIC esta constituido por el ADN proviral y las proteínas RT, NC, IN y MA. Los PICs de los distintos retrovirus pueden contener proteínas suplementarias que les confieren la capacidad de infectar células en diferentes estados de proliferación. Para ingresar en el núcleo, los oncoretrovirus necesitan de la división de la membrana nuclear, en tanto que los lentivirus son capaces de entrar al núcleo a través de los poros nucleares, sin necesidad de la dislocación de la membrana. Es por ello que un

*Figura 19 El ciclo retroviral de los MLVs*



oncoretrovirus es infectivo solo cuando las células se encuentran en proliferación y efectúan la mitosis, en cambio los lentivirus son capaces de infectar ciertas células en estado de quiescencia, en fases no proliferativas.

(4) **La integración del ADN viral:** la integración del ADN proviral necesita de las secuencias LTR y la funcionalidad de las secuencias IR. Este proceso es mediado por la integrasa (IN), la cual es responsable de la escisión del ADN celular e inserción del ADN viral. Este es un fenómeno de recombinación no homóloga y aparentemente sin especificidad de sitio, aunque se ha demostrado que existen regiones favorables para la integración dependiendo del estado de compactación de la cromatina.

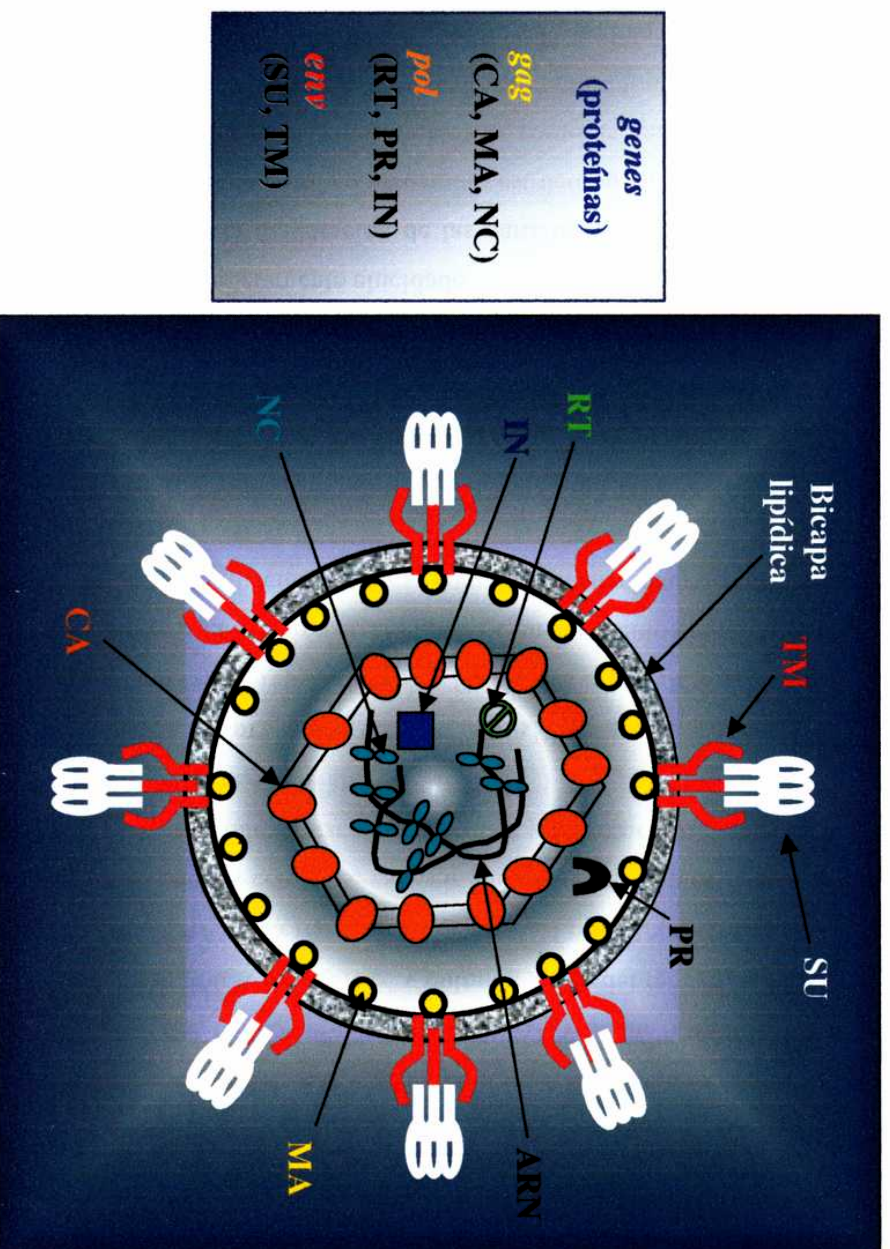
(5) **La transcripción del ADN proviral:** la ARN polimerasa I es la enzima que transcribe el ADN proviral dando origen a un solo ARNm. La transcripción comienza en el primer nucleótido de la región R del LTR 5' y culmina luego del reconocimiento de la secuencia de poliadenilación AAUAAA de la región R del LTR 3'. Los ARNm virales son sometidos a los mismos procesamiento que los celulares, es decir adición de un Cap en 5' y de una cola de poli-A en 3'. Todos los ARNm virales presentan el primer y último exón no codificante R-U5 de la LTR 5' y U3-R de la LTR 3', respectivamente.

(6) **La síntesis de las proteínas virales:** Los ARNm generados por *splicing* alternativo, que codifican para las proteínas retrovirales son traducidos a proteínas utilizando la maquinaria traduccional de la célula. La traducción se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y las proteínas virales pueden sufrir modificaciones tales como glicosilaciones, escisiones proteolíticas, miristilaciones, etc.

(7) **La formación y salida de las nuevas partículas virales:** los precursores proteicos Gag y Gag-Pro-Pol, como así también las gpEnv expresadas en la superficie celular, los ARNm virales y los ARNt celulares homólogos a la secuencia PPT, interactúan en la membrana plasmática para formar nuevas partículas virales. El proceso de formación y salida de las nuevas partículas aún no ha sido completamente elucidado.

(8) **La maduración:** la maduración de las partículas virales es primordial para que las mismas sean infecciosas. Esta consiste en un cambio estructural en el "core" de la partícula viral. La proteasa viral juega un rol central en este proceso, como así también la gpEnv. La acción de estas dos proteínas hace posible la generación de partículas biológicamente funcionales. Las partículas virales que han salido de la célula y madurado podrán entonces comenzar un nuevo ciclo infeccioso.

**Figura 20** Representación de una partícula retroviral madura con sus proteínas virales



Adaptación realizada a partir de la Tesis doctoral de Estanislao Bachrach, 2001

### 1.1.3. Las proteínas de la partícula viral

Como ha sido mencionado anteriormente, las proteínas retrovirales están codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*. Estos tres genes contienen la información para al menos 8 proteínas virales. Los mismos son transcriptos a partir de un solo promotor localizado en las LTR, y las proteínas son obtenidas por *splicing* alternativo o por corrimientos en los marcos de lectura. Las proteínas virales pueden separarse en tres grupos según su función: las proteínas estructurales, las enzimas virales y las proteínas de la envoltura.

**Las proteínas estructurales (gen *gag*):** El gen *gag* permite la traducción de un precursor poliprotéico llamado Gag, el cual es traducido a partir del ARN viral. Dicha traducción comienza en una secuencia IRES (*internal ribosome entry site*) y la misma es Cap independiente. El precursor Gag es encapsidado en las partículas virales y más tarde clivado por la proteasa viral durante la maduración. El clivaje de Gag origina al menos tres nuevas proteínas: la proteína de la matriz (MA), de la cápside (CA) y de la nucleocápside (NC) (Figura 20). Las regiones de Gag que luego del clivaje dan lugar a las MA, CA y NC participan al ensamblaje de los viriones.

**Las enzimas virales (gen *pol*):** estas proteínas son traducidas a partir de las ARNm virales, gracias a un corrimiento en el marco de lectura que permite evitar un codón stop al final del gen *gag*. Esto conduce a la síntesis de un precursor Gag-Pol que luego es clivado para dar origen a las proteínas Gag y las enzimas transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN). La otra enzima es la proteasa viral (PR) que es traducida a partir del ARNm por mecanismos diferentes dependiendo del retrovirus (Figura 20). La PR es indispensable para el clivaje de los precursores Gag y Gag-Pol, y la misma es funcional como un homodímero. La RT es una ADN polimerasa, ADN o ARN-dependiente, que posee igualmente la actividad RNasaH capaz de degradar híbridos ADN-ARN. Estas funciones son indispensables para la transcripción inversa. A diferencia de otras polimerasas, la RT no tiene la actividad de "*proof-reading*" y en consecuencia no corrige los errores que incorpora durante la transcripción. La IN cataliza la integración del ADN proviral en el genoma celular

**Las proteínas de la envoltura (gen *env*):** estas proteínas son traducidas por *splicing* alternativo. Como otras proteínas retrovirales, ellas son sintetizadas como un precursor que luego es clivado. El clivaje de las proteínas de la envoltura es efectuado por una proteasa celular en el aparato de Golgi. Las dos proteínas resultantes son la glicoproteína de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM) (Figura 20). SU está fuertemente glicosilada y la misma contiene sitios de unión para receptores celulares. TM es responsable de la fusión entre las membranas viral y celular. SU y TM pueden estar unidas por uniones no covalentes (envoltura anfotrópica) o

por puentes disulfuro (envoltura ecotrópica), y los dímero resultantes SU-TM son incorporados en las partículas virales en forma de trímeros (SU-TM)<sub>3</sub>. Este proceso se efectúa gracias a la interacción de la parte citoplásmica de TM con la región MA de Gag.

#### 1.1.4. El tropismo

El tropismo podría ser definido como la capacidad del retrovirus a infectar un cierto tipo celular perteneciente a una especie animal específica. Esta capacidad está determinada por la habilidad de las proteínas de la envoltura viral de interactuar con diferentes receptores presentes en la superficie de las células blanco. En este manuscrito solo describiré el tropismo de los MLVs y del HIV-1. Para entrar en la célula los oncoretrovirus murinos utilizan diferentes moléculas de la superficie celular que comparten similitudes estructurales. Los MLVs han sido separados en grupos según el receptor celular que utilicen para entrar en la célula. Los virus ecotrópicos son aquellos capaces de infectar células murinas o de pequeños roedores. Estos virus reconocen un transportador de aminoácidos catiónicos independiente de sodio (m-CAT-1), localizado en la superficie celular [298, 299]. Los virus anfotrópicos pueden infectar células murinas y humanas. Reconocen un transportador de iones fosfato inorgánico (Pit-2) que es dependiente de sodio y que es expresado de manera ubiquitaria [300, 301]. Los virus de la cepa 10A1 que derivan de una recombinación entre los virus anfotrópicos y un gen *env* endógeno, pueden utilizar Pit-2 y además reconocen Pit-1 que es un homólogo a Pit-2, con 62% de homología [302, 303]. Otros tropismos diferentes son los que presentan los virus xenotrópicos y politrópicos, capaces de infectar respectivamente células no murinas y células de diversas especies incluyendo murinas [304, 305].

Los retrovirus HIV-1, como así también HIV-2, son capaces de reconocer como receptor el CD4 [306, 307]. Al parecer, la capacidad de los lentivirus de reconocer el CD4 es el resultado de una evolución reciente del virus. CD4 es expresado en un gran número de células hematopoyéticas, incluyendo linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En general, para entrar en una célula, los lentivirus necesitan la presencia de una segunda molécula de membrana. Esta molécula es un receptor de quimioquinas de tipo CXC o CC (según la cantidad de cisteínas en su extremo N-terminal). Las cepas de HIV-1 de tropismo M, detectadas en los primeros estadios del SIDA, utilizan como coreceptor el CCR5. Los ligandos naturales de CCR5 son las proteínas MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), MIP-1 $\beta$  y RANTES. Estas cepas infectan los macrófagos y los linfocitos T, entre otros.

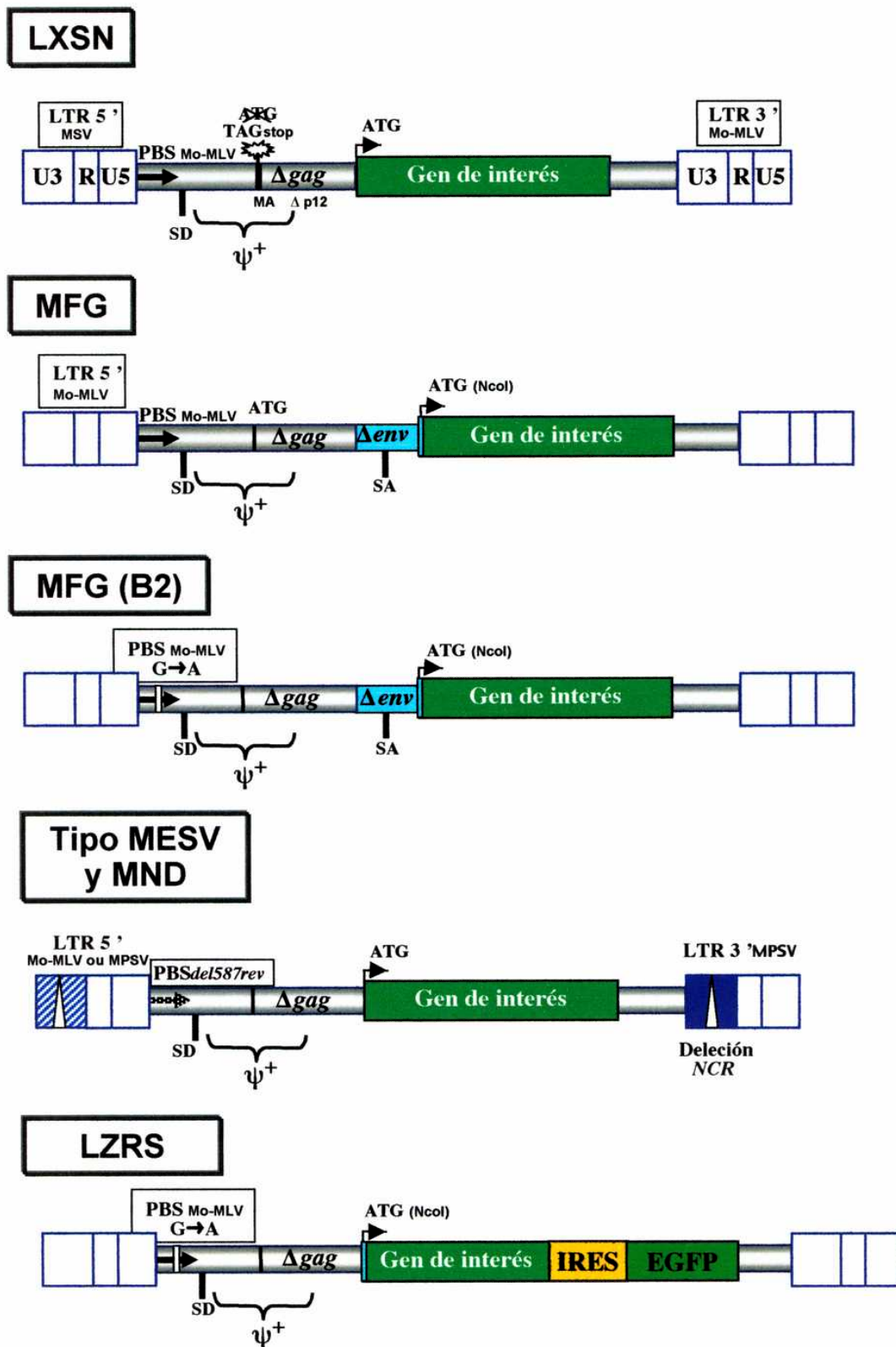
Las cepas de HIV de tropismo T que aparecen en un estadio más avanzado del SIDA y que están asociadas con una progresión acelerada de la enfermedad, se caracterizan por su poder de replicación en células T. Su coreceptor mayor es el CXCR4, quien utiliza como ligando natural el factor SDF-1 $\alpha$  (*stroma-derived factor-1  $\alpha$* ). En estos estadios existen además cepas de tropismo mixto capaces de infectar macrófagos y linfocitos T, utilizando los dos coreceptores, CCR5 y CXCR4 a la vez. Estos coreceptores se encuentran a proximidad del receptor CD4, muchas veces formando complejos CD4/CCR5 o CD4/CXCR4, lo cual facilita la fijación de las partículas virales.

El tropismo es una característica sumamente importante para los retrovirus, y el mismo ha contribuido al éxito evolutivo de estos organismos. Actualmente, el tropismo se ha convertido en una útil herramienta para la construcción de vectores retrovirales para la transferencia de genes. Mediante la modificación de las envolturas virales y la construcción de quimeras de las gpEnv es posible fabricar nuevos vectores retrovirales con nuevos tropismos hacia diferentes tipos celulares.

## 1.2. Los vectores retrovirales

Los retrovirus poseen todas las funciones para replicarse en las células animales, integrarse al genoma de la célula huésped, y expresarse de manera estable durante el transcurso de las divisiones celulares. El descubrimiento que ciertos retrovirus llevan secuencias provenientes de proto-oncogenes celulares puso de manifiesto la particularidad de estos virus de ser capaces de adquirir secuencias celulares sin perder sus capacidades infecciosas. Esto condujo al estudio de la capacidad de los retrovirus a aceptar diversos tipos de secuencias codificantes en su genoma, que no afectaran la capacidad de los mismos de infectar células blanco. Así, numerosos trabajos demostraron que es posible suprimir grandes regiones del genoma retroviral reemplazándolas por otras secuencias codificantes. Mientras que las deleciones dejan al virus no competente para la replicación, el aporte en *trans* de las funciones virales indispensables para la replicación mediante un virus auxiliar, permite restablecer la programación del virus modificado. Estas características de los retrovirus motivaron a la utilización de los mismos para desarrollar vectores de transferencia de genes. El principio de aportar en *trans* todas las proteínas virales necesarias y suficientes para la generación de partículas virales infecciosas constituye la base de la estrategia de producción de vectores virales.

**Figura 21** Vectores retrovirales derivados de MLVs



Adaptación a partir de Sitbon M et al., 2001

### I.2.1. Construcción de vectores retrovirales

#### I.2.1.a. Vectores derivados de MLV

Desde los años 80 y hasta la fecha, numerosos vectores retrovirales han sido contruidos variando diferentes secuencias de los retrovirus. Con el fin de mejorar y prolongar la expresión del transgén a largo plazo, diferentes vectores basados en los MLV han sido modificados sucesivamente. Los vectores retrovirales para la transferencia de genes son una copia de los retrovirus defectivos para la replicación. Los mismos son obtenidos reemplazando los tres genes virales *gag*, *pol* y *env* (y no solo uno, como es el caso para la mayoría de virus defectivos) por uno a más transgenes. Las secuencias llamadas en *cis* que son necesarias para la regulación de la encapsidación ( $\psi$ ), la transcripción inversa (PBS, R, PPT), y la expresión de los transgenes (LTR), son conservadas. En este caso, cuando los retrovirus son no replicativos conviene utilizar el término "transducción" y no infección, ya que en los mismos la interrupción del ciclo viral imposibilita la producción de partículas virales, al menos que intervenga un virus auxiliar.

En términos de expresión del transgén, la elección del vector de base determinará cuales serán las secuencias que regularán y afectarán esta expresión. Aunque existen numerosas posibilidades, en este manuscrito solo detallaré los vectores de expresión derivados de MLV utilizados más frecuentemente.

En el vector retroviral prototipo inicial (LXSN), la expresión de un gen de interés X es controlada por la LTR [308]. En la forma de plásmido es la LTR5' la que ejerce dicho control, y en la forma proviral integrada es la LTR3'. El gen X es ubicado luego de la secuencia  $\psi$  acoplada a los primeros 600 nucleótidos del gen *gag* los cuales serían importantes para la encapsidación. Estas dos regiones acopladas se designan con el término  $\psi+$  [309]. Para evitar la traducción de la primera parte de Gag comprendida en los 600 nucleótidos, el primer AUG correspondiente a la secuencia de *gag* es sustituido por el codón stop TAG (Figura 21).

Con el fin de mejorar la expresión del transgén, las secuencias formando parte del vector prototipo aquí descrito sufrieron importantes modificaciones. De este modo, en la serie de vectores MFG, la región correspondiente al sitio aceptor de *splicing* (SA) situado al comienzo del gen *env*, fue agregada luego de la secuencia  $\psi+$  con el fin de aumentar el *splicing* a nivel del transgén [310]. En esta misma serie de vectores, el codón ATG del gen *gag* no fue reemplazado por un codón stop (Figura 21).

Directamente derivado del MFG, el MFG(B2) [311] posee una mutación adicional en la secuencia PBS con el objetivo de mejorar la expresión del transgén en ciertos tipos celulares

como por ejemplo las *stem cells* hematopoyéticas. Este vector ha sido utilizado en ensayos clínicos de terapia génica para una inmunodeficiencia humana [312] (ver ítem II.4.2. de este capítulo) (Figura 21).

Otras modificaciones de los vectores retrovirales han sido introducidas con el fin de mejorar la expresión del transgén en células hematopoyéticas [311, 313]. De este modo, en los vectores tipo MESV (*Murine Embryonal Cell Virus*) [313] o MND (*Mp-Ncr-DI*) [314], derivados de MLV y MPSV (*Myeloproliferative sarcoma virus*), se introdujeron tres tipos de modificaciones: 1) la expresión del transgén en la forma proviral está bajo el control de secuencias U3 del MPSV; 2) la secuencia de regulación negativa NCR (*negative control region*), la cual es conservada en varios retrovirus, fue eliminada; 3) la secuencia PBS del virus "wild-type" fue reemplazada por una PBS ARNtGln derivada de un mutante de MoMLV (*Moloney MLV*) dl587rev, según el mismo principio que en el vector MFG(B2) (figura 21).

Vectores que han sido construidos recientemente se basan en la cepa FB29 de MLV de Friend. Estos vectores han sido descritos por tener títulos infecciosos mayores a los de otros MLVs [315] y por poseer un espectro de expresión mas amplio. Este tipo de vector permite la transducción de células hematopoyéticas utilizando menos cantidad de factores de crecimiento, preservando el poder de diferenciación de las células [316].

Otro tipo de vectores son los que utilizan promotores internos para controlar la expresión del transgén. Estos promotores pueden ser ubiquitarios, como por ejemplo el del cytomegalovirus humano (CMV), o específicos para ciertos tipos celulares como por ejemplo el promotor del CD4 [317]. La introducción de estos promotores en general se acompaña de una delección de la región U3 en 3' ( $\Delta U3$ ). Una vez que el vector se ha integrado, la LTR5' $\Delta U3$  es inactiva, lo que permite evitar una competición por los factores de transcripción entre el promotor interno y el promotor natural de virus. Estos vectores LTR3' $\Delta U3$  son denominados vectores SIN (*self-inactivating*).

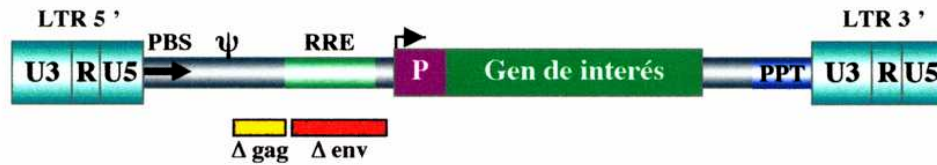
Otra alternativa a la de los promotores internos es la utilización de la secuencia IRES que permite la traducción de dos genes a partir de un mismo ARNm viral. Este es el caso del vector LZRS utilizado en una gran parte del trabajo que es presentado en este manuscrito. El mismo deriva del LXSXN y fue construido por el equipo del Dr. Spitz en Holanda. Este vector contiene la secuencia que codifica para la proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) después de la IRES y bajo control de la LTR [314] (Figura 21).

La utilización de vectores retrovirales derivados de MLV se limita a la células en proliferación, ya que la integración de los mismos necesita de una dislocación de la membrana nuclear.

**Figura 22** Vectores lentivirales derivados de HIV-1

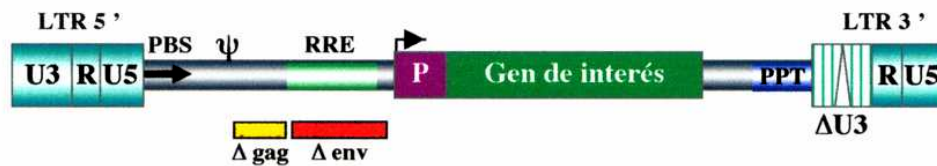
**HR**

Vector complementado con *env*, *gag*, *pol*, y *Tat*, *Rev*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef* (Ref. 318)



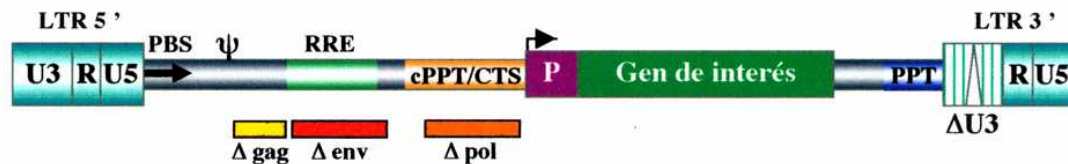
**SIN**

Vector complementado con *env*, *gag*, *pol*, y solo *Tat* y *Rev* (Ref. 319, 320)



**TRIPΔU3**

Vector complementado con *env*, *gag*, *pol*, *tat* y *Rev* (Ref. 294)



Adaptación realizada a partir de la Tesis doctoral de Valérie Dardalhon, 2001

### I.2.1.b. Vectores derivados de HIV-1

Los vectores para la transferencia de genes derivados de HIV-1 han sido generados según el mismo principio que los vectores basados en MLV. Un sistema de complementación en *trans* es igualmente utilizado para asegurar la producción de las partículas virales. Los lentivirus, a diferencia de los MLVs, son capaces de infectar células en fase no proliferativa gracias a su particularidad de poder ser importados al núcleo sin necesidad de dislocación de la membrana nuclear. Esta característica de los lentivirus motivó a la creación de vectores lentivirales que podrían ser de suma utilidad para la transducción de células que no efectúan mitosis, como por ejemplo neuronas, *stem cells* o células musculares. Durante la corta historia de estos vectores, tres diferentes generaciones han sido creadas, y cada una de ellas ha sido mejorada progresivamente en términos de eficiencia y bioseguridad. En la figura 22 se ilustran algunos de los vectores lentivirales derivados de HIV-1.

En la primera generación, los vectores lentivirales contienen en *cis* las secuencias codificando para la transcripción, integración, transcripción inversa, y encapsidación (LTR5'/*leader*:SD-360 nucleótidos de *gag*/ una parte de *env* con la RRE<sup>+</sup> + SA/promotor interno + transgén/ LTR3'), y las proteínas accesorias son aportadas en *trans* en diferentes plásmidos. En los de segunda generación (vectores HR), solo las proteínas accesorias Tat y Rev son aportadas en *trans* [318]. En estos vectores la U3 de la LTR3' fue eliminada para que los mismos fueran vectores lentivirales SIN [319, 320]. También, se agregaron elementos de regulación post-transcripcional, especialmente la secuencia WPRE (*Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*) que insertada en la región 3' permite incrementar el nivel de expresión del transgén entre 5 y 8 veces [321].

En la tercera generación (vectores TRIPΔU3), los vectores lentivirales se mejoraron aún más. En los mismos se agregó la secuencia cPPT/CTS en la parte central del vector [293, 322]. La ubicación de esta secuencia en el centro del vector sería importante ya que permite transducir un porcentaje mayor de células blanco. Esto fue demostrado para la transducción de fibroblastos, células endoteliales y células progenitoras hematopoyéticas [323]. Pese a que se ha postulado que la secuencia cPPT/CTS incrementa la importación al núcleo del PIC [293, 294], actualmente existen ciertos interrogantes sobre cual es la función principal de la misma [295, 296].

## I.2.2. Producción de partículas retrovirales

### I.2.2.a. Líneas de empaquetaje y producción de vectores derivados de MLV

Las secuencias necesarias para la producción de las partículas virales las cuales han sido eliminadas del vector, son aportadas en *trans* en líneas celulares llamadas líneas de empaquetaje. Los vectores retrovirales derivados de oncoretrovirus pueden generarse a partir de sistemas de producción transitorios o estables. En el contexto de protocolos clínicos es de interés contar con sistemas estables. Esto permite: 1) eliminar el riesgo de recombinación entre los plásmidos codificando para las proteínas aportadas en *trans* y el plásmido conteniendo el vector retroviral; 2) “estandarizar” los métodos de producción de vectores posibilitando controles de bioseguridad más pertinentes; 3) producir los vectores a gran escala para su utilización en ensayos preclínicos en modelos animales, y clínicos en el hombre.

Las primeras líneas de empaquetaje que fueron construidas derivaban de células NIH3T3 de ratón. Después se establecieron líneas derivadas de células humanas, como la serie FLY [324], o la línea Phoenix [325]. No obstante, la línea que sigue siendo la más utilizada en ensayos clínicos es la NIH3T3. Otras líneas también han sido modificadas con el fin de aumentar los títulos virales producidos. Por ejemplo, la 293T expresa el antígeno T del virus SV40, lo cual permite acumular un gran número de copias de plásmidos que contengan un origen de replicación de SV40 y que pueden llevar los genes necesarios para la producción de las partículas. En la actualidad se puede disponer de varias líneas de empaquetaje que expresan de manera inductible o constitutiva los genes *gag-pol* de MoMLV y un gen *env* de tropismo variado. De acuerdo al gen *env* expresado se pueden obtener vectores derivados de MLV con diferente tropismo, lo que determinará la capacidad del vector a infectar las células blanco. Por ejemplo, vectores producidos en líneas que contengan el gen *env* GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*) infectarán más eficazmente las células hematopoyéticas y los linfocitos T [326, 327]. En cambio, los vectores que llevan en la envoltura la glicoproteína G del rabdovirus de la estomatitis vesicular (VSV-G), poseerán un mayor tropismo pudiendo transducir varios tipos celulares diferentes [328]. El receptor de VSV-G aún no ha sido identificado, pero al parecer se trataría de fosfolípidos aniónicos. Una ventaja de este tipo de proteína de la envoltura es su estabilidad, lo cual permite la ultracentrifugación de las partículas virales, obteniendo así títulos infecciosos elevados [329, 330]. La desventaja de VSV-G es su toxicidad, lo cual obliga a que sea expresada en las líneas de empaquetaje de manera transitoria [331, 332].

En la actualidad, existen líneas de empaquetaje capaces de generar títulos virales superiores a  $10^6$  partículas infecciosas por mililitro (p.i/ml), pudiendo alcanzar los  $10^8$  a  $10^9$  p.i/ml

mediante la utilización de técnicas de concentración de los sobrenadantes que contienen las partículas.

### **I.2.2.b. Producción de vectores derivados de HIV-1**

Generalmente, la producción de vectores derivados de lentivirus se efectúa mediante la cotransfección transitoria en la línea 293T de un plásmido conteniendo el vector retroviral y de otros que codifican para las proteínas accesorias. Como ha sido mencionado anteriormente, para la producción de vectores lentivirales de primera generación, las proteínas accesorias Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef son expresadas a partir de plásmidos transfectados en la 293T. Junto a estas proteínas también se expresa la proteína VSV-G quien permite la obtención de partículas virales con tropismo variado [318] (Figura 22).

Para la producción de los vectores de segunda generación, las células de empaquetaje solo contienen las proteínas accesorias Tat y Rev. En efecto, parecería que los genes accesorios no son indispensables para la producción de las partículas virales, ya que se mostró que las proteínas Vif y Vpu no son necesarias para obtener viriones a partir de la línea de empaquetaje 293T [333, 334]. Sin embargo, la importancia de ciertas proteínas accesorias para la transducción de diferentes tipos celulares es motivo de controversia [335]. La proteína Vpr sería necesaria para la transducción eficaz de macrófagos [334, 336], en tanto que Vif y/o Vpr lo serían para la transducción de las células del hígado [337]. La transducción de células neuronales y de células progenitoras hematopoyéticas podría efectuarse en ausencia de genes accesorios [338, 339] (Figura 22). Los vectores de tercera generación se producen de manera similar a los de segunda generación.

Como para los vectores derivados de MLV, la calidad del "stock" viral se mide por el título viral. Para los vectores derivados de HIV-1, dicho título es calculado midiendo en los sobrenadantes obtenidos de las células de empaquetaje, la concentración de la proteína p24 (CA de HIV-1).

## **II. Historia y actualidad de la terapia génica**

### **II.1. Más de una década no solo de progresos**

La corta historia de la terapia génica ha sido escrita sobre la base de descubrimientos espectaculares y avances científicos progresivos, que han hecho de la misma una nueva área conceptual de la biomedicina. La evolución de la terapia génica puede ser seguida a través de los títulos de revistas o editoriales que le fueron consagrados desde fines de los años 80. Así, a

comienzos de los 90, y en la euforia de los primeros resultados pre-clínicos obtenidos en ratones, Dusty Miller escribía en la revista Nature: "*Human gene therapy comes of age*" [282]. En 1997, Inder Verma era mucho más prudente titulando en Nature: "*Gene therapy: promises, problems and prospects*" [340]. En 1999, la noticia de la muerte de un paciente debida a los efectos adversos de un vector adenoviral conmocionaba al mundo científico y abría varios interrogantes sobre la terapia génica. A la ocasión Nature publicaba: "*Virus treatment questioned after gene therapy death*" [341], y la editorial agregaba: "*Gene therapy - a loss of innocence*" [342]. Promediado el 2000 volvieron los títulos optimistas con "*Gene therapy for human SCID: dreams become reality*" [343] y "*Gene therapy turns the corner*" [344], ambos publicados en Nature Medicine.

Cuales fueron las causas de esta evolución un tanto caótica de la terapia génica?

Las primeras experiencias de transferencia de genes se remontan al comienzo de los años 80. Muy rapidamente, la utilización de esta técnica es considerada y tenida en cuenta para la terapéutica contra las patologías que no tenían un tratamiento satisfactorio. Este es el caso de ciertos tipos de cáncer y ciertas enfermedades genéticas. Los primeros ensayos pre-clínicos realizados en ratones tienen lugar muy tempranamente [345, 346] y algo más tarde se efectúa el primer ensayo clínico. El mismo comienza en 1989, en un paciente con un melanoma, donde los linfocitos que infiltran tumores (TIL) fueron marcados genéticamente con el fin de estudiar la posibilidad de desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer [284]. En 1990 también tiene lugar el primer ensayo clínico de terapia génica en el caso de una SCID, la deficiencia en la enzima ADA. Solamente dos años más tarde, en junio de 1992, 13 protocolos de ensayos clínicos habían sido aceptados en los EEUU, 5 de los cuales fueron marcaciones genéticas, 3 para enfermedades genéticas (ADA y hipercolesterolemia familiar) y 5 de inmunoterapias contra el cáncer [282]. Entre 1992 y 1996 el número de ensayos clínicos aumentó considerablemente, siendo más de 140 los aprobados en 1995, implicando a más de 600 pacientes. Estos protocolos utilizaban para la transferencia de genes principalmente los vectores retrovirales (60%), aunque los vectores no-virales también eran empleados (lipofección 12%). Finalmente, los vectores derivados de adenovirus eran utilizados en 13% de los ensayos y los AAV en solo 1%. La decepción llega algo más tarde, cuando los resultados fueron mucho menos espectaculares de lo que se esperaba. En efecto, los mismos revelaban que la terapia génica era aplicable, pero que las técnicas de transferencia de genes eran aún muy ineficaces. Además las mejoras clínicas observadas en algunos de los pacientes tratados fueron solo parciales y transitorias [285, 347, 348].

## II.2. La terapia génica en números

Los ensayos clínicos de terapia génica han sido aplicados en diferentes países, más o menos distribuidos en todos los continentes. Los EEUU encabeza la lista con el 79.4% de los ensayos realizados. En segundo lugar, y mucho más lejos, se encuentra el Reino Unido con 7.4%. Luego se encuentran Francia con 2.4, Canadá 1.7, Alemania 1.6, Suiza 1.3, Italia 1.1, Holanda 0.9, y finalmente otros países con 4.1%. La mayor parte de estos ensayos han sido aplicados para el tratamiento del cáncer. En efecto; 63.4% de la totalidad de los mismos fueron para esta enfermedad. 12.3% han sido destinados al tratamientos de las enfermedades monogénicas, 8% para enfermedades vasculares, 6.4% para las infecciosas y 1.9% para otras enfermedades. En los protocolos aplicados se han utilizado una variedad de vectores para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales han sido los más empleados, participando en 34.1% de los mismos. Los adenovirus han sido utilizados en 26.9% y los Poxivirus en 6.1%. Los AAV y los herpes simplex en 2.4 y 0.8%, respectivamente. Entre los vectores no virales, la lipofección es la más utilizada con el 12.1%, seguida por la utilización de ADN desnudo (11%) y la transferencia de ARN (0.9). Finalmente, 1.7% de los ensayos han utilizado otras técnicas para la transferencia de genes. Con respecto a los tipos de genes más utilizados, las citoquinas son las más comunes, presentes en 21.1% de los ensayos. Los antígenos han sido empleados en 11.9% de los mismos. Genes sanos para reemplazar genes mutados en 10.5% de los casos, genes suicidas y genes supresores de tumores en 8.6% , marcadores en 6.3, receptores en 4.2, genes múltiples en 15.6 y otros en 12.4%. De acuerdo al modo de administración de los vectores, en 23.9% de los ensayos los vectores se inyectaron por vía intratumoral. En 18.1% la administración fue por vía intravenosa y en 10.1% subcutánea. En 7.1% de los casos se realizó un trasplante de médula ósea y en 7.7 y 3.5% de los ensayos los vectores se administraron por vía intramuscular e intraperitoneal, respectivamente. 3.1% utilizó la vía nasal y 3.3 varias vías en simultaneo. 17% de los ensayos utilizaron otras vías.

(*The Journal of Gene Medicine database* <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/>)

## II.3. La terapia génica hoy

### II.3.1. Las enfermedades implicadas en ensayos clínicos

A lo largo de este manuscrito se ha citado en reiteradas oportunidades la importancia de la terapia génica como una alternativa para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades y trastornos genéticos. La medicina moderna valoriza de más en más esta posibilidad y en algunos países se destinan importantes sumas de dinero para el desarrollo de esta

nueva y revolucionaria tecnología. Como venimos de ver, un considerable número de ensayos clínicos han sido aplicados para el tratamiento de diferentes enfermedades.

El Cáncer es la enfermedad para la cual se han realizado la mayor cantidad de ensayos clínicos. Algunas de las estrategias que han sido aplicadas son las inmunoterapias con histocompatibilidad de antígenos; la utilización de genes supresores de tumores, como el gen BCRA1; el uso de vectores virales portando genes antitumorales o pro-apoptóticos, como por ejemplo el gen p53; la utilización de liposomas conteniendo dicho gen; y la terapia con vectores llevando genes suicidas o genes para citoquinas que ayudan a la eliminación de ciertos tumores, como por ejemplo la IL-2, IL-12 o IL-7. Estas estrategias se han aplicado para diferentes tipos de cáncer incluyendo, cáncer de ovario, carcinoma pulmonar, otros cáncer de pulmón, leucemias, tumores sólidos, melanomas y carcinomas hepatocelulares. También en la carcinomatosis leptomeningeal, en adenocarcinomas, en glioblastomas y en el control de GvHD en el trasplante alogénico de HSCs.

La enfermedad infecciosa que ha concentrado la mayor cantidad de esfuerzos para el desarrollo de nuevas terapias es el SIDA. El objetivo principal de las mismas es de inhibir la infección por el virus HIV o la replicación del mismo en los linfocitos y macrófagos. Para ello se emplean vectores retrovirales que contienen genes de proteínas dominantes negativas de moléculas indispensables para el ciclo replicativo del virus. Otra estrategia es la utilización de ARNm antisense o de ribozimas [349, 350].

Entre las enfermedades monogénicas que han sido incluidas en ensayos clínicos se pueden citar la X-SCID, la deficiencia en ADA, la mucopolysacaridosis [351], la hipercolesterolemia familiar [348], la fibrosis quística [352-355], la hemofilia B [356, 357], y la enfermedad granulomatosa crónica [358].

Otras enfermedades para las cuales se han realizado ensayos clínicos son la enfermedad de la arteria coronaria, la esclerosis anfotrópica lateral y la artritis reumatoide.

#### **II.4. La terapia génica para las SCIDs**

Los efectos drásticos de las SCIDs sobre los pacientes que las padecen, la poca disponibilidad de donantes histocompatibles para el tratamiento por trasplante de HSCs, y el descubrimiento de los diferentes genes implicados en cada una de las deficiencias que conducen a una SCID, han hecho de esta enfermedad un candidato apropiado para la aplicación de la terapia génica. Además, se demostró que el producto de distintos genes responsables de SCIDs proporciona señales de supervivencia, de proliferación o de diferenciación para los progenitores

linfoides, con lo cual la introducción de un gen “*wild-type*” en células que posean uno defectuoso podría representar una ventaja selectiva para las mismas. Esto pudo ser demostrado en un raro evento de reversión *in vivo*, en un paciente con una deficiencia en ADA debida a mutaciones heterocigotas en los alelos aportados por cada uno de sus padres [359]. Gracias a una nueva mutación somática, el alelo materno llevando la sustitución de una arginina por una histidina en el codón 156 del gen *ADA*, fue revertido a su secuencia normal volviendo a codificar para una arginina en dicho codón. Esta reversión fue detectada en una población mayoritaria de linfocitos del paciente conjuntamente con algunas células que conservaron la mutación, formando un mosaico genético de células linfoides. La reversión a la forma normal del gen *ADA* confirió a una “afortunada” célula progenitora una potente ventaja selectiva para propagarse y dar origen a las poblaciones de linfocitos normales, predominantes en la sangre periférica de este paciente [359].

Este descubrimiento es la evidencia más clara de terapia génica somática *in vivo* [360] y sugiere fuertemente que de la misma manera que en este paciente, la transferencia *ex vivo* de un gen terapéutico en células progenitoras, podría conferir a estas últimas una ventaja selectiva de crecimiento, propagación y diferenciación *in vivo*.

#### II.4.1. La terapia génica para la deficiencia en ADA

ADA es una enzima ubiquitaria que transforma reversiblemente adenosina en iosina y 2'-deoxyadenosina (dAdo) en 2'-deoxyinosina [361]. La deficiencia en ADA provoca defectos en el metabolismo de las purinas, los cuales conducen primeramente a la ausencia del desarrollo de los linfocitos, pero también a anormalidades no asociadas al sistema inmunológico. Es por ello que la deficiencia en ADA es considerada como un caso particular de SCID. Esta deficiencia fue identificada como una causa de SCID en 1972 [362], y recién en 1984 el gen *ADA* pudo ser clonado [363].

Para el tratamiento de los pacientes deficientes en ADA se utilizó una terapia basada en la administración de la enzima ADA estabilizada por un acoplamiento a polyethileneglycol (PEG-ADA) [364]. Debido a que los sustratos tóxicos de ADA difunden libremente en el cuerpo de los pacientes deficientes en la enzima, la administración de PEG-ADA debe realizarse semanalmente. Aplicando este tratamiento, el desarrollo de los linfocitos T puede ser restaurado a niveles suficientes para permitir al paciente vivir libre de infecciones. Sin embargo, algunos pacientes no respondieron satisfactoriamente al tratamiento con PEG-ADA.

Debido al pequeño tamaño de la parte codificante del gen *ADA* y a su expresión ubiquitaria, este gen fue inmediatamente elegido como un buen candidato para utilizarlo en un

protocolo de transferencia de genes en aquellos pacientes donde el PEG-ADA no había funcionado. Los vectores retrovirales derivados del virus MoMLV fueron elegidos para transportar el gen *ADA* dentro de células progenitoras linfoides o de linfocitos T maduros. La transferencia del gen *ADA* en las células T periféricas de pacientes condujo a resultados alentadores, aunque no del todo suficientes para asegurar una mejoría en los pacientes tratados y por ello se decidió recomenzar simultáneamente el tratamiento con PEG-ADA [285]. Los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos pusieron en evidencia problemas técnicos, en particular a nivel de la eficacia de las transducciones y de la estabilidad de la expresión de los transgenes. No obstante, aportaron numerosas informaciones consecuentes para el desarrollo de la terapia génica. En primer lugar se demostró que la estrategia de transferencia del gen *ADA* en los linfocitos T era realizable. En efecto, las células T aisladas de pacientes fueron transducidas *ex vivo* y reintroducidas en los mismos sin la aparición de efectos adversos [285, 365]. En segundo lugar, al menos en un paciente, las células T transducidas fueron detectadas entre 8 y 10 años después de realizada la transferencia del gen. Esto es una verdadera demostración de la longevidad de las células T humanas *in vivo*, y es un resultado auspicioso para la aplicación de la terapia génica en los desórdenes del sistema linfoide. Sin embargo, la mayoría de los linfocitos T circulantes fueron células sin transducir y debido a que los pacientes fueron tratados simultáneamente con PEG-ADA, no fue posible determinar si la transferencia del gen *ADA* dentro de las células T proporcionó algún beneficio para los mismos.

Diferentes grupos tuvieron un objetivo más ambicioso, el de corregir de manera definitiva la deficiencia en *ADA* insertando el gen de esta enzima dentro de células progenitoras hematopoyéticas [289, 366-369]. Tres ensayos clínicos fueron puestos en marcha: uno utilizó dos vectores retrovirales para introducir el gen en células T periféricas y en células progenitoras de la médula ósea [289]; otro utilizó como blanco células progenitoras de la sangre de cordón umbilical [366, 368]; y otro utilizó como blanco células de la médula ósea aisladas de pacientes con una edad más avanzada [367]. Una vez más, en estos ensayos no se interrumpió el tratamiento con PEG-ADA. Aunque en general, los resultados obtenidos fueron más bien decepcionantes (de acuerdo a las expectativas creadas), pudieron rescatarse algunos conceptos interesantes. En uno de los ensayos, un pequeño porcentaje de leucocitos fue transducido, y los mismos fueron detectados 8 años más tarde [366, 368]. Además, cuando las dosis de PEG-ADA suministradas a los pacientes fueron reducidas de 60 a 15U/Kg/semana, se pudo detectar un número mayor de células T transducidas que de células mieloides transducidas. Esta observación indica que la transferencia del gen puede traducirse en una ventaja selectiva para los precursores de células T. Esto significa

que la expresión del transgén en los precursores hematopoyéticos proporciona una supervivencia selectiva, una ventaja en el crecimiento y posiblemente en la diferenciación de las células progenitoras linfoides, lo cual enfatiza la importancia de ADA en el desarrollo de los linfocitos. Debido a que el tratamiento con PEG-ADA permite la supervivencia y proliferación de las células T en los pacientes, es probable que la ventaja selectiva de los progenitores de linfocitos T transducidos con el gen *ADA* haya sido eliminada por la presencia de la enzima administrada. Un trabajo realizado en un paciente donde el tratamiento con PEG-ADA fue interrumpido y en el cual células T transducidas fueron inyectadas, refuerza esta idea. En dicho trabajo, el número de células T transducidas expresando en gen *ADA* aumentó progresivamente, reemplazando los linfocitos T sin transducir y ocupando casi el 100% de las células T circulantes [369].

Basándose en estos resultados, el equipo encabezado por el Dr. Bordignon lanzó un ensayo clínico con dos pacientes deficientes en ADA, en los cuales el tratamiento PEG-ADA había sido interrumpido por razones económicas [370]. Las familias de cada uno de los dos niños, uno con nacionalidad Colombiana y el otro Palestina, no podían afrontar los gastos ocasionados por el tratamiento PEG-ADA, y los planes sociales de salud de sus gobiernos respectivos no contemplaban la cobertura de los gastos para tal tratamiento.

En el ensayo realizado por el equipo de Bordignon, los pacientes fueron transplantados con "*stem cells*" hematopoyéticas autólogas transducidas con un vector retroviral portando el gen *ADA*. Previo al trasplante, los pacientes recibieron un condicionamiento no mielo ablativo, de baja intensidad, con el propósito de establecer una situación en la cual la ventaja selectiva de las células transducidas pueda ponerse de manifiesto. Algunos meses después del trasplante, el número de células T en la sangre de los pacientes aumentó considerablemente, y a los 12 meses 70% y 100% de las mismas en uno y otro paciente respectivamente, contenían el vector retroviral. Al año del trasplante, ambos pacientes gozaban de un buen estado de salud, sin haber contraído infecciones severas. Actualmente, los dos se encuentran en sus hogares, desarrollándose y creciendo normalmente, y no ha sido necesario administrar PEG-ADA como tratamiento alternativo [370].

Este trabajo muestra un significativo avance con respecto a aquellos realizados en los comienzos de la terapia génica en pacientes deficientes en ADA tratados con PEG-ADA.

#### **II.4.2. La terapia génica para la X-SCID**

Un grupo de SCIDs es caracterizado por fallas en el desarrollo de los linfocitos T (con o sin células NK). Estas fallas son originadas por la ausencia de la cadena  $\gamma\text{c}$ , lo cual

conduce a una señalización anormal de ciertos receptores de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-11, IL-15 y IL-21). Esta condición puede presentarse como resultado de la falta de expresión de  $\gamma c$  o bien por la expresión de una forma no funcional de la misma (X-SCID) [371]. Este tipo de inmunodeficiencia es la más frecuente entre las diferentes formas de SCID, representando entre un 50 a 60% de los casos [372]. X-SCID es provocada por mutaciones originadas en el locus Xq12-13.1 del cromosoma x [373]. Estas mutaciones pueden ser bien diversas, pudiendo ir desde simples sustituciones hasta una variedad de mutaciones puntuales [374, 375]. Los pacientes que padecen esta enfermedad carecen de linfocitos T maduros y de células NK, por el contrario el número de linfocitos B es más elevado que lo normal.

Del mismo modo que para otras formas de SCID, el único tratamiento de la X-SCID consiste en el trasplante de médula ósea a partir de donantes histocompatibles. Como para el caso de la deficiencia en ADA, la terapia génica para la X-SCID es una alternativa sumamente interesante. Los buenos resultados obtenidos en ensayos pre-clínicos realizados en ratones y la experiencia adquirida en los últimos años en los protocolos utilizados para ADA, fueron estimulantes para que la terapia génica sea aplicada en pacientes deficientes en  $\gamma c$ . Un caso particular y sumamente llamativo, de un paciente X-SCID que presentaba una corrección parcial de la inmunodeficiencia, también contribuyó a la puesta en marcha de los ensayos clínicos. En este paciente pudo detectarse un pequeño número de linfocitos T circulantes normales (expresando  $\gamma c$  funcional), mientras que las otras células hematopoyéticas llevaban  $\gamma c$  mutada [376]. La única explicación para este descubrimiento es que una reversión de la mutación se haya producido en una célula progenitora T, y que entonces haya corregido el defecto. Este simple evento pudo conducir a la generación de una población de células T normales, las cuales pudieron ser detectadas en la sangre del paciente durante años. Esto significa que la célula progenitora revertante tuvo una extraordinaria capacidad de proliferar, probablemente debido a la ventaja selectiva que le proporcionó tener una  $\gamma c$  normal. Este tipo de ventaja selectiva también fue observada en los experimentos hechos en ratones. El concepto de ventaja selectiva es primordial para la terapia génica de una SCID. El mismo permite alimentar la idea de que si una célula progenitora transducida con un gen sano es inyectada en un paciente, la misma proliferará de manera preferencial dando origen a todas las poblaciones de células hematopoyéticas que requieran del producto funcional de dicho gen.

El 28 de abril del 2000, la revista Science publicaba un trabajo sin precedentes en la historia de la terapia génica. Un equipo francés encabezado por el Dr Alain Fischer había aplicado un protocolo de terapia génica para la inmunodeficiencia en  $\gamma c$  humana [312]. El trabajo

comenzado en 1999 por el equipo del doctor Fischer en el hospital Necker de París consistió en el aislamiento de células progenitoras de la médula ósea CD34<sup>+</sup> obtenidas a partir de pacientes, en la transducción *ex vivo* de las mismas utilizando un vector retroviral derivado de MLV portando el gen “*wild type*” de  $\gamma c$ , y en la reintroducción de las células transducidas mediante una inyección en dichos pacientes. En 4 de los 5 pacientes tratados, el trasplante de células CD34<sup>+</sup> transducidas condujo a la generación de células T que fueron fenotípicamente iguales a las de un individuo sano. También pudieron detectarse células T que habían emigrado recientemente del timo, indicando que luego del tratamiento la timopoyesis fue funcional. De manera interesante, todas las células T y NK detectadas en estos pacientes expresan el transgén  $\gamma c$ . Sin embargo, solo de 0.1 a 1% de células mieloides, y de 1 a 1.5% de células B, expresan dicho transgén [312]. Una vez más esto pone de manifiesto la ventaja selectiva de las células T y NK, donde la cadena  $\gamma c$  es imprescindible, en cambio en otras células hematopoyéticas donde la presencia de  $\gamma c$  parecería ser menos importante, su expresión no proporciona ventaja alguna.

Desde marzo del 99 hasta mediados del 2002, 11 pacientes han sido tratados y en 9 de ellos, la corrección de la inmunodeficiencia en células T ha persistido por un período superior a los 3 años. Hasta mediados del 2002, todos los pacientes gozaban de buena salud, sin haber contraído infecciones o haber manifestado alguna sintomatología de SCID [377].

#### II.4.2.a. Último momento ...

Los ensayos clínicos de terapia génica contra la X-SCID sean quizás, en términos de logros obtenidos, los más espectaculares realizados hasta la fecha. Sin ninguna duda han marcado un punto de inflexión en la evolución de esta disciplina. Pero la historia de la terapia génica está muy lejos de terminarse y cuando el éxito escribía una buena parte de esta historia, un acontecimiento adverso introdujo un nuevo punto de interrogación.

En octubre del 2002, el Dr. Fischer y la Dra. Cavazzana-Calvo, ambos responsables del protocolo de terapia génica para la X-SCID, hacen pública la noticia que 30 meses después del trasplante, uno de los pacientes tratados por terapia génica había desarrollado un desorden linfoproliferativo similar a una leucemia, caracterizado por la proliferación monoclonal de células T  $\gamma\delta$ . Las causas concretas que indujeron este desorden aún no han sido completamente establecidas. El gen terapéutico es expresado normalmente en el clon T leucémico, dentro del rango esperado para una célula T. Además ninguna mutación fue detectada en la secuencia del mismo. En su informe, Cavazzana-Calvo confirma que una sola copia del vector fue encontrada

en las células leucémicas, y que el sitio de integración del mismo fue encontrado dentro de un gen celular que normalmente controla procesos de proliferación y diferenciación de células sanguíneas. Este gene llamado LMO2, es activado de manera anormal en algunos tipos de células T leucémicas, y en este caso en particular, su expresión fue aumentada considerablemente, entre 10 y 100 veces. Estos investigadores especulan que la integración del vector pudo haber modificado la regulación de la expresión de LMO2, incrementando la posibilidad de una transformación leucémica. Probablemente otros eventos también hayan contribuido a esta transformación, y de hecho, en la mayoría de las células leucémicas se encontró una translocación cromosómica (6t;13), la cual fue detectada por primera vez 34 meses después del trasplante. Además, el paciente había contraído una infección por el virus de la "varicella" antes de que la leucemia haya sido detectada lo cual pudo haber tenido algún efecto sobre el desarrollo de la misma. Por último, distintos miembros de la familia de este niño presentaban antecedentes de cáncer sugiriendo que el paciente pudo haber tenido una cierta predisposición para desarrollar la enfermedad [378].

Pero la historia no termina aquí. Dos meses después de que se diera a conocer el primer caso adverso de este ensayo clínico, es decir en diciembre del 2002, el Dr Fischer y la Dra. Cavazzana-Calvo reportan un segundo caso de leucemia en otro paciente X-SCID tratado por terapia génica. Este segundo caso presenta ciertas similitudes y algunas diferencias con el primero. De manera similar al primer caso, el segundo paciente fue tratado a una edad muy temprana (3 meses de edad vs. 1 mes para el primero) con una fuerte dosis de células CD34<sup>+</sup>  $\gamma$ c<sup>+</sup>. Los dos niños que desarrollaron la leucemia fueron los dos que recibieron las dosis más altas de células transducidas con  $\gamma$ c. Ambos pacientes desarrollaron la leucemia aproximadamente 3 años después del comienzo del tratamiento. Por último, en el segundo caso uno de los sitios de integración del vector retroviral fue localizado cerca (no dentro) del gen LMO2. A diferencia del primer paciente, la leucemia en este niño fue causada por la proliferación descontrolada de tres clones diferentes de linfocitos T $\alpha\beta$  (no T $\gamma\delta$ ). En los tres clones se detectó el mismo sitio de integración del vector, en la cercanía del gen LMO2. Debido a esto, es probable que los tres clones provengan de una misma célula progenitora T. Este paciente no había contraído la "varicella" y se desconoce si en su familia existen antecedentes de cáncer.

Si bien varios factores pueden haber intervenido en el desarrollo de la leucemia en estos dos pacientes, el sitio de integración del vector retroviral podría haber influido fuertemente en el establecimiento de la linfoproliferación. La inserción del retrovirus puede perturbar el funcionamiento de un gen implicado en la regulación del crecimiento y la proliferación celular.

Este fenómeno es conocido como oncogenesis insercional, y aunque nunca había sido detectado en pacientes, la posibilidad de que el evento ocurra existe. Mientras que la oncogenesis insercional ha sido siempre considerada como un riesgo teórico, la experiencia francesa muestra que dicho riesgo debe ser considerado como real.

Mientras que los dos pacientes están siendo tratados por quimioterapia y los mismos soportan bien el tratamiento, los ensayos clínicos para la X-SCID en Francia y en el resto del mundo han sido momentaneamente suspendidos. Por su parte, el Dr. Fischer, la Dra Cavazzana-Calvo y todo un grupo de expertos, reúnen sus esfuerzos para determinar con justeza cuales han sido las causas que condujeron a la linfoproliferación. Estos eventos adversos podrían considerarse como un nuevo “traspié” de la terapia génica. Pero como podemos ver, la historia de la terapia génica esta muy lejos de terminarse, solo es el comienzo, el inicio, el punto de partida de una nueva etapa en la medicina moderna. Aún quedan muchos interrogantes por responder y muchas más páginas por escribir en este capítulo...

(Todos las informaciones suministradas en este ítem fueron obtenidos de los bancos de datos de la *European Society of Gene Therapy* (<http://www.esgt.org>) y de la *American Society of Gene Therapy* (<http://www.asgt.org>), ambos actualizados en marzo del 2003.

# *Objetivos*

## Objetivos

En muchos procesos de desarrollo y señalización en los vertebrados, los genes miembros de una misma familia génica desempeñan funciones redundantes, y en ciertos casos las mismas también pueden ser diferentes. En general, las moléculas pertenecientes a una misma familia son originadas por la duplicación de genes, los cuales subsecuentemente divergen en secuencia. De este modo, moléculas muy similares del punto de vista estructural frecuentemente funcionan de manera similar.

La familia de proteínas tirosina quinasas Syk forma parte de aquellas familias originadas por la duplicación de genes. ZAP-70 y Syk son los dos miembros que la componen y si bien estas dos quinasas han sido caracterizadas, muchos interrogantes quedan sin responder sobre el funcionamiento de las mismas en los procesos que regulan la diferenciación y activación celular.

Uno de los objetivos de esta Tesis es el estudio de las proteínas ZAP-70 y Syk en los procesos precoces de transducción de señales en la activación vía el TCR de los linfocitos T. En este estudio me interesaré principalmente a los eventos de señalización donde ZAP-70 y Syk intervienen de manera activa. Además, intentaré dilucidar cuales son las diferencias funcionales entre estas dos quinasas y cual es el aporte de cada una de ellas a la activación celular. Para la realización de este estudio me serviré de células T primarias humanas, obtenidas de individuos sanos y de pacientes deficientes en ZAP-70. En paralelo, utilizaré líneas celulares T Jurkat, expresando de manera diferencial las quinasas ZAP-70 y Syk. Para llevar a cabo este trabajo emplearé diferentes técnicas de inmunohistoquímica y de biología celular y molecular.

La inmunodeficiencia humana en ZAP-70 es una forma rara de SCID, que se caracteriza por un bloqueo en el desarrollo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por la presencia de células CD4<sup>+</sup> no funcionales en la sangre periférica de los pacientes que la padecen. Esta enfermedad comienza a manifestarse durante el primer año de vida de los niños inmunodeficientes, generalmente cuando los efectos protectores de los anticuerpos maternos disminuyen. De no ser tratados, los niños deficientes en ZAP-70 no sobreviven más de dos años debido a el desarrollo recurrente de infecciones oportunistas devastadoras. Hasta el momento, el único tratamiento eficaz es el trasplante de médula ósea a partir de donantes histocompatibles. Desafortunadamente para la

mayoría de los pacientes, la disponibilidad de donantes histocompatibles es limitada y otros tipos de trasplantes a partir de médulas no histocompatibles provocan serias complicaciones inmunológicas.

Una estrategia alternativa que ha sido aplicada para el tratamiento de otras inmunodeficiencias es la terapia génica con vectores retrovirales. Este tipo de terapia permite introducir un gen sano ("*wild-type*") en aquellas células donde se desea reemplazar un gen defectuoso. De este modo, la introducción del gen "*wild-type*" de ZAP-70 en células aisladas de pacientes deficientes en esta proteína y su posterior reimplantación en los mismos podría traducirse en un beneficio para estos pacientes.

El segundo de los objetivos de esta Tesis será establecer las bases de un protocolo de terapia génica para la inmunodeficiencia en ZAP-70. En una primera etapa investigaré si la introducción mediada por un vector retroviral del gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 permite la reconstitución de las funciones defectuosas que presentan dichas células.

Si esta primera estrategia funciona, entonces me concentraré en los estudios *in vivo* para tratar por terapia génica ratones deficientes en ZAP-70. En un primer tiempo estudiaré la posibilidad de transducir células progenitoras de la médula ósea utilizando un vector retroviral conteniendo el gen "*wild-type*" de ZAP-70. Posteriormente introduciré las células transducidas en los ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> con el fin de estudiar si mediante esta estrategia es posible reconstituir el sistema hematopoyético de los ratones, incluyendo el desarrollo de células T. Además, este estudio me permitirá determinar si la expresión del gen "*wild-type*" de ZAP-70 se limita solamente a las células T o si bien es expresado en otros tipos de células hematopoyéticas no-T. Si este último fuera el caso, evaluaré como esta expresión afectará la diferenciación y el funcionamiento de las células hematopoyéticas no-T.

# ***Materiales y Métodos***

## Materiales y Métodos

---

### I. Células T primarias humanas deficientes en ZAP-70

Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMc) de dos pacientes deficientes en ZAP-70, fueron aisladas por gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque. Las células T $\alpha\beta$  CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> fueron purificadas utilizando anticuerpos anti( $\alpha$ )-CD4 unidos a bolitas magnéticas según el protocolo descrito por el fabricante (DynaL, Inc., Great Neck, NY). Luego de la purificación, las células fueron puestas en cultivo. Las mismas fueron cultivadas en medio Yssel [379] suplementado con 1% de suero AB humano y con 100 u/ml de IL-2 humana recombinante, a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron estimuladas cada quince días con 0.5  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (PHA) y con factores de crecimiento aportados en “trans” por PBMcs de donantes sanos y una línea celular B infectada con Epstein-Bar virus, irradiadas de manera letal. Todos los experimentos de activación vía el TCR realizados en linfocitos T primarios fueron hechos con células en estado de reposo, las cuales no fueron estimuladas durante los 10 días previos a la realización del experimento. Antes de la activación, las células fueron incubadas toda la noche en medio Yssel sin IL-2 con el objetivo de reducir el nivel basal de activación de las mismas.

### II. Líneas celulares T

La línea celular T Jurkat, clon77-6.8, la cual expresa las proteínas ZAP-70 y Syk, fue gentilmente donada por el Dr. K. A. Smith (New York, USA). La línea celular Jurkat E6.1, deficiente en Syk, fue obtenida a partir de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA). La línea celular Jurkat P116, deficiente en Syk y ZAP-70 fue amablemente donada por el Dr Jacques Nunes (Nice, France).

Las líneas celulares derivadas de la E6.1 y de la P116 expresando ZAP-70 y/o Syk, fueron establecidas en el laboratorio por transducción con los vectores retrovirales LZRS/ZAP-70/EGFP o LZRS/Syk/EGFP.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), en presencia de 1% de penicilina y estreptomycin, a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de ser activadas, las células fueron “hambreadas” durante 16 horas en medio RPMI, en ausencia de FCS.

### III. Construcción de los vectores retrovirales y líneas de empaquetaje

El vector LZRS-EGFP fue construido de la siguiente manera: la secuencia de 726 pb codificando la EGFP, digerida con las enzimas de restricción *NcoI/NotI*, fue clonada dentro del plásmido pBluescript-IRES digerido con las mismas enzimas. La secuencia entera de 1324 pb IRES-EGFP fue ligada dentro del vector LZRS, “*downstream*” del sitio de clonado múltiple del mismo [380]. El vector LZRS-ZAP-70/EGFP fue creado a partir del vector que viene de ser descrito. El cDNA “*wild-type*” de ZAP-70 humana fue clonado dentro del sitio de clonado múltiple del vector, digerido con *EcoRI* y *NotI*. De la misma manera, el vector LZRS-Syk/EGFP fue obtenido por el clonado del cDNA de Syk en el vector LZRS-EGFP digerido con *EcoRI* y *NotI*.

Para los experimentos de transducción de linfocitos T humanos y líneas celulares T, las partículas virales fueron producidas en la línea de empaquetaje PG13 la cual expresa la proteína de la envoltura del virus de la leucemia del Gibbon ape (GALV), y en la línea anfotrópica Phoenix. La línea de empaquetaje PG13/LZRS-EGFP clon 7, fue establecida en el laboratorio como describe [380]. Brevemente, las células PG13 fueron transducidas con el vector retroviral LZRS-EGFP y luego de la transducción, las células EGFP positivas fueron aisladas utilizando un citometro de flujo FACScan o FACS vantage. Las células aisladas fueron luego clonadas por dilución límite en placas de 96 hoyos. La capacidad infecciosa de los sobrenadantes obtenidos de cada uno de los clones, fue analizada en experimentos de infección de células T Jurkat. El sobrenadante más eficaz (clon 7) fue así seleccionado, colectado, filtrado en filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y guardados hasta su utilización a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La línea PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP clon 10, fue obtenida de manera similar a la línea anterior. La línea Phoenix/LZRS-Syk/EGFP fue generada por transfección de la células Phoenix con el vector LZRS-Syk/EGFP y tratadas de igual manera que en los casos precedentes.

Para la transducción de las células murinas, las partículas virales fueron producidas en la línea de empaquetaje ecotrópica GP+E86. Las células GP+E86 fueron transfectadas con un plásmido conteniendo las secuencias del vector LZRS-ZAP-70/EGFP y luego las células EGFP positivas fueron seleccionadas por dos aislamientos secuenciales utilizando un citometro de flujo FACScan o FACS vantage. El vector control utilizado en los experimentos realizados con células murinas fue el MND-EGFP, el cual también deriva de MLV. La capacidad infecciosa de los sobrenadantes conteniendo las diferentes partículas retrovirales, fue analizada en experimentos de infección de células NIH3T3, y los mismos fueron de  $2 \times 10^5$  para el vector LZRS-ZAP-70/EGFP

y de  $1 \times 10^6$  para el MND-EGFP. Los sobrenadantes recolectados fueron filtrados y guardados hasta su utilización a  $-80^\circ\text{C}$ .

Todas las líneas de empaquetaje fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FCS, 2 mM de L-Glutamina, y 1% de penicilina y estreptomycin, a  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ . La totalidad de los sobrenadantes retrovirales producidos a partir de las células de empaquetaje fueron obtenidos de cultivos celulares a 80-90% de confluencia, crecidos a  $32^\circ\text{C}$  durante 24 o 48 horas.

#### IV. Transducción de los linfocitos T primarios y de las líneas celulares T

Los protocolos de transducción de células T utilizados fueron previamente establecidos y optimizados en el laboratorio [380]. Brevemente, las líneas celulares T E6.1 y P116 fueron transducidas en placas de 24 hoyos tratadas con el fragmento de fibronectina (CH-296), diluido en PBS a una concentración de  $8\mu\text{g/ml}$ , durante 2 horas a temperatura ambiente. La fibronectina no absorbida a la placa fue removida y  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas en cada hoyo, en 0.5ml de medio RPMI suplementado con FCS y antibióticos. 0.5ml de sobrenadante conteniendo las partículas retrovirales fueron agregados en cada hoyo y luego las placas fueron guardadas a  $37^\circ\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente, el medio de cada hoyo fue removido y 0.5ml de medio fresco fueron agregados. Luego de la incubación de la placa 6 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 0.5ml de un nuevo sobrenadante retroviral fueron adheridos y las placas se incubaron nuevamente durante la noche. Una vez finalizada la incubación, las células fueron recuperadas y transferidas a nuevas placas para ser cultivadas. Tres días más tarde, el porcentaje de células EGFP positivas fue evaluado por citometría de flujo.

Para la transducción de las células T primarias humanas deficientes en ZAP-70 y control, 72 horas antes de la transducción las células fueron estimuladas como para su cultivo (ver ítem I). Luego las mismas fueron transducidas con los sobrenadantes conteniendo las partículas retrovirales LZRS-EGFP o LZRS-ZAP-70/EGFP. El protocolo de transducción aplicado fue idéntico al utilizado para las líneas celulares. Una vez finalizada la transducción, las células fueron recuperadas y transferidas a nuevas placas para ser cultivadas. Tres días más tarde, el porcentaje de células EGFP positivas fue calculado por citometría de flujo.

## V. Aislamiento, transducción y trasplante de las células murinas de la médula ósea

Las células progenitoras de la médula ósea fueron obtenidas a partir de ratones deficientes en ZAP-70 (ZAP-70<sup>-/-</sup>). Los ratones fueron inyectados con 150mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU) para eliminar las células en fase de proliferación y aumentar la proporción de células progenitoras las cuales permanecen en estado de quiescencia. Dos días después, los ratones fueron sacrificados y se recuperaron las tibias y fémures, a partir de los cuales se obtuvieron las células de la médula. Las células obtenidas, como así también células progenitoras obtenidas de ratones "wild-type" utilizadas posteriormente como control, fueron lavadas e incubadas con un cóctel de anticuerpos lin<sup>+</sup> biotinilados, capaces de reconocer marcadores celulares presentes en células hematopoyéticas diferenciadas y no en progenitoras. Luego las células fueron incubadas con bolitas magnéticas unidas a streptavidina para eliminar las lin<sup>+</sup>, según lo descrito por el fabricante (Dynal, Inc., Great Neck, NY). Después, las células progenitoras (lin<sup>-</sup>) fueron lavadas y estimuladas durante 48 horas con IL-3, IL-6 y SCF (*stem cell factor*), en medio DMEM suplementado con 15% de FCS. Unicamente, las células estimuladas obtenidas de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> fueron luego transducidas. La transducción se realizó en placas de 24 hoyos tratadas con fibronectina y preincubadas con las partículas virales. Las preincubaciones consistieron en 2 adiciones secuenciales de 1ml de sobrenadante retroviral MND-EGFP o LZRS-ZAP-70/EGFP, incubadas 15 minutos cada una. Las células fueron transducidas en medio DMEM + 15% FCS en presencia de IL-3, IL-6 y SCF y cultivadas durante 48 hs. Después, las células transducidas, como así también aquellas sin transducir obtenidas de ratones WT, fueron lavadas e inyectadas en la vena de la cola de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup>, irradiados de manera letal con 900 rad.

## VI. Aislamiento por FACS de las células EGFP<sup>+</sup>

Las células EGFP<sup>+</sup> fueron aisladas según la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada una de las poblaciones celulares expresando la EGFP. Las células fueron concentradas a 1x10<sup>7</sup> células/ml en medio RPMI + 10% FCS y luego fueron aisladas por FACS. Las células seleccionadas fueron recuperadas en PBS y en los minutos siguientes las mismas fueron puestas en cultivo. El nivel de expresión de la EGFP fue calculado 24 a 72 horas más tarde.

Todos los aislamientos fueron hechos con un citometro FACScan o FACS vantage, con la asistencia del Dr. C. Duperray (INSERM, Montpellier)

## VII. Anticuerpos y detección de marcadores de superficie

Los anticuerpos monoclonales (mAbs)  $\alpha$ -ZAP-70 clón 2F3.2 y  $\alpha$ -zeta( $\alpha$ - $\zeta$ ), como así también el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -Syk clón A7840, fueron generosamente donados por el Dr. A Weiss (University of California, San Francisco, USA). El mAb  $\alpha$ -ZAP-70 capaz de reconocer la formas humana y murina de la proteína, y los anticuerpos  $\alpha$ -Erk-2 y  $\alpha$ -PLC- $\gamma$ 1 fueron comprados en Transduction Laboratories (Lexington, USA), El  $\alpha$ -fosfoErk que reconoce la forma doblemente fosforilada, Thr<sup>183</sup>-Tyr<sup>185</sup> de Erk-1/Erk-2, fue adquirido en Promega (Charbonnière, France), y el monoclonal  $\alpha$ -fosfotirosina 4G10 en Upstate Biotechnology Inc (Lake Placid, USA). Los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -fosfoZAP<sup>319</sup> y  $\alpha$ -Lck fueron adquiridos en la compañía Ozima (Evry, Francia).

Los clones de mAbs  $\alpha$ -CD3, utilizados para la activación de las células T vía el TCR fueron el UCHT1 y el OKT3. El UCHT1 fue obtenido de Pharmingen (San Diego, USA) y el OKT3 fue producido a partir de un hibridoma adquirido en la ATCC. Los anticuerpos  $\alpha$ -F(ab')<sub>2</sub> de ratón utilizados para el "crosslinking" fueron obtenidos de Pharmingen (Marseille, France)

El mAb  $\alpha$ -CD3 conjugado con la molécula phycoerythrina (PE) ( $\alpha$ -CD3-PE), utilizado para la marcación del complejo TCR en las líneas celulares T fue obtenido de Immunotech (Marseille, Francia).

Los mAbs conjugados con PE o CyChrome (Cy),  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD62L,  $\alpha$ -CD25,  $\alpha$ -CD69,  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -IgG1,  $\alpha$ -IgG3,  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD5 y  $\alpha$ -TCR $\beta$ , utilizados para la inmunomarcación de las células hematopoyéticas en los experimentos realizados en ratones, fueron todos adquiridos en Pharmingen (San Diego, CA).

## VIII. Estimulación de las células T

Las células T primarias y las líneas celulares T fueron incubadas la noche previa a la activación en medio Yssel sin IL-2 o en medio RPMI sin suero, respectivamente, y luego fueron lavadas en RPMI y concentradas a  $1 \times 10^7$  células/ml para ser activadas. Las células primarias fueron estimuladas con el anticuerpo  $\alpha$ -CD3 OKT3 (10 $\mu$ g/ml) y las líneas celulares con el  $\alpha$ -CD3 UCHT1 (10 $\mu$ g/ml), durante un minuto a 37 °C. Luego se agregó un anticuerpo  $\alpha$ -F(ab')<sub>2</sub> y se incubó otros dos minutos para el "crosslinking". En los experimentos de co-estimulación CD3/CD4, las células fueron activadas con una mezcla del  $\alpha$ -CD3 UCHT1 (10 $\mu$ g/ml) y del  $\alpha$ -CD4 (10 $\mu$ g/ml) y luego incubadas con el anticuerpo  $\alpha$ -F(ab')<sub>2</sub>.

Para la activación de las células con pervanadato, las mismas fueron concentradas a  $1 \times 10^7$  células/ml como se indicó arriba, y luego fueron incubadas durante 5 minutos con una mezcla de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0,1mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3mM en PBS, a 37 °C.

Una vez activadas las células fueron lisadas en un “buffer” de lisis 1% NP-40 (Nonidet P-40), suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas, aprotinina y PMSF, y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\beta$ -glicerofosfato, piruvato de sodio y fluoruro de sodio, respectivamente. Las células activadas fueron lisadas durante 15 minutos, en hielo.

#### **IX. Inmunoprecipitación e inmunoblots**

Los sobrenadantes post-nucleares obtenidos por centrifugación de las células lisadas fueron colectados y utilizados como extractos celulares totales o para experimentos de inmunoprecipitación. Las inmunoprecipitaciones se realizaron incubando los sobrenadantes con los anticuerpos deseados entre 2 y 4 horas, a 4°C. Luego, las muestras fueron incubadas con proteína A-sefarosa durante toda la noche y a la misma temperatura. Los inmunoprecipitados y extractos totales fueron hervidos y resueltos en geles de electroforesis de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) para luego ser transferidos sobre membranas de nitrocelulosa. Los inmunoblots se realizaron bloqueando las membranas 1 hora con TBS ( $\text{NaCl}$  150mM, Tris 20mM pH7.5) conteniendo 0.1% de Tween 20 y 5% de seroalbúmina bovina (BSA) o leche descremada. Una vez bloqueadas las membranas fueron incubadas con los anticuerpos indicados durante 1 hora a temperatura ambiente y luego 30 minutos con los anticuerpos secundarios contra ratón o conejo, conjugados con la HRP (*horse-radish peroxidase*). Finalmente las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas usando el sistema de detección ECL (*enhanced chemiluminescence*). Para las utilidades posteriores, las membranas fueron deshibridadas y los inmunoblots fueron realizados como ha sido explicado.

#### **X. Determinación de la proliferación de los linfocitos y de la secreción de citoquinas**

Las células T primarias humanas ( $1 \times 10^5$  en 100 $\mu$ l/hoyo) fueron cultivadas por triplicado en placas de 96 hoyos, en presencia o ausencia de IL-2 (100 u/ml) y del mAb OKT3 inmovilizado (1 $\mu$ g/ml). Luego de tres días en cultivo, las células fueron pulsadas con  $^3\text{H}$ -Timidina (1 $\mu$ Ci/hoyo) durante 12 horas, luego recuperadas y más tarde la radioactividad incorporada en las mismas fue monitoreada en un contador de centelleo.

Para la determinación de la capacidad proliferativa de los esplenocitos murinos obtenidos de los ratones en los ensayos pre-clínicos realizados, las células fueron sembradas por triplicado en placas de 96 hoyos ( $1 \times 10^5$  en 100  $\mu$ l/hoyo). Las mismas fueron cultivadas en RPMI suplementado con 10% FCS y 50 mM de 2-mercaptoethanol, en ausencia o presencia de  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) y  $\alpha$ -CD28 (2  $\mu$ g/ml), o de Lipopolisacárido (LPS) (20  $\mu$ g/ml). Luego de 48 horas las células fueron pulsadas con 0,5  $\mu$ Ci/hoyo de  $^3$ H-Timidina durante 16 horas, recuperadas y la radioactividad incorporada en las células fue monitoreada como se indicó arriba.

Para medir la cantidad de IL-2 secretada, las células fueron activadas como se indicó y 24 horas mas tarde se recolectaron 0,5 ml de sobrenadante de cultivo libre de células, a partir de cada hoyo de la placa. La concentración de IL-2 en estos sobrenadantes fue determinada utilizando un kit ELISA comercial, según las indicaciones del fabricante (Immunotech, Marseille, Francia).

#### **XI. Ensayo *in vitro* de conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas**

Los esplenocitos obtenidos 18 semanas luego de efectuado el transplante de los ratones, fueron cultivados en RPMI suplementado con 10% FCS a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Para la inducción de la conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas se agregó LPS (20  $\mu$ g/ml) o LPS + IL-4 (25 ng/ml). Después de 6 días de cultivo, las células fueron colectadas y marcadas con el mAb  $\alpha$ -B220-PE conjuntamente con los mAbs  $\alpha$ -IgG1-Cy o  $\alpha$ -IgG3-Cy, y luego analizadas por FACS.

#### **XII. Análisis del repertorio del TCR de las células T**

El ARN total fue preparado a partir de esplenocitos obtenidos 18 semanas post-transplante, utilizando RNeasy (Ambion, Austin, TX). 2  $\mu$ g del ARN fueron utilizados para realizar una transcripción inversa con hexanucleótidos al azar (Pharmacia Biotech, Orsay, Francia) y una transcriptasa inversa del virus de Moloney (MoMLV) (RT; Gibco, Cergy, Francia). Los ADNc fueron amplificados (40 ciclos) en una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l conteniendo 1 de los 24 "primers" TCRBV (región hipervariable de la cadena  $\beta$  del TCR) y un "primer" C $\beta$  capaz de reconocer las dos regiones constante C $\beta$ 1 y C $\beta$ 2 de la cadena  $\beta$  [381, 382]. 2  $\mu$ l de cada uno de los 24 fragmentos TCRBV/C $\beta$  productos de la PCR fueron empleados para realizar 2 ciclos de elongación utilizando un "primer" C $\beta$  marcado fluorescentemente (6-Fam) que permite que los productos de la misma puedan ser detectados en un secuenciador automático de ADN. 1  $\mu$ l del

producto resultante fue cargado en un gel de secuencia de acrilamida al 6%, resuelto, y luego los fragmentos fueron analizados por tamaño y fluorescencia utilizando el *software* Immunoscope. En este trabajo se utilizó la nomenclatura TCRBV propuesta por B. Arden y colaboradores [383].

### **XIII. Análisis estadísticos**

La significación estadística fue calculada utilizando un test *t* de Student, con una distribución unilateral y con varianzas iguales (homoscedástica) para dos muestras independientes. Se consideró que los datos fueron significativamente diferentes cuando el valor de *P* fue inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Todos los datos son presentados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

## ***Resultados Parte I***

## Resultados Parte I

### Rol de las proteínas tirosina quinasa ZAP-70 y Syk en la señalización vía el TCR

#### **A- “ZAP-70 y Syk regulan de manera diferencial los eventos precoces de señalización vía el TCR en células T primarias CD4<sup>+</sup> humanas y en líneas celulares T”**

##### **Introducción**

Las proteínas tirosina quinasa ZAP-70 y Syk funcionan de manera diferente en los procesos que regulan la diferenciación de los linfocitos T y probablemente ambas proteínas participan diferencialmente en la señalización vía el TCR. Los mecanismos por los cuales ZAP-70 y Syk son activadas han sido bien estudiados y existe una vasta literatura al respecto (ver Introducción General, capítulo II). Sin embargo, el rol que desempeña cada una de estas quinasas en los eventos precoces durante la cascada de señalización del TCR aún no ha sido bien documentado. La falta de modelos celulares en los cuales estas dos proteínas son expresadas separadamente han hecho difícil un estudio comparativo de ambas. Mientras que diferentes líneas celulares T y células T primarias expresan ZAP-70 en una casi total ausencia de Syk, pocos o ningún sistema celular T expresa Syk en ausencia de ZAP-70. Además, la obtención por transfección de líneas celulares T expresando de manera estable Syk no ha podido realizarse ya que la proteína parecería tener ciertos efectos citotóxicos cuando su nivel de expresión es elevado [265].

En los estudios realizados por la Dra. Taylor con células T CD4<sup>+</sup> deficientes en ZAP-70 transformadas con el virus HTLV-I, se encontró que Syk era expresada entre 5 y 10 veces más que en células T normales [384]. Tiempo más tarde, los estudios efectuados en el laboratorio por la Dra. Noraz con células T CD4<sup>+</sup> aisladas de nuevos pacientes deficientes en ZAP-70 y cultivadas *in vitro*, demostraron que la expresión de Syk en estas últimas también fue significativamente mayor que aquella observada en células T obtenidas de individuos sanos [275]. De este modo, las células T deficientes en ZAP-70 cultivadas *in vitro* y expresando Syk se transformaron en un modelo celular de sumo interés para el estudio comparativo de ZAP-70 y Syk.

Los estudios de caracterización de las células T deficientes en ZAP-70 y expresando Syk realizados por la Dra. Noraz demostraron que las mismas fallan para responder a una estimulación del TCR, siendo incapaces de proliferar. Además, la fosforilación de Syk en estas células resultó en la activación diferencial de ciertas moléculas de señalización provocando una movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular más importante, una disminución de la actividad quinasa de las proteínas Erk, JNK y p38, y un profundo defecto en la secreción de IL-2 [275]. El aporte del trabajo realizado por la Dra. Noraz permite afirmar que aunque Syk puede compensar ciertas funciones de ZAP-70 activando moléculas efectoras que actúan más tardíamente, las dos quinasas modulan de modo diferente las señales en respuesta a la estimulación del TCR.

Teniendo en cuenta que ZAP-70 y Syk intervienen en los procesos de fosforilación que tienen lugar tempranamente luego de la activación del TCR, el estudio de estas dos quinasas en los eventos precoces de señalización permitiría determinar si existen diferencias en los mecanismos de activación de cada proteína que pudieran provocar la activación diferencial de moléculas efectoras. Para intentar responder a estos interrogantes se utilizó como modelo de estudio las células T deficientes en ZAP-70 que expresan Syk, juntamente con células T control aisladas de individuos sanos y con líneas celulares T expresando ZAP-70 y/o Syk de manera estable.

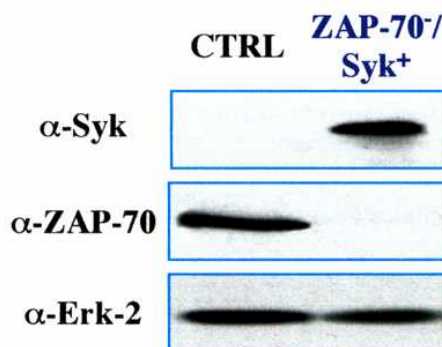
Con el fin de facilitar la lectura de esta Tesis las células T deficientes en ZAP-70 que expresan Syk descritas por [275] serán definidas como células T primarias ZAP-70/Syk<sup>+</sup>.

## Resultados

### **Syk es fuertemente expresada en células T deficientes en ZAP-70 cultivadas *in vitro* y es fosforilada luego de la estimulación del TCR**

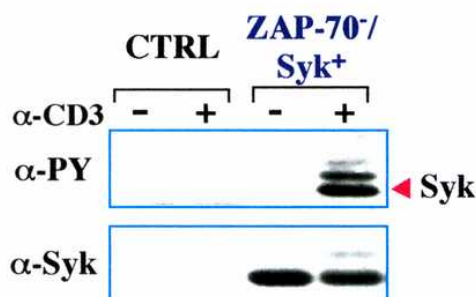
Con el fin de determinar el nivel de expresión de Syk en las células T deficientes en ZAP-70, se realizaron experiencias de “*western blot*” utilizando un anticuerpo específico contra Syk. Los resultados obtenidos muestran que en las células T deficientes en ZAP-70 cultivadas *in vitro*, el nivel de expresión de Syk fue muy superior al observado en células T control cultivadas de la misma manera (Figura 1). Estos datos coinciden con las observaciones previas realizadas en el laboratorio por la Dra. Noraz, donde células T cultivadas *in vitro* obtenidas a partir de 5 pacientes no relacionados deficientes en ZAP-70, presentaron niveles de expresión de Syk significativamente más altos que los observados en células T normales [275]. Aunque las causas del aumento en la expresión de Syk en las células de pacientes aún no han sido determinadas, las

**Figura 1-** Nivel de expresión de las proteínas Syk y ZAP-70 en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y control.



**Figura 1-** Extractos celulares totales obtenidos de  $1 \times 10^6$  células T primarias aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 (ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>) o de individuos sanos utilizadas como control (CTRL), fueron resueltos en un 10% SDS-PAGE y transferidos sobre una membrana de nitrocelulosa. Luego el nivel de expresión de Syk fue monitoreado por *western-blot* utilizando un anticuerpo policlonal α-Syk. Los niveles de ZAP-70 y de proteína cargada en cada hoyo, Erk-2, son mostrados como un control.

**Figura 2-** Inmunoprecipitación de Syk y evaluación de su estado de fosforilación en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>.



**Figura 2-** Syk fue inmunoprecipitada a partir de  $5 \times 10^6$  células T primarias aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 (ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>) o de individuos sanos utilizadas como control (CTRL), estimuladas (+) o sin estimular (-) con un mAb α-CD3. Los inmunoprecipitados fueron analizados por *western-blot* con un mAb α-fosfotirosina (α-PY) para evaluar el nivel de fosforilación de Syk. La posición de Syk fosforilada es indicada por la flecha. Las membranas fueron rehibridadas con un α-Syk para determinar el nivel de Syk inmunoprecipitada (panel inferior).

observaciones de la Dra. Noraz demuestran que dicho incremento no es producto de la selección de un clón individual de células T que en un momento dado comenzaron a expresar Syk.

Para asegurarse que las células expresando Syk eran deficientes en ZAP-70, las membranas fueron rehibridadas con un anticuerpo específico contra ZAP-70. Como se esperaba, ZAP-70 solo fue detectada en las células T aisladas de individuos sanos, en tanto que en las células aisladas de pacientes la proteína no pudo ser detectada (Figura 1).

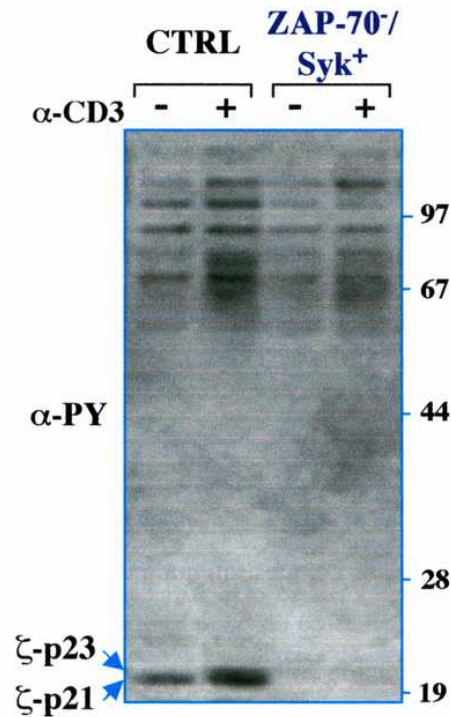
Para determinar si Syk podía ser fosforilada sobre tirosina en respuesta a la estimulación del TCR en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> se efectuaron experiencias de inmunoprecipitación de Syk a partir de lisados celulares obtenidos de dichas células y de células T control, sin activar o estimuladas vía el TCR. Los resultados muestran que luego de la activación del TCR, Syk es fosforilada sobre tirosina solo en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, en tanto que en las células T control tratadas de manera equivalente no se detectó ninguna señal correspondiente a Syk fosforilada (Figura 2).

Conjuntamente, estos resultados demuestran que mediante el cultivo *in vitro* de células T deficientes en ZAP-70 se puede disponer de un modelo de células T primarias humanas donde la quinasa Syk es expresada en ausencia de su proteína homóloga ZAP-70. Además, el hecho que Syk pueda ser activada por fosforilación sugiere que en estas células la proteína es funcional. Este modelo celular proporciona una herramienta única y fundamental para el estudio comparativo de ZAP-70 y Syk en un contexto fisiológico de células T sin transformar.

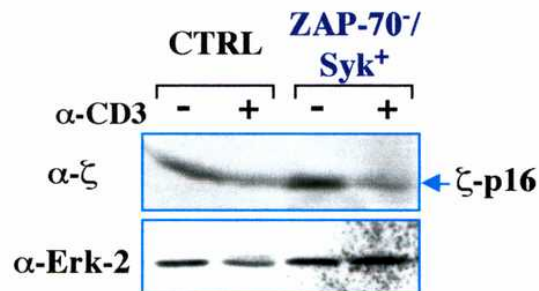
### **ZAP-70 y Syk difieren en su capacidad para sustentar la fosforilación de la cadena $\zeta$ del TCR en células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas**

La estimulación del TCR conduce a la fosforilación de residuos tirosina de múltiples proteínas que intervienen en las cascadas de señalización de este receptor. La acción de estas proteínas una vez activadas inducirá cambios en el interior de la célula que determinarán el estado fisiológico de la misma. Para estudiar los roles de ZAP-70 y Syk en la fosforilación de proteínas dependiente del TCR, células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y células T control fueron estimuladas vía el TCR y a partir de ellas se realizaron experiencias de "western-blot" utilizando anticuerpos anti( $\alpha$ )-fosfotirosina. Como se esperaba, en ambos tipos celulares la estimulación del TCR condujo a un aumento en la fosforilación de proteínas de diverso peso molecular. Sin embargo, el perfil de fosforilación obtenido en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas fue más atenuado que el observado en las células control (Figura 3-A). Llamativamente, el

**Figura 3-A-** Pattern de proteínas fosforiladas sobre tirosina en las células T primarias control y ZAP-70/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR.



**Figura 3-B-** Inmunoblot anti- $\zeta$  para determinar el nivel de expresión de la cadena  $\zeta$  en las células T primarias control y ZAP-70/Syk<sup>+</sup>.



**Figura 3-** A-  $1 \times 10^6$  células T control (CTRL) o ZAP-70/Syk<sup>+</sup> fueron estimuladas (+) o no (-) con un mAb  $\alpha$ -CD3. Los extractos celulares totales obtenidos de las mismas fueron resueltos electroforéticamente (10% SDS-PAGE) y analizados por western-blot con un mAb  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Las flechas indican la posición de las dos formas fosforiladas de la cadena  $\zeta$  del TCR, p21 y p23. A la derecha del panel las cifras corresponden a un marcador de peso molecular. B- Para determinar el nivel de expresión de  $\zeta$ , no fosforilada ( $\zeta$ -p16), las membranas fueron rehibridadas con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$  (panel superior). Para verificar la cantidad de proteína cargada en el gel, las membranas fueron rehibridadas con un mAb  $\alpha$ -Erk-2 (panel inferior).

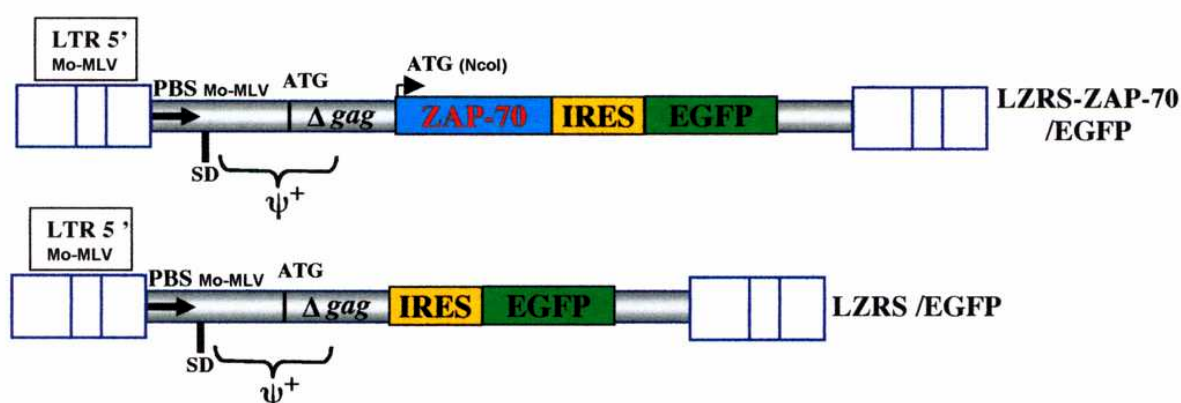
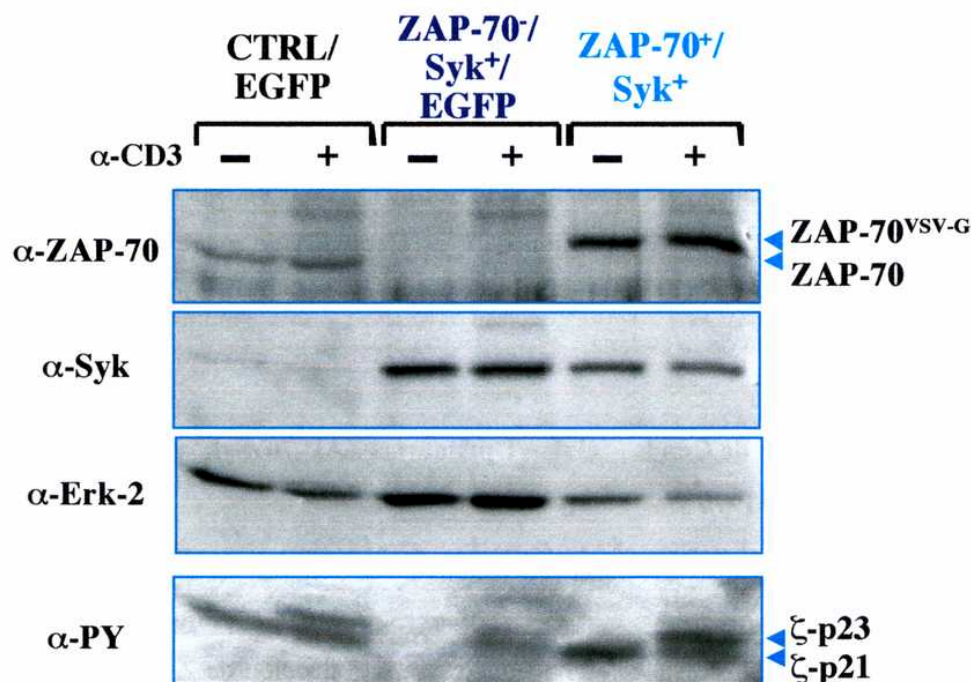
doblete de peso molecular próximo a 20kD correspondiente a las formas p21 y p23 de la cadena  $\zeta$  del TCR fosforilada, no pudo ser detectado en estas células (Figura 3-A). Más curioso aún, la forma  $\zeta$ -p21 que es fosforilada de manera constitutiva en las células T control sin activar, tampoco pudo ser detectada en las células expresando Syk (Figura 3-A). Estas observaciones no fueron consecuencia de una reducida cantidad de proteínas totales cargadas en el gel, ya que la rehibridación de la membrana con un anticuerpo  $\alpha$ -Erk-2 demostró que el nivel de proteína Erk-2 fue equivalente entre las distintas células (Figura 3-B). Por otra parte, estos resultados fueron confirmados en reiteradas oportunidades descartando que estas observaciones sean consecuencia de algún artefacto experimental.

La ausencia de  $\zeta$  fosforilada en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> pudo haber sido la consecuencia de un déficit en la expresión de la cadena. Para determinar si este era el caso, el nivel de expresión de  $\zeta$  en estas células y en las células T control fue monitoreado por "western blot" utilizando un anticuerpo  $\alpha$ - $\zeta$ . Los resultados presentados en la Figura 3-B muestran claramente que la cantidad de  $\zeta$  presente en ambos tipos celulares fue equivalente, indicando que en estas células esta cadena es correctamente expresada.

En conjunto, estos resultados sugieren que en las células T primarias humanas ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades para sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR. Mientras que en presencia de ZAP-70 la fosforilación de  $\zeta$  es efectuada de manera constitutiva y en respuesta a la estimulación del TCR, la presencia de Syk no es suficiente para permitir alguno de los dos tipos de fosforilación de la cadena.

### **El defecto de fosforilación de $\zeta$ en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> puede ser revertido por la introducción de ZAP-70**

Para determinar si el defecto de fosforilación de  $\zeta$  en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> podía ser revertido por ZAP-70, la proteína portando una "etiqueta" VSV-G en su extremidad C-terminal fue expresada ectopicamente. La introducción de ZAP-70 dentro de las células T ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> se realizó mediante la transducción de estas últimas con el vector retroviral LZRS-ZAP-70/EGFP conteniendo el gen "wild-type" de ZAP-70 (Figura 4-A). Paralelamente y para descartar posibles cambios en el estado de activación de las células debidos exclusivamente a la presencia del vector, las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y las células T control fueron transducidas con un vector retroviral "vacío" LZRS/EGFP llevando solamente el gen reportero EGFP (Figura 4-A). Para evaluar si ZAP-70 fue bien expresada en las células transducidas, las

**Figura 4-A** Representación de los vectores retrovirales LZRS-ZAP-70/EGFP y LZRS/EGFP.**Figura 4-B** La fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> es restaurada por la expresión ectópica de ZAP-70.

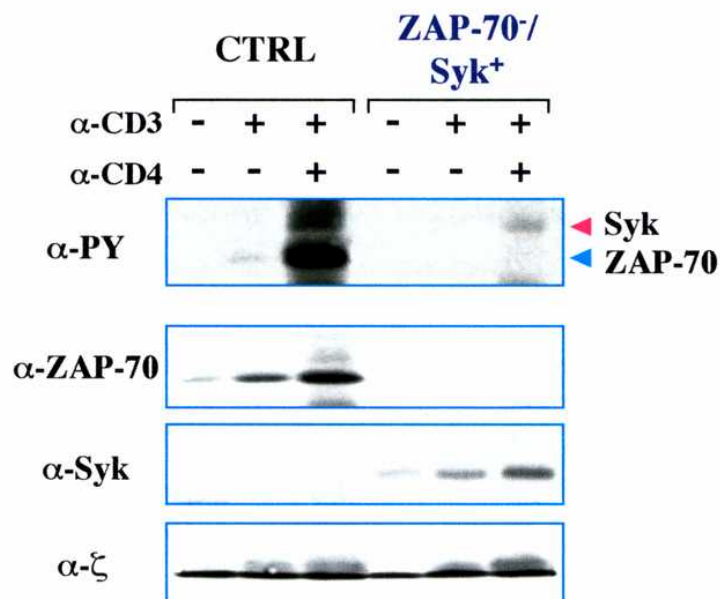
**Figura 4- A.** Esquema de los vectores retrovirales LZRS/EGFP y LZRS-ZAP-70/EGFP utilizados para la transducción de las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>. **B.**  $1 \times 10^6$  células T primarias control o ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> transducidas con el vector LZRS/EGFP (CTRL/EGFP y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>/EGFP, respectivamente), y  $1 \times 10^6$  células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>), fueron estimuladas (+) o no (-) con un mAb  $\alpha$ -CD3. Los extractos celulares obtenidos de las células fueron resueltos en 10% SDS-PAGE y analizados por *western-blot*. El nivel de expresión de ZAP-70 fue monitoreado con un mAb  $\alpha$ -ZAP-70. Las flechas indican las formas endógena (ZAP-70) y ectópica (ZAP-70<sup>VSV-G</sup>) de la proteína. El nivel de Syk fue calculado rehibridando la membrana con un anticuerpo  $\alpha$ -Syk. La cantidad de proteína cargada en el gel fue verificada con un mAb  $\alpha$ -Erk-2. Para determinar el estado de fosforilación de la cadena  $\zeta$ , la membrana fue rehibridada con un mAb  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Las flechas en el panel inferior indican la posición de las formas fosforiladas p21 y p23 de la cadena  $\zeta$  del TCR.

mismas fueron lisadas y el nivel de ZAP-70 fue monitoreado por “western blot”. Como se puede apreciar en la figura 4-B, ZAP-70 fue bien expresada en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> transducidas (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>), y su nivel de expresión fue entre 2 y 3 veces superior al de ZAP-70 endógena, observado en las células T control transducidas con la EGFP. El retardo en la migración de la banda correspondiente a ZAP-70 ectópica es debido a la presencia de la etiqueta VSV-G que aumenta ligeramente el peso molecular de la proteína. De acuerdo a lo observado en esta figura, la presencia de ZAP-70 parecería afectar el nivel de expresión de Syk, sin embargo, la cantidad de proteína total cargada en las calles del gel correspondientes a las células ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> fue algo inferior a la observada para las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> transducidas con la EGFP (Figura 4-B, blot  $\alpha$ -Erk-2). En consecuencia, se puede asumir que el nivel de Syk en estas dos células no difiere significativamente y por lo tanto que la presencia de ZAP-70 no altera la expresión de esta proteína (Figura 4-B, blot  $\alpha$ -Syk). Es importante destacar que ZAP-70 tampoco afectó el estado de foforilación de Syk, ya que la proteína fue correctamente fosforilada en las células T ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR (datos no presentados).

Con el fin de determinar el estado de fosforilación de  $\zeta$ , las células T primarias transducidas con ZAP-70 (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>) como así también células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>/EGFP y células T control/EGFP, fueron estimuladas vía el TCR y la fosforilación fue evaluada por “western blot”. El nivel de fosforilación de  $\zeta$  en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>/EGFP y control/EGFP fue equivalente al observado respectivamente en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y control sin transducir, indicando que la presencia del vector solo no modifica el estado de activación de las células transducidas (Figura 4-B). De manera sorprendente, en las células transducidas con el vector portando el gen de ZAP-70, la fosforilación de  $\zeta$  aumentó significativamente. La expresión ectópica de ZAP-70 no solo aumentó la fosforilación constitutiva de  $\zeta$ -p21 sino también la de la forma  $\zeta$ -p23 inducida por la estimulación del TCR, además, el nivel de fosforilación observado fue equivalente al detectado en las células T control (Figura 4-B).

Estos resultados confirman lo antes mencionado, que ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades para sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$ . Al mismo tiempo demuestran que los defectos en la fosforilación de  $\zeta$  pueden ser revertidos por alguna función aportada exclusivamente por ZAP-70 la cual no puede ser sustituida por la acción de su quinasa homóloga Syk. Este hecho es otra prueba elocuente de que el defecto de fosforilación de  $\zeta$  en las células T

**Figura 5-** Nivel de fosforilación de ZAP-70 y de Syk asociadas a la cadena  $\zeta$  del TCR.



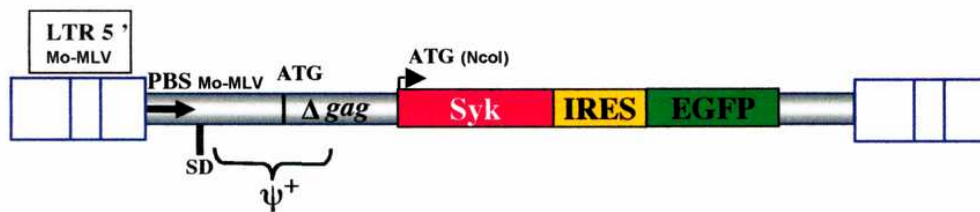
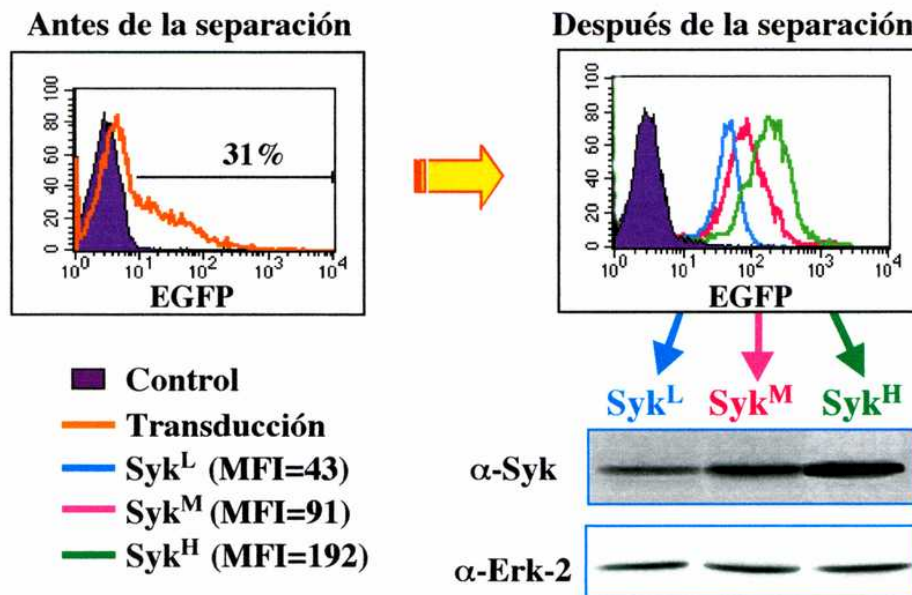
**Figura 5-** La cadena  $\zeta$  del TCR fue inmunoprecipitada a partir de lisados celulares totales obtenidos de  $1 \times 10^7$  células T primarias control (CTRL) o ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> sin estimular (-), estimuladas con un mAb  $\alpha$ -CD3 (+), o co-estimuladas con los mAbs  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD4 (++). Los inmunoprecipitados fueron resueltos en 10% SDS-PAGE y analizados por *western-blot*. El estado de fosforilación ZAP-70 y de Syk asociadas a la cadena  $\zeta$  fue determinado hibridando las membranas con un anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Las flechas indican la posición de las formas fosforiladas de Syk y de ZAP-70 (panel superior). El nivel de asociación de ZAP-70 y de Syk con  $\zeta$  fue estimado rehibridando las membranas con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 o  $\alpha$ -Syk, respectivamente. Para determinar si la cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada en cada condición fue equivalente, la membrana fue rehibridada con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ .

ZAP-70/Syk<sup>+</sup> está directamente asociado con estas quinasas y no con alguna característica particular intrínseca a  $\zeta$ .

**ZAP-70 y Syk recrutadas sobre la cadena  $\zeta$  del TCR exhiben un nivel de fosforilación diferente luego de la estimulación vía este receptor de las células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas**

ZAP-70 y Syk participan activamente en la formación de complejos multiproteicos interactuando con los ITAMs fosforilados y con diferentes moléculas efectoras. Dado que en las células T primarias humanas estimuladas vía el TCR estas dos quinasas modulan de modo diferente la activación de moléculas efectoras [275], y que la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR es diferente en presencia de Syk o de ZAP-70 (este manuscrito), era interesante estudiar el nivel de fosforilación de estas dos quinasas luego del reclutamiento de las mismas sobre  $\zeta$ . Para ello, la cadena  $\zeta$  del TCR fue inmunoprecipitada a partir de células T ZAP-70/Syk<sup>+</sup> y de células T control sin estimular, estimuladas vía el TCR o co-estimuladas con un anticuerpo  $\alpha$ -CD4 (ver materiales y métodos). Luego, el estado de fosforilación de ZAP-70 y de Syk co-inmunoprecipitadas con  $\zeta$  fue evaluado por "western blot". En las células T control estimuladas por el TCR, la banda de 70kD correspondiente a ZAP-70 fue claramente detectada por el anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina, indicando que la proteína es bien fosforilada una vez reclutada sobre  $\zeta$  (Figura 5). Como era de esperar, la co-estimulación de estas células vía el co-receptor CD4 incrementó drásticamente el nivel de fosforilación de ZAP-70. Contrariamente, en las células T ZAP-70/Syk<sup>+</sup> la banda de 72kD correspondiente a Syk solo fue detectada en condiciones de co-estimulación, y la intensidad de la misma fue muy inferior a la de ZAP-70 observada en las células control (Figura 5).

Con el fin de determinar el nivel de asociación de ZAP-70 y Syk con  $\zeta$ , la membrana fue rehibridada con anticuerpos específicos para estas dos proteínas. Como puede observarse, la hibridación con el anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 reveló que en las células T control ZAP-70 co-inmunoprecipita con  $\zeta$  y que su nivel de reclutamiento es máximo cuando las células son co-estimuladas (Figura 5). En lo que respecta a Syk, el anticuerpo específico contra esta quinasa reveló que la proteína es capaz de interactuar con la cadena  $\zeta$ . De manera similar a ZAP-70, el nivel de reclutamiento de Syk aumentó progresivamente con la estimulación de las células alcanzando el máximo luego de la co-estimulación (Figura 5). Aunque ambas proteínas fueron capaces de asociarse a  $\zeta$ , las cantidades relativas de ZAP-70 y de Syk recrutadas no pudieron ser

**Figura 6-A** Representación del vector retroviral LZRS-Syk/EGFP**Figura 6-B** Análisis del nivel de correlación entre la fluorescencia emitida por la EGFP y la expresión de Syk en las células T transformadas P116, transducidas con los vectores retrovirales**Figura 6-** Obtención de las líneas celulares T expresando la quinasa Syk.

**A-** Esquema del vector retroviral LZRS-Syk/EGFP utilizado para la transducción de las células T transformadas P116 (ZAP-70/Syk). **B-** Las células P116 transducidas con el vector LZRS-Syk/EGFP (transducción) fueron separadas por citometría de flujo (FACS) según sus intensidades medias de fluorescencia (MFIs) emitidas por la EGFP. De este modo se obtuvieron 3 poblaciones de células P116 transducidas expresando niveles bajos (Syk<sup>L</sup>), intermedios (Syk<sup>M</sup>), o altos (Syk<sup>H</sup>) de la proteína Syk. Como control se utilizaron células P116 sin transducir. El nivel de expresión de Syk en cada una de estas poblaciones fue evaluado por *western-blot* utilizando un anticuerpo policlonal  $\alpha$ Syk. Los resultados demuestran una buena correlación entre la expresión de la proteína Syk y la fluorescencia emitida por la EGFP. Para determinar si la cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue equivalente, la membrana fue rehibridada con un mAb  $\alpha$ -Erk-2.

comparadas, debido a que los anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk utilizados no reconocen sus proteínas específicas con la misma afinidad.

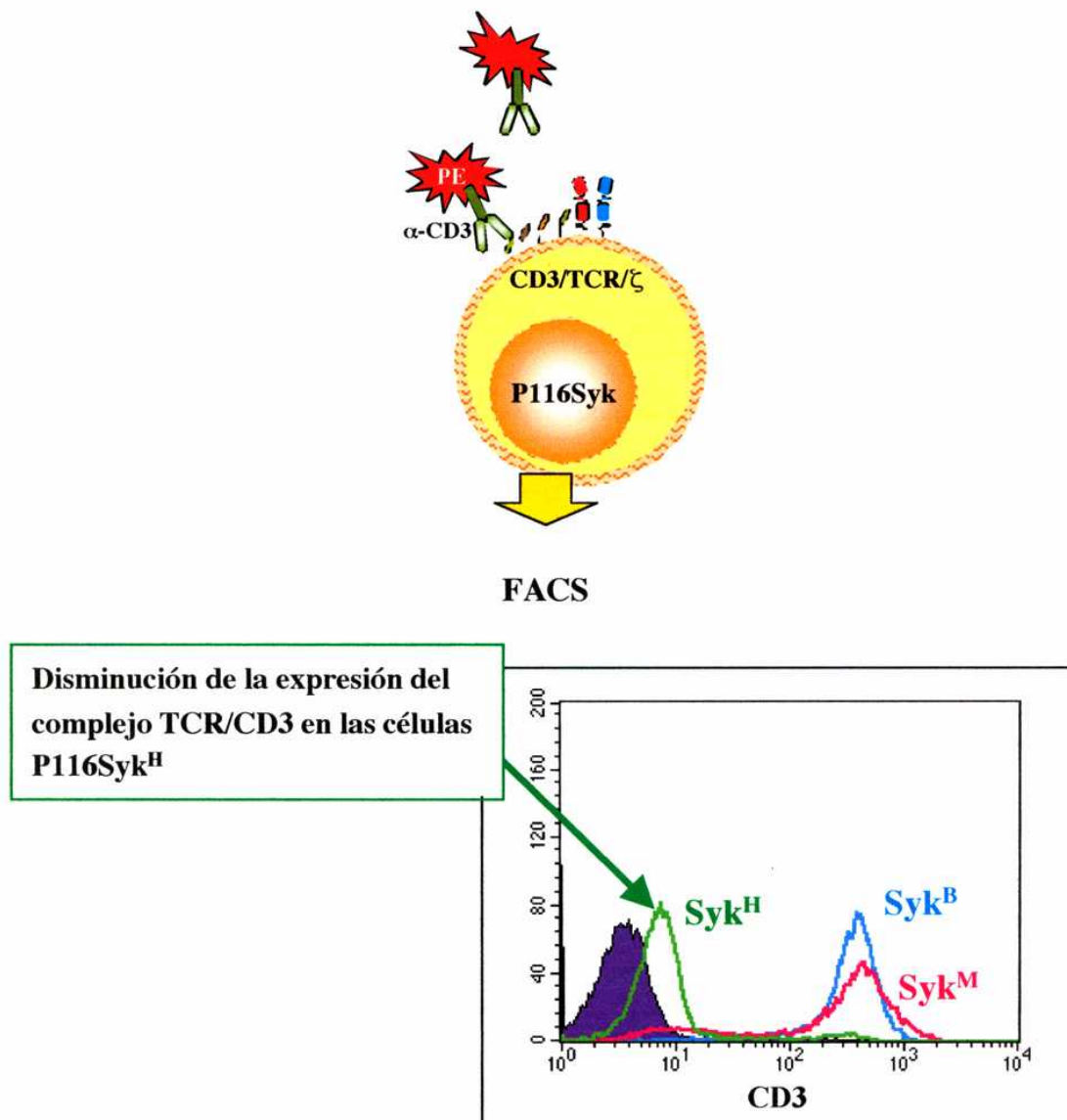
Estos resultados permiten afirmar que el nivel de fosforilación de ZAP-70 asociada a  $\zeta$  en las células T control es superior al que presenta Syk en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, sin embargo los mismos no son suficientes para explicar las causas de estas diferencias. Una posibilidad es que la pobre fosforilación de  $\zeta$  en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> haya ocasionado una asociación más baja de Syk con esta cadena, y por lo tanto la cantidad de Syk fosforilada unida al TCR fue inferior a la de ZAP-70 en las células T control. Por otro lado, es posible que la cantidad de Syk en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> sea inferior a la de ZAP-70 en las células control, y en consecuencia habría un número más bajo de moléculas de Syk disponibles para interactuar con  $\zeta$  y nuevamente habría menos cantidad de Syk que de ZAP-70 asociada y fosforilada.

### **Generación de líneas celulares T expresando niveles equivalentes de ZAP-70 y de Syk**

Como venimos de ver, en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> la fosforilación de  $\zeta$  es defectuosa y el nivel de Syk fosforilada asociada a la misma fue muy inferior al que presentó ZAP-70 en las células T control. Una menor cantidad de Syk en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> podría ser la causa de los defectos observados en estas células. De este modo, consideramos de sumo interés estudiar como  $\zeta$  es fosforilada cuando Syk es expresada a niveles equivalentes a los de ZAP-70. Para ello decidimos generar líneas celulares T expresando separadamente niveles equivalentes de estas dos quinasas. Luego de prolongados esfuerzos se pudieron generar líneas T expresando ZAP-70 o Syk a niveles equivalentes y de manera estable. Dichas líneas fueron obtenidas mediante la transducción con vectores retrovirales de la línea celular T PI16 de fenotipo ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, descrita previamente por Williams y colaboradores [265].

Los vectores retrovirales LZRS, contienen el ADNc de ZAP-70 o bien el de Syk, junto con el gen reportero EGFP situado después de una secuencia IRES (Figuras 4-A y 6-A). En los mismos el gen de interés (ZAP-70 o Syk) y el gen reportero están bajo el control de un mismo promotor LTR (ver introducción general, ítem I.2.1.a. del capítulo V), lo cual junto con la presencia de la secuencia IRES, permite una expresión equivalente de ambas proteínas (de interés y reportera). De este modo, el nivel de expresión de la EGFP en las células transducidas es representativo del nivel de expresión de ZAP-70 o de Syk, dependiendo del vector que haya sido utilizado. Las células EGFP<sup>+</sup> transducidas con el vector Syk o con el vector ZAP-70, con

**Figura 7-** Análisis por FACS de la expresión del complejo TCR/CD3 en las células T transformadas P116Syk<sup>L</sup>, P116Syk<sup>M</sup> y P116Syk<sup>H</sup>.



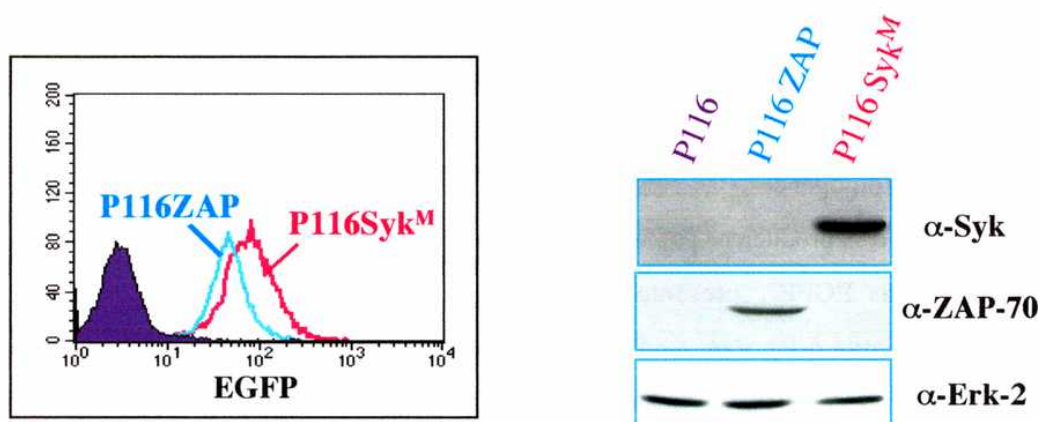
**Figura 7-**  $2 \times 10^5$  células P116Syk<sup>L</sup>, P116Syk<sup>M</sup> y P116Syk<sup>H</sup> fueron marcadas con un mAb  $\alpha$ -CD3 conjugado a la molécula fluorescente phycoerythrina (PE). Luego las células marcadas fueron analizadas por FACS. Como control se utilizó la línea P116 marcada con un anticuerpo control no específico conjugado a PE, incapaz de reconocer el CD3 (■).

intensidades medias de fluorescencia (MFIs) similares, expresarán cantidades equivalentes de Syk y de ZAP-70.

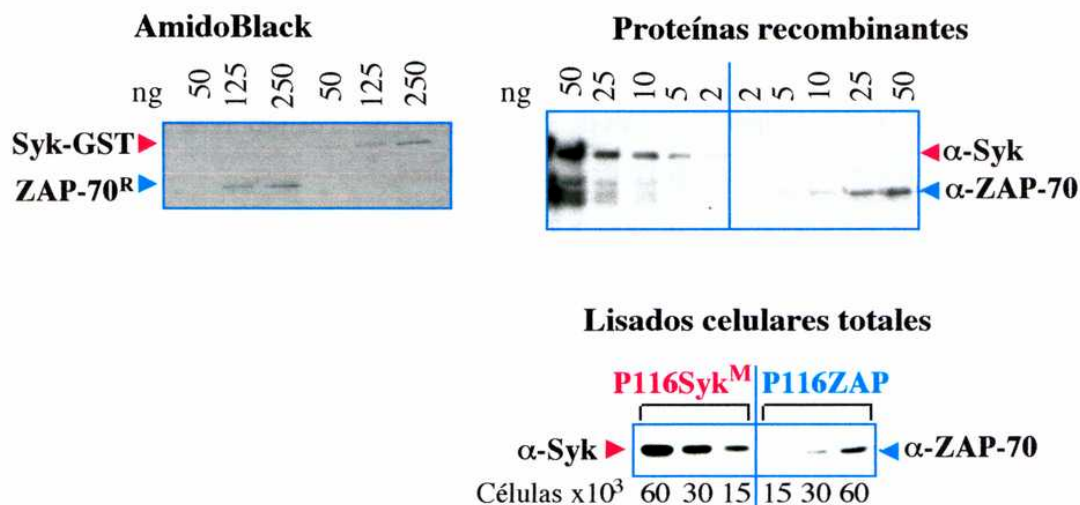
Para la obtención de la línea T expresando Syk, las células P116 fueron transducidas con el vector LZRS-Syk/EGFP. Luego de la transducción, 31% de las células fueron EGFP<sup>+</sup>, con valores de MFI bastante heterogéneos (Figura 6-B). Para obtener poblaciones de células transducidas más homogéneas, las células EGFP<sup>+</sup> fueron separadas por citometría de flujo (FACS) según las MFIs producidas por la EGFP. De este modo se obtuvieron tres poblaciones de células transducidas EGFP<sup>+</sup>, presentando cada una de ellas MFIs de 43, 91 y 192, respectivamente (Figura 6-B). Para confirmar si existía una buena correlación entre el nivel de expresión de Syk y el de la EGFP, la cantidad de Syk presente en cada población fue evaluada por "western-blot". Los resultados presentados en la figura 6-B muestran que el nivel de expresión de Syk aumentó de manera proporcional a la fluorescencia de la EGFP, confirmando que existe una buena correlación entre la expresión de las dos proteínas. Las tres poblaciones celulares expresando niveles bajos, intermedios o altos de Syk fueron llamadas respectivamente P116Syk<sup>L</sup>, P116Syk<sup>M</sup> y P116Syk<sup>H</sup> (del inglés: *Low*, *Medium* y *High*). Todas las poblaciones celulares P116 expresando diferentes niveles de Syk fueron capaces de proliferar y expandirse *in vitro*, pudiendo ser mantenidas en cultivo durante varios meses.

Dado que estas células fueron generadas para el estudio de la señalización vía el TCR, era importante determinar si las tres poblaciones P116Syk<sup>L</sup>, P116Syk<sup>M</sup> y P116Syk<sup>H</sup> expresaban niveles comparables de este receptor. Para ello, las células fueron marcadas con un anticuerpo dirigido contra la subunidad CD3 del TCR conjugado a la molécula fluorescente phycoerythrina (PE) y luego las células fueron analizadas por FACS (Figura 7). El complejo TCR/CD3 fue expresado sobre la superficie de la mayoría de las células P116Syk<sup>L</sup> y P116Syk<sup>M</sup>, como así también en las células P116 sin transducir utilizadas como control. Sorprendentemente, solo 8.7% de las células P116Syk<sup>H</sup> fueron CD3/PE<sup>+</sup>, es decir que en la mayoría de estas células el TCR/CD3 no fue expresado (Figura 7). Este fenómeno asociado a Syk demuestra claramente que cantidades demasiado elevadas de Syk no pueden ser toleradas por las células P116 sin que se produzcan cambios en su fenotipo. Por este motivo, las células P116Syk<sup>H</sup> fueron descartadas de los estudios de señalización vía el TCR. La línea P116Syk<sup>L</sup> también fue descartada ya que se consideró que el nivel de expresión de Syk en la misma no era suficientemente alto. Finalmente,

**Figura 8-A** Generación de la línea P116ZAP expresando ZAP-70 a niveles equivalentes a los de Syk en las células P116Syk<sup>M</sup>.



**Figura 8-B** Validación de la expresión de niveles equivalentes de ZAP-70 y de Syk en las células P116ZAP y P116Syk<sup>M</sup>.



**Figura 8-** Obtención de la línea celular P116 expresando ZAP-70. **A-** La línea celular P116ZAP fue generada transduciendo las células P116 con el vector retroviral LZRS-ZAP-70/EGFP. Las células transducidas fueron separadas por FACS para obtener una población de células con una MFI equivalente a la de las células P116Syk<sup>M</sup>. El nivel de expresión de ZAP-70 fue evaluado por *western-blot* con un mAb α-ZAP-70. **B-** La cantidad de ZAP-70 en las células P116ZAP fue comparada con la de Syk en las P116Syk<sup>M</sup> utilizando anticuerpos α-ZAP-70 y α-Syk, y las dos proteínas recombinantes purificadas. Por medio de una tinción de proteínas por AmidoBlack se confirmó que la cantidad de ZAP-70 (ZAP-70<sup>R</sup>) y Syk (Syk-GST) recombinantes cargadas en el gel fue similar. Luego la cantidad de ZAP-70 y de Syk presentes en las células P116ZAP o P116Syk<sup>M</sup> fue calculada comparando las intensidades de las señales que los anticuerpos produjeron sobre lisados celulares totales obtenidos a partir de 60, 30 o 15x10<sup>3</sup> células, con las intensidades de las bandas obtenidas con diferentes concentraciones de las proteínas recombinantes. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas con el software NIHImage permitiendo estimar la cantidad de proteína por célula (19pg de ZAP-70/P116ZAP y 20pg de Syk/P116Syk<sup>M</sup>).

la línea P116Syk<sup>M</sup> capaz de expresar un nivel importante de Syk sin sufrir cambios fenotípicos apreciables, fue seleccionada para la realización de los estudios de señalización.

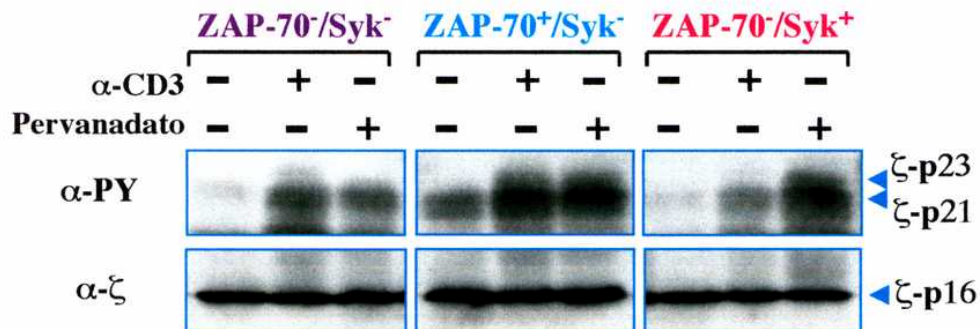
Para generar una línea P116 expresando ZAP-70 a niveles equivalentes a los de Syk en las P116Syk<sup>M</sup>, las células P116 fueron transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP utilizado previamente (Figura 4-A). Luego, basándose en el nivel de expresión de la EGFP, las células transducidas presentando una MFI similar a la de las células P116Syk<sup>M</sup> fueron separadas por FACS. Por último, el nivel de expresión de ZAP-70 en las células transducidas (P116ZAP-70) fue monitoreado por “western blot” (Figura 8-A).

Para validar por una estrategia más directa si los niveles de expresión de ZAP-70 y de Syk en las líneas P116ZAP y P116Syk<sup>M</sup> eran equivalentes, decidimos utilizar anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk para estimar por “western blot” la cantidad de cada quinasa. Para poder efectuar este tipo de estimación nos servimos de las proteínas ZAP-70 y Syk recombinantes con las que se realizaron curvas estándar. A partir de estas curvas se determinó cuales eran las intensidades de las bandas producidas por los anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk para cada una de las diluciones de sus proteínas recombinantes específicas (Figura 8-B). En paralelo, las intensidades de las bandas producidas por estos anticuerpos sobre lisados celulares totales obtenidos a partir de células P116ZAP o P116Syk<sup>M</sup>, fueron comparadas con aquellas obtenidas de las curvas estándar. De esta manera y con la ayuda de un programa informático que permite cuantificar las intensidades de las bandas obtenidas por “western blot” se pudo estimar la cantidad de ZAP-70 y de Syk presente en cada célula. Para realizar este experimento, extractos celulares totales fueron obtenidos a partir de 15000, 30000 o 60000 células P116ZAP o P116Syk<sup>M</sup>, y luego las cantidades de las dos proteínas fueron calculadas como se indicó (Figura 8-B). De este modo se pudo determinar que los niveles de Syk y de ZAP-70 en estas células fueron equivalentes, con cantidades aproximadas de 0,19 pg de Syk por célula P116Syk<sup>M</sup> y 0,20 pg de ZAP-70 por célula P116ZAP (datos no presentados). En este experimento también pudimos constatar que el anticuerpo  $\alpha$ -Syk es bastante más eficaz que el  $\alpha$ -ZAP-70, teniendo una afinidad por Syk 6,5 veces superior que la que posee el  $\alpha$ -ZAP-70 por ZAP-70.

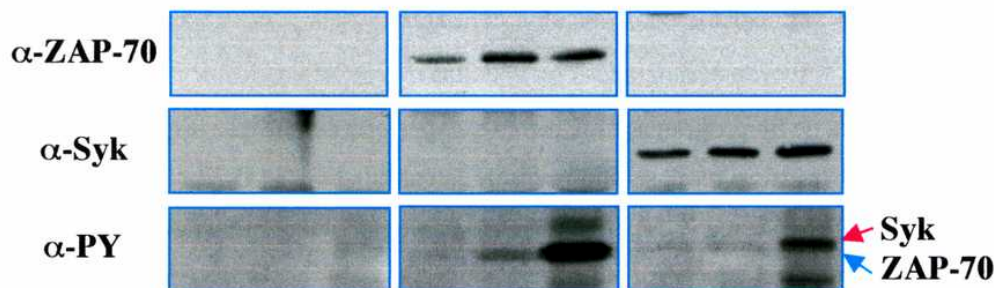
La generación de estas líneas celulares T proporcionan por la primera vez un modelo celular en el cual el rol de ZAP-70 y Syk en la señalización vía el TCR puede ser estudiado en un contexto donde ambas quinasas son expresadas individualmente y a niveles equivalentes.

De ahora en más, para diferenciar las líneas celulares T transformadas de las células T primarias, y para facilitar la comprensión de los resultados, las dos líneas T generadas serán

**Figura 9-A** Nivel de fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR en las líneas celulares T expresando ZAP-70 o Syk.



**Figura 9-B** Determinación del grado de asociación de ZAP-70 y de Syk a la cadena  $\zeta$  del TCR.



**Figura 9-** ZAP-70 pero no Syk, es capaz de sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR en las líneas celulares T expresando una u otra quinasa. **A-** La cadena  $\zeta$  del TCR fue inmunoprecipitada a partir de lisados celulares totales obtenidos de  $1 \times 10^7$  células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> o ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> sin estimular (-), estimuladas con un mAb  $\alpha$ -CD3 (+), o activadas con pervanadato (+). Los inmunoprecipitados fueron resueltos en 10% SDS-PAGE y analizados por *western-blot*. El estado de fosforilación de  $\zeta$  en las diferentes líneas celulares fue evaluado utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). La cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada en cada condición fue monitoreada rehibridando la membrana con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ . Las flechas indican las formas p21 y p23 de  $\zeta$  fosforilada y la forma p16 correspondiente a la cadena no fosforilada (panel inferior). **B-** La asociación de ZAP-70 y de Syk con  $\zeta$  fue analizada rehibridando la membrana con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 o  $\alpha$ -Syk, respectivamente. Para evaluar el nivel de fosforilación de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$ , la membrana fue hibridada con anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Las flechas indican la posición de las formas fosforiladas de Syk y de ZAP-70 (panel inferior).

citadas de acuerdo a la expresión de ZAP-70 y de Syk como células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> (P116Syk<sup>M</sup>), y células T transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> (P116ZAP).

**ZAP-70 pero no Syk, es capaz de sustentar la fosforilación de  $\zeta$  y de asociarse de manera preferencial al TCR cuando ambas quinasas son expresadas a niveles equivalentes**

Para estudiar el estado de fosforilación de  $\zeta$  en presencia de cantidades equivalentes de ZAP-70 o de Syk, la cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de las células T transformadas P116 ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> y de las líneas celulares transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR o activadas con pervanadato. Luego, el nivel de fosforilación de  $\zeta$  fue evaluado por "western blot" utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina. Como se esperaba, las células T P116 ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> presentaron un nivel de fosforilación de  $\zeta$  sumamente bajo. La estimulación de las mismas vía el TCR indujo una fosforilación extremadamente débil y solo de la forma  $\zeta$ -p21 (Figura 9-A). De manera similar a lo observado en las células T primarias, la presencia de ZAP-70 en las células T transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> incrementó de forma considerable el nivel basal de fosforilación de la forma p21. Además, la estimulación de las células vía el TCR condujo a un aumento en el nivel de fosforilación de  $\zeta$ , pudiéndose detectar las dos formas de  $\zeta$  fosforilada, p21 y p23 (Figura 9-A). En marcado contraste, en las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> expresando solo Syk, las fosforilaciones constitutiva e inducida por el TCR de ambas formas de  $\zeta$  fueron sumamente débiles, con niveles no muy diferentes de los observados en la línea celular ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>. La activación de las células con pervanadato provocó la fosforilación de  $\zeta$  solo en las líneas celulares expresando alguna de las dos quinasas. Esta activación indujo la aparición de las dos formas de  $\zeta$  fosforilada p21 y p23, incluso en las células transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, con un nivel de fosforilación en estas últimas comparable al observado en las ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> (Figura 9-A). Es importante destacar que en ciertos experimentos, el nivel de fosforilación de  $\zeta$  inducido por el pervanadato fue superior al observado aquí (datos no presentados). Este tipo de variaciones es bastante común y probablemente se deban a diferencias en los estados fisiológicos de las células al momento de realizar el experimento que repercuten en la respuesta al estímulo dado.

Para determinar el grado de asociación de ZAP-70 y Syk con la cadena  $\zeta$  del TCR, las membranas obtenidas en la inmunoprecipitación anterior fueron rehibridadas con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk. Mientras que en las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> como era de esperar,

ZAP-70 y Syk no fueron detectadas, en las demás líneas celulares T ambas quinasas co-inmunoprecipitaron con  $\zeta$ . ZAP-70 fue detectada en las células T transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> estimuladas o sin estimular, sin embargo, la cantidad de proteína asociada a  $\zeta$  fue mayor cuando las células fueron activadas (Figura 9-B). Syk por su parte, co-inmunoprecipitó con  $\zeta$  en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y del mismo modo que ZAP-70, su nivel de asociación se vio incrementado con la activación de las células (Figura 9-B). Dado que las intensidades de las bandas obtenidas para cada proteína fueron bastante equivalentes y teniendo en cuenta que la afinidad del anticuerpo  $\alpha$ -Syk es 6 veces superior a la del  $\alpha$ -ZAP-70, parecería ser que la cantidad de Syk asociada a  $\zeta$  es inferior a la de ZAP-70.

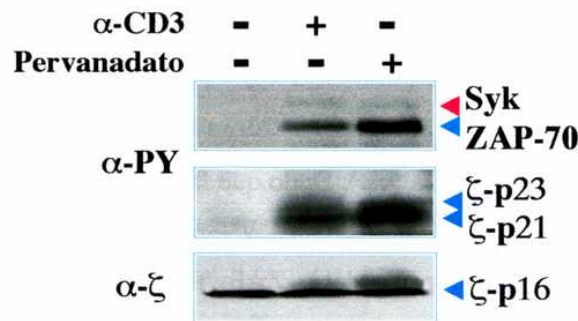
Por último, el estado de fosforilación de ZAP-70 y Syk asociadas al TCR fue monitoreado por “western blot” con un anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina. La estimulación de las células ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> con el anticuerpo  $\alpha$ -CD3 provocó un aumento en los niveles de fosforilación de ZAP-70, en cambio, esta misma estimulación no indujo ningún aumento significativo en el estado de fosforilación de Syk en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 9-B). La estimulación TCR-independiente producida por el pervanadato incrementó de manera drástica los niveles de fosforilación de ZAP-70 y de Syk asociadas al TCR, sin embargo, la cantidad de ZAP-70 fosforilada fue bien superior a la que presentó Syk (Figura 9-B).

Resumiendo, todos estos resultados confirman lo antes observado en las células T primarias humanas y demuestran que solo ZAP-70 es capaz de revertir los defectos de fosforilación de  $\zeta$ , ya que cantidades equivalentes de Syk no pueden reemplazar este efecto de ZAP-70. Estos resultados también demuestran que ZAP-70 asociada a los ITAMs de  $\zeta$  es más intensamente fosforilada y probablemente mejor recrutada que Syk.

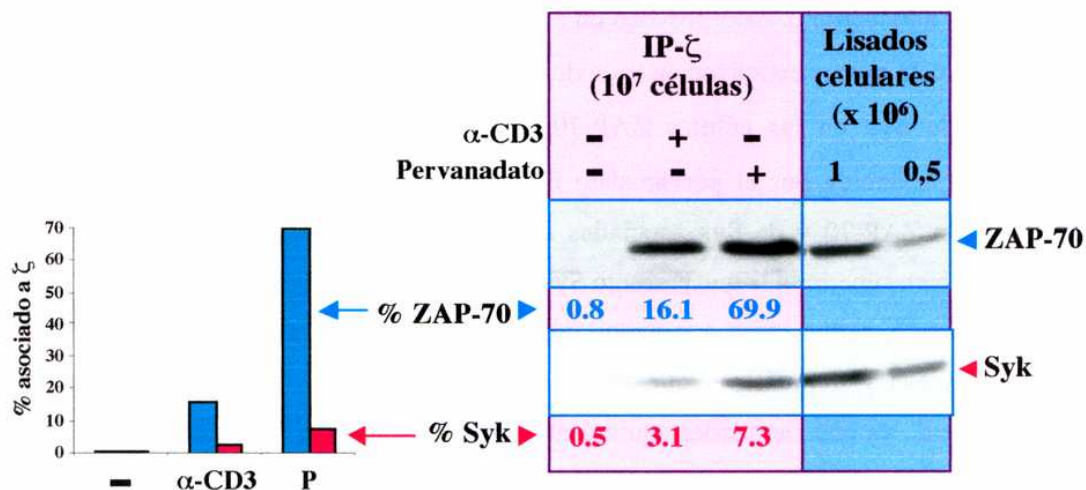
### **ZAP-70 es preferencialmente recrutada sobre el TCR en dos líneas celulares T que expresan ZAP-70 y Syk en condiciones donde la cadena $\zeta$ es fosforilada correctamente**

El reclutamiento de ZAP-70 y Syk sobre el TCR es máximo luego de la activación de este receptor, una vez que los ITAMs presentes en la cadena  $\zeta$  han sido fosforilados. Los diferentes estados de fosforilación de  $\zeta$  ofrecen diversas opciones de unión para ZAP-70 y Syk. Para determinar si el bajo nivel de fosforilación de  $\zeta$  en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> pudo haber sido la causa del menor reclutamiento y más baja fosforilación que presentó Syk unida a esta cadena comparado con la que presentó ZAP-70, decidimos estudiar estas dos quinasas en condiciones donde  $\zeta$  es correctamente fosforilada. En primer término se utilizó la línea celular T Jurkat que

**Figura 10-A** Nivel de fosforilación de ZAP-70 y Syk asociadas a la cadena  $\zeta$  del TCR, en las células T transformadas Jurkat (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>) donde  $\zeta$  es completamente fosforilada.



**Figura 10-B** Determinación de los porcentajes relativos de ZAP-70 y de Syk asociadas a la cadena  $\zeta$  del TCR en las células T transformadas Jurkat (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>).



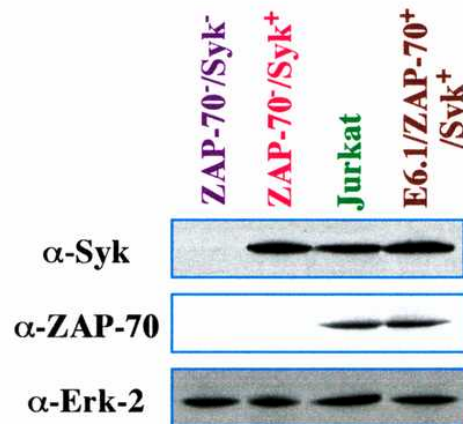
**Figura 10-** En la línea celular T Jurkat (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>), ZAP-70 es recrutada sobre el TCR de manera preferencial comparado con Syk. **A-** La cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de  $1 \times 10^7$  células T transformadas Jurkat sin estimular, estimuladas con un mAb  $\alpha$ -CD3 o activadas con pervanadato. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en gel y el estado de fosforilación de  $\zeta$  como así también los de ZAP-70 y Syk asociadas al TCR fueron evaluados por *western-blot*. Las flechas indican la posición de las formas fosforiladas de Syk y de ZAP-70 (panel superior) y las de fosfo- $\zeta$ , p21 y p23 y de  $\zeta$  p16 (paneles intermedio e inferior). La cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada fue monitoreada con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ . **B-** El porcentaje relativo de ZAP-70 y de Syk asociadas al TCR fue estimado comparando la cantidad de cada una de estas proteínas co-inmunoprecipitadas con  $\zeta$  con la cantidad total de cada una de ellas presente en las células Jurkat. Para ello, la membrana obtenida previamente conteniendo también muestras correspondientes a lisados celulares totales provenientes de  $1$  o  $0,5 \times 10^6$  células Jurkat sin estimular, fue hibridada con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 o  $\alpha$ -Syk. Las intensidades de las bandas obtenidas de los inmunoprecipitados o de los lisados totales fueron cuantificadas con el software NIHImage. Los valores arrojados por las intensidades de las bandas de las proteínas co-inmunoprecipitadas fueron normalizados a  $1 \times 10^6$  células, y comparados con aquellos obtenidos de los lisados totales. El porcentaje relativo de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$  fue estimado asumiendo que los valores de las intensidades de bandas obtenidos con el  $\alpha$ -ZAP-70 o con el  $\alpha$ -Syk en los lisados totales corresponden respectivamente al 100% de ZAP-70 o de Syk presente en la célula. Las cifras indicadas debajo de cada inmunoblot corresponden a los porcentajes relativos de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$ , y las mismas son representadas en el histograma, a la izquierda de la figura.

expresa de manera endógena ZAP-70 y Syk, y donde  $\zeta$  es completamente fosforilada cuando las células son activadas. Las células fueron estimuladas vía el TCR o activadas con pervanadato y posteriormente la cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada. Como muestra la figura 10-A, la activación de las células Jurkat condujo a una fosforilación completa de la cadena  $\zeta$  con la aparición de las dos formas fosforiladas  $\zeta$ -p21 y  $\zeta$ -p23. Estas activaciones también indujeron la fosforilación de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$ . Nuevamente, el nivel de fosforilación de Syk asociada al TCR fue inferior al observado para ZAP-70, aún bajo condiciones de estimulación por pervanadato, reproduciendo lo observado en las células T primarias y en las líneas T transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 10-A).

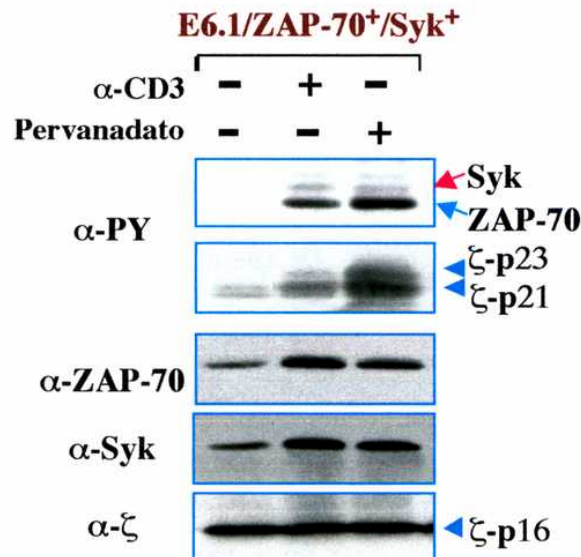
Dado que en estas células ZAP-70 y Syk no son expresadas a niveles equivalentes, para tener una idea del reclutamiento sobre el TCR de cada una de estas proteínas se estimó que porcentaje del total de ZAP-70 y del total de Syk presente en las células se asoció con  $\zeta$  luego de la activación. Una vez realizada la inmunoprecipitación de  $\zeta$ , los niveles de ZAP-70 y Syk asociadas fueron evaluados por "western blot". En paralelo, la cantidad total de ZAP-70 y de Syk presente en las células también fue monitoreada por "western blot" a partir de lisados totales (Figura 10-B). Las membranas obtenidas en los dos casos fueron hibridadas simultáneamente con un único anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 o  $\alpha$ -Syk y reveladas con un tiempo de exposición idéntico. Luego, las señales obtenidas para cada proteína co-inmunoprecipitada con  $\zeta$  fueron comparadas con aquellas obtenidas de los lisados totales. De este modo, cuantificando las intensidades de bandas obtenidas por "western blot" pudimos determinar los porcentajes relativos de ZAP-70 y de Syk unidas al TCR. Los resultados son representados en la figura 10-B. Mientras que en el estado basal de activación los porcentajes relativos de ZAP-70 y Syk asociadas a  $\zeta$  no superaron el 1%, la estimulación de las células vía el TCR condujo al reclutamiento de ambas proteínas. Bajo esta estimulación, 16% del total de ZAP-70 presente en la célula fue reclutado, y en cambio, solo 3% del total de Syk pudo asociarse a  $\zeta$  (Figura 10-B). La activación de las células con pervanadato condujo a un incremento en los porcentajes de ZAP-70 y de Syk inmunoprecipitadas con  $\zeta$ . Una vez más, mientras que para ZAP-70 dicho incremento fue drástico pasando de 1 a 70% del total de proteína presente, para Syk fue sumamente débil con solo 7% de la proteína total asociada con  $\zeta$  (Figura 10-B).

Para evaluar el reclutamiento de ZAP-70 y de Syk sobre  $\zeta$  correctamente fosforilada en un contexto donde Syk sea expresada a niveles equivalentes a los de ZAP-70, generamos una línea celular T ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>. Las células T transformadas E6.1 que expresan de manera

**Figura 11-A** Nivel de expresión de Syk y de ZAP-70 en las células T transformadas E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>



**Figura 11-B** En la línea celular E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, ZAP-70 es recrutada de manera preferencial sobre la cadena  $\zeta$  del TCR comparado a su proteína homóloga Syk.



**Figura 11-** El clon Jurkat E6.1 (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup>) fue transducido con el vector retroviral LZRS-Syk/EGFP. En la línea celular resultante E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, que expresa niveles equivalentes de Syk y de ZAP-70, ZAP-70 es recrutada de manera preferencial sobre el TCR. **A-** Los niveles de expresión de Syk y de ZAP-70 en la línea celular E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> fue comparado con aquellos observados en las líneas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y Jurkat (ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>). Los extractos celulares totales obtenidos de  $1 \times 10^6$  células de cada línea fueron resueltos en 10% SDS-PAGE y analizados por *western-blot*. El nivel de expresión de Syk y de ZAP-70 fue monitoreado con anticuerpos  $\alpha$ -Syk y  $\alpha$ -ZAP-70. La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue estimada rehibridando la membrana con un mAb  $\alpha$ -Erk-2. **B-** La cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de  $1 \times 10^7$  células T transformadas E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> sin estimular, activadas con un  $\alpha$ -CD3 o con pervanadato. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en gel, transferidos sobre una membrana de nitrocelulosa y luego la misma fue hibridada con un mAb  $\alpha$ -PY. Las flechas indican la posición de las formas fosforiladas de Syk y de ZAP-70 (panel superior) y las de fosfo- $\zeta$  p21 y p23 (panel intermedio). El nivel de asociación de ZAP-70 y de Syk con el TCR fue evaluado rehibridando la membrana con los anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk. La cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada en cada condición fue monitoreada con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ .

endógena ZAP-70 y son deficientes en Syk, fueron transducidas con el vector retroviral LZRS-Syk/EGFP utilizado previamente. Luego de la transducción se seleccionaron las células EGFP<sup>+</sup> con una MFI similar a la de las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> utilizadas en los experimentos anteriores. De este modo se obtuvo la línea celular T E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> expresando niveles equivalentes de ZAP-70 y de Syk, y expresando una cantidad más importante de esta última quinasa con respecto a las células Jurkat utilizadas en el experimento precedente. Los niveles de expresión de ZAP-70 y Syk en estas células fueron comparados por “western blot” y los mismos son presentados en la figura 11-A.

Para confirmar que la cadena  $\zeta$  es bien fosforilada en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, las mismas fueron estimuladas vía el TCR o activadas con pervanadato y luego  $\zeta$  fue inmunoprecipitada. Como se esperaba, la activación de las células condujo a una fosforilación completa de la cadena  $\zeta$  con la aparición de las dos formas fosforiladas  $\zeta$ -p21 y  $\zeta$ -p23. La activación con pervanadato indujo una fosforilación de  $\zeta$  más intensa que la producida por la estimulación del TCR (Figura 11-B). Es importante destacar que una cantidad más importante de Syk en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> no incrementó el nivel de fosforilación de  $\zeta$  observado en las células Jurkat (Figuras 10-A y 11-B).

Cuando el estado de fosforilación de ZAP-70 y Syk asociadas al TCR fue monitoreado por “western blot”, los resultados reprodujeron lo observado en las células Jurkat. La activación vía el TCR de las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> provocó un aumento en los niveles de fosforilación de ZAP-70 y de Syk. Sin embargo, mientras que para ZAP-70 el aumento fue significativo, en el caso de Syk dicho aumento fue solo muy débil (Figura 11-B). La estimulación de las células con pervanadato indujo un nivel de fosforilación de ZAP-70 asociada a  $\zeta$  aún más elevado, pero para Syk el nivel casi no se vio incrementado. Esto difirió de lo observado con las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas de igual manera donde el nivel de fosforilación de Syk asociada al TCR aumentó de manera drástica con el pervanadato (Figuras 11-B y 9). En todas las condiciones de estimulación, la cantidad de ZAP-70 fosforilada unida al TCR fue superior a la que presentó Syk.

Para evaluar el grado de asociación de ZAP-70 y Syk con la cadena  $\zeta$  en las células T E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, las membranas obtenidas en la inmunoprecipitación fueron rehibridadas con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk. El anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 reveló que ZAP-70 se asoció con  $\zeta$  en las células estimuladas o sin estimular, pero la cantidad de proteína unida a la cadena fue

mayor cuando las células fueron activadas (Figura 11-B). Syk también co-inmunoprecipitó con  $\zeta$  y del mismo modo que ZAP-70, su nivel de asociación se vio incrementado con la activación de las células. La cantidad de Syk asociada a  $\zeta$  en estas células fue similar a la observada en las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> en las cuales la fosforilación de la cadena es defectuosa (Figuras 11-B y 9). Esto demuestra que en presencia de ZAP-70 y en condiciones donde  $\zeta$  es fosforilada correctamente el reclutamiento de Syk no es superior al que presenta la quinasa cuando la misma es expresada individualmente. Cuando se comparó la cantidad relativa de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$ , las intensidades de las bandas correspondientes a cada una de estas proteínas fueron bastante similares entre sí (Figura 11-B). Nuevamente, si se tienen en cuenta las afinidades de los anticuerpos  $\alpha$ -Syk y  $\alpha$ -ZAP-70, la cantidad de Syk reclutada sobre  $\zeta$  en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> fue inferior a la de ZAP-70. Una vez más, los resultados demuestran que aún cuando Syk es expresada a niveles equivalentes a los de ZAP-70, esta última quinasa es la que se asocia preferencialmente con la cadena  $\zeta$  del TCR.

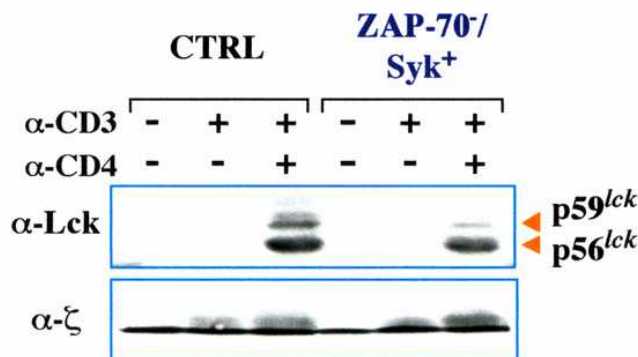
En conjunto todos estos resultados demuestran que en las líneas celulares Jurkat y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, expresando ZAP-70 y Syk en condiciones donde la cadena  $\zeta$  del TCR es completamente fosforilada, ZAP-70 es mejor reclutada que Syk y es esta quinasa la que presenta una mayor cantidad de forma fosforilada unida a  $\zeta$ .

### **El reclutamiento de la quinasa Lck sobre la cadena $\zeta$ del TCR es modulado de manera diferente por ZAP-70 y por Syk**

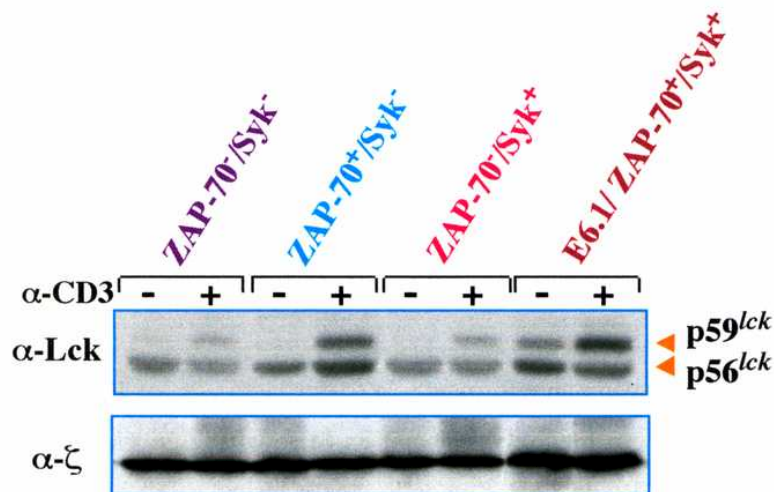
Como ha sido mencionado anteriormente, la fosforilación de los ITAMs presentes en las cadenas del TCR es un evento precoz y esencial en la señalización vía este receptor. Como venimos de ver, las capacidades de ZAP-70 y de Syk para sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR y para asociarse a la misma no son las mismas. Pero dado que ni ZAP-70 ni Syk han sido descritas como quinasas capaces de fosforilar  $\zeta$ , como es que estas dos proteínas modulan de manera diferente la fosforilación de esta cadena?

Una vez que el TCR ha sido estimulado, una de las primeras quinasas que entran en acción es la Lck (ver Introducción General, capítulo II, ítem III). Esta proteína es responsable de la fosforilación de los ITAMs, una vez que la célula T ha sido activada. La fosforilación de los mismos se lleva a cabo a través de una interacción mediada por las Syk quinasas, entre la Lck y la cadena  $\zeta$  del TCR. Para estudiar si esta interacción ocurre de manera diferente en presencia de ZAP-70 o de Syk, células T primarias control y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, y las líneas celulares T

**Figura 12-A** Nivel de asociación de la Lck con la cadena  $\zeta$  en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>.



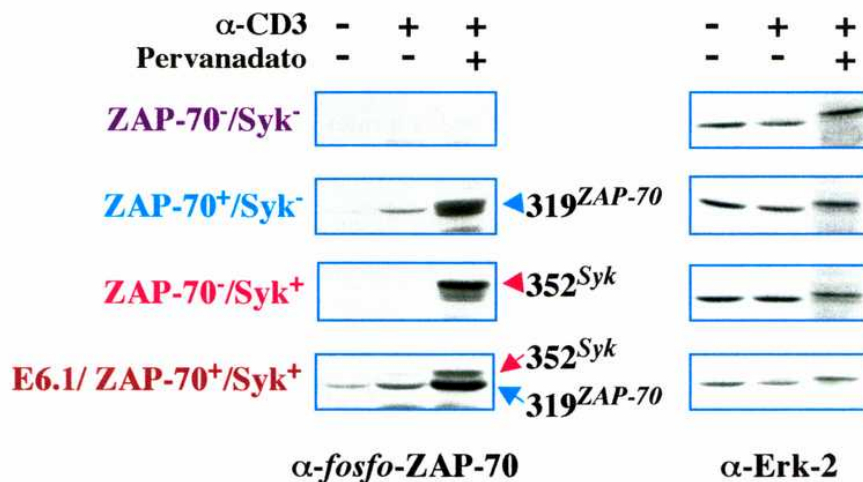
**Figura 12-B** Nivel de asociación de la Lck con la cadena  $\zeta$  en las líneas celulares T.



**Figura 12-** Nivel de asociación de la Lck con la cadena  $\zeta$  del TCR en presencia de ZAP-70 o de Syk. **A-** Los niveles de Lck co-inmunoprecipitados con  $\zeta$  fueron monitoreados en las células T primarias humanas control (CTRL) y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>. La cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de  $1 \times 10^7$  células sin estimular, estimuladas con un mAb  $\alpha$ -CD3 o co-estimuladas con los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD4. **B-** En el caso de las líneas celulares T donde ZAP-70 o Syk fueron introducidas,  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de  $1 \times 10^7$  células sin estimular o activadas con un mAb  $\alpha$ -CD3. Tanto en las células T primarias (12-A) como en las líneas celulares T transformadas (12-B), los inmunoprecipitados obtenidos fueron resueltos en 10% SDS-PAGE, transferidos sobre nitrocelulosa y sometidos a *western-blot* con un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -Lck, capaz de reconocer las formas p56 y p59 de la quinasa. Las flechas indican la posición de estas dos formas de Lck. La cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada en cada condición fue monitoreada con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ .

transformadas expresando niveles equivalentes de ZAP-70 y/o Syk, fueron estimuladas vía el TCR o para el caso de las células primarias, co-estimuladas vía el co-receptor CD4. Luego, la cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada y el nivel de Lck asociado a la misma fue evaluado por “western blot” utilizando un anticuerpo capaz de reconocer las formas p56lck y p59lck. Los resultados presentados en la figura 12-A muestran que en las células T primarias estimuladas vía el TCR, el nivel de Lck asociado a  $\zeta$  estuvo por debajo de los límites de detección del anticuerpo y solo fue visible con largos tiempos de exposición (datos no presentados). Sin embargo, cuando las células fueron co-estimuladas vía el CD4, un fuerte aumento en la cantidad de Lck recrutada pudo ser observado. Bajo estas condiciones de activación, Lck fue detectada en las dos poblaciones de células T primarias, control y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>. Sorpresivamente en estas últimas células, el nivel de Lck recrutado sobre  $\zeta$  fue significativamente más bajo que el observado en las células control (figura 12-A). A diferencia de las células T primarias, en las líneas celulares T transformadas, la estimulación vía el TCR fue suficiente para inducir el reclutamiento de la Lck sobre  $\zeta$ . Además, en estas líneas la forma p56lck, y en el caso de la línea E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> también la p59lck, pudieron ser detectadas aún en condiciones donde las células no fueron estimuladas (figura 12-B). Estas diferencias entre células T primarias y líneas celulares T transformadas están dadas presumiblemente por el diferente estado de activación que poseen unas y otras, especialmente en el momento en que fue realizado el experimento. Dejando de lado estas diferencias, los resultados obtenidos con las líneas celulares transformadas confirman las observaciones hechas en las células T primarias. La estimulación del TCR en las células transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, provocó un pequeño aumento en la cantidad de Lck recrutada sobre  $\zeta$ , principalmente de la forma p59lck y muy similar al observado en la línea ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>. En cambio, en las células T transformadas ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, la activación de las mismas vía este receptor indujo un fuerte incremento en la asociación de las dos formas p56lck y p59lck con la cadena  $\zeta$  (Figura 12-B). Esto demuestra que en las líneas celulares expresando ZAP-70, el nivel de reclutamiento de la Lck sobre  $\zeta$  es significativamente superior al observado en las líneas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>. Estas diferencias no son consecuencia de variaciones en el nivel de expresión de Lck, ya que las diferentes líneas celulares ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> expresaron todas niveles equivalentes de esta proteína (datos no presentados).

**Figura 13** Nivel de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk en los extractos celulares totales obtenidos de las líneas celulares T expresando ambas quinasas



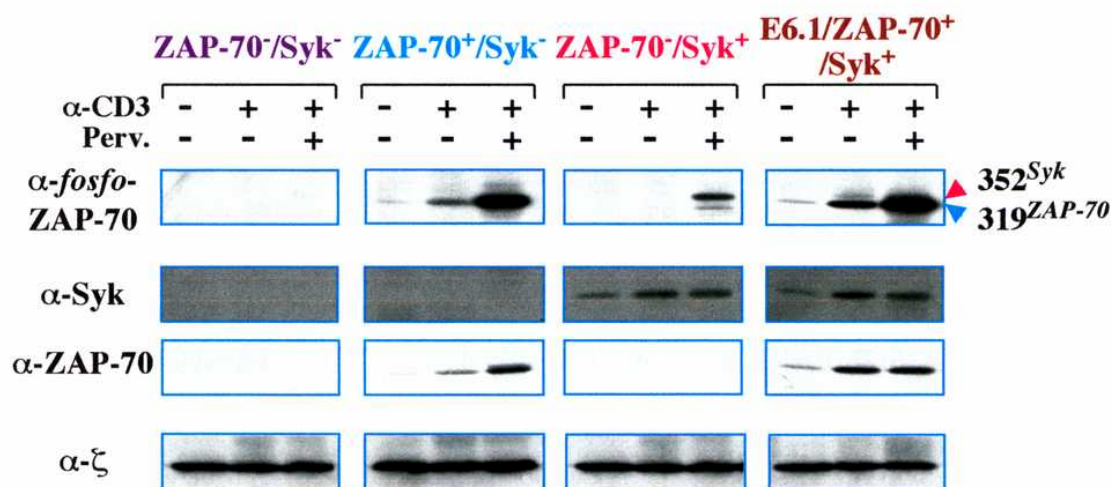
**Figura 13-** Diferente nivel de fosforilación de las tirosinas homólogas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk en las líneas celulares T. Los niveles de fosforilación de la Y319 de ZAP-70 y de la Y 352 de Syk fueron evaluados a partir de extractos celulares totales. Los lisados celulares obtenidos a partir de  $1 \times 10^6$  células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, sin estimular, estimuladas con un  $\alpha$ -CD3 o activadas con pervanadato, fueron resueltos por gel y transferidos sobre nitrocelulosa. La membrana fue luego hibridada con un anticuerpo  $\alpha$ -fosfo-ZAP-70 capaz de reconocer las tirosinas fosforiladas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk. La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue estimada utilizando un mAb  $\alpha$ -Erk-2.

Conjuntamente, estos resultados demuestran de manera sorprendente que ZAP-70 y Syk modulan de manera diferente la capacidad de la Lck para interactuar con los ITAMs de la cadena  $\zeta$  del TCR.

**El reclutamiento de la Lck sobre la cadena  $\zeta$  del TCR en la líneas celulares T está relacionado con el estado de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk.**

La tirosina 319 de ZAP-70 y su correspondiente 352 de Syk, localizadas en el interdominio B de estas quinasas, regulan positivamente la activación de la célula T. La función más importante de estas tirosinas es la de interactuar con las Src quinasas. En efecto, la tirosina 319 de ZAP-70 es capaz de unirse al dominio SH2 de la Lck favoreciendo el reclutamiento de esta última al complejo ZAP-70/TCR/  $\zeta$ . De esta manera, una mayor concentración de Lck asociada a este complejo hace posible la fosforilación completa de los ITAMs como así también la unión al TCR y fosforilación de nuevas moléculas de ZAP-70 (ver Introducción General, capítulo II, ítem III.3.4.). Teniendo en cuenta que en las líneas celulares transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> el reclutamiento de la Lck sobre  $\zeta$  es modulado de manera diferente por ZAP-70 y por Syk, el estado de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk fue evaluado por “western blot”. Los experimentos fueron realizados utilizando un anticuerpo comercial  $\alpha$ -fosfo-ZAP-70 específico para la Y319 fosforilada, pero capaz de reconocer la Y352 fosforilada de Syk. El nivel de fosforilación de la Y319 y de la Y352 fue monitoreado a partir de extractos celulares totales obtenidos de células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, sin estimular, activadas vía el TCR o con pervanadato. Como se esperaba, en la línea ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> no se detectó ninguna señal correspondiente a ZAP-70 o a Syk (Figura 13). En las células ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> activadas por el TCR o con pervanadato, ZAP-70 fue intensamente fosforilada sobre la Y319 (Figura 13). Nótese que aún en ausencia de estimulación esta tirosina fue fosforilada, sobre todo en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>. El nivel de fosforilación de la Y319 en estas células fue ligeramente superior al observado en las células ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y dicha diferencia se debió a una expresión algo más importante de ZAP-70 en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> (datos no presentados). En marcado contraste y de manera sorprendente, en las células transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> solo la estimulación con pervanadato indujo la fosforilación de la Y352 de Syk. Sin estimulación o bajo activación del TCR, el nivel de fosfo-Syk-352 detectado fue extremadamente bajo y solamente la

**Figura 14** Nivel de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk en asociación con la cadena  $\zeta$  en las líneas celulares T.



**Figura 14-** Diferente nivel de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk en las proteínas recrutadas sobre el TCR. Para determinar el nivel de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk en las proteínas asociadas al TCR, se realizó la inmunoprecipitación de la cadena  $\zeta$  a partir de  $1 \times 10^7$  células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, sin estimular, estimuladas con un  $\alpha$ -CD3 o activadas con pervanadato (Perv.). El estado de fosforilación de la Y319 y de la Y352 fue monitoreado por *western-blot* con un anticuerpo  $\alpha$ -fosfo-ZAP-70. Los niveles de ZAP-70 y de Syk asociadas a  $\zeta$  fueron determinados rehibridando la membrana con los anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -Syk. Por último, la cantidad de  $\zeta$  inmunoprecipitada en cada condición fue monitoreada con un mAb  $\alpha$ - $\zeta$ .

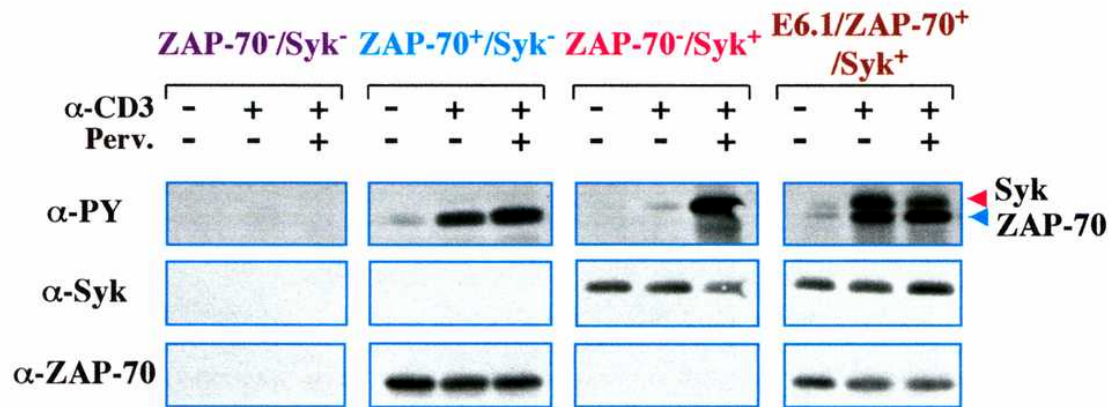
proteína fosforilada pudo ser visualizada cuando los “films” fueron revelados con largas exposiciones (Figura 13 y datos no presentados). Finalmente, en la línea E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, Syk fosforilada sobre la Y352 pudo ser detectada luego de la estimulación del TCR y bajo activación con pervanadato, aunque en el primer caso de manera muy débil. En ambas situaciones de estimulación, el nivel de fosforilación que presentó la Y352 de Syk fue más bajo que el observado para la Y319 de ZAP-70. Es interesante destacar que en estas células, el nivel de fosfo-Syk-352 inducido por la estimulación del TCR fue superior al que presentó la proteína en la línea ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>. Esta observación no tuvo relación con la cantidad de Syk presente en las células ya que los niveles de proteína en cada una de ellas fueron equivalentes (datos no presentados).

El bajo nivel de fosforilación de la Y352 de Syk también pudo ser observado en las células T deficientes en ZAP-70. En efecto, el nivel de fosforilación de la Y352 en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> fue marcadamente inferior al de la Y319 de ZAP-70 en las células T primarias control, independientemente de la manera en que las células fueron estimuladas (datos no presentados).

Para determinar si de la misma manera que en los extractos celulares totales, las diferencias en el nivel de fosforilación de las tirosinas 319 de ZAP-70 y 352 de Syk podían ser detectadas sobre las proteínas asociadas al TCR, la cadena  $\zeta$  fue inmunoprecipitada a partir de las diferentes líneas celulares tratadas como en el experimento precedente y el nivel de fosforilación fue monitoreado por “western blot”. Los resultados de la inmunoprecipitación presentados en la figura 14 muestran de manera similar a los lisados totales que en las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> solo la estimulación con pervanadato indujo una buena fosforilación de la Y352 de Syk. El nivel de fosfo-Syk-352 en las células sin estimular o estimuladas vía el TCR, fue prácticamente indetectable por el anticuerpo. Contrariamente, en las células transformadas expresando ZAP-70, la Y319 fosforilada de esta proteína fue bien detectada en todas las condiciones, y su nivel de fosforilación aumentó con las estimulaciones (Figura 14). Nuevamente, en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR, el nivel de fosforilación de la Y352 de Syk asociada a  $\zeta$  fue mayor al observado en las células ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 14).

Estos resultados demuestran que en las células expresando ZAP-70, el nivel de fosforilación de la tirosina 319 de ZAP-70 es significativamente mayor que el que presenta Syk sobre la tirosina homóloga 352 en las células donde esta última es expresada. Además, estas mismas diferencias también fueron observadas sobre el nivel de fosforilación de estas tirosinas en

**Figura 15** ZAP-70 modula positivamente el estado de fosforilación sobre tirosina de Syk en las células T transformadas expresando ambas quinasas.



**Figura 15-** Inmunoprecipitación de ZAP-70 y de Syk y determinación del nivel de fosforilación sobre tirosina de ambas proteínas. Las quinasas ZAP-70 y Syk fueron inmunoprecipitadas con una mezcla de anticuerpos α-ZAP-70 y α-Syk, a partir de extractos celulares obtenidos de  $1 \times 10^7$  células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup>, ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, sin estimular, estimuladas con un α-CD3 o activadas con pervanadato. Los productos de las inmunoprecipitaciones fueron resueltos por gel y transferidos sobre nitrocelulosa. El estado de fosforilación de ZAP-70 y de Syk fue evaluado por *western-blot* con un anticuerpo α-fosfotirosina (α-PY). La cantidad de ZAP-70 y de Syk inmunoprecipitadas fue monitoreada rehibridando la membrana con los anticuerpos α-ZAP-70 o α-Syk. Las flechas en el panel superior indican las posiciones de Syk y de ZAP-70 fosforiladas sobre tirosina.

las proteínas asociadas a  $\zeta$ , correlacionando perfectamente con el grado de reclutamiento de la Lck sobre esta cadena del TCR.

### **ZAP-70 modula positivamente la fosforilación de Syk en las líneas celulares T estimuladas vía el TCR**

Entre los resultados que venimos de ver, una observación muy llamativa fue la presencia de Syk fosforilada sobre la Y352 en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR. Mientras que los niveles de fosfo-Syk-352 detectados en los extractos totales de la línea ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> fueron extremadamente bajos, en los de las células expresando ZAP-70 y Syk la fosforilación de la Y352 fue considerablemente superior. Estas diferencias también fueron detectadas en los experimentos de co-inmunoprecipitación, cuando el nivel de fosforilación de la Y352 de Syk asociada a la cadena  $\zeta$  fue monitoreado. Estas observaciones sugieren que la fosforilación de Syk y especialmente la de su tirosina 352, son dependientes del estado de fosforilación de  $\zeta$  y por lo tanto ZAP-70 modularía indirecta y positivamente la fosforilación de su proteína homóloga. Para confirmar esto, Syk y también ZAP-70 fueron inmunoprecipitadas a partir de las diferentes líneas celulares sin estimular, activadas vía el TCR o con pervanadato, y el estado global de fosforilación sobre tirosina de ambas proteínas fue evaluado por “western blot”. Como se esperaba, ZAP-70 inmunoprecipitada fue fosforilada sobre tirosina con niveles de fosforilación que aumentaron luego de la estimulación del TCR y que llegaron a ser máximos con la activación con pervanadato (Figura 15). La inmunoprecipitación con el anticuerpo  $\alpha$ -Syk resultó en la precipitación de cantidades importantes de Syk, equivalentes en las dos líneas celulares ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 15). Cuando el nivel de fosforilación de Syk fue evaluado en las células T transformadas ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR, la proteína fosforilada fue debilmente detectada. En cambio, coincidiendo con las observaciones efectuadas anteriormente, la estimulación del TCR en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> indujo una fuerte fosforilación de Syk, esta vez mucho más evidente gracias a que la proteína fue inmunoprecipitada (Figura 15). Nuevamente, estas observaciones demuestran que la fosforilación de Syk inducida por la estimulación del TCR ocurre de manera más eficaz cuando ZAP-70 se encuentra presente en la misma célula. La estimulación con pervanadato indujo la fosforilación de las dos quinasas en las distintas células, sin embargo, ZAP-70 y Syk fueron más intensamente fosforiladas cuando fueron expresadas individualmente que en las E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 15). Esto fue observado solo cuando las células fueron estimuladas con pervanadato, la

estimulación de las mismas vía el TCR no provocó tal efecto. Este fenómeno puede explicarse por el hecho que cuando Syk y ZAP-70 se encuentran juntas en una célula, las mismas son capaces de competir entre sí por la maquinaria de fosforilación común entre ambas, y en consecuencia el nivel de fosforilación de cada una de ellas es inferior al que las mismas presentan cuando son expresadas de forma individual. Esto es válido para el caso de la estimulación TCR-independiente producida por el pervanadato, pero en el caso de la activación vía el TCR, ZAP-70 y Syk participan de manera diferencial en la señalización y los requerimientos de una no son necesariamente los mismos que los de la otra.

En conjunto, estos resultados demuestran que la fosforilación de Syk inducida por la estimulación del TCR es modulada positivamente por ZAP-70. Esta modulación es TCR dependiente y la misma no tiene lugar cuando la activación celular se realiza con pervanadato. El efecto modulador de ZAP-70 sobre Syk afecta la fosforilación de su tirosina 352, la cual es primordial para la interacción de esta quinasa con la Lck. Finalmente, como ZAP-70 no ha sido descrita como capaz de transfosforilar Syk, el efecto modulador de la misma sobre Syk debe producirse de manera indirecta y muy probablemente esté relacionado con la Lck y con el estado de fosforilación de la cadena  $\zeta$ .

## B- Discusión

La mayor parte de los estudios comparativos de ZAP-70 y Syk han sido realizados ya sea en timocitos murinos o bien en células T humanas transformadas, capaces de proliferar indeterminadamente. La dificultad del cultivo *in vitro* de las células T primarias humanas hizo que los estudios de señalización del TCR en este tipo de células sean raros. Las colaboraciones realizadas con el Dr. Yssel y la utilización de un medio especial para el cultivo de células T primarias humanas creado por él mismo [379] nos permitió cultivar *in vitro* dichas células. De este modo obtuvimos cultivos de células T primarias humanas deficientes en ZAP-70 expresando Syk y de células T control que fueron utilizados para el estudio comparativo de ZAP-70 y de Syk (este manuscrito y [275]).

Los intentos realizados por otros grupos para obtener líneas celulares T expresando de manera estable la proteína Syk fracasaron porque la proteína presentaba cierta toxicidad [265]. En esos experimentos, los autores habían decidido utilizar la transfección como estrategia para introducir el gen Syk dentro de la línea celular T transformada P116 (ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>). Esta estrategia les permitió expresar la quinasa en cantidades importantes pero nunca de manera

estable [265]. En el trabajo que presentamos aquí hemos sido capaces de generar diferentes líneas celulares T transformadas, y entre ellas una expresando Syk de manera estable. La estrategia utilizada para el establecimiento de esta línea fue completamente diferente a la utilizada por Williams y colaboradores. Aquí, la proteína Syk fue introducida en las células P116 utilizando la técnica de transferencia de genes mediada por un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina (MLV), portando el ADNc del gen Syk. Este vector presenta la ventaja de integrarse en la célula transducida en un número de copias relativamente bajo (en general inferior a 5) y de tener un promotor que permite la expresión estable de niveles moderados de Syk. En efecto, las células transducidas con dicho vector expresaron niveles de Syk ligeramente más elevados a los del clon celular T Jurkat ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>. Esto es de suma importancia para evitar efectos tóxicos causados por la sobre-expresión de la proteína. En efecto, Williams y colaboradores concluyeron que la expresión de Syk obtenida mediante la utilización de la técnica de transfección, la cual fue varias veces superior a las de las células Jurkat ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, fue la causa de la citotoxicidad en las células transfectadas [265]. En completo acuerdo con estos autores, aquí demostramos que las células P116 no toleran niveles de expresión de Syk excesivamente altos. Mientras que en los trabajos de Williams, los autores especulan que los efectos citotóxicos producidos pudieron deberse a una mayor susceptibilidad a la apoptosis mediada por Fas, en nuestro trabajo las células expresando cantidades importantes de la proteína (P116Syk<sup>H</sup>) disminuyeron sustancialmente el nivel de expresión del TCR. Un estudio más detallado al respecto sería necesario para comprender cuales son los mecanismos capaces de modificar la expresión de este receptor en presencia de fuertes cantidades de Syk.

Un gran número de evidencias sobre las diferencias funcionales existentes entre ZAP-70 y Syk en las células T humanas han sido obtenidas mediante estudios comparativos entre estas dos quinasas realizados en líneas celulares T. Las células T transformadas se establecieron a partir de linfocitos T leucémicos humanos y diversas variantes fueron también seleccionadas por mutagénesis. La mayoría de estos estudios fueron hechos en contextos celulares donde ZAP-70 y Syk fueron expresadas conjuntamente. En este trabajo presentamos por primera vez un estudio comparativo del rol de ZAP-70 y Syk en los eventos tempranos de señalización vía el TCR, realizado en células T primarias humanas sin transformar y en líneas celulares T expresando ZAP-70 o Syk de forma individual y de manera estable. Utilizando estos dos modelos de células T pudimos demostrar que ZAP-70 y Syk difieren significativamente en sus capacidades para

sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR. En las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y en la línea celular T ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, la cadena  $\zeta$  de este receptor fue fosforilada de manera defectuosa antes y después de la estimulación del TCR (Figuras 3-A y 9-A). La introducción de ZAP-70 en las células T primarias o su expresión ectópica en la línea celular P116 ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>-</sup> fue suficiente para revertir los defectos y recobrar la fosforilación normal de  $\zeta$  con sus dos formas p21 y p23 (Figuras 4 y 9-A). Estos resultados demuestran claramente que la fosforilación de  $\zeta$  es modulada positivamente por alguna función aportada por ZAP-70 la cual no puede ser sustituida por la acción de su quinasa homóloga Syk.

El defecto de fosforilación de  $\zeta$  en ausencia de ZAP-70 también ha sido observado por otros autores. Coincidiendo con nuestros resultados Williams y colaboradores demostraron que en las células P116 la fosforilación de  $\zeta$  no aumentó con la estimulación del TCR, y que este defecto fue completamente revertido solo cuando ZAP-70 fue expresada [265]. En un estudio realizado en una línea de timocitos deficientes en ZAP-70 expresando Syk, Gelfand y colaboradores mostraron que en esas células  $\zeta$  no era fosforilada correctamente [272]. Las observaciones hechas por la Dra. Taylor con células T CD4<sup>+</sup> deficientes en ZAP-70 transformadas con HTLV-I y los resultados obtenidos en el laboratorio por la Dra. Noraz con células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> también mostraron que en ausencia de ZAP-70 la fosforilación de  $\zeta$  fue defectuosa. [275, 384]

Ciertos autores han propuesto que la unión de ZAP-70 a los ITAMs fosforilados de  $\zeta$  protege a estos motivos de la acción de ciertas fosfatasas, y así, en ausencia ZAP-70 los mismos quedan expuestos pudiendo ser defosforilados [233]. Dado que estos defectos no pueden ser revertidos por Syk, es probable que esta quinasa no posea las mismas capacidades que ZAP-70 para proteger a los ITAMs de la defosforilación. Williams propuso que Syk podría fallar en proteger  $\zeta$  porque la proteína una vez activada se disocia rápidamente del complejo TCR dejando las cadenas expuestas [265]. Sin embargo, la interacción entre ZAP-70 y la cadena  $\zeta$  también es un proceso sumamente dinámico, con disociaciones y reasociaciones extremadamente rápidas [385]. Además, en una publicación reciente se demostró que luego de la estimulación del TCR, ZAP-70 es capaz de moverse velozmente dentro y fuera de "clusters" formados por los receptores estimulados, indicando que esta proteína no se une de manera irreversible al TCR [175].

Una alternativa más probable para explicar un posible efecto de fosfatasas es que la

capacidad de Syk para interactuar con los ITAMs de la cadena  $\zeta$  difiera de la que presenta ZAP-70. Diversas publicaciones realizadas por distintos grupos han sugerido que ZAP-70 y Syk son capaces de unirse a los ITAMs con afinidades similares [106, 110, 114]. Sin embargo, todas estas observaciones fueron obtenidas de experimentos *in vitro* y por lo tanto no tuvieron en cuenta factores intracelulares que hubieran podido modular positiva o negativamente las afinidades de ambas proteínas. Latour y colaboradores demostraron que la afinidad de Syk por los ITAMs fosforilados fue mayor que la de ZAP-70 [266]. En ese trabajo los autores evaluaron las capacidades de ZAP-70 y Syk para asociarse *in vitro* con péptidos correspondientes a los ITAMs de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de alta afinidad a la inmunoglobulina E (Fc $\epsilon$ RI). Por lo tanto, la afinidad que cada una de estas quinasas pueda tener por los ITAMs de  $\beta$  o  $\gamma$  no es necesariamente la misma que la que tienen por los de la cadena  $\zeta$  del TCR.

En este trabajo nosotros evaluamos el nivel de reclutamiento de ZAP-70 y Syk sobre la cadena  $\zeta$  del TCR utilizando diferentes estrategias y en un contexto celular. La estimación precisa de las cantidades relativas de ZAP-70 y de Syk recrutadas sobre el TCR fue difícil de realizar debido a que no existen anticuerpos capaces de reconocer estas dos quinasas con la misma afinidad. El agregado de una "etiqueta" en los extremos de N o C-terminal de ambas proteínas permitiría que las dos sean detectadas con un mismo anticuerpo dirigido contra dicha etiqueta, sin embargo el agregado de este tipo de secuencias en los extremos de Syk interfiere con la actividad quinasa de la proteína [266]. Nosotros contornamos estos inconvenientes utilizando ZAP-70 y Syk recombinantes para así determinar las afinidades relativas de los anticuerpos  $\alpha$ -Syk y  $\alpha$ -ZAP-70. De este modo estimamos que el  $\alpha$ -Syk que utilizamos posee una afinidad por Syk 6,5 veces superior de la que tiene el  $\alpha$ -ZAP-70 por ZAP-70. Teniendo en cuenta las afinidades de los anticuerpos, demostramos que ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades para asociarse con la cadena  $\zeta$ . El nivel de ZAP-70 recrutada sobre el TCR en las células T primarias control fue mayor al observado para Syk en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figura 5). Además, los resultados obtenidos en las líneas celulares T ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> expresando niveles equivalentes de ambas proteínas, demostraron igualmente que ZAP-70 es capaz de asociarse a los ITAMs fosforilados en cantidades al menos 5 veces superiores a las de Syk (Figura 9-B). En la línea E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, donde la cadena  $\zeta$  del TCR es fosforilada correctamente, el nivel de Syk recrutada sobre  $\zeta$  también fue inferior a la de ZAP-70 (figura 11-B). Por último, los experimentos realizados en la línea celular T Jurkat ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> demostraron que luego de la

activación de las células, la proporción de ZAP-70 que se asocia a  $\zeta$  es mayor a la de Syk (Figura 10-B).

Estos descubrimientos avalan la posibilidad de que una actividad fosfatasa sea la causa de la defosforilación de  $\zeta$  en ausencia de ZAP-70. El hecho que Syk sea menos eficaz que ZAP-70 para unirse a los ITAMs fosforilados podría provocar que muchos de estos motivos no sean protegidos, quedando más expuestos y accesibles para que alguna fosfatasa intervenga y los defosforile. Sin embargo, algunos experimentos preliminares realizados en el laboratorio sugieren que el bajo nivel de fosforilación de  $\zeta$  en ausencia de ZAP-70 no es solo consecuencia de una actividad fosfatasa. En efecto, cuando las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y las células T primarias control expresando solo ZAP-70 fueron activadas vía el TCR luego de que las mismas hayan sido preincubadas en presencia del inhibidor de fosfatasas ortovanadato, el nivel de fosforilación de  $\zeta$  en las células ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> continuó siendo inferior al observado en las células control (Noraz N, datos no publicados).

En este trabajo nosotros demostramos que en la línea celular T ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimulada vía el TCR y en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> co-estimuladas vía el CD4, el nivel de fosforilación de Syk asociada a  $\zeta$  fue extremadamente bajo y significativamente inferior al observado para ZAP-70. Este mismo tipo de resultado también fue observado cuando se comparó el estado de fosforilación de la tirosina 319 de ZAP-70 con el de la tirosina homóloga 352 de Syk (Figura 14). Dado que estas tirosinas son capaces de interactuar con el dominio SH2 de la Lck favoreciendo el reclutamiento de esta última al complejo TCR/CD3/ $\zeta$  [119, 150], es posible que en ausencia de ZAP-70, un defecto en la fosforilación de Syk, especialmente sobre su tirosina 352 provoque un bajo nivel de reclutamiento de la Lck lo cual podría explicar el defecto de fosforilación de la cadena  $\zeta$ . Esta posibilidad es avalada por nuestro descubrimiento que en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> co-estimuladas vía el CD4, y en la línea celular ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> estimuladas vía el TCR, el nivel de Lck reclutada sobre  $\zeta$  fue significativamente más bajo que el observado en las células expresando ZAP-70 (Figuras 12-A y 12-B).

Un número importante de trabajos han demostrado que la asociación de Syk con los ITAMs fosforilados es suficiente para su activación, independientemente de la intervención de la Lck [121, 122, 125]. ZAP-70 en cambio, requiere de la participación de la Lck para volverse activa [109, 118, 120, 132, 386]. Además, Syk pero no ZAP-70, es capaz de revertir los defectos de señalización en líneas celulares Jurkat deficientes en Lck o CD45 [123]. Latour y colaboradores

demostraron que como las Src quinasas, Syk es capaz de fosforilar los ITAMs de la cadena  $\zeta$  del TCR en un hibridoma celular T murino  $CD4^- / CD8^-$  con un TCR específico para un solo tipo de antígeno [126]. Todos estos descubrimientos le atribuyen a Syk una capacidad superior a la de ZAP-70 para activarse y funcionar en las células T, lo cual contradice nuestras observaciones presentadas en este trabajo. Sin embargo, vale la pena destacar diferentes puntos. Por un lado, los ITAMs de la cadena  $\zeta$  son un pobre sustrato de Syk *in vitro* [27], además, en nuestro sistema, una cantidad más importante de Syk ectopicamente expresada en las células E6.1/ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> no produjo aumento alguno en el estado de fosforilación de  $\zeta$ , comparado con las células T Jurkat ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup> (Figuras 10-A y 11-B). Por último, la mayoría de los trabajos presentados arriba, provienen de experimentos realizados en diferentes clones de la línea celular T Jurkat expresando conjuntamente ZAP-70 y Syk. De este modo, la presencia de ZAP-70 puede disimular los verdaderos requerimientos de activación de Syk en una célula T y su dependencia de la Lck. De hecho nosotros demostramos claramente que en las líneas celulares utilizadas en este trabajo, el estado de fosforilación de Syk es modulado positivamente por ZAP-70 (Figura 15). Esta modulación positiva de ZAP-70 sobre Syk también ha sido observada en células B que expresan ZAP-70, en un caso particular de leucemia linfocítica crónica (CLL) donde los genes para la región variable de las inmunoglobulinas no están mutados. En la mayoría de las células B, la estimulación del receptor de células B (BCR) conduce a la fosforilación sobre tirosina de Syk, pero en las células B ZAP-70<sup>+</sup> responsables de la CLL sin mutación para la región variable de las inmunoglobulinas, dicha fosforilación es cuatro veces superior a la que presenta Syk en otras células B leucémicas que no expresan ZAP-70 [387].

En repetidas oportunidades, los resultados que obtuvimos con las líneas celulares T generadas en el laboratorio no hicieron más que confirmar aquellos que habían sido observados en las células T primarias. Sin embargo, en los experimentos de inmunoprecipitación de Syk efectuados con las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y con la línea celular ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, el estado de fosforilación de esta quinasa fue muy diferente entre ambas. Las diferencias en la fosforilación global sobre tirosina de Syk entre las células primarias y la línea celular pueden estar dadas por distintas causas. En las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, Syk es expresada de manera endógena, en cambio, en la línea ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> esta proteína fue expresada ectopicamente. Una posibilidad es que la falta de fosforilación de Syk en esta línea celular sea la consecuencia de algún defecto intrínseco a la proteína ectópica. Sin embargo, cuando estas

células fueron estimuladas con pervanadato, Syk fue fuertemente fosforilada. Además, en línea E6.1ZAP-70<sup>+</sup>/Syk<sup>+</sup>, donde Syk fue expresada ectopicamente y de manera idéntica a la línea ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>, la quinasa también fue fosforilada, incluso bajo estimulación del TCR. Esto demuestra claramente que las diferencias entre el nivel de fosforilación de Syk en las células T primarias ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> y en la línea celular ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup> no fueron provocadas por algún defecto intrínseco a la proteína Syk expresada de forma ectópica, sino más bien por alguna característica particular asociada al fondo genético de las células. En efecto, esta otra posibilidad puede ser más apropiada ya que las diferencias entre una célula T primaria y una línea celular T son muchas. Una especialmente interesante entre las células T primarias y la línea celular T expresando Syk en ausencia de ZAP-70, es el nivel de expresión del co-receptor CD4. Mientras que en las células T primarias este co-receptor es fuertemente expresado, su nivel de expresión en la línea celular T es significativamente más bajo (datos no presentados). Una cantidad más importante de CD4 en las células primarias permitiría la mejor fosforilación de Syk vía la Lck. Dado que para su fosforilación Syk debe interactuar con los ITAMs fosforilados, también es altamente probable que las diferencias observadas entre el nivel de fosfo-Syk entre estos dos tipos de células estén asociadas a los defectos de fosforilación de  $\zeta$  que presentan unas y otras. Algunos resultados preliminares realizados en el laboratorio respaldan esta posibilidad ya que indicarían que en las células T primarias los defectos de fosforilación basal de  $\zeta$  son menores que los de la línea celular T (datos no presentados). Por último es importante remarcar que estas hipótesis aún no han sido confirmadas y para ello es necesario realizar experimentos y estudios adicionales que permitan comprender mejor las verdaderas causas de las diferencias en los niveles de fosforilación de Syk entre las células T primarias y la línea celular T expresando Syk pero no ZAP-70.

Los resultados presentados en este trabajo muestran claramente que ZAP-70 y Syk se comportan de manera diferente en los eventos precoces de señalización vía el TCR, especialmente en sus capacidades para sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$ . Estas diferencias podrían estar dadas por las distintas habilidades de ZAP-70 y de Syk para asociarse con los ITAMs del TCR y protegerlos de la defosforilación, y por sus diferentes capacidades para interactuar con la Lck. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los procesos que regulan la señalización vía el TCR son sumamente complejos, y numerosas señales activadoras e inhibitoras son finamente reguladas por distintas quinasas y fosfatasas, por lo tanto los diferentes estados de fosforilación de  $\zeta$  en presencia de ZAP-70 o de Syk pueden deberse a mecanismos

donde estas quinasas intervienen indirectamente. Los efectos inhibidores de las señales provenientes del TCR en general son producidos por la acción de fosfatasa que defosforilan moléculas activadoras o receptores celulares. Los defectos de fosforilación de  $\zeta$  observados en este trabajo puede que sean el producto de una señal inhibidora producida por una fosfatasa. Recientemente se demostró que en células T primarias, CTLA-4, un receptor de membrana perteneciente a la misma familia que el coreceptor CD28, es capaz de suprimir las señales precoces inducidas por la activación del TCR. Este efecto supresor se debe a una inhibición sobre la fosforilación de la tirosina 319 de ZAP-70, que según los autores es provocada por una actividad fosfatasa asociada a este receptor. Si bien estos autores no fueron capaces de identificar la fosfatasa en cuestión, ellos proponen como un posible candidato la SHP-1 (*Src homology protein 1 domain-containing tyrosine phosphatase 1*) [388]. SHP-1 al igual que SHP-2, son fosfatasas que poseen dominios SH-2 lo que les permite interactuar con otras moléculas con estos dominios como ZAP-70 y Syk. Una interacción diferencial entre ZAP-70 y/o Syk con alguna de estas dos fosfatasas podría explicar las diferencias observadas en nuestro trabajo entre las células expresando ZAP-70 o Syk. La más baja fosforilación sobre tirosina que presentó Syk en las células T primarias y en la línea celular expresando Syk en ausencia de ZAP-70 puede haber sido causada por una mayor cantidad de fosfatasa asociada con Syk. De hecho, SHP-1 es capaz de defosforilar a Syk de manera más eficiente que a ZAP-70 [389]. Sin embargo estas no son más que especulaciones ya que hasta el momento no disponemos de pruebas concretas sobre esta posibilidad. Para ello sería necesario realizar nuevos experimentos que permitan determinar cuales son las actividades fosfatasa asociadas a ZAP-70 y a Syk en las células T expresando una u otra quinasas. Aunque SHP-1 y SHP-2 son buenos candidatos para asociarse diferencialmente con ZAP-70 y con Syk no deben descartarse otras fosfatasas como por ejemplo PP2A, CD45 o CD148.

Todos los resultados presentados en esta parte del trabajo de Tesis confirman una vez más que pese a las homologías existentes entre ZAP-70 y Syk, estas dos quinasas funcionan de manera diferente. Mientras que el rol de ZAP-70 en los eventos tempranos de señalización vía el TCR ha sido bien estudiado y documentado, el de Syk lo ha sido mucho menos y en general se ha asumido que esta quinasas se comporta como su proteína homóloga. Nuestros descubrimientos demuestran por primera vez que este no es el caso y que estas dos quinasas intervienen de manera diferente en dichos eventos. En este trabajo presentamos evidencias claras de que ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades para asociarse con la cadena  $\zeta$  del TCR y probamos que ZAP-70 lo

hace de manera más eficaz que Syk. Además, nuestros resultados permiten afirmar que a diferencia de ZAP-70, Syk es ineficaz para sustentar la óptima fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR.

## ***Resultados Parte II***

## Resultados Parte II

---

### Estudios preclínicos de terapia génica para la inmunodeficiencia en ZAP-70

#### A-“Reconstitución de células T primarias humanas deficientes en ZAP-70”

##### Introducción

La proteína ZAP-70 desempeña un papel crucial en la activación y desarrollo de los linfocitos T. Los pacientes deficientes en esta proteína presentan una SCID caracterizada por la ausencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Aunque en estos pacientes el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en la sangre periférica es normal, los mismos son incapaces de responder a la estimulación mediada por el TCR [233, 269, 270]. La importancia de ZAP-70 en la señalización vía el TCR es debida a su capacidad para transmitir las señales originadas por la interacción del TCR con los antígenos, fosforilando diversos sustratos intracelulares. En efecto, las células CD4<sup>+</sup> de pacientes deficientes en ZAP-70 presentan una marcada disminución en la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR y de las proteínas MAPK, lo cual está asociado con un profundo defecto en la proliferación y la secreción de IL-2 inducidas por el TCR [275].

La deficiencia en ZAP-70 conduce a la muerte de los pacientes que la padecen durante el primer año de vida. Hasta el momento el único tratamiento para estos niños es el trasplante de médula ósea, pero la mayoría de los pacientes carecen de donantes histocompatibles y los trasplantes no histocompatibles están asociados con numerosas complicaciones inmunológicas. El desarrollo de estrategias alternativas como la terapia génica basada en la transferencia del gen “wild-type” de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> o de células progenitoras hematopoyéticas aisladas de pacientes, podría representar un beneficio para los pacientes que no tengan donantes histocompatibles. De este modo, la inyección de las células transducidas *ex vivo* permitiría reconstituir total o parcialmente el sistema inmunológico de los mismos.

Un requisito previo a la planificación de un ensayo clínico de terapia génica para la deficiencia en ZAP-70, es asegurarse que las funciones defectuosas de las células CD4<sup>+</sup> de los pacientes pueden ser restauradas por la introducción del gen sano de ZAP-70. Con el objetivo de estudiar la transferencia de genes en células T deficientes en ZAP-70, en el laboratorio se habían llevado a cabo algunos experimentos iniciales utilizando vectores retrovirales. Células T y líneas celulares T CD4<sup>+</sup> establecidas a partir de pacientes y de individuos sanos, fueron transformadas

con el virus HTLV-I [384]. Este virus permite immortalizar las células T, pero al mismo tiempo, su presencia puede alterar la expresión y función de ciertas quinasas y fosfatasa importantes en las vías de señalización. La immortalización de las células fue necesaria para poder realizar el cultivo de las mismas, de otra manera no hubiese sido posible ya que la activación vía el TCR en ausencia de ZAP-70 no es funcional, y sin este estímulo las células casi no proliferan. Aunque la introducción del gen "*wild-type*" de ZAP-70 en las células T pudo realizarse, la presencia de HTLV-I no aseguraba que los resultados obtenidos sean la consecuencia exclusiva de la introducción la proteína "*wild-type*". HTLV-I pudo haber modificado la actividad de ciertas proteínas implicadas en la señalización, interfiriendo en la interpretación de los resultados. Si bien la estrategia de immortalización de las células deficientes en ZAP-70 con HTLV-I simplifica enormemente el cultivo *in vitro* de las mismas, la realización de estudios bioquímicos en este tipo de células es mucho más limitada.

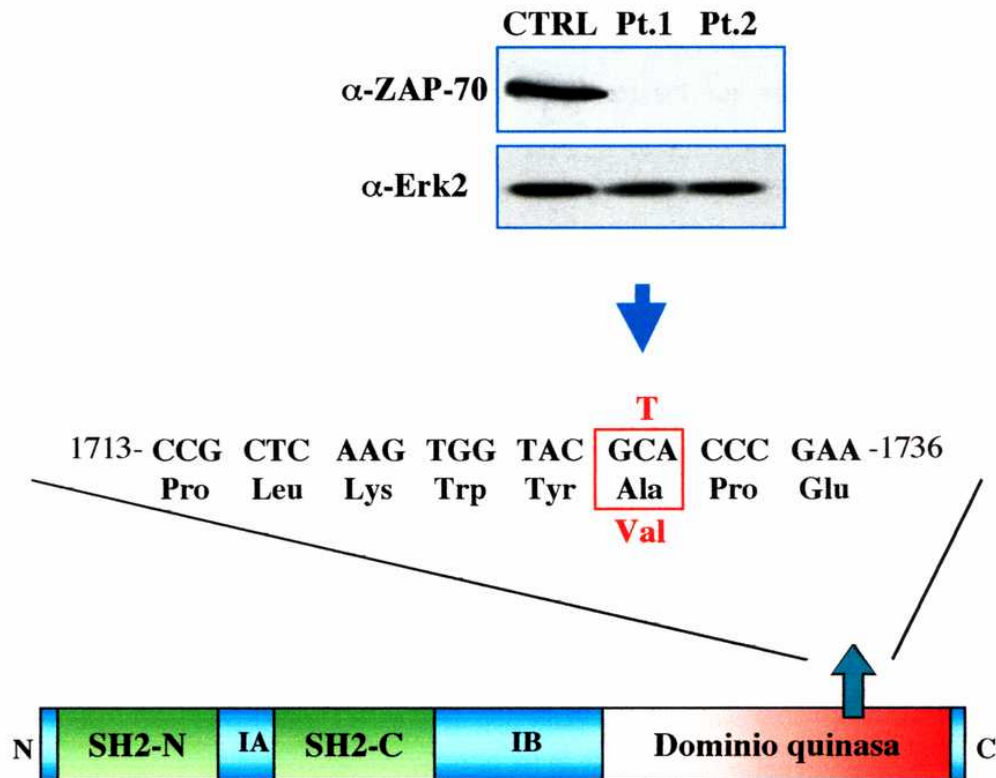
Recientemente, un sistema para crecer células T primarias humanas *in vitro* fue desarrollado por Hans Yssel y colaboradores [379]. Para trabajar en un sistema mas fisiológico que el de líneas celulares T transformadas con HTLV-I, el laboratorio utilizó dicho sistema de cultivo para la caracterización y el estudio de células T primarias humanas deficientes en ZAP-70 [275]. Estos trabajos fueron indispensables para el establecimiento y optimización de las condiciones de cultivo que fueron utilizadas durante la realización de esta Tesis. Basándonos en esas condiciones se pudo realizar la transferencia de genes en células T primarias humanas deficientes en ZAP-70 y estudiar si la expresión de la proteína ZAP-70 "*wild-type*" era suficiente para reconstituir el fenotipo defectuoso de las mismas.

## Resultados

### Caracterización y expansión *in vitro* de células T deficientes en ZAP-70

Dos hermanos hijos de una relación consanguínea, presentaban una historia clínica con numerosas infecciones y diarrea crónica. El análisis de las células T de la sangre periférica de ambos niños reveló un fenotipo consistente con una inmunodeficiencia en ZAP-70, es decir un número normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (59% y 63% en los dos niños, respectivamente), y una marcada ausencia de células T CD8<sup>+</sup> (3% y 6%, respectivamente) [275]. Las células CD8<sup>+</sup> de uno de los pacientes fueron estudiadas más en detalle y se constató que la mayoría de las mismas eran células NK (72%), en tanto que en los individuos normales el porcentaje de NK CD8<sup>+</sup> fue de 6-13%. De la misma manera que en otros pacientes deficientes en ZAP-70, los pacientes 1 (Pt.1) y 2 (Pt.2) presentaron un marcado defecto en la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> luego de la

**Figura 1** Mutación en el dominio quinasa de ZAP-70 en dos pacientes deficientes en dicha proteína.



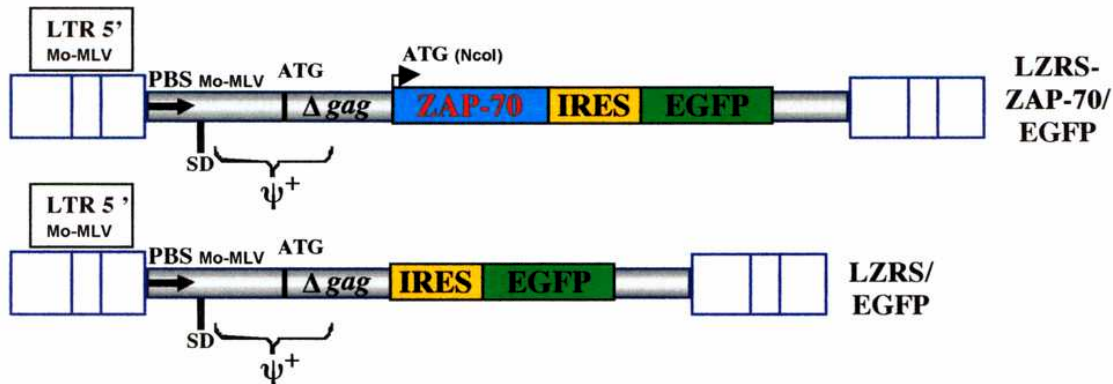
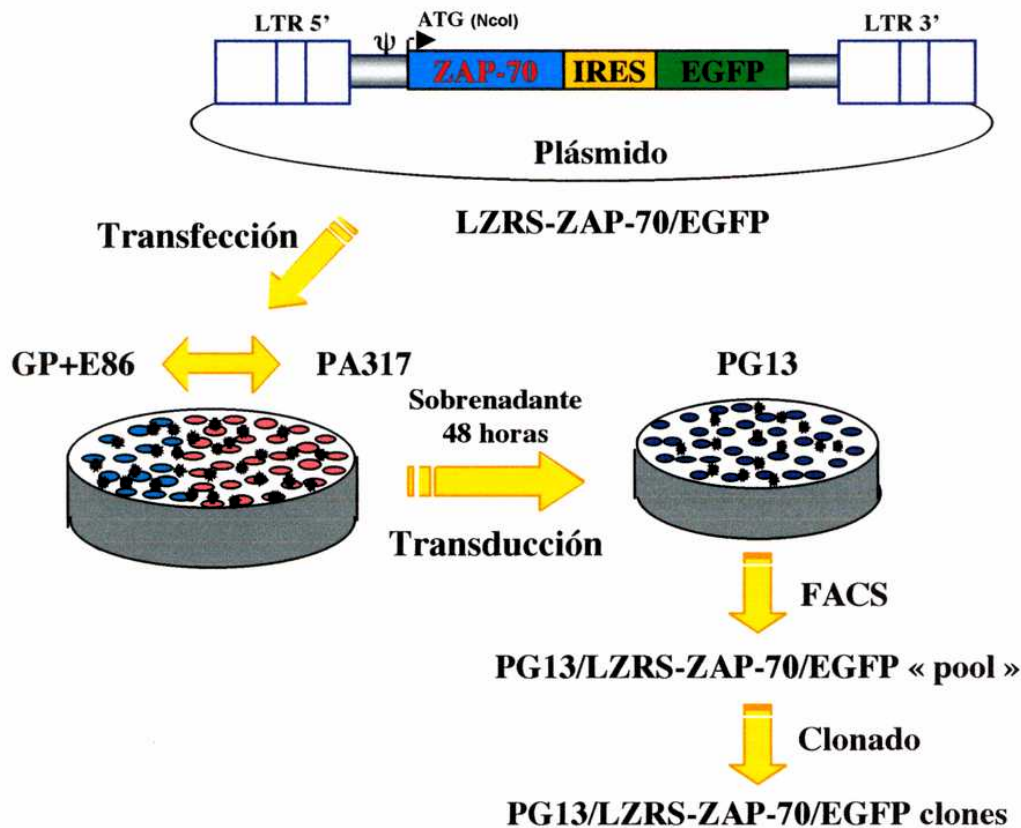
**Figura 1-** Identificación de dos pacientes con una deficiencia en ZAP-70 debida a una mutación puntual en el dominio quinasa de la proteína. Extractos celulares totales obtenidos de  $1 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> aisladas de dos pacientes hermanos (Pt.1 y Pt.2), y de un individuo sano (CTRL) fueron fraccionados en 10% SDS-PAGE y transferidos sobre nitrocelulosa. La membrana fue hibridada con un mAb  $\alpha$ -ZAP-70 para determinar el nivel de ZAP-70. La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue estimada utilizando un mAb  $\alpha$ -Erk-2. La secuencia presentada en la parte inferior de la figura corresponde a la secuencia del dominio quinasa de ZAP-70 donde fue detectada la mutación puntual responsable de la ausencia de la proteína en estos pacientes (Noraz N et al.,2000).

estimulación de las mismas vía el TCR (datos no presentados). Precedentemente, el laboratorio había establecido cuales eran las mutaciones responsables de la deficiencia en ZAP-70 en estos pacientes. En ambos se detectó una transición homocigota en la posición 1729 de un nucleótido C a T, resultando en una sustitución de alanina por valina en el amino ácido 507 del dominio quinasa de la proteína responsable de la ausencia completa de la misma en estos pacientes [275] (Figura 1).

El cultivo *in vitro* de las células T primarias deficientes en ZAP-70 nos permitió reunir un número considerable de las mismas para poder realizar los estudios de transferencia de genes utilizando vectores retrovirales. Los cultivos se efectuaron en medio IMDM suplementado con suero humano, y cada 15 días se adicionaron células alimentadoras (*feeder cells*) irradiadas, PHA e IL-2 exógena (ver materiales y métodos). Luego de la amplificación, la población celular resultante consistió en células T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> ZAP-70<sup>-/-</sup>, con un repertorio de TCRBV policlonal ([275] y datos no presentados).

#### **Las células T deficientes en ZAP-70 transducidas con un vector retroviral portando el gene "wild-type" de ZAP-70 presentan una ventaja selectiva de crecimiento**

El ADNc de ZAP-70 "wild-type" humana, llevando en su extremidad C-terminal una "etiqueta" VSV-G, fue clonado en el vector retroviral LZRS, el cual contiene la secuencia codificante de la EGFP "downstream" de una secuencia IRES (Figura 2-A). La EGFP es una proteína fluorescente, lo cual hace más fácil y rápida la identificación de las células transducidas. El vector resultante LZRS-ZAP-70/EGFP fue empaquetado en viriones retrovirales expresando la proteína de la envoltura GalV, ya que esta última permite obtener una alta transducción de células linfoides [326, 390]. Para producir los viriones conteniendo este vector decidimos utilizar la línea de empaquetaje anfotrópica PG13 conteniendo el gen *GalV*. Para generarla, se realizó la transfección de las líneas de empaquetaje ecotrópica GP+E86 y anfotrópica PA317 con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP. 48 horas después de realizada la misma, los sobrenadantes del cultivo de estas dos líneas conteniendo los viriones LZRS-ZAP-70/EGFP fueron utilizados para transducir las células PG13, las cuales pueden ser infectadas por partículas virales anfo y ecotrópicas. De este modo un número importante de células PG13 pueden ser transducidas y las mismas podrán producir nuevos viriones infectivos llevando la proteína de la envoltura GalV. Los procedimientos para la obtención de la línea PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP se detallan brevemente en la figura 2-B. En este trabajo se utilizó como control el vector LZRS/EGFP "vacío" llevando unicamente el gen reportero EGFP (Figura 2-A).

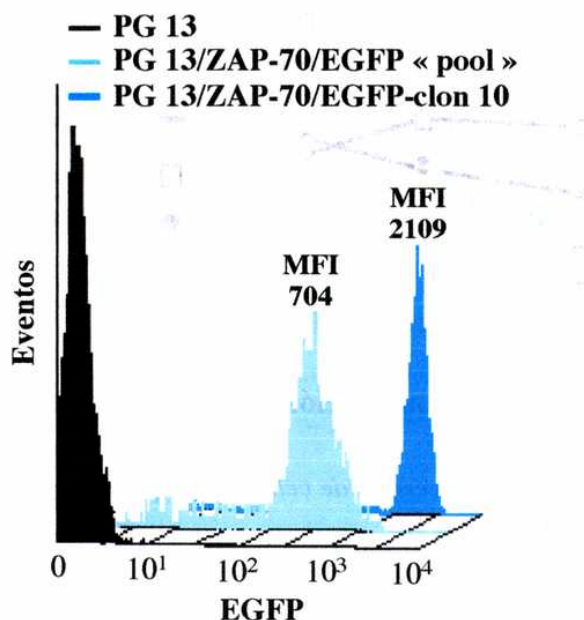
**Figura 2-A** Vectores retrovirales LZRS-ZAP-70/EGFP y LZRS/EGFP "vacío".**Figura 2-B** Obtención de la línea de empaquetaje PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP.

**Figura 2-** Generación de las líneas de empaquetaje PG13 productoras de partículas virales LZRS-ZAP-70/EGFP o LZRS/EGFP. **A-** Esquema de los vectores retrovirales LZRS-ZAP-70/EGFP y LZRS/EGFP. **B-** Representación del protocolo de obtención de la línea de empaquetaje PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP. Inicialmente, se realizó la transfección de las líneas de empaquetaje ecotrópica GP+E86 y anfotrópica PA317 con un plásmido llevando la secuencia del vector LZRS-ZAP-70/EGFP. 48 horas después, los sobrenadantes de cultivo de estas dos líneas, conteniendo los viriones LZRS-ZAP-70/EGFP, fueron utilizados para transducir la línea anfotrópica PG13. Las células PG13 transducidas (pool) capaces de producir nuevos viriones infectivos LZRS-ZAP-70/EGFP, fueron clonadas por dilución límite para seleccionar el mejor clon productor de partículas retrovirales. La obtención de los clones productores de las partículas retrovirales control LZRS/EGFP se realizó de manera similar.

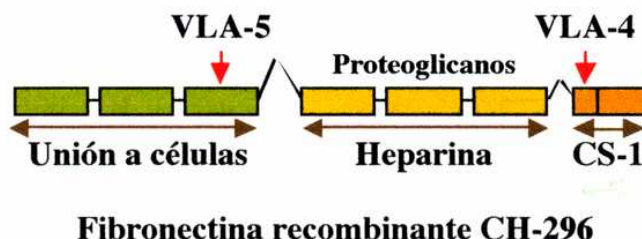
Los valores de títulos retrovirales son generalmente estimados transduciendo líneas celulares indicadoras (células NIH 3T3 o HeLa), pero ello no refleja la habilidad de los mismos para transducir células T humanas [391]. Para estimar la capacidad del vector LZRS-ZAP-70/EGFP a infectar células T humanas, sobrenadantes retrovirales obtenidos de 20 clones diferentes de la línea de empaquetaje PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP, fueron utilizados para transducir la línea celular T Jurkat. La media de transducción de la células Jurkat, sometidas a una simple exposición con los virus provenientes de los diferentes clones, varió entre 5% y 45% (datos no presentados). De la misma manera que para los clones de la línea PG13 llevando el vector LZRS-EGFP [380], el nivel de expresión de la EGFP en los diferentes clones de la línea PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP correlacionó con la capacidad de los viriones respectivos para transducir las células Jurkat. En efecto, las partículas retrovirales producidas por la línea PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10, la cual tuvo una intensidad media de fluorescencia (MFI) de 2109, fueron las más eficientes para transducir las células Jurkat. En cambio, el clón 6, el cual expresó un nivel inferior de EGFP (MFI=115), produjo el nivel más bajo de partículas infecciosas (Figura 3-A y datos no presentados). La población original PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP ("pool") a partir de la cual se obtuvieron los diferentes clones, tuvo una MFI de 704, representando un punto intermedio entre los dos extremos, clón 6 y clón 10 (Figura 3-A). La expresión de la EGFP en la línea PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10 permaneció estable durante más de 6 meses, y los sobrenadantes retrovirales producidos por la misma fueron utilizados para la realización de todos los experimentos de transducción. De la misma manera que para la obtención de la PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10, una línea PG13/LZRS-EGFP-clón 7 control, fue seleccionada por producir los viriones LZRS-EGFP con mayor eficacia de transducción de células Jurkat. La eficacia del LZRS-EGFP-clón 7 fue superior a la de los viriones LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10, con una media de transducción de  $55 \pm 8\%$  y  $35 \pm 8\%$ , respectivamente (datos no presentados).

Las células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 fueron transducidas como se describe en materiales y métodos. Brevemente, las células fueron estimuladas 48 horas con células "alimentadoras", PHA e IL-2 exógena y luego fueron expuestas a los sobrenadantes retrovirales producidos por las líneas PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10 o PG13/LZRS-EGFP-clón7 por un período de 6 horas durante dos días consecutivos, en presencia de fibronectina. La fibronectina permite mejorar la transferencia de genes dentro de las células T primarias [380]. Esta molécula participa en la adhesión de las células con las partículas virales gracias a sus tres sitios de unión. Los sitios repetidos de unión a la heparina interactúan directamente con el retrovirus, y

**Figura 3-A** Intensidades medias de fluorescencia (MFIs) de diferentes poblaciones de células PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP.

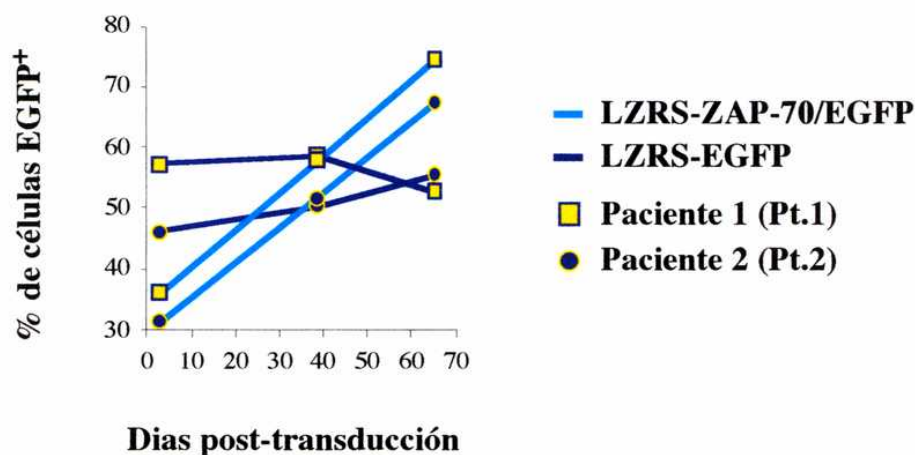


**Figura 3-B** Esquema del fragmento de fibronectina recombinante CH-296.

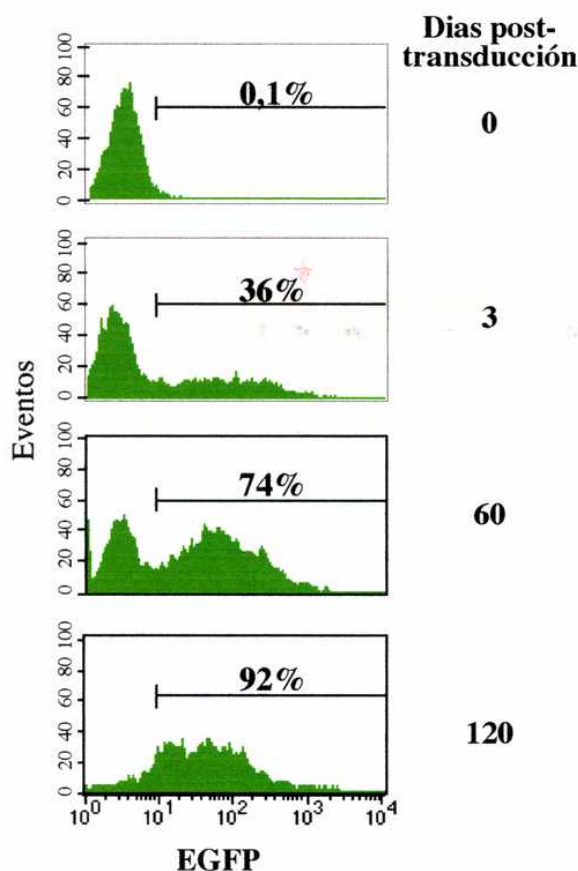


**Figura 3-** Correlación entre las MFIs en los clones PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP y la capacidad de los mismos a producir partículas retrovirales infectivas. **A-** La intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por la EGFP en los diferentes clones PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP fue analizada por FACS. En la figura solo se representan las células PG13 sin transducir, la población de células PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP sin clonar (pool), y el mejor clon productor de partículas retrovirales PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clon10. **B-** Representación del fragmento de fibronectina recombinante CH-296 utilizado para optimizar la transferencia de genes en linfocitos T primarios humanos. En el esquema se representan los sitios de unión a las células y CS-1, capaces de interactuar con la integrinas celulares VLA-5 y VLA-4, respectivamente, como así también los dominios de unión a heparina responsables de la interacción con las partículas retrovirales.

**Figura 4-A** Ventaja selectiva de crecimiento de las células T de pacientes transducidas con el vector retroviral LZRS-ZAP-70/EGFP.



**Figura 4-B** Progresión del porcentaje de células T de pacientes EGFP<sup>+</sup>, transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP.



**Figura 4-** Evolución de las células T aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 transducidas con los vectores retrovirales LZRS-ZAP-70/EGFP o LZRS/EGFP. Las células obtenidas de los pacientes 1 y 2 (Pt.1 y Pt.2) y transducidas con los vectores retrovirales, fueron expandidas en cultivo y la expresión de la EGFP fue monitoreada por FACS.

**A-** Comparación de los porcentajes de células T EGFP<sup>+</sup> transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP o con el vector control LZRS/EGFP, a diferentes tiempos después de realizada la transducción.

**B-** Representación de los perfiles obtenidos por FACS, 3, 60 o 120 días después de realizada la transducción de las células T con el vector retroviral LZRS-ZAP-70/EGFP. El porcentaje de células EGFP<sup>+</sup> es indicado en cada histograma.

los dominios de unión a las células y CS-1 los hacen con la superficie celular vía las integrinas VLA-5 y VLA-4, respectivamente [392]. En este trabajo utilizamos un fragmento de fibronectina recombinante denominado CH-296 conteniendo estos tres dominios (Figura 3-B).

Las células transducidas fueron luego expandidas en medio de cultivo y la expresión de la EGFP fue analizada por FACS 3, 40, 60 y 120 días después de realizada la transducción. Como muestra la figura 4-A, el nivel de transferencia génica fue significativamente mayor con el vector control LZRS-EGFP (46 y 57% en los Pt.1 y Pt.2, respectivamente) comparado con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP (31 y 36% para los Pt.1 y Pt.2, respectivamente). Estos valores coincidieron con los observados luego de la transducción de las células T Jurkat (datos no presentados). De manera muy interesante, en los diferentes experimentos de transducción que se realizaron, el porcentaje de células de pacientes transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP aumentó considerablemente luego de que las mismas fueron expandidas *in vitro*. En el experimento presentado aquí, luego de dos meses de cultivo el porcentaje de células del Pt.1 y del Pt.2 transducidas con dicho vector aumentó de 36 a 74% y de 31 a 67%, respectivamente. Contrariamente, el porcentaje de células T de pacientes transducidas con el vector control LZRS-EGFP permaneció esencialmente constante (Figura 4-A). Pasados los 120 días, el porcentaje de células transducidas expresando ZAP-70/EGFP fue superior a 90% (Figura 4-B).

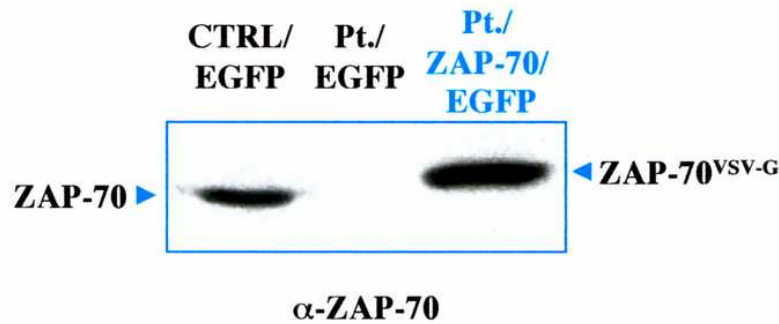
Estos resultados indican que las células T de pacientes transducidas con el gen "wild-type" de ZAP-70 presentan una ventaja selectiva de crecimiento *in vitro* frente a aquellas células transducidas con el vector control portando solo la EGFP.

### **ZAP-70 es fuertemente expresada y fosforilada en las células T de pacientes transducidas con el vector retroviral ZAP-70/EGFP**

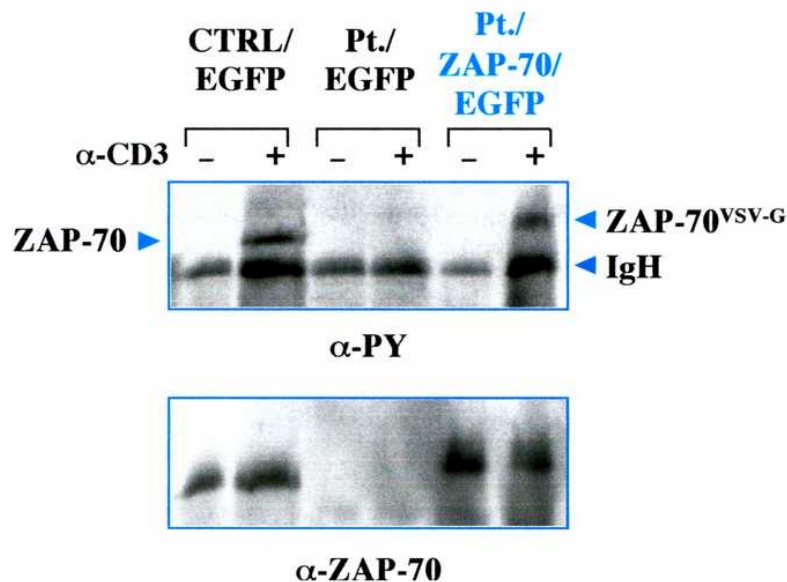
Con el fin de determinar si en las células T de pacientes transducidas con el vector ZAP-70/EGFP, ZAP-70 es expresada y fosforilada correctamente, se desarrollaron experiencias de inmunoprecipitación e inmunoblot utilizando anticuerpos específicos contra esta proteína. Todos los experimentos descritos a continuación fueron hechos sobre células expandidas *in vitro* entre 2 y 3 meses después de realizada la transducción. A ese momento del cultivo aproximadamente 50% y 70% de las células transducidas con el vector LZRS-EGFP o LZRS-ZAP-70/EGFP respectivamente, fueron EGFP<sup>+</sup>.

La proteína ZAP-70 introducida en las células de pacientes fue expresada a niveles entre 1.5 y 3 veces superiores a los observados para ZAP-70 endógena en las células T control obtenidas de individuos sanos (Figura 5-A). Para determinar si ZAP-70 ectópica es correctamente

**Figura 5-A** Determinación del nivel de expresión de ZAP-70 en las células T primarias de pacientes deficientes en ZAP-70, transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP.



**Figura 5-B** ZAP-70 es fosforilada sobre tirosina en las células T de pacientes transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP y estimuladas vía el TCR.



**Figura 5-** ZAP-70 es bien expresada y fosforilada en las células T de pacientes transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP. **A-** Para determinar el nivel de expresión de ZAP-70 en las células transducidas, se obtuvieron lisados celulares totales a partir de  $1 \times 10^6$  células T control (CTRL), células T de pacientes transducidas con el vector LZRS/EGFP, o células T de pacientes transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP. Los lisados totales fueron resueltos electroforéticamente en 10% SDS-PAGE y el nivel de expresión ZAP-70 fue analizado por *western-blot* con un mAb  $\alpha$ -ZAP-70. Las flechas indican la posición de ZAP-70 en las células CTRL (ZAP-70) y en las células de pacientes transducidas con ZAP-70 (ZAP-70<sup>VSV-G</sup>). **B-** Para evaluar el nivel de fosforilación de ZAP-70 en las diferentes poblaciones celulares,  $2 \times 10^6$  células fueron estimuladas (+) o no (-) con un anticuerpo  $\alpha$ -CD3 y luego ZAP-70 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 a partir de lisados totales obtenidos de las mismas. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en gel y luego analizados por *western-blot* con un mAb  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Las flechas indican las posiciones de ZAP-70 y ZAP-70<sup>VSV-G</sup> fosforiladas sobre tirosina. Además, también se indica la posición de la cadena pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 utilizado para inmunoprecipitar ZAP-70 (IgH). La cantidad de ZAP-70 inmunoprecipitada en cada una de las condiciones fue monitoreada rehibridando la membrana con un mAb  $\alpha$ -ZAP-70 (panel inferior).

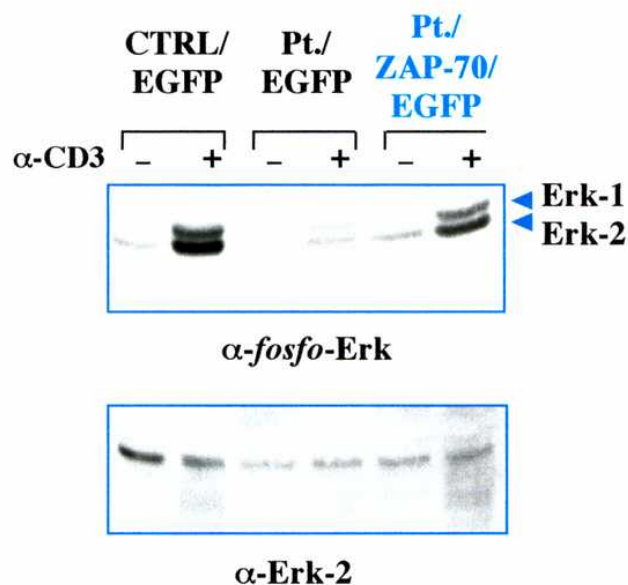
fosforilada sobre tirosina, la proteína fue inmunoprecipitada a partir de células T control transducidas con el vector EGFP y de células T de pacientes transducidas con los vectores EGFP o ZAP-70/EGFP. Las células fueron estimuladas vía el TCR o tratadas con medio de cultivo como control negativo. En estas experiencias se pudo observar que la estimulación del TCR en las células expresando ectopicamente ZAP-70 indujo la fosforilación de esta proteína a niveles equivalentes a los observados para ZAP-70 endógena en las células T control. Como se esperaba, no se detectó fosforilación alguna de ZAP-70 en las células transducidas solo con la EGFP (Figura 5-B).

Los resultados obtenidos muestran que la transducción de las células T de pacientes con un vector retroviral llevando el gen “*wild-type*” de ZAP-70 permite obtener altos niveles de expresión de esta quinasa y una correcta fosforilación de la proteína una vez que el TCR ha sido estimulado.

#### **Los defectos de fosforilación de las proteínas MAPK observados en las células T deficientes en ZAP-70 son revertidos por la transducción de las mismas con el vector retroviral ZAP-70/EGFP**

Un número creciente de evidencias indican que la señalización vía las proteínas Ras-Erk es necesaria para la proliferación de distintos tipos de células [393]. Como ha sido mencionado anteriormente, ZAP-70 es una importante proteína implicada en la señalización por el TCR y las células deficientes en ZAP-70 muestran una marcada disminución en la fosforilación de las MAPKs como así también en la proliferación celular y la secreción de IL-2 [275]. Considerando que ZAP-70 una vez introducida en las células es bien expresada y fosforilada, era importante determinar si las funciones defectuosas observadas en las células sin transducir podían ser revertidas luego de la transducción de las mismas. Con el fin de evaluar el estado de fosforilación de las MAPKs, las células T de pacientes transducidas con el vector ZAP-70/EGFP o con el vector EGFP, como así también células T control, fueron estimuladas con un anticuerpo  $\alpha$ -CD3 y la fosforilación de Erk-1 y Erk-2 fue analizada por “*western blot*”. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal capaz de reconocer las formas fosforiladas de ambas MAPKs. Luego de la activación del TCR, las células de pacientes transducidas con el vector control presentaron una marcada disminución en la fosforilación de Erk, en cambio las transducidas con el gen “*wild-type*” de ZAP-70 mostraron una buena fosforilación de ambas formas de Erk (Figura 6). Sin embargo, el nivel de fosforilación de Erk-1 y Erk-2 en las células expresando ZAP-70 ectópica fue ligeramente inferior al observado en las células control. Es probable que esta diferencia haya

**Figura 6** La expresión ectópica de ZAP-70 en las células T de pacientes restaura la fosforilación inducida por la estimulación del TCR de las MAPKs Erk-1 y Erk-2.



**Figura 6-** El nivel de fosforilación de las MAPKs Erk-1 y Erk-2 fue evaluado por *western-blot*. Los lisados celulares totales fueron obtenidos de  $1 \times 10^6$  células T control (CTRL) y células T de pacientes transducidas con el vector LZRS/EGFP, o de células T de pacientes transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP. Las células fueron estimuladas con un anticuerpo  $\alpha$ -CD3 (+) o incubadas con medio de cultivo (-). Los lisados celulares fueron resueltos en 10% SDS-PAGE y luego transferidos sobre una membrana que más tarde fue hibridada con un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -fosfo-Erk capaz de reconocer las formas fosforiladas de Erk-1 y Erk-2. Estas dos formas fosforiladas son indicadas por las flechas en el panel superior. La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue estimada rehibridando la membrana con un mAb  $\alpha$ -Erk-2.

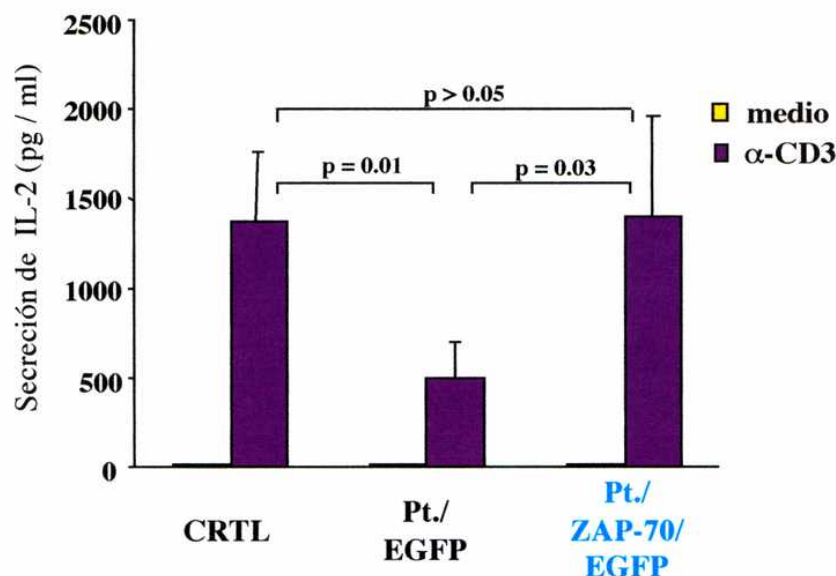
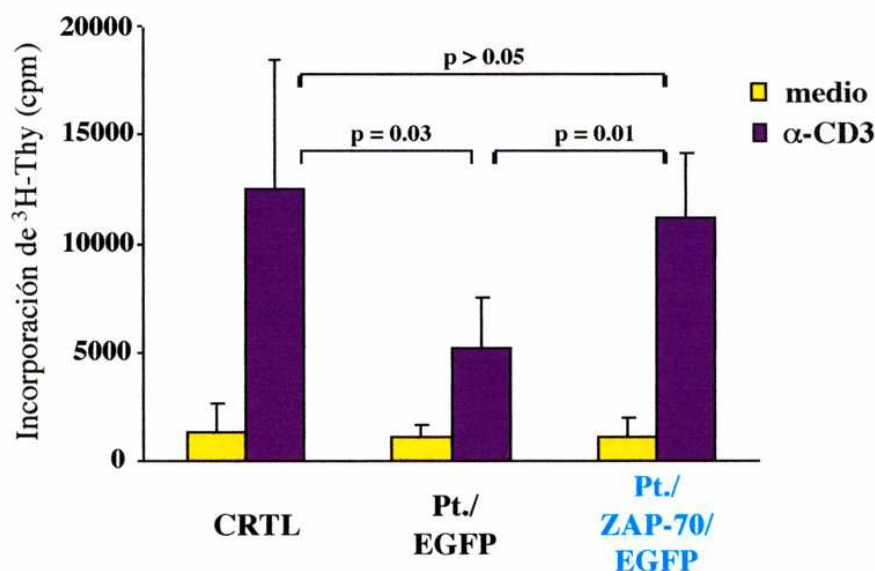
estado dada por una pequeña proporción de las células transducidas que no expresaron ZAP-70 (30% de células EGFP') (datos no presentados).

Estos resultados muestran claramente que introduciendo el gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células T deficientes en esta quinasa, es posible restaurar la fosforilación de Erk-1 y Erk-2.

### **La proliferación y la secreción de IL-2 inducidas por la estimulación del TCR son restauradas en las células T deficientes en ZAP-70 transducidas con el vector retroviral ZAP-70/EGFP**

El hecho que los experimentos de transferencia de genes presentados aquí fueron realizados en células T primarias posibilitó determinar cuales fueron las consecuencias biológicas de la expresión del transgén en las células de pacientes. La secreción de IL-2 y la proliferación inducidas por el TCR, eventos cruciales para el desarrollo de una respuesta normal de las células T. En las células T primarias deficientes en ZAP-70, la disminución de la proliferación y de la secreción de citoquinas correlacionó bien con los defectos observados en la fosforilación de Erk-1 y Erk-2. Para ver si de la misma manera que para estas dos quinasa, la introducción del gen "*wild-type*" de ZAP-70 podía revertir las funciones defectuosas, las células T de pacientes transducidas con el vector ZAP-70/EGFP o con el vector EGFP, y células T control, fueron estimuladas vía el TCR y la proliferación y secreción de IL-2 fueron determinadas. La secreción de IL-2 fue estimada midiendo el nivel de esta citoquina secretada en el medio de cultivo, 24 horas después de la estimulación del TCR. Los resultados presentados en la figura 7-A muestran que antes de la estimulación, ni las células T control ni las de pacientes producen niveles detectables de IL-2 (<5 pg/ml). Luego de la estimulación vía el TCR, las células deficientes en ZAP-70 presentaron un marcado déficit en la producción de IL-2, en comparación con lo observado en las células T control ( $p=0.01$ ). Por el contrario, la activación de las células T transducidas con el gen "*wild-type*" de ZAP-70 indujo la producción de cantidades sustanciales de IL-2, equivalentes a aquellas secretadas por las células T control ( $p>0.05$ ) (Figura 7-A). Esto demuestra que los importantes defectos en la producción de IL-2 observados en las células T deficientes en ZAP-70 pueden ser revertidos por la introducción del gen "*wild-type*" de ZAP-70.

Finalmente se comparó la habilidad de las células deficientes en ZAP-70 y de aquellas reconstituidas con el gen "*wild-type*" de ZAP-70 para proliferar luego de que ambas fueran activadas vía el TCR. Debe remarcarse que el nivel de proliferación de los linfocitos T primarios normales varía de un experimento a otro. Para eliminar posibles errores provenientes de un único

**Figura 7-A** Secreción de IL-2 luego de la transducción de las células T de pacientes.**Figura 7-B** Nivel de proliferación de las células T transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP.

**Figura 7-** La secreción de IL-2 y la proliferación celular inducidas por la estimulación del TCR son restauradas luego de la transducción del vector retroviral LZRS-ZAP-70 en las células deficientes en ZAP-70. **A-** Para determinar el nivel de secreción de IL-2,  $1 \times 10^5$  células T control (CTRL) y células T de pacientes transducidas con el vector LZRS/EGFP o con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP, fueron no estimuladas (medio), o estimuladas con un mAb α-CD3 inmovilizado. La IL-2 secretada en el sobrenadante de cultivo fue medida 24 horas después de la activación, utilizando un kit ELISA comercial. Los valores presentados corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar de triplicados realizados para cada muestra en al menos tres experimentos independientes. **B-** Para evaluar la proliferación celular, las células tratadas fueron cultivadas durante tres días y luego pulsadas con  $1 \mu\text{Ci}$  de <sup>3</sup>H-Timidina. 18 horas más tarde las células fueron colectadas y la cantidad de <sup>3</sup>H-Timidina incorporada fue medida utilizando un contador de centelleo. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar de cuatro experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Los análisis estadísticos fueron realizados aplicando el test t de Student.

experimento, los resultados que mostramos aquí representan la media  $\pm$  el desvío estándar de las muestras obtenidas a partir de 4 experimentos individuales, cada uno de ellos realizado por triplicado. Las células de pacientes transducidas con el vector ZAP-70/EGFP o con el vector EGFP, y las células T control, fueron activadas con un anticuerpo  $\alpha$ -CD3 inmovilizado y 3 días más tarde la proliferación fue medida. La proliferación inducida por la activación del TCR de las células deficientes en ZAP-70 fue marcadamente inferior a la de las células T normales ( $p=0.03$ ). Sin embargo, en aquellas células donde el gen “*wild-type*” de ZAP-70 fue introducido se pudo observar un significativo aumento de la proliferación en respuesta a la estimulación del TCR ( $P=0.01$ ) (Figura 7-B). De manera importante, las células reconstituidas con el gen de ZAP-70 fueron capaces de proliferar de manera comparable a como lo hicieron las células T control estimuladas con el anti-CD3 ( $p>0.05$ ) (Figura 7-B).

Conjuntamente, estos resultados permiten concluir que la introducción del gen “*wild-type*” de ZAP-70 en las células T de pacientes confiere a las mismas la capacidad de responder a la estimulación del TCR, proliferando y secretando IL-2.

## **B-“Reconstitución del desarrollo y la función linfóide T en ratones deficientes en ZAP-70 luego del trasplante de células progenitoras de la médula ósea transducidas con el gen ZAP-70”**

### **Introducción**

Como venimos de ver, la transferencia mediada por retrovirus de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> deficientes en esta proteína permite reconstituir las funciones de las células T, lo cual avala la idea que la terapia génica para la deficiencia en ZAP-70 puede ser una alternativa factible. Sin embargo, la terapia génica basada en la transducción de células CD4<sup>+</sup> deficientes en ZAP-70 no permite la reconstitución de las células T CD8<sup>+</sup>, ausentes en los pacientes ZAP-70<sup>-/-</sup>. Aunque en presencia de células CD4<sup>+</sup> normales, la ausencia de CD8<sup>+</sup> es compatible con la vida, la reconstitución de estas últimas células es indispensable para la íntegra funcionalidad del brazo citotóxico del sistema inmune.

Diversos ensayos clínicos de terapia génica basados en la transducción retroviral de células progenitoras pluripotentes de la médula ósea han sido empleados para el tratamiento de diferentes inmunodeficiencias primarias (ver Introducción General, Capítulo V, ítem II.4.). Entre

estos ensayos se encuentran los realizados por el grupo del Dr. Fischer en los cuales la introducción del gen “*wild-type*” de  $\gamma c$  dentro de células progenitoras de la médula ósea  $\gamma c$  resultó en el desarrollo de linfocitos T funcionales [312]. De manera similar, la introducción del gen “*wild-type*” de ZAP-70 dentro de células progenitoras ZAP-70<sup>-/-</sup> podría resultar en el desarrollo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como así también CD8<sup>+</sup> funcionales. Sin embargo, para el caso de la inmunodeficiencia en ZAP-70 varios puntos importantes deben ser tenidos en cuenta:

1) la introducción de ZAP-70 dentro de las células progenitoras será suficiente para permitir el desarrollo de los linfocitos CD4 y CD8 *in vivo*? 2) si el desarrollo tiene lugar, los linfocitos resultantes presentarán un repertorio de TCR policlonal y serán capaces de montar una respuesta inmune normal? 3) a diferencia de  $\gamma c$ , ZAP-70 es solo expresada en linfocitos T y células NK, por consecuencia será imprescindible determinar si la expresión ectópica de ZAP-70 en las células progenitoras afectará de manera negativa la diferenciación y el funcionamiento de las líneas hematopoyéticas no T?

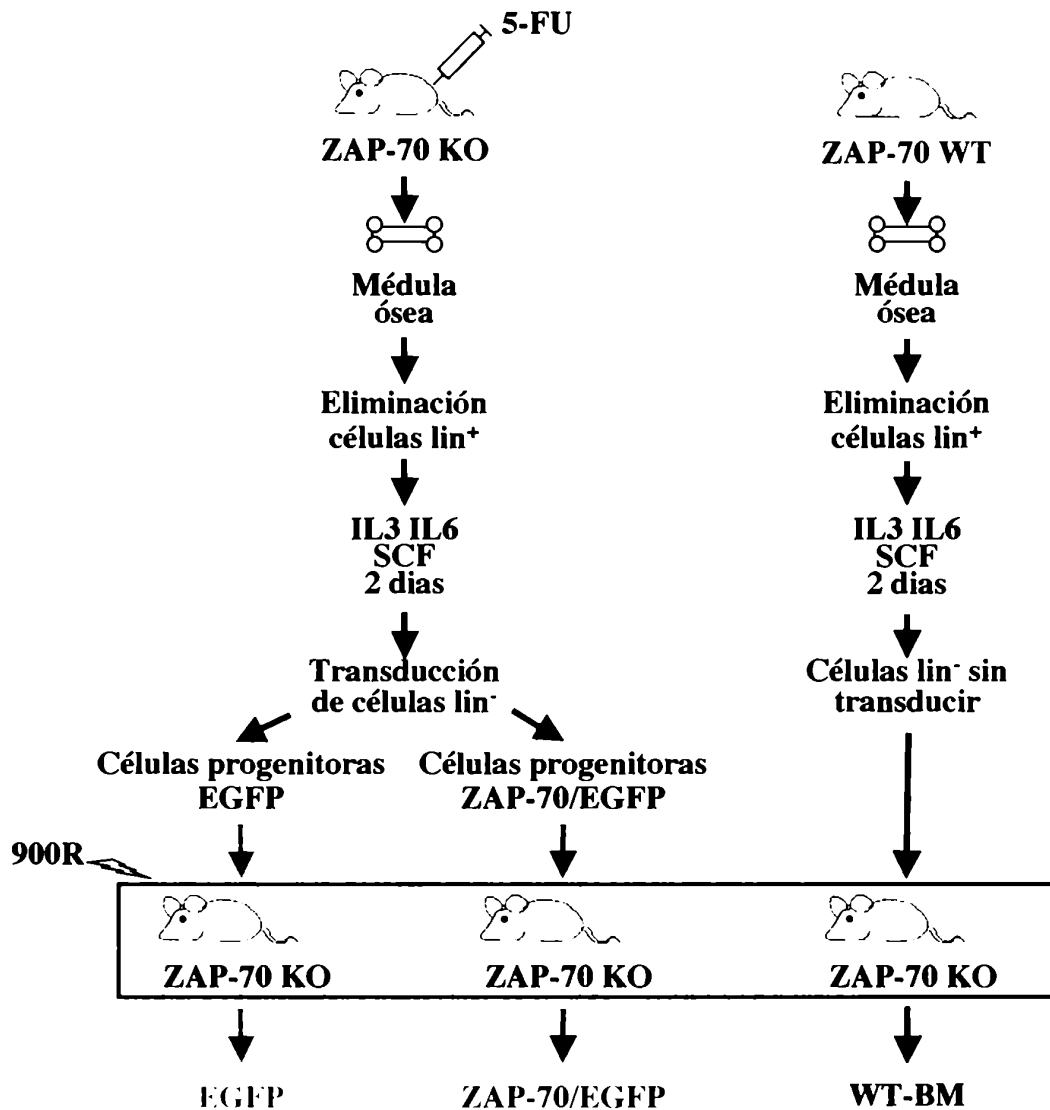
Los ratones ZAP-70 “*knockout*” (ZAP-70 KO) son un excelente modelo para intentar responder a todas estas preguntas. Pero el fenotipo de estos ratones y el de los pacientes deficientes en ZAP-70 no es idéntico. Como hemos visto anteriormente, la ausencia de esta proteína en ratones provoca un bloqueo precoz en el desarrollo de los linfocitos T y en consecuencia estos animales carecen de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (ver Introducción General, ítem V del capítulo IV). Sin embargo, las ratones ZAP-70 KO recapitulan muchas de las características de los pacientes deficientes en ZAP-70 y ofrecen un modelo interesante para el desarrollo de estudios pre-clínicos de terapia génica con células progenitoras para el tratamiento de la inmunodeficiencia en ZAP-70.

## Resultados

### Introducción del gen “*wild-type*” de ZAP-70 dentro de células progenitoras hematopoyéticas murinas ZAP-70<sup>-/-</sup>

Gracias a una colaboración con los laboratorios del doctor Candotti y del doctor Singer en el *National Institute of Health* (NIH) en USA, se pudo disponer de ratones deficientes en ZAP-70. Para la obtención de las células progenitoras de la médula ósea, los ratones deficientes en ZAP-70 fueron inyectados con 5-fluorouracilo (5-FU). Este compuesto elimina las células en proliferación dejando intactas aquellas quiescentes, característica exclusiva de las células pluripotentes. 48 horas después de la inyección los ratones fueron sacrificados y los fémures y

**Figura 8** Aislamiento, transducción y transplante de las células progenitoras de la médula ósea en los ratones ZAP-70 KO.

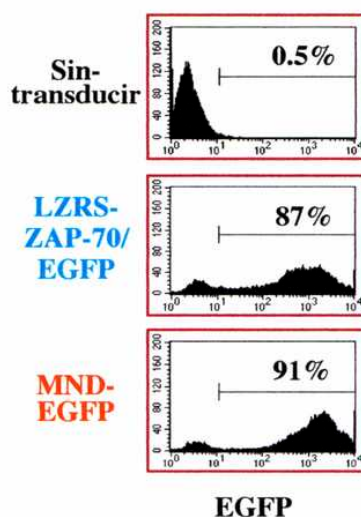


**Figura 8-** Los ratones ZAP-70 KO fueron inyectados con 5-fluorouracilo (5-FU) para eliminar las células en proliferación. Dos días después, los ratones fueron sacrificados y se recuperaron las células de la médula ósea a partir de las tibias y fémures. Las células obtenidas, como así también células progenitoras obtenidas de ratones "wild-type" fueron incubadas con anticuerpos lin<sup>+</sup> para eliminar las células hematopoyéticas diferenciadas. Las células progenitoras (lin<sup>-</sup>) fueron estimuladas durante 48 hs con IL-3, IL-6 y SCF y luego transducidas. La transducción se realizó en presencia de fibronectina preincubando las células lin<sup>-</sup> con las partículas retrovirales MND-EGFP o LZRS-ZAP-70/EGFP. Las células transducidas y las células sin transducir obtenidas de ratones WT, fueron cultivadas durante 48 hs y luego transplantadas por inyección intravenosa en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> irradiados letalmente. Ocho semanas después del transplante se analizaron muestras de sangre periférica y a las 18 semanas después de realizado el mismo, todos los ratones tratados fueron sacrificados para la extracción y el análisis de los distintos órganos linfoides.

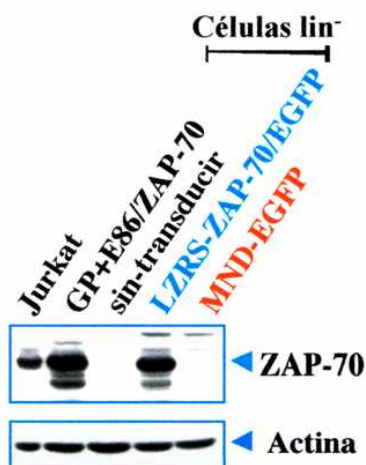
tibias de los mismos fueron recolectados para la extracción de la médula ósea (Figura 8). Las suspensiones celulares obtenidas de la médula se componen no solo de células progenitoras sino también de células hematopoyéticas diferenciadas que colonizan igualmente este órgano linfoide. Todas estas células tienen la particularidad de expresar moléculas de superficie las cuales permiten identificar las distintas poblaciones de células medulares. De este modo, aquellas células que hayan entrado en alguna vía de diferenciación expresarán el marcador  $\text{lin}^+$ . Este marcador es en realidad un conjunto de moléculas presentes en diferentes tipos de líneas celulares hematopoyéticas tales como el CD3 en los linfocitos T, la molécula B220 en los B, en los granulocitos la Gr-1, en las macrófagos la Mac-1, y en los eritrocitos la Ter-119. Las células que no expresen estos marcadores serán  $\text{lin}^-$  y guardarán un fenotipo de célula progenitora. Para el caso de las células murinas, los marcadores c-kit, Sca-1 y Thy-1, permiten determinar cuan inmadura es la célula progenitora. Aquellas  $\text{lin}^-$  que sean  $\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{Thy-1}^{\text{low}}$  tendrán un fenotipo correspondiente al de una célula progenitora pluripotente inmadura.

Con el objetivo de eliminar las células hematopoyéticas  $\text{lin}^+$  presentes en la médula, la suspensión celular obtenida de los huesos fue incubada con un cóctel de anticuerpos dirigidos contra los marcadores "lin". Luego de la separación, las células resultantes  $\text{lin}^+$  y  $\text{lin}^-$  fueron marcadas con anticuerpos anti c-kit, Sca-1 y Thy-1 para confirmar si el fenotipo de estas últimas correspondía al de una célula progenitora. Satisfactoriamente, la mayoría de las células  $\text{lin}^-$  resultantes presentaron un fenotipo de célula progenitora inmadura,  $\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{Thy-1}^{\text{low}}$  (datos no presentados). Una vez confirmado esto, las células  $\text{lin}^-$  fueron puestas en cultivo durante 48 horas en presencia de FCS, IL-3, IL-6 y SCF. Después, las células en fase de proliferación fueron transducidas con los vectores retrovirales derivados de MLV, MND-EGFP como control [394] y el vector LZRS-ZAP-70/EGFP utilizado previamente (Figura 8). Ambos vectores fueron producidos en la línea de empaquetaje ecotrópica GP+E86. La transducción de las células fue realizada en medio de cultivo conteniendo los factores de crecimiento y en presencia de fibronectina. Tres días después de la infección, el porcentaje de células expresando la EGFP fue calculado por citometría de flujo utilizando un FACScan. Mientras que la totalidad de las células sin transducir fueron EGFP negativas, 91% y 87% de las células transducidas con el vector control EGFP o con el vector ZAP-70/EGFP respectivamente, expresaron la EGFP (Figura 9-A). Es importante remarcar que el porcentaje de células  $\text{EGFP}^+$  fue sumamente alto, lo que muestra

**Figura 9-A** Determinación del porcentaje de células  $\text{lin}^- \text{EGFP}^+$  luego de la transducción de las mismas con los vectores retrovirales.



**Figura 9-B** Nivel de expresión de ZAP-70 en las células progenitoras  $\text{lin}^-$  transducidas, en la línea de empaquetaje GP+E86 y en la línea celular T humana Jurkat.



**Figura 9-** Transducción de las células progenitoras de la médula ósea  $\text{ZAP-70}^{-/-}$  con el vector retroviral LZRS-ZAP-70/EGFP. **A-** Las células progenitoras de la médula ósea  $\text{lin}^-$  aisladas de ratones  $\text{ZAP-70KO}$ , fueron incubadas con los sobrenadantes retrovirales correspondientes, en presencia de citoquinas. Las células transducidas fueron expandidas en cultivo durante 48 horas y la expresión de la EGFP en las mismas fue monitoreada por FACS. Los histogramas mostrados representan las células  $\text{lin}^-$  sin transducir, transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP, o transducidas con el vector control MND-EGFP. Los porcentajes de células  $\text{lin}^- \text{EGFP}^+$  son indicados en cada histograma. **B-** El nivel de expresión de ZAP-70 en las células  $\text{ZAP-70}^{-/-} \text{lin}^-$  transducidas con los vectores retrovirales, como así también en la línea de empaquetaje GP+E86 productora de las partículas LZRS-ZAP-70 y en la línea celular T humana Jurkat, fue monitoreado por *western-blot* utilizando un  $\text{mAb } \alpha\text{-ZAP-70}$ . La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue evaluada rehibridando la membrana con un anticuerpo  $\alpha\text{-actina}$ .

que los sobrenadantes conteniendo las partículas retrovirales son altamente eficaces para la infección de células progenitoras murinas.

Para confirmar que ZAP-70 fue expresada solamente en aquellas células conteniendo el vector LZRS-ZAP-70/EGFP, se realizaron experiencias de "western blot". Como se puede observar en la figura 9-B, ZAP-70 fue expresada solo en aquellas células transducidas con el vector conteniendo el gen "wild-type" de ZAP-70, las células sin transducir o transducidas con el vector MND-EGFP no expresaron cantidades detectables de la proteína. Vale la pena destacar que el nivel de expresión de ZAP-70 en las células progenitoras transducidas fue entre 2 y 3 veces superior al observado en línea celular T humana Jurkat, lo cual demuestra la eficacia del promotor retroviral LTR en el vector utilizado (Figura 9-B).

### **Transplante de ratones ZAP-70 KO con células progenitoras transducidas con el vector ZAP-70/EGFP**

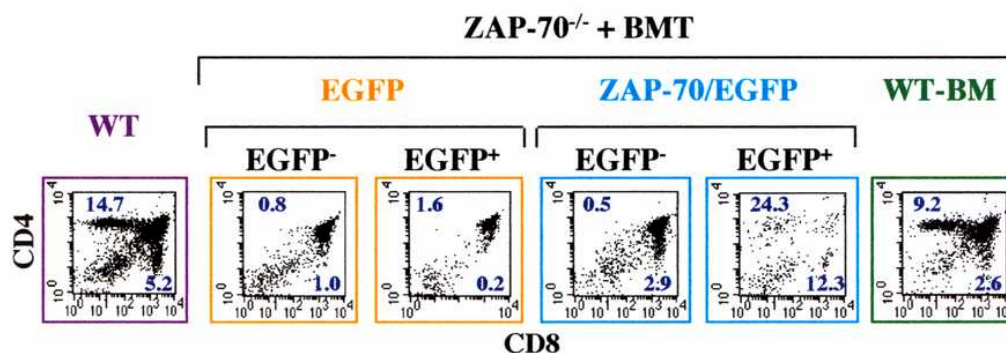
En una segunda etapa, las células progenitoras transducidas previamente fueron inyectadas en ratones ZAP-70 KO. Más precisamente, las células transducidas con el vector EGFP o con el vector ZAP-70/EGFP, como así también células control sin transducir aisladas de un ratón "wild-type" (WT), fueron inyectadas en ratones ZAP-70 KO. Antes de la inyección, los ratones fueron irradiados con dosis letales de rayos  $\gamma$  para impedir el desarrollo de las células progenitoras endógenas (Figura 8). Una vez inyectados, los animales fueron criados en un bioterio en un ambiente libre de patógenos. Ocho semanas después de realizado el transplante se tomaron muestras de sangre periférica de los ratones tratados para determinar el número de células pertenecientes a las diferentes poblaciones hematopoyéticas. Finalmente, a las 18 semanas después de realizado el transplante todos los ratones tratados fueron sacrificados para realizar la extracción y el análisis de los distintos órganos linfoides (Figura 8).

En este manuscrito, los ratones transplantados con el vector EGFP serán citados como ratones EGFP, los transplantados con ZAP-70/EGFP, ZAP-70/EGFP, y los transplantados con células "wild-type" sin transducir, WT-BM.

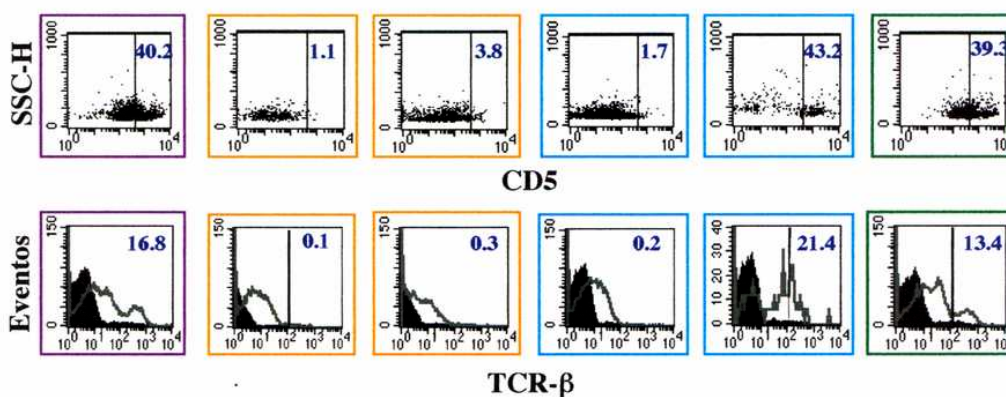
### **Diferenciación de los timocitos en ratones ZAP-70 KO luego del transplante de células progenitoras lin<sup>+</sup> transducidas con el vector ZAP-70/EGFP**

La timopoyesis fue estudiada 18 semanas después del transplante para determinar los efectos de la expresión del transgén sobre la diferenciación a largo plazo de los timocitos. El bloqueo en la diferenciación de células T en los ratones ZAP-70 KO ocurre en el estadio DP

**Figura 10-A** Diferenciación de los timocitos en los ratones  $ZAP-70^{-/-}$  luego del trasplante con las células progenitoras transducidas con el vector  $ZAP-70/EGFP$ .



**Figura 10-B** Expresión de marcadores de diferenciación en los timocitos de ratones transplantados con las células progenitoras llevando el gen wild-type de  $ZAP-70$



**Figura 10-** 18 semanas post-trasplante los ratones  $ZAP-70$  KO transplantados ( $ZAP-70^{-/-}$ +BMT) con el vector EGFP (EGFP), con el vector  $ZAP-70/EGFP$  ( $ZAP-70/EGFP$ ) o con células WT sin transducir (WT-BM), fueron sacrificados y a partir de los mismos se recolectaron los timocitos para ser analizados por FACS. Como control se utilizaron timocitos obtenidos de ratones *wild-type* no transplantados (WT). **A-** Las células fueron marcadas con anticuerpos  $\alpha$ -CD8-PE y  $\alpha$ -CD4-Cy. Los porcentajes de timocitos simple positivos (SP) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son indicados en cada gráfico. Para el caso de los ratones transplantados con las células progenitoras transducidas con los vectores retrovirales, se muestra las poblaciones de timocitos transducidos expresando la EGFP (EGFP<sup>+</sup>) como así también aquellas no transducidas que no expresaron dicha proteína (EGFP<sup>-</sup>). **B-** El nivel de expresión de los marcadores de diferenciación timocitaria CD5 y TCRβ fue evaluado en las poblaciones de timocitos EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup>. La expresión de estos dos marcadores también fue monitoreada en las células aisladas de ratones WT y WT-BM. Los porcentajes de timocitos CD5<sup>hi</sup> y TCRβ<sup>hi</sup> son indicados en cada histograma. Los histogramas son representativos de los datos obtenidos para cada uno de los 3 o 4 animales analizados en cada grupo.

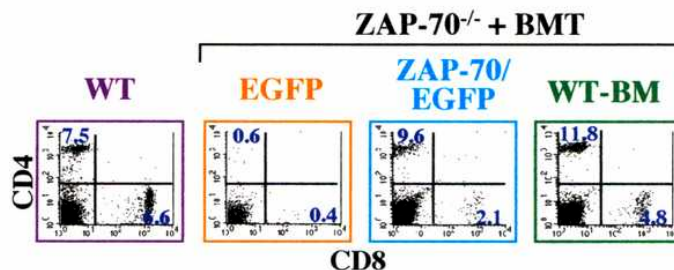
CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Esta subpoblación de timocitos es la más representada en un timo normal y en consecuencia los ratones ZAP-70 KO transplantados con el vector EGFP o con el vector ZAP-70/EGFP no presentaron diferencias significativas en el número total de timocitos:  $2,4 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$  y  $3,8 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$ , respectivamente. De manera similar, los ratones WT-BM transplantados con células “wild-type” sin transducir presentaron  $5,6 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^7$  timocitos totales (datos no presentados).

Como hemos visto anteriormente, las diferentes subpoblaciones de timocitos pueden distinguirse de acuerdo a la expresión de los coreceptores CD4 y CD8 (ver Introducción General, ítem I.2. del capítulo I). En los ratones ZAP-70 KO transplantados con el vector EGFP los porcentajes de timocitos SP CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> detectados fueron extremadamente bajos debido al bloqueo en el estadio DP. No obstante se puede observar que la distribución relativa de las subpoblaciones DN y DP no fueron modificadas por la presencia del vector (Figura 10-A, ratones EGFP). En cambio, dentro de las poblaciones de timocitos portando el vector ZAP-70/EGFP, el porcentaje de células SP aumentó de manera considerable ( $20.8\% \pm 9.7\%$  y  $8.6\% \pm 4.0\%$  para los timocitos CD4 y CD8;  $p < 0.05$  para ambas condiciones) (Figura 10-A). Es importante destacar que estos porcentajes no fueron significativamente diferentes de aquellos observados en los ratones WT-BM control ( $12.9\% \pm 5.1\%$  y  $4.1\% \pm 1.3\%$  para los timocitos CD4 y CD8;  $p > 0.05$  para ambas condiciones).

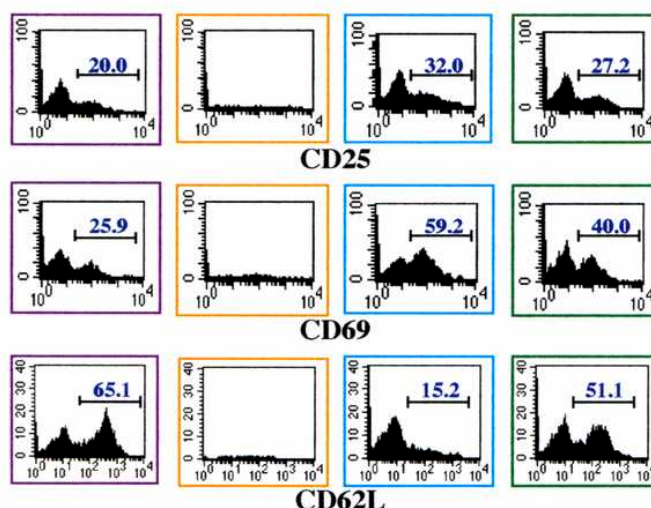
Para evaluar más en detalle la diferenciación de los timocitos transducidos con ZAP-70, la expresión de los marcadores de diferenciación CD5 y TCR $\beta$  fue monitoreada en las poblaciones de células sin transducir (EGFP<sup>-</sup>) y transducidas (EGFP<sup>+</sup>). La expresión del marcador de activación CD5, aumentó significativamente en los timocitos transducidos con el vector ZAP-70, comparado con aquellos transducidos con el vector EGFP ( $35.2\% \pm 11.8\%$  vs.  $2.7\% \pm 1.6\%$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 10-B). Además, el porcentaje de timocitos transducidos con el vector ZAP-70 expresando fuertemente el CD5, fue equivalente a los observados en ratones WT y WT-BM. Resultados similares fueron obtenidos para la expresión del TCR $\beta$ , con elevados niveles de expresión en los timocitos transducidos con el vector ZAP-70, equivalentes a los observados en los ratones control (Figura 10-B).

Colectivamente, estos resultados demuestran que el trasplante de células progenitoras de la médula ósea transducidas con el gen “wild-type” de ZAP-70 permite eliminar el bloqueo en la diferenciación de los timocitos en ratones ZAP-70 KO. La expresión ectópica de ZAP-70

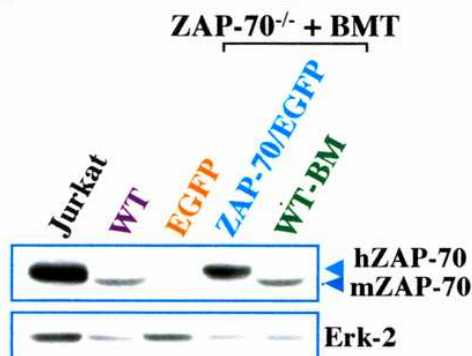
**Figura 11-A** Determinación del porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 en los ratones transplantados.



**Figura 11-B** Determinación del estado de activación de los linfocitos T periféricos.



**Figura 11-C** Nivel de expresión de ZAP-70 en los esplenocitos de los ratones transplantados.



**Figura 11-** Reconstitución de los linfocitos T en los ratones ZAP-70 KO transplantados (ZAP-70<sup>-/-</sup> + BMT). Los esplenocitos fueron recolectados a partir de los diferentes animales tratados (EGFP, ZAP-70/EGFP o WT-BM) 18 semanas post-transplante y de animales WT sin tratar. **A-** Las células fueron marcadas con anticuerpos  $\alpha$ -CD8-PE y  $\alpha$ -CD4-Cy y analizadas por FACS. El porcentaje de linfocitos T simple positivos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son indicados en cada gráfico. **B-** El estado de activación de los linfocitos fue evaluado por FACS determinando el nivel de expresión de los marcadores activación CD25 y CD69.

El porcentaje relativo de linfocitos T naives y de memoria fue monitoreado mediante la marcación de la molécula CD62L. Los porcentajes de células marcadas son indicados en cada histograma. Estos parámetros no pudieron ser analizados en los ratones EGFP ya que los mismos carecen de células T periféricas. Los datos son representativos de los resultados obtenidos en la totalidad de los animales analizados en cada grupo. **C-** El nivel de expresión de ZAP-70 en los esplenocitos de ratones EGFP, ZAP-70/EGFP o WT-BM, como así también en esplenocitos obtenidos de ratones WT y en la línea celular T humana Jurkat, fue monitoreado por *western-blot* con un anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 capaz de reconocer las formas humana (hZAP-70) y murina (mZAP-70) de la proteína. La cantidad de proteína cargada en cada hoyo fue determinada hibridando la membrana con un mAb  $\alpha$ -Erk-2.

proporciona una ventaja selectiva a los timocitos transducidos permitiéndoles pasar a un estadio de diferenciación más avanzado.

### **Fenotipo y función de los linfocitos T periféricos de los ratones transplantados con células progenitoras lin<sup>-</sup> transducidas con el vector ZAP-70/EGFP**

La presencia de células T esplénicas periféricas en los ratones tratados con ZAP-70 fue examinada y el fenotipo y funcionamiento de las mismas fue determinado. Como se esperaba, en los ratones ZAP-70 KO transplantados con el vector EGFP, no se detectaron células T periféricas. Sin embargo, la introducción de ZAP-70 permitió la diferenciación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Ambas poblaciones de linfocitos T, es decir la CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, fueron detectadas en el bazo y también en la sangre periférica de los 4 ratones transplantados con el vector ZAP-70/EGFP (Figura 11-A y datos no presentados). Con el fin de determinar el estado de activación de estos linfocitos T se estudió el nivel de expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69. Las células CD4<sup>+</sup> de los ratones tratados con ZAP-70 expresaron el CD25 a niveles equivalentes a los observados en los ratones WT-BM control (Figura 11-B). La expresión del marcador de activación CD69 también fue detectada en las células CD4<sup>+</sup> de los ratones tratados con ZAP-70, pero su nivel de expresión fue algo superior al observado en los ratones WT ( $52\% \pm 5.9\%$  vs.  $35.7\% \pm 3.2\%$ ;  $P < 0.05$ ). El porcentaje de células T “naives” y de memoria también fue monitoreado midiendo el nivel de expresión del marcador CD62L, expresado principalmente sobre la superficie de las células “naives”. Aunque ambas poblaciones fueron detectadas, el porcentaje de células T “naives” CD4<sup>+</sup> (CD62L<sup>+</sup>) en los ratones reconstituidos con ZAP-70 fue inferior al observado en los WT-BM ( $12.7\% \pm 4.8\%$  vs.  $49.6\% \pm 6.6\%$ ;  $P < 0.005$ ). Sin embargo, estos últimos también presentaron porcentajes aumentados de células T CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>, comparado con los ratones WT sin transplantar (Figura 11-B). Esto sugiere que el aumento en el porcentaje de células T activadas (CD69<sup>+</sup>) y de memoria (CD62L<sup>-</sup>) en los ratones reconstituidos es una consecuencia del tratamiento de los ratones, probablemente relacionada con la irradiación letal que sufrieron los animales.

Para confirmar que ZAP-70 fue expresada en las células T CD4<sup>+</sup>, el nivel de expresión de la proteína fue monitoreado por “western blot” utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -ZAP-70 capaz de reconocer tanto la forma humana como murina de esta quinasa. La expresión de ZAP-70 fue detectada en los esplenocitos de los ratones transplantados con el vector ZAP-70/EGFP, y su nivel de expresión fue aproximadamente 3 veces superior al de la forma murina endógena

**Tabla 1** Nivel de proliferación de los linfocitos T y B esplénicos obtenidos de los diferentes animales transplantados.

|                                            | Medio         | $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 | LPS              |
|--------------------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|
| <b>WT</b><br>Ratones ZAP-70 <sup>-/-</sup> | 702 $\pm$ 97  | 74146 $\pm$ 1821              | 61841 $\pm$ 871  |
| <b>EGFP</b>                                | 497 $\pm$ 84  | 1424 $\pm$ 262                | 61050 $\pm$ 2660 |
| <b>ZAP-70/EGFP</b>                         | 690 $\pm$ 163 | 11553 $\pm$ 1203              | 48732 $\pm$ 3944 |
| <b>WT-BM</b>                               | 424 $\pm$ 51  | 58456 $\pm$ 2231              | 47541 $\pm$ 2392 |

**Tabla 1-** Proliferación de los esplenocitos en ratones ZAP-70 KO luego del trasplante de las células progenitoras transducidas con los vectores retrovirales. Los esplenocitos fueron obtenidos 18 semanas después de realizado el trasplante a partir de los diferentes ratones tratados y fueron depositados por triplicado en placas de 96 hoyos. La proliferación de las células T y B fue monitoreada en presencia de los anticuerpos  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 y de LPS, respectivamente. Las células fueron cultivadas 48 horas y luego 0,5 $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-Timidina fueron agregados para luego continuar el cultivo 16 horas más. Una vez finalizado el cultivo, las células fueron recolectadas y la radioactividad incorporada fue determinada en un contador de centelleo. En esta tabla se muestra la media  $\pm$  el desvío estándar de los valores obtenidos de los cultivos realizados por triplicado.

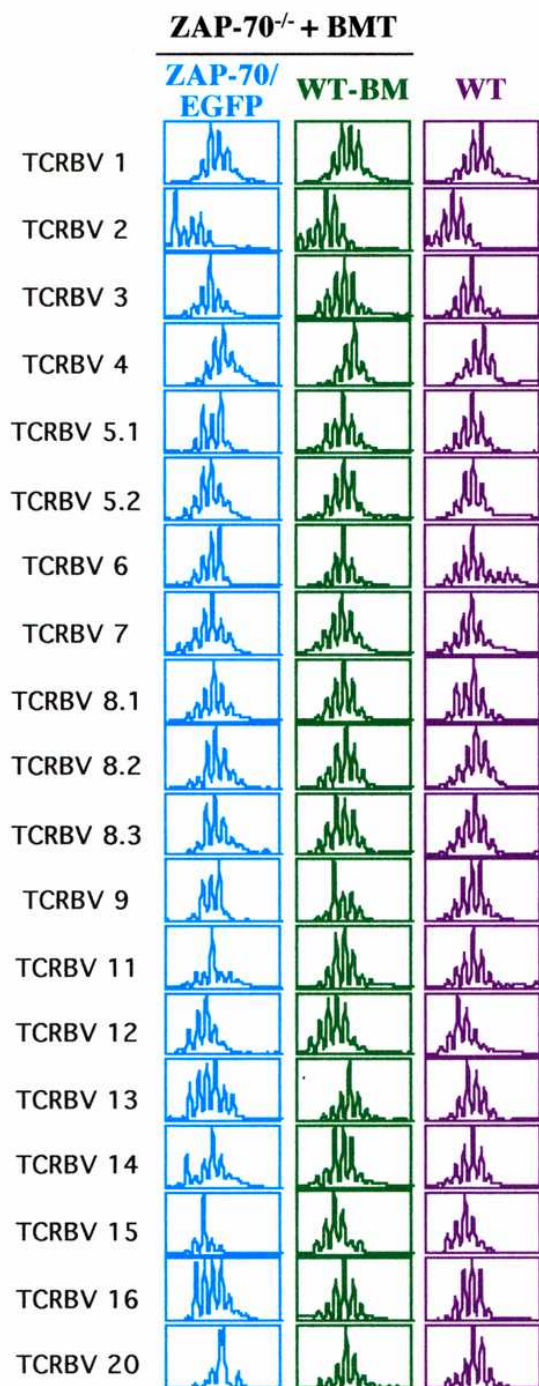
observada en los ratones WT (Figura 11-C). Sin embargo, esta observación no puede ser considerada como una afirmación ya que no se conoce si el anticuerpo  $\alpha$ -ZAP-70 utilizado reconoce con la misma afinidad la proteína ZAP-70 humana y murina. De todas maneras, estas observaciones sugieren que la introducción mediada por retrovirus de ZAP-70 dentro de células progenitoras hematopoyéticas resulta en una fuerte expresión de la proteína en células T esplénicas diferenciadas.

Finalmente, para estudiar la capacidad proliferativa de los linfocitos T reconstituidos bajo estimulación del TCR, los esplenocitos de los ratones tratados fueron activados *in vitro* y se midió la capacidad de los mismos a incorporar  $^3\text{H}$ -timidina. La incorporación de esta base radio marcada fue analizada 3 días después de que las células hayan sido estimuladas con los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD28. Como se esperaba, los esplenocitos de ratones deficientes en ZAP-70 transplantados con el vector EGFP no respondieron a la estimulación, en cambio, aquellos obtenidos de ratones transplantados con ZAP-70 proliferaron de manera considerable en respuesta a la estimulación ( $P < 0,05$  comparado con esplenocitos transducidos con la EGFP) (Tabla 1). Sin embargo, el nivel de proliferación de estos últimos fue inferior al observado en esplenocitos WT o esplenocitos obtenidos de ratones WT-BM. Esta diferencia pudo estar dada por el porcentaje más bajo de células T presentes en los ratones reconstituidos con ZAP-70 comparado con los ratones WT-BM ( $13.9\% \pm 2.0\%$  vs.  $24.4\% \pm 3.6\%$ ;  $P < 0.05$ ). De este modo, cuando los esplenocitos fueron puestos en cultivo para la realización del test de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina, el número de células T en la muestra correspondiente a los ratones transducidos con ZAP-70 fue 2 veces inferior al de células T en la muestra de los ratones WT-BM. En consecuencia, el número de células capaces de proliferar e incorporar  $^3\text{H}$ -timidina en respuesta a la estimulación con los anticuerpos  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 fue inferior en el caso de los ratones ZAP-70/EGFP.

### **Repertorio del TCR de los linfocitos T reconstituidos con ZAP-70**

Debido a que el número absoluto de células T en los ratones transplantados con ZAP-70 fue inferior al observado en ratones WT, era importante caracterizar la naturaleza de estas células, especialmente la policlonalidad de las mismas. Para ello, la abundancia de cada TCRBV dentro de la población de células T fue calculada usando el método de inmunoscopia®. Este método se basa en la RT-PCR de la región hipervariable CDR3 (*complementarity determining region 3*) de las diferentes subfamilias BV de la cadena  $\beta$  del TCR. Un par de "primers"

**Figura 12** Análisis de Inmunoscopia<sup>®</sup> del repertorio TCRBV en los linfocitos T de los ratones transplantados.



**Figura 12-** Reconstitución de un repertorio de células T diverso en los ratones transplantados con ZAP-70.

El repertorio TCRBV fue estudiado comparando la abundancia de la región CDR3 de los TCRs de los linfocitos T (perfiles de inmunoscopia) en poblaciones de esplenocitos obtenidas de ratones WT y de ratones transplantados (ZAP-70<sup>-/-</sup> + BMT) con el con células progenitoras transducidas ZAP-70/EGFP o sin transducir WT-BM. Mediante una RT-PCR y utilizando 24 *primers* específicos para diferentes subfamilias de TCRs y 1 *primer* consenso para la región constante  $\beta$  (C $\beta$ ), se generaron 24 productos los cuales fueron luego amplificados en presencia de un *primer* C $\beta$  fluorescente. Los histogramas representan la intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias (eje y) en función del tamaño de la región CDR3 de cada subfamilia de TCR (eje x). Los datos presentados corresponden a la distribución de los tamaños de la región CDR3 en 19 subfamilias TCRBV obtenidos a partir de 1 de los 4 animales estudiados en cada grupo.

específico para una subfamilia dada permitirá obtener diversos fragmentos de amplificación correspondientes a los ARNs que codifican para esa cadena  $\beta$  en la población de células T estudiada. Si los tamaños de estos fragmentos siguen una distribución Gaussiana entonces la subfamilia BV en cuestión será representada de manera diversa y la misma será policlonal.

Un total de 24 RT-PCRs correspondientes a 24 subfamilias diferentes de TCRBV fueron realizadas a partir de linfocitos T esplénicos de los diferentes ratones tratados. En los ratones transducidos con el vector ZAP-70/EGFP, todas las RT-PCR efectuadas dieron señales de amplificación en cada una de las 24 diferentes subfamilias de TCRBV analizadas. Sin embargo, 5 sets de "primers" correspondientes a las subfamilias 5.3, 10, 17, 18 y 19, no permitieron obtener una amplificación óptima, aún en los ratones WT (datos no presentados). Por este motivo solo se tuvieron en cuenta los datos obtenidos de las PCRs correspondientes a las 19 subfamilias restantes. Los análisis realizados a partir de las muestras de ARN aisladas de los ratones ZAP-70/EGFP revelaron una distribución Gaussiana de los fragmentos de amplificación obtenidos para cada una de las 19 subfamilias estudiadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con los ARNs aislados de ratones WT y de ratones WT-BM (Figura 12). Estos descubrimientos demuestran que la introducción de ZAP-70 dentro de células progenitoras promueve la selección en el timo de células T policlonales, las cuales una vez que han quitado dicho órgano son capaces de permanecer en la sangre periferia de los ratones transplantados conservando su policlonalidad. Los perfiles obtenidos para 3 subfamilias TCRBV (9, 11 y 20) en los ratones reconstituidos con ZAP-70 no fueron estrictamente Gaussianos (Figura 12) y para determinar cual podría ser la consecuencia fisiológica de ello debería realizarse un estudio más detallado.

### **Diferenciación y función de las líneas hematopoyéticas no-T luego de la transferencia del gen de ZAP-70 dentro de las células progenitoras**

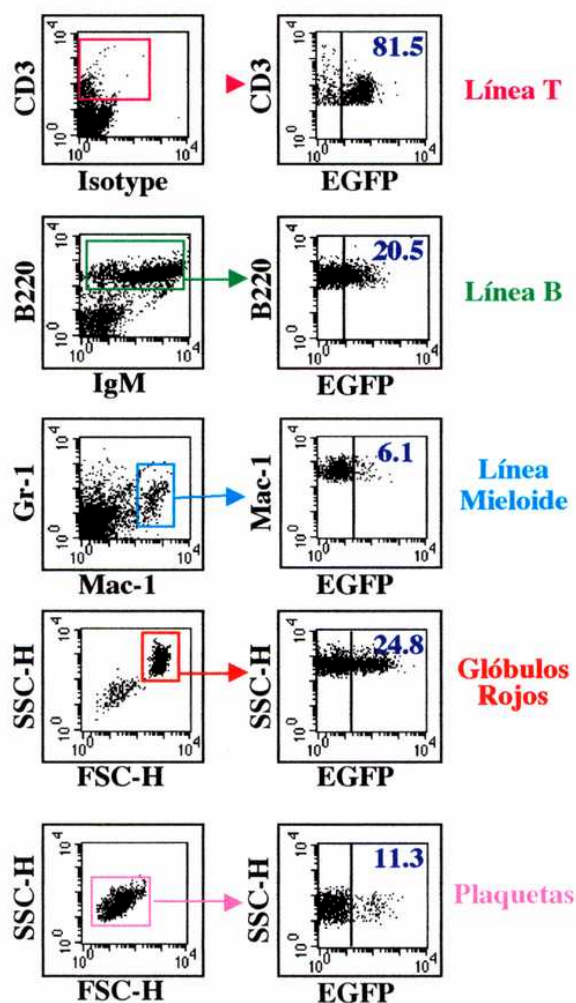
Debido a que ZAP-70 solo se expresa en linfocitos T y células NK, es importante determinar si la expresión ectópica de esta proteína en células hematopoyéticas no T, provoca efectos adversos en la diferenciación y función de estas últimas. La transducción de células progenitoras hematopoyéticas con el vector ZAP-70/EGFP no alteró el número absoluto de células blancas y rojas de la sangre, ni el número de células B o células mieloides esplénicas. Estas poblaciones estuvieron representadas de manera equivalente a las observadas en ratones WT o WT-BM (Tabla 2). Los ratones ZAP-70 KO transducidos con el vector EGFP presentaron un número incrementado de células mieloides esplénicas en comparación con los otros grupos de animales transplantados. Esto estuvo asociado a una esplenomegalia observada en 2 de los 3

**Tabla 2** Determinación del número de células hematopoyéticas no-T en la sangre periférica de los ratones transplantados con el gen "wild-type" de ZAP-70.

|                               | n | WBC/ml         | RBC/ $\mu$ l  | Células<br>B esplénicas<br>(B220 <sup>+</sup> /IgM <sup>+</sup> ) | Células<br>mieloides esplénicas<br>(Mac1 <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> ) |
|-------------------------------|---|----------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>WT</b>                     | 3 | N.D.           | N.D.          | 112.7 $\pm$ 10.6                                                  | 3.2 $\pm$ 1.1                                                              |
| Ratones ZAP-70 <sup>-/-</sup> |   |                |               |                                                                   |                                                                            |
| EGFP                          | 3 | 16.8 $\pm$ 2.2 | 8.5 $\pm$ 0.8 | 46.8 $\pm$ 40.7                                                   | 32.6 $\pm$ 29.9                                                            |
| <b>ZAP-70/EGFP</b>            | 4 | 20.9 $\pm$ 2.8 | 7.6 $\pm$ 0.5 | 58.0 $\pm$ 24.6                                                   | 3.0 $\pm$ 1.3                                                              |
| <b>WT-BM</b>                  | 4 | 17.9 $\pm$ 5.1 | 8.3 $\pm$ 0.6 | 55.6 $\pm$ 15.8                                                   | 4.9 $\pm$ 1.3                                                              |

**Tabla 2-** Diferenciación de las líneas hematopoyéticas luego de la transferencia del gen ZAP-70. Ocho semanas luego de efectuado el trasplante se contó el número de células blancas (WBC) y rojas (RBC) presentes en la sangre periférica recolectada a partir de los ratones transplantados. El número de células B y de células mieloides presentes en el bazo fue obtenido 18 semanas después de realizado el trasplante marcando cada una de estas poblaciones con los anticuerpos  $\alpha$ -B220 y  $\alpha$ -IgM específicos para las primeras, y  $\alpha$ -Mac-1 y  $\alpha$ -Gr-1 específicos para las células mieloides. Como control se utilizaron ratones WT sin transplantar, excepto para la determinación del número de células blancas y rojas de la sangre (datos no determinados N.D.). Todos los valores presentados en la tabla corresponden al número de células  $\times 10^6 \pm$  desvío estándar.

**Figura 13** Expresión de la EGFP en las diferentes líneas hematopoyéticas de los ratones transplantados con el vector ZAP-70/EGFP.



**Figura 13-** Los porcentajes de células EGFP<sup>+</sup> pertenecientes a las diferentes líneas hematopoyéticas presentes en los ratones ZAP-70/EGFP, fueron monitoreados por FACS. Las células esplénicas T, B y mieloides fueron seleccionadas según la expresión de los marcadores CD3, B220 y Gr-1/Mac-1, respectivamente (poblaciones encuadradas en los *plots* del panel izquierdo). Los glóbulos rojos y las plaquetas fueron identificados sobre la base de sus tamaños respectivos, según el perfil FSC/SSC obtenido por FACS para cada una de estas poblaciones y conforme a lo descrito previamente por Persons y Otsu (Persons DA et al.,1997; Otsu M et al.,2000). La expresión de la EGFP en cada línea hematopoyética fue determinada en cada una de las poblaciones seleccionadas, y el porcentaje de células EGFP<sup>+</sup> es indicado en cada caso (panel derecho). Los datos presentados corresponden a 1 de los 3 animales tratados en este grupo.

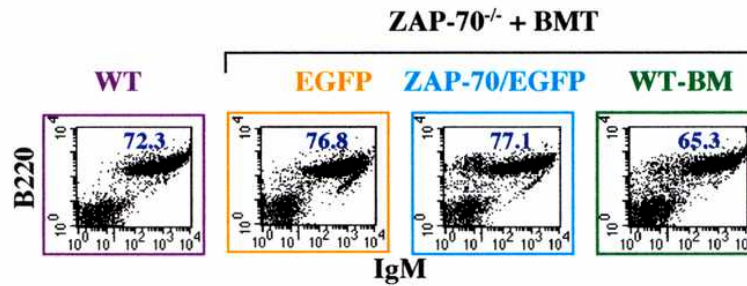
ratones transplantados con este vector. Este fenotipo probablemente fue causado por el estado de inmunosupresión de los animales, especialmente en el contexto de una irradiación letal seguida del trasplante de médula ósea. Además, este fenotipo también ha sido observado en otros modelos de ratones con SCID, específicamente ratones X-SCID irradiados letalmente y transplantados con células progenitoras X-SCID (Otsu M and Candotti F, datos no publicados).

Para evaluar la presencia del vector ZAP-70/EGFP en las diferentes líneas hematopoyéticas, las células esplénicas y sanguíneas de los ratones transplantados fueron marcadas con anticuerpos específicos y la expresión de la EGFP fue medida. Como se esperaba, en los ratones transplantados con ZAP-70 la mayoría de las células T ( $CD3^+$ ) periféricas fueron EGFP<sup>+</sup>, confirmando que la presencia de ZAP-70 es indispensable para la diferenciación de esta línea linfóide (Figura 13). Pero la expresión del transgén también fue detectada en todas las demás líneas hematopoyéticas analizadas, incluyendo los granulocitos (Gr-1) los cuales poseen una vida media relativamente corta en la sangre periférica. Esta observación sugiere que al menos una parte de las células lin<sup>-</sup> transducidas inicialmente fueron progenitores pluripotentes inmaduros capaces de diferenciarse renovando diferentes poblaciones de células hematopoyéticas, incluyendo los granulocitos. En las diferentes líneas hematopoyéticas no T la expresión del transgén varió entre 6% y 25% de las células y estos porcentajes también fueron diferentes entre los diferentes ratones transducidos con el vector ZAP-70/EGFP (Figura 13).

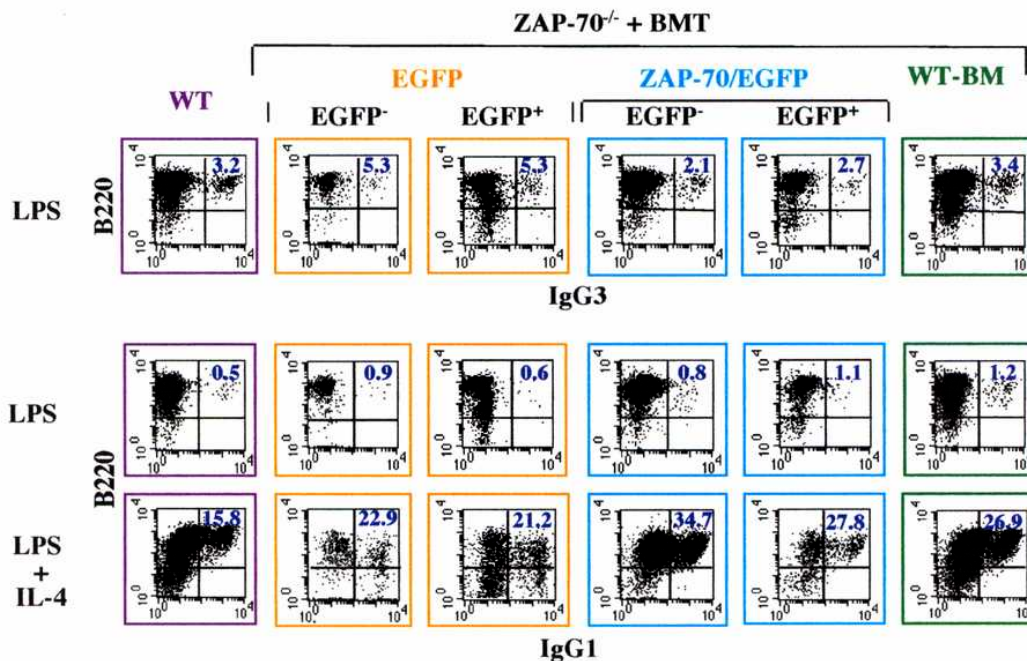
En lo que respecta a la línea hematopoyética B, el porcentaje de células esplénicas expresando los marcadores B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> característicos de linfocitos B fue equivalente en todos los ratones tratados y en los ratones WT, variando entre 65% y 77% (Figura 14-A). Es importante remarcar que la introducción de ZAP-70 no afectó de manera adversa la capacidad de los linfocitos B a proliferar luego de su estimulación con lipopolisacáridos (LPS). Todos los esplenocitos provenientes de los diferentes grupos de ratones transplantados proliferaron a niveles equivalentes en respuesta al LPS (Tabla 1).

Posteriormente, la función de los linfocitos B fue monitoreada en un ensayo *in vitro* de conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas presentes sobre la superficie de las células B. Como ha sido descrito en la literatura, la estimulación de los linfocitos B con LPS conduce a una permutación de las inmunoglobulinas de membrana, característica de las células B funcionales. Si las células son estimuladas con LPS una de las inmunoglobulinas de membrana expresadas es la IgG3, en cambio, cuando las células son estimuladas con LPS + IL-4, la inmunoglobulina que se expresa es la IgG1 [395, 396]. Bajo tratamiento con LPS, aproximadamente 2.5 a 4% de los

**Figura 14-A** Porcentaje de células B ( $B220^+$ ) en el bazo de los ratones transplantados y de ratones "wild-type" sin transplantar



**Figura 14-B** Ensayo in vitro de conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas de las células B en los diferentes ratones transplantados.



**Figura 14-** Desarrollo de células B y conmutación del isotipo de las inmunoglobulinas luego de la terapia génica para ZAP-70. **A-** El porcentaje de células B esplénicas presentes en los ratones WT y en los ratones EGFP, ZAP-70/EGFP y WT-BM fueron monitoreados por FACS mediante la utilización de anticuerpos específicos. En los gráficos se muestra el porcentaje de células expresando el marcador B220, presente sobre la superficie de los linfocitos B. **B-** Para estudiar la conmutación de las inmunoglobulinas IgG3 e IgG1, los esplenocitos fueron cultivados en presencia de LPS o de LPS + IL-4, respectivamente. Después de 6 días de cultivo, las células fueron colectadas, marcadas con anticuerpos  $\alpha$ -IgG1 y  $\alpha$ -IgG3 y analizadas por FACS. En los diferentes casos se muestran los porcentajes de células B  $B220^+/IgG3^+$  y  $B220^+/IgG1^+$ . En los animales EGFP y ZAP-70/EGFP estos porcentajes son representados en las poblaciones de células que no expresan (EGFP<sup>-</sup>) o que expresan el transgén (EGFP<sup>+</sup>). Los datos presentados son representativos de 3 animales analizados en cada grupo.

esplenocitos expresaron la IgG3, independientemente del tipo de trasplante (Figura 14-B). La expresión de IgG1 fue muy baja en todas las poblaciones de linfocitos B tratados con LPS solo (<1%), sin embargo, la combinación de LPS con IL-4 resultó en la expresión de IgG1 en aproximadamente 15 a 35% de células B de los distintos ratones analizados (Figura 14-B). Es importante destacar que la presencia del transgén ZAP-70 no afectó esta respuesta, ya que lo observado en los esplenocitos EGFP<sup>+</sup> fue equivalente a lo observado en aquellos transducidos con el vector ZAP-70/EGFP (EGFP<sup>+</sup>) (Figura 14-B). De este modo, la diferenciación y la función de los linfocitos B no parecerían verse afectadas de manera adversa por la introducción de ZAP-70 dentro de las células progenitoras hematopoyéticas.

### C- Discusión

La técnica de transferencia de genes mediada por vectores retrovirales fue puesta en práctica hace ya algunos años, pero los niveles de transducción de células humanas que se obtenían no superaban el 10%. Gracias a los avances realizados en el laboratorio como así también a los hechos por otros grupos, ya sea en la generación de nuevos vectores retrovirales o en la optimización de los protocolos de transferencia de genes, los niveles de transducción de células humanas aumentaron considerablemente. La transducción de células T primarias humanas es una tarea dificultosa, y más aún si se trata de células inmunodeficientes. En este trabajo hemos sido capaces de realizar la transferencia de genes mediada por retrovirus en células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas deficientes en ZAP-70. Los resultados obtenidos muestran claramente que esta estrategia puede ser utilizada exitosamente para introducir el gen "wild-type" de ZAP-70 dentro de dichas células.

Como ha sido reportado previamente [380] y como se describe en este trabajo, la utilización de la EGFP como gen marcador facilita considerablemente la identificación de los clones de las líneas de empaquetaje. En la línea de empaquetaje PG13 la expresión de la EGFP correlacionó con la capacidad infectiva de los diferentes clones, es decir que la más alta eficacia de transducción fue obtenida utilizando el clón en el cual el nivel de expresión de la EGFP fue máximo. Según estos criterios de selección se pudieron establecer los dos clones, PG13/LZRS-EGFP-clón 7 y PG13/LZRS-ZAP-70/EGFP-clón 10, a partir de las cuales se obtuvieron sobrenadantes retrovirales con altos títulos infecciosos. Utilizando estos

sobrenadantes se pudieron alcanzar niveles de transducción de células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas deficientes en ZAP-70 superiores a 50%.

El éxito de la transferencia del gen de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas deficientes en ZAP-70 se debió también a las condiciones de cultivo utilizadas. En efecto, las células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes deficientes en ZAP-70 pudieron ser cultivadas *in vitro* gracias a la utilización del medio de cultivo Yssel. Dicho medio contiene una combinación de factores de crecimiento indispensables para la expansión de este tipo de células. Además, el medio Yssel contiene suero humano en lugar de suero fetal bovino, siendo este último no recomendado para el cultivo *ex vivo* de células humanas que pudieran ser reinyectadas en pacientes.

Las células T CD4<sup>+</sup> deficientes en ZAP-70 transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP expresaron niveles ectópicos de ZAP-70 entre dos y tres veces superiores al nivel de expresión endógeno de la proteína, observado en células T control. Este descubrimiento demuestra que el promotor retroviral LTR presente en el vector retroviral utilizado en este estudio es lo suficientemente potente como para permitir una expresión fuerte del transgén ZAP-70. En lo que respecta a la capacidad de ZAP-70 ectópica para reconstituir las funciones defectuosas de las células de pacientes, la expresión de la misma en las células transducidas permitió aumentar considerablemente el nivel de activación de las MAPKs inducido por la estimulación del TCR. Aunque el mismo permaneció relativamente más bajo que en las células T control, cabe remarcar que al momento en el que fue realizada la experiencia 30% de las células transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP fueron EGFP<sup>+</sup> (y por inferencia ZAP-70<sup>+</sup>). De este modo, los datos sugieren fuertemente que las células transducidas con ZAP-70 y las células T control, responden de manera similar a la estimulación del TCR. Estas observaciones contrastaron con las observadas en células de pacientes sin transducir, donde el nivel de activación de las MAPKs fue mínimo.

Previamente se mencionó que las células deficientes en ZAP-70 presentan defectos de proliferación y que las mismas no son capaces de producir citoquinas. Aquí, se muestra que estas células fueron capaces de proliferar y secretar IL-2 solamente cuando el gen "wild-type" de ZAP-70 fue introducido en las mismas. Es probable que la reconstitución de estas respuestas haya sido la causa de la ventaja selectiva de crecimiento observada en las células transducidas con ZAP-70. Dicha ventaja selectiva fue puesta de manifiesto por un significativo aumento en el número de

células expresando la EGFP, luego de la expansión *in vitro* de las mismas (30% a más del 90%). La ventaja selectiva de crecimiento también ha sido observada por otros grupos en experimentos *in vitro* de transducción de líneas celulares B deficientes en  $\gamma c$  [397], e *in vivo* luego de la transferencia del gene  $\gamma c$  en una pequeña fracción de células progenitoras CD34<sup>+</sup> deficientes en esta proteína [312].

Como venimos de ver, la transferencia mediada por retrovirus del gen “*wild-type*” de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> deficientes en esta proteína permite reconstituir las funciones defectuosas de las mismas. La transducción *ex vivo* de las células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes y la posterior reimplantación de las células reconstituidas en la sangre de los mismos podría restaurar inmediatamente su sistema inmunológico. Esta estrategia sería crucial para los pacientes los cuales recuperando la función CD4 podrían deshacerse de las infecciones oportunistas. Esto les permitiría evolucionar hacia un mejor estado sanitario y seguir tratamientos alternativos como por ejemplo un trasplante de médula ósea. Es claro que cuanto mejor sea el estado de salud del paciente, mucho más exitosas serán las terapias alternativas que se apliquen.

Aunque estos razonamientos pueden ser atractivos y hasta convincentes, uno de los grandes inconvenientes de este tipo de estrategia es la ausencia de reconstitución de la subpoblación de células T CD8<sup>+</sup>. Las células T CD8<sup>+</sup> o linfocitos T citotóxicos juegan un papel central en la respuesta inmune destruyendo células blanco infectadas con patógenos virales. Aunque la deficiencia de CD8<sup>+</sup> puede ser compatible con la vida, la ausencia de esta función en el sistema de defensa del organismo podría tener consecuencias adversas frente a infecciones con patógenos raros o muy virulentos. Para contornear este inconveniente se decidió utilizar la terapia génica basada en la transferencia del gen “*wild-type*” de ZAP-70 dentro de células progenitoras de la médula ósea. En teoría, este tipo de estrategia permitiría el desarrollo de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> funcionales en la sangre periférica. De este modo, decidimos desarrollar un estudio pre-clínico de terapia génica para el tratamiento de la inmunodeficiencia en ZAP-70 utilizando células progenitoras. Estos estudios fueron realizados en un modelo animal de ratones ZAP-70 KO, los cuales recapitulan muchas de las características de los pacientes deficientes en ZAP-70. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que en dichos ratones, el desarrollo y las funciones de los linfocitos T pueden ser reconstituidos mediante el trasplante de células progenitoras de la médula ósea transducidas con un retrovirus conteniendo el gen “*wild-type*” de ZAP-70.

El análisis de las diferentes poblaciones de células hematopoyéticas en los ratones reconstituidos revelaron una expresión ectópica de ZAP-70 en la gran mayoría de los linfocitos T. Aunque se pudieron detectar células transducidas pertenecientes a otras líneas hematopoyéticas, el porcentaje de células no T expresando ZAP-70 fue muy variado, según la línea y en todos los casos inferior al observado para los linfocitos T. Por otro lado, la proliferación y la permutación del isotipo de inmunoglobulinas de las células B no se vio afectado por la presencia del transgén ZAP-70. Esto podría sugerir que la expresión ectópica de ZAP-70 en las líneas hematopoyéticas no-T no afecta negativamente el desarrollo y la función de estas células. Sin embargo, para determinar con exactitud cuales son los efectos de la expresión ectópica de ZAP-70 en las líneas no-T es necesaria la realización de trabajos suplementarios más detallados. Del mismo modo, un análisis exhaustivo también permitiría determinar las causas de las variaciones en el nivel de expresión de ZAP-70 en las distintas líneas hematopoyéticas no-T.

A través de su TCR las células T reconocen los antígenos presentados por las moléculas del MHC. Gracias a la diversidad de TCR adquirida durante la diferenciación en el timo, la población de linfocitos T de un individuo es capaz de proteger al mismo de una gran cantidad de antígenos. Esta diversidad esta determinada por el repertorio de los diferentes clones de TCRs presentes sobre la superficie de las células T periféricas. De este modo, el repertorio de TCRs será diverso si el mismo es policlonal.

Aunque en los ratones transplantados con ZAP-70 el número de células T periféricas fue 2 veces inferior al observado en los ratones WT control, el repertorio de TCRs de las células reconstituidas fue policlonal, equivalente al observado en ratones control. Sin embargo, en 3 de las 19 subfamilias TCRBV analizadas ciertos clones estuvieron menos representados que en los ratones WT control. Las consecuencias fisiológicas de esto deberían ser determinadas en un estudio en profundidad. De todos modos existen antecedentes que muestran que un número reducido de células T funcionales es suficiente para la protección de un individuo. Esto pudo ser observado en un paciente deficiente en ZAP-70 transplantado con una médula ósea haploidéntica, donde el número de células T funcionales provenientes del donante no superó el 6% ( $6\% \pm 2\%$ ) y sin embargo eso fue suficiente para mediar las funciones de inmunidad específica del paciente [280].

En lo que respecta a la vida media de una célula T y a su renovación en la sangre periférica, algunos de los datos obtenidos en los ensayos clínicos de terapia génica para la

deficiencia en ADA muestran que células T transducidas pueden ser encontradas en sangre de los pacientes hasta 10 años después de realizada la implantación de las mismas [398]. Aún cuando estos datos demuestran que una célula T puede permanecer durante largos períodos de tiempo en la sangre periférica de un individuo, es poco probable que una misma célula sea funcional durante toda la vida de ese individuo.

Como mantener entonces una población de linfocitos T funcionales durante toda la vida de un paciente deficiente en ZAP-70 transplantado?

La capacidad de auto-renovación de las células progenitoras pluripotentes de la médula ósea asegura un reservorio de células indiferenciadas, capaces de originar diferentes poblaciones de células hematopoyéticas a lo largo de toda la vida de un individuo. De igual manera, las células progenitoras pluripotentes transducidas con el gen "*wild-type*" de ZAP-70 podrán permanecer en la médula ósea e ir originando nuevas células T expresando ZAP-70 que reemplazarán o sustituirán aquellos linfocitos T que pudieran desaparecer con el transcurso del tiempo. Aunque la identidad de una célula progenitora pluripotente es muy difícil a determinar, se sabe que el tratamiento con 5-FU y la eliminación de las células  $\text{lin}^+$  de la médula permiten enriquecer de manera considerable el número de células pluripotentes. Teniendo en cuenta que en los procesos de selección de células progenitoras utilizados en este trabajo, ambos procedimientos fueron aplicados, puede asumirse que en la población de células transducidas con ZAP-70 que fueron inyectadas en los ratones ZAP-KO, un porcentaje de las mismas fueron células progenitoras pluripotentes. Además, el hecho que a 18 semanas después del trasplante todas las poblaciones de células hematopoyéticas analizadas expresaron la EGFP sugiere fuertemente que al menos algún progenitor hematopoyético muy primitivo fue transducido. Por el contrario, es seguro que muchas de las células transducidas no fueron células progenitoras pluripotentes, porque mientras que el porcentaje de células  $\text{lin}^-$  transducidas inicialmente fue 80%, los porcentajes de células diferenciadas no-T llevando el vector ZAP-70/EGFP no superaron el 25% (6% a 25%).

Todas estas observaciones sugieren que la transferencia del gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células progenitoras y el posterior trasplante de las mismas en los pacientes deficientes en ZAP-70 podría permitir la reconstitución duradera y hasta quizás definitiva del sistema inmunitario de estos pacientes. Sin embargo, un cierto número de parámetros aún deben ser evaluados para asegurar que esta estrategia no presenta efectos adversos a largo plazo.

Como ha sido presentado en la introducción general de este manuscrito, dos de los 11 pacientes con X-SCID que fueron tratados por terapia génica, dos presentaron casos de leucemia con un alto grado de probabilidad de que la misma haya sido inducida por el sitio de integración del vector retroviral utilizado para la transferencia del gen terapéutico (ver ítem II.4.2.a. del capítulo V) [378]. Los efectos adversos de la terapia génica en estos dos pacientes han planteado nuevos interrogantes sobre los verdaderos riesgos de oncogénesis insercional asociada a los vectores retrovirales. Los estudios pre-clínicos de terapia génica efectuados para la X-SCID no mostraron evidencias de leucemia u otras formas de cáncer, y lo mismo ha ocurrido con diversos ensayos de terapia génica que han utilizado vectores retrovirales. Como una de las principales prioridades en el establecimiento de un ensayo clínico es preservar al paciente, es indispensable replantearse seriamente cual es el valor predictivo de los modelos animales. Los ensayos pre-clínicos efectuados en animales son los que reproducen de manera más próxima las condiciones clínicas en las que los pacientes son tratados. La realización de nuevos estudios en ratones X-SCID permitirían determinar si el riesgo de leucemia observado en los pacientes X-SCID tratados por terapia génica es: 1) específico para el transgén  $\gamma c$  en particular; 2) relativo a la enorme presión de selección para la diferenciación de las células transducidas con dicho gen; 3) relativo a características intrínsecas del tipo de células transducidas; o 4) relativo al estado del paciente (recipiente) en donde las células son inyectadas.

En el contexto de los resultados de los ensayos pre-clínicos de terapia génica para la inmunodeficiencia en ZAP-70 presentados en esta Tesis, es imperativo evaluar si el tratamiento puede ocasionar riesgos de leucemia. Aunque el vector retroviral utilizado en estos ensayos (LZRS) no es exactamente el mismo que el utilizado en los pacientes X-SCID (MGF), ambos vectores son bastante similares y los dos derivan del mismo oncoretrovirus MLV. El diseño de nuevos vectores portando el gen ZAP-70 permitiría reducir algunos de los riesgos asociados a los mismos. La creación de vectores con genes suicidas (HSV-TK) facilitaría la eliminación de las células transducidas en caso de desarrollo de una leucemia. Otra posibilidad es la incorporación en el vector retroviral de una secuencia aisladora conocida como "*RNA insulator*" ubicada en ambos extremos del vector. Este tipo de secuencia es una señal fuerte de terminación / poliadenilación que previene la interacción de las secuencias *enhancers* con genes vecinos al sitio de integración del vector retroviral [399-401].

A diferencia de la cadena  $\gamma c$  cuya expresión es detectada en una amplia variedad de células hematopoyéticas, ZAP-70 es solo expresada en células T, NK y en una población de

células B inmaduras. La utilización de vectores con promotores ubiquitarios como es el caso del vector LZRS, puede traducirse en un riesgo adicional para el desarrollo de leucemias u otros tipos de cáncer de la sangre originados en líneas hematopoyéticas no-T que expresen ZAP-70 de manera ectópica. Recientemente se ha demostrado que ZAP-70 es expresada en células B leucémicas, en un caso particular de leucemia linfocítica crónica (CLL) donde los genes para la región variable de las inmunoglobulinas no están mutados [387, 402] aunque no puede asegurarse que ZAP-70 sea la causa del desarrollo de la CLL, el nivel de la quinasa correlaciona con la progresión de la enfermedad y con el estado de activación de las células B leucémicas [387, 402]. Estos descubrimientos advierten sobre la posibilidad que la expresión de ZAP-70 en células B proporcione un riesgo adicional para el desarrollo de una CLL. Una posibilidad para contornear este problema es la utilización de vectores con promotores específicos, capaces de funcionar solo en células T. Recientemente se ha diseñado un vector lentiviral SIN (*Self-inactivating*) con la región U3 de la LTR3' eliminada (LTR3' $\Delta$ U3), y con las secuencias promotoras del gen CD4, incluyendo un *enhancer* proximal y la exclusión de un *silencer* que impide que el promotor sea funcional en las células T CD8 [403]. El diseño de un vector donde ZAP-70 sea regulada por este promotor y la introducción del mismo en HSCs permitiría que la proteína sea expresada solo en la línea hematopoyética T derivada de las células progenitoras transducidas.

Es importante destacar que si bien el vector retroviral puede ser la causa de la leucemia observada en los pacientes X-SCID, también existen otros factores de riesgo que pueden haber contribuido al desarrollo de este tipo de cáncer y que deben ser tenidos en cuenta en futuros estudios pre-clínicos de terapia génica, incluidos aquellos para la inmunodeficiencia en ZAP-70. Algunos de los factores que pueden estar al origen de un proceso leucemogénico son:

**El contexto neonatal vs. adulto:** Es interesante remarcar que ninguno de los estudio pre-clínicos de transferencia de genes realizados en ratones fueron hechos en neonatos. En cambio, los dos niños X-SCID tratados por terapia génica que desarrollaron posteriormente la leucemia, ambos fueron transplantados en período neonatal (1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> mes de vida). Recientemente, Min y colaboradores demostraron que la proliferación de células T en ratones neonatos es significativamente superior a la de los ratones adultos, indicando que la presión para la expansión de estas células es mucho mayor durante el período neonatal [404]. Un incremento en la expansión celular en los neonatos podría proporcionarles un riesgo adicional para el desarrollo de una leucemia. En el caso de la inmunodeficiencia en ZAP-70, las HSCs transducidas con un vector

retroviral llevando el gen ZAP-70 deberían ser inyectadas en ratones ZAP-70 KO neonatos (24 horas después del nacimiento) y estudiar si en tal situación los animales desarrollan leucemias.

**La fuerte presión selectiva debida al fenotipo de las SCIDs:** Una de las características de las SCIDs que hacen de esta enfermedad un buen candidato para la terapia génica es una presión de selección que en teoría favorece la diferenciación de las células linfoides reconstituidas. Presiones de selección diferentes pueden jugar un rol importante en el establecimiento de un proceso leucemogénico tal como el de las leucemias observadas en los pacientes X-SCID. En los ensayos pre-clínicos para esta inmunodeficiencia, los animales utilizados fueron condicionados con una irradiación letal antes del trasplante, en cambio, en los ensayos clínicos los pacientes fueron trasplantados sin condicionamiento alguno. Estas diferencias afectan diferencialmente la presión de selección en un caso u otro. De este modo, es importante definir como ocurre la selección frente a diferentes situaciones de condicionamiento, y como las mismas pueden modificar el riesgo de desarrollo de leucemias.

**Las características de las HSCs y la influencia sobre la integración del vector retroviral:** Las HSCs de la médula ósea utilizadas en los estudios realizados en ratones no son estrictamente las mismas que las que han sido empleadas en los estudios con humanos. En el primer caso, las HSCs son poblaciones lin<sup>-</sup> o poblaciones celulares totales obtenidas de la médula ósea de animales tratados con 5-FU. En el caso de humanos, las células empleadas son células de la médula ósea CD34<sup>+</sup>, y de acuerdo a la expresión de este marcador las mismas son consideradas más o menos inmaduras. La integración de los retrovirus parece realizarse a nivel de la zona de eucromatina de los cromosomas, con lo cual existe un mayor riesgo de inserción en un región transcripcionalmente activa. Trabajos recientes han demostrado la presencia de zonas "calientes" dentro del genoma donde los retrovirus se integran de manera preferencial [405, 406]. Sin embargo, aún no ha sido determinado si la identidad de las HSCs a ser transducidas puede modular de manera diferente la especificidad de los sitios de integración de los retrovirus.

**El fondo genético y los efectos de las citoquinas:** El fondo genético de casi todos los ratones utilizados en ensayos pre-clínicos de terapia génica es el de los animales C57/B16. En estos animales la respuesta celular T esta claramente desviada hacia la línea Th1, con el patrón de citoquinas característico de la misma. Por el contrario, en humanos la respuesta T esta dada por células Th1 y también Th2. De este modo, es importante determinar si los micro ambientes determinados por diferentes citoquinas *in vivo* puede modular la proliferación de las células T y un eventual riesgo de leucemia. Esto debería ser evaluado en ratones C57/B16 cruzados con ratones BALB/c que presentan una respuesta Th2.

**El medio externo:** En la mayoría de los laboratorios donde se han realizado ensayos pre-clínicos con ratones SCIDs, los animales son mantenidos en ambientes especiales, en general libre de patógenos y muchas veces bajo esterilidad. Es claro que este no es el caso de los pacientes transplantados, los cuales viven expuestos a numerosos microorganismos, patógenos, etc. Una vez más, es importante determinar como el medioambiente puede modular el riesgo de leucemia, y para ello, los ratones reconstituidos deben ser expuestos a condiciones similares a la que los pacientes encuentran luego de ser transplantados.

Nuestros descubrimientos demuestran que la transferencia del gen ZAP-70 dentro de células progenitoras puede ser un tratamiento exitoso para la deficiencia en ZAP-70. Los datos aquí presentados proporcionan las bases para el futuro establecimiento de un protocolo clínico de terapia génica para esta inmunodeficiencia. No obstante es indispensable que el análisis de los posibles riesgos de leucemia sea realizado en profundidad y de manera exhaustiva. Al mismo tiempo, el diseño de vectores más seguros y más fiables permitirá en gran medida eliminar algunos de esos riesgos, en particular aquellos asociados con la oncogénesis insercional.

Creo que sería justo concluir esta parte del manuscrito diciendo que se ha llegado a un momento en donde el aporte de la investigación fundamental es absolutamente necesario para intentar responder a los numerosos interrogantes a los cuales la comunidad científica interesada en la terapia génica esta confrontada.

## *Conclusión General*

## Conclusión General

---

La extraordinaria variación de actividades fisiológicas que muestran los seres vivos y la especificidad propia de cada especie, se deben principalmente a la presencia de las proteínas. Proteínas que son capaces de exhibir actividades catalíticas, de transporte y almacenamiento, de soporte mecánico, como factores de crecimiento y diferenciación como receptores de membrana, de anticuerpos, de adhesión y de coordinación de movimientos. Los organismos tienden a divergir entre sí por el efecto simultáneo de la mutación y la selección natural. Este fenómeno que es apreciado en la enorme variedad de especies distintas que conforman los ecosistemas, es el efecto macroscópico de los pequeños cambios producidos y acumulados a nivel molecular. De igual forma que las especies se clasifican por el parecido de sus parámetros morfológicos, las proteínas se clasifican por su parecido en secuencia. Si el porcentaje de similitud es significativamente elevado podemos concluir que ambas secuencias son homólogas. La homología entre secuencias, además de sugerir un mismo origen filogenético, frecuentemente nos indica una correlación funcional de las proteínas.

La familia de proteínas tirosina quinasas Syk está constituida por dos proteínas homólogas, ZAP-70 y Syk. Estas dos quinasas expresadas en diferentes células hematopoyéticas, comparten numerosas características entre sí, a nivel de sus estructuras y secuencias. Aunque en ciertos casos las funciones de estas quinasas pueden ser redundantes, en otros, las funciones de estas dos proteínas divergen considerablemente.

En la primera parte del trabajo de Tesis presentado en este manuscrito se estudió comparativamente el papel que desempeñan ZAP-70 y Syk en los eventos precoces de señalización vía el TCR en los linfocitos T. En este estudio que podría definirse como la parte de investigación básica de esta Tesis, se pudo establecer un original modelo celular basado en células T primarias humanas y en líneas celulares T expresando de manera diferencial estas dos proteínas tirosina quinasa, lo cual nos permitió revelar por primera vez importantes diferencias entre ZAP-70 y Syk. Algunos de los más importantes descubrimientos realizados en este trabajo se detallan a continuación:

- Utilizando una condición de cultivo diseñada por el Dr. Hans Yssel se pudo realizar el cultivo de células T primarias humanas deficientes en ZAP-70 que expresan Syk (ZAP-70<sup>-</sup>/Syk<sup>+</sup>) y el de células T control, lo cual nos permitió efectuar por primera vez un estudio comparativo

entre ZAP-70 y Syk en un contexto celular más fisiológico que el de las líneas celulares transformadas.

- A diferencia de otros grupos, hemos sido capaces de generar líneas celulares T expresando de manera estable la quinasa Syk en ausencia de ZAP-70. La utilización de una original estrategia basada en la técnica de transferencia de genes mediada por un vector retroviral derivado de MLV portando el ADNc del gen *Syk*, la proteína pudo ser expresada a niveles moderados, eliminando los efectos citotóxicos que la misma presenta cuando es expresada fuertemente.
- Utilizando estos dos modelos de células T pudimos demostrar que ZAP-70 y Syk difieren significativamente en sus capacidades para sustentar la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del TCR, cuando las células T son estimuladas vía este receptor. En efecto, la fosforilación de  $\zeta$  es modulada positivamente por alguna función aportada exclusivamente por ZAP-70 la cual no puede ser sustituida por la acción de su quinasa homóloga Syk.
- ZAP-70 y Syk difieren en sus capacidades de reclutamiento sobre el TCR. Syk es menos eficaz que ZAP-70 para asociarse con la cadena  $\zeta$  del TCR y cuando cantidades equivalentes de las dos proteínas están presentes en una misma célula, ZAP-70 es reclutada de manera preferencial.
- El reclutamiento de la Lck sobre la cadena  $\zeta$  del TCR es modulado de manera diferente por ZAP-70 y por Syk. En presencia de Syk, la cantidad de Lck asociada a  $\zeta$  es significativamente más baja que la que se observa en las células expresando ZAP-70, y el bajo nivel de reclutamiento de la Lck sobre  $\zeta$  en células expresando solo Syk está asociado a un defecto mayor en la fosforilación de esta quinasa, especialmente de su tirosina 352.
- Aquí mostramos claramente que ZAP-70 modula positivamente el nivel de fosforilación de Syk inducido por la estimulación del TCR. Estas observaciones son avaladas por un reciente descubrimiento que demuestra que la expresión de ZAP-70 en células B de la leucemia linfocítica crónica resulta en un incrementada fosforilación de Syk [387].

Todos estos descubrimientos contribuyen al mejor conocimiento de como ZAP-70 y Syk son reguladas durante la activación de los linfocitos T por los antígenos. Si bien el nivel de Syk en una célula T madura es bajo, es posible que cantidades reducidas de la quinasa participen junto con ZAP-70 en la transducción de señales y en la activación en estas células. Diferentes subpoblaciones de células T más inmaduras (células T "naives") expresan niveles más elevados de Syk. Durante la diferenciación tímica, los timocitos inmaduros también expresan cantidades considerables de ambas quinasas. Igualmente, las células NK y NKT (CD3<sup>+</sup>), expresan ZAP-70 y Syk en forma conjunta.

La demostración en nuestro trabajo que ZAP-70 interviene preferencialmente en la señalización precoz vía el TCR sugiere que la presencia de Syk en aquellas células T que expresan ambas quinasas podría estar asociada a funciones menos dependientes de este receptor. Esto es respaldado por el hecho que mientras la expresión de ZAP-70 se limita principalmente a células T y NK, el espectro de expresión de Syk es mucho mas amplio, comprendiendo células que no tienen TCRs sobre su superficie. De la misma manera, la presencia de Syk en los timocitos inmaduros donde el TCR aún no es expresado puede ser importante para la señalización, probablemente vía otros receptores de citoquinas como por ejemplo el de la IL-2, donde ZAP-70 sería menos activa. Cuando el TCR madura y es expresado sobre la superficie de los timocitos más diferenciados, ZAP-70 vía la interacción con este receptor puede transformarse en la quinasa de preferencia y en consecuencia la expresión de Syk disminuye. Por último, se ha propuesto que las diferencias entre los fenotipos de la inmunodeficiencia en ZAP-70 en ratones y en humanos es debida a mecanismos de compensación existentes en estos últimos y que serían orquestados por Syk. Aunque la posibilidad es válida, es evidente que Syk no reemplaza completamente a ZAP-70, de hecho las células T CD4<sup>+</sup> de los pacientes deficientes en ZAP-70 no responden a la estimulación *in vitro* del TCR. Sin embargo, la capacidad de estas células de mantenerse y proliferar en la periferia podría bien deberse a la intervención de Syk en otras vías de señalización implicadas en la regulación homeostática de las mismas.

En la segunda parte de esta Tesis se abordó una problemática más específica, con lo cual la misma puede ser considerada como un estudio de investigación aplicada. Como ha sido explicado en la introducción general, la inmunodeficiencia en ZAP-70 es una forma rara de SCID, generalmente fatal durante la infancia de los pacientes que la padecen. Hasta el momento y

como para la mayoría de las SCIDs, el único tratamiento eficaz es el trasplante de médula ósea a partir de donantes histocompatibles. En ausencia de donantes apropiados los pacientes son transplantados con médulas no histocompatibles, lo cual incrementa considerablemente los riesgos de complicaciones inmunológicas que pueden culminar con la vida del paciente. Un tratamiento alternativo para estos niños podría ser la terapia génica.

Esta segunda parte se focalizó en un amplio estudio pre-clínico realizado *ex vivo* e *in vivo*, que tuvo como finalidad determinar las bases para el establecimiento de un protocolo de terapia génica para la inmunodeficiencia humana en ZAP-70. Utilizando un vector retroviral derivado de MLV para la transferencia del gen "*wild-type*" de ZAP-70 se obtuvieron resultados altamente satisfactorios algunos de los cuales son enumerados a continuación.

- Los resultados obtenidos muestran claramente que la transferencia de genes mediada por retrovirus puede ser utilizada exitosamente para introducir el gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas deficientes en ZAP-70.
- Las células T CD4<sup>+</sup> deficientes en ZAP-70 transducidas con el vector LZRS-ZAP-70/EGFP expresaron niveles ectópicos de ZAP-70 entre dos y tres veces superiores al nivel de expresión endógeno de la proteína, observado en células T control.
- La transferencia mediada por retrovirus del gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células T CD4<sup>+</sup> deficientes en esta proteína, permite reconstituir las funciones defectuosas de las mismas.
- La introducción de ZAP-70 en las células CD4<sup>+</sup> deficientes aisladas de pacientes se traduce en una importante ventaja selectiva de crecimiento para las mismas.
- La transferencia mediada por un vector retroviral del gen "*wild-type*" de ZAP-70 dentro de células progenitoras murinas obtenidas de la médula ósea, pudo realizarse eficazmente.
- El trasplante de células progenitoras de la médula ósea transducidas con el gen ZAP-70 dentro de ratones ZAP-70 KO permite el desarrollo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> funcionales.

- En los ratones transplantados con células progenitoras transducidas con ZAP-70, el desarrollo y las funciones de los linfocitos T pueden ser reconstituidos sin que los animales presenten signos de efectos adversos provocados por el tratamiento.
- En los ratones transplantados con células progenitoras transducidas con ZAP-70, las diferentes poblaciones de líneas hematopoyéticas no-T analizadas estuvieron bien representadas, sugiriendo que la expresión ectópica de ZAP-70 no afecta adversamente el desarrollo de las mismas. Sin embargo un estudio más detallado es necesario para confirmar cuales son los verdaderos efectos de ZAP-70 en las células no-T.
- 18 semanas después del trasplante todas las poblaciones de células hematopoyéticas analizadas expresaron la EGFP sugiriendo fuertemente que al menos algún progenitor hematopoyético muy primitivo fue transducido.

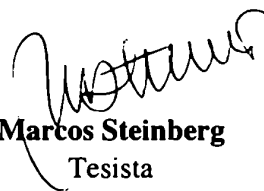
Estos descubrimientos proporcionan la primera base para el establecimiento de un protocolo clínico de terapia génica aplicable a pacientes deficientes en ZAP-70. La reconstitución del desarrollo y la funciones de las células T en los ratones ZAP-70 KO sugieren que la transferencia del gen ZAP-70 dentro de células progenitoras de la médula ósea y el trasplante de las mismas en los pacientes deficientes en ZAP-70 podría permitir una reconstitución duradera y hasta quizás definitiva de los pacientes. Sin embargo, es necesario desarrollar nuevos estudios para determinar si esta estrategia es suficiente para permitir una óptima reconstitución inmune, sin provocar efectos adversos en los pacientes tratados. Nuestro trabajo contribuye al desarrollo de la terapia génica, no solo para el tratamiento de la inmunodeficiencia en ZAP-70, sino también para el tratamiento de un gran número de enfermedades monogénicas que hasta el momento no tienen tratamientos satisfactorios.

En este mes de abril del 2003, cuando la redacción de este manuscrito de Tesis está próxima de su fin, la continuidad futura de los ensayos clínicos de terapia génica utilizando vectores retrovirales es una gran incógnita. Los casos de leucemia asociadas a los vectores retrovirales en los dos pacientes tratados por terapia génica abren un nuevo interrogatorio sobre cuales son los verdaderos riesgos de esta tecnología. La continuidad de la terapia génica depende más que nunca del aporte de la comunidad científica y médica, y de las contribuciones que

puedan realizar los organismos reguladores internacionales y las familias de pacientes implicados en los ensayos clínicos. Hoy, en el mundo entero, cientos de pacientes víctimas de una inmunodeficiencia severa siguen muy de cerca la evolución de la terapia génica, esperanzados en que algún día esta tecnología pueda convertirse en la cura definitiva de sus enfermedades.



**Naomi Taylor**  
Directora de Tesis



**Marcos Steinberg**  
Tesisista

# *Bibliografía*

## Bibliografia

---

- 1 **Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M. and Peault, B.,** Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 2804-2808.
- 2 **Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. and Loken, M. R.,** Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38-progenitor cells. *Blood* 1991. **77**: 1218-1227.
- 3 **Keating, A., Powell, J., Takahashi, M. and Singer, J. W.,** The generation of human long-term marrow cultures from marrow depleted of Ia (HLA-DR) positive cells. *Blood* 1984. **64**: 1159-1162.
- 4 **Lu, L., Walker, D., Broxmeyer, H. E., Hoffman, R., Hu, W. and Walker, E.,** Characterization of adult human marrow hematopoietic progenitors highly enriched by two-color cell sorting with My10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies. *J Immunol* 1987. **139**: 1823-1829.
- 5 **Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I. and Dick, J. E.,** A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998. **4**: 1038-1045.
- 6 **Rodewald, H. R., Kretzschmar, K., Takeda, S., Hohl, C. and Dessing, M.,** Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *Embo J* 1994. **13**: 4229-4240.
- 7 **Ktorza, S., Blanc, C., Laurent, C., Sarun, S., Verpilleux, M. P., Debre, P. and Schmitt, C.,** Complete TCR-delta rearrangements and partial (D-J) recombination of the TCR-beta locus in CD34+7+ precursors from human cord blood. *J Immunol* 1996. **156**: 4120-4127.
- 8 **Carlyle, J. R. and Zuniga-Pflucker, J. C.,** Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* 1998. **9**: 187-197.
- 9 **Res, P. and Spits, H.,** Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol* 1999. **11**: 39-46.
- 10 **Spits, H., Blom, B., Jaleco, A. C., Weijer, K., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Heemskerk, M. H. and Res, P. C.,** Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 1998. **165**: 75-86.
- 11 **Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W. and Love, P. E.,** CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 1998. **188**: 2301-2311.
- 12 **Fowlkes, B. J., Edison, L., Mathieson, B. J. and Chused, T. M.,** Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. *J Exp Med* 1985. **162**: 802-822.
- 13 **Guidos, C. J., Weissman, I. L. and Adkins, B.,** Developmental potential of CD4-8- thymocytes. Peripheral progeny include mature CD4-8- T cells bearing alpha beta T cell receptor. *J Immunol* 1989. **142**: 3773-3780.
- 14 **Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L.,** CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 85-116.
- 15 **Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S. and Pure, E.,** Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. **86**: 6734-6738.

- 16 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986. **136**: 2348-2357.
- 17 Mosmann, T. R. and Sad, S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996. **17**: 138-146.
- 18 Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. and Dutton, R. W., Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994. **180**: 1715-1728.
- 19 Sad, S., Marcotte, R. and Mosmann, T. R., Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995. **2**: 271-279.
- 20 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995. **155**: 1151-1164.
- 21 Powrie, F., Menon, S. and Coffman, R. L., Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 3043-3049.
- 22 Li, L., Sad, S., Kagi, D. and Mosmann, T. R., CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions. *J Immunol* 1997. **158**: 4152-4161.
- 23 David, D., Bani, L., Moreau, J. L., Demaison, C., Sun, K., Salvucci, O., Nakarai, T., de Montalembert, M., Chouaib, S., Joussemet, M., Ritz, J. and Theze, J., Further analysis of interleukin-2 receptor subunit expression on the different human peripheral blood mononuclear cell subsets. *Blood* 1998. **91**: 165-172.
- 24 Weiss, A. and Littman, D. R., Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994. **76**: 263-274.
- 25 Madden, D. R., The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995. **13**: 587-622.
- 26 Garboczi, D. N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E. A., Biddison, W. E. and Wiley, D. C., Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol* 1996. **157**: 5403-5410.
- 27 Chu, D. H., Morita, C. T. and Weiss, A., The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 1998. **165**: 167-180.
- 28 Schaeffer, E. M., Debnath, J., Yap, G., McVicar, D., Liao, X. C., Littman, D. R., Sher, A., Varmus, H. E., Lenardo, M. J. and Schwartzberg, P. L., Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* 1999. **284**: 638-641.
- 29 van Leeuwen, J. E. and Samelson, L. E., T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 1999. **11**: 242-248.
- 30 Acuto, O. and Cantrell, D., T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 2000. **18**: 165-184.
- 31 Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G., Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997. **15**: 707-747.
- 32 Kuo, C. T. and Leiden, J. M., Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 1999. **17**: 149-187.
- 33 Schade, A. E. and Levine, A. D., Signal transduction through the T cell receptor is dynamically regulated by balancing kinase and phosphatase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2002. **296**: 637-643.

- 34 **Orloff, D. G., Ra, C. S., Frank, S. J., Klausner, R. D. and Kinet, J. P.**, Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature* 1990. **347**: 189-191.
- 35 **Shaw, A. S. and Dustin, M. L.**, Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997. **6**: 361-369.
- 36 **Viola, A. and Lanzavecchia, A.**, T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996. **273**: 104-106.
- 37 **Trowsdale, J.**, in Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (Ed.), *Immunology*, sixth Edn., MOSBY, London 2001, p. 105-115.
- 38 **Luescher, I. F., Vivier, E., Layer, A., Mahiou, J., Godeau, F., Malissen, B. and Romero, P.**, CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1995. **373**: 353-356.
- 39 **Renard, V., Romero, P., Vivier, E., Malissen, B. and Luescher, I. F.**, CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J Exp Med* 1996. **184**: 2439-2444.
- 40 **Garcia, K. C., Scott, C. A., Brunmark, A., Carbone, F. R., Peterson, P. A., Wilson, I. A. and Teyton, L.**, CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996. **384**: 577-581.
- 41 **June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S. and Thompson, C. B.**, Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990. **11**: 211-216.
- 42 **Nunes, J. A., Truneh, A., Olive, D. and Cantrell, D. A.**, Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J Biol Chem* 1996. **271**: 1591-1598.
- 43 **Lu, Y., Granelli-Piperno, A., Bjorndahl, J. M., Phillips, C. A. and Trevillyan, J. M.**, CD28-induced T cell activation. Evidence for a protein-tyrosine kinase signal transduction pathway. *J Immunol* 1992. **149**: 24-29.
- 44 **Corey, S. J. and Anderson, S. M.**, Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 1999. **93**: 1-14.
- 45 **Brickell, P.**, in MJ, C. (Ed.), *In pretein phosphorylation in cell growth regulation*, London 1996, p. 19-57.
- 46 **Chow, L. M. and Veillette, A.**, The Src and Csk families of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Semin Immunol* 1995. **7**: 207-226.
- 47 **Winkler, D. G., Park, I., Kim, T., Payne, N. S., Walsh, C. T., Strominger, J. L. and Shin, J.**, Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 5176-5180.
- 48 **Joung, I., Kim, T., Stolz, L. A., Payne, G., Winkler, D. G., Walsh, C. T., Strominger, J. L. and Shin, J.**, Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 5778-5782.
- 49 **Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. and Schlossman, S. F.**, The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988. **85**: 5190-5194.
- 50 **Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M. and Rose, J. K.**, The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 1989. **59**: 627-636.

- 51 **Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. and Littman, D. R.**, Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 1990. **60**: 755-765.
- 52 **Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. and Bolen, J. B.**, The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988. **55**: 301-308.
- 53 **Baldari, C. T., Telford, J. L. and Acuto, O.**, EMBO WORKSHOP REPORT: lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling Siena, Italy, November 6-10, 1999. *Embo J* 2000. **19**: 4857-4865.
- 54 **Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A. and Nakagawa, H.**, Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 1991. **351**: 69-72.
- 55 **Abraham, N. and Veillette, A.**, Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Mol Cell Biol* 1990. **10**: 5197-5206.
- 56 **Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T. and Noel, J. P.**, Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* 1996. **382**: 555-559.
- 57 **Byth, K. F., Conroy, L. A., Howlett, S., Smith, A. J., May, J., Alexander, D. R. and Holmes, N.**, CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 1996. **183**: 1707-1718.
- 58 **Kishihara, K., Penninger, J., Wallace, V. A., Kundig, T. M., Kawai, K., Wakeham, A., Timms, E., Pfeffer, K., Ohashi, P. S., Thomas, M. L. and et al.**, Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993. **74**: 143-156.
- 59 **Kung, C., Okumura, M., Seavitt, J. R., Noll, M. E., White, L. S., Pingel, J. T. and Thomas, M. L.**, CD45-associated protein is not essential for the regulation of antigen receptor-mediated signal transduction. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 3951-3955.
- 60 **Stone, J. D., Conroy, L. A., Byth, K. F., Hederer, R. A., Howlett, S., Takemoto, Y., Holmes, N. and Alexander, D. R.**, Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70. *J Immunol* 1997. **158**: 5773-5782.
- 61 **D'Oro, U., Sakaguchi, K., Appella, E. and Ashwell, J. D.**, Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 4996-5003.
- 62 **D'Oro, U. and Ashwell, J. D.**, Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* 1999. **162**: 1879-1883.
- 63 **Chow, L. M., Fournel, M., Davidson, D. and Veillette, A.**, Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 1993. **365**: 156-160.
- 64 **Orchansky, P. L., Ng, D. H., Johnson, P. and Teh, H. S.**, Increase in the specific activity of p50csk in proliferating T cells correlates with decreased specific activity of p56lck and p59fyn and reduced phosphorylation of CD3 subunits. *Mol Immunol* 1996. **33**: 531-540.
- 65 **Bougeret, C., Delaunay, T., Romero, F., Jullien, P., Sabe, H., Hanafusa, H., Benarous, R. and Fischer, S.**, Detection of a physical and functional interaction between Csk and Lck which involves the SH2 domain of Csk and is mediated by autophosphorylation of Lck on tyrosine 394. *J Biol Chem* 1996. **271**: 7465-7472.

- 66 **Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., Drbal, K., Kuramitsu, Y., Kornacker, B., Horejsi, V. and Schraven, B.**, Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 2000. **191**: 1591-1604.
- 67 **Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A. and Okada, M.**, Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 2000. **404**: 999-1003.
- 68 **Cohen, G. B., Ren, R. and Baltimore, D.**, Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 1995. **80**: 237-248.
- 69 **Pawson, T.**, Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995. **373**: 573-580.
- 70 **Geiger, T. L., Leitenberg, D. and Flavell, R. A.**, The TCR zeta-chain immunoreceptor tyrosine-based activation motifs are sufficient for the activation and differentiation of primary T lymphocytes. *J Immunol* 1999. **162**: 5931-5939.
- 71 **Irving, B. A., Chan, A. C. and Weiss, A.**, Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 1993. **177**: 1093-1103.
- 72 **Romeo, C., Amiot, M. and Seed, B.**, Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 1992. **68**: 889-897.
- 73 **Letourneur, F. and Klausner, R. D.**, T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. **88**: 8905-8909.
- 74 **Frank, S. J., Cenciarelli, C., Niklinska, B. B., Letourneur, F., Ashwell, J. D. and Weissman, A. M.**, Mutagenesis of T cell antigen receptor zeta chain tyrosine residues. Effects on tyrosine phosphorylation and lymphokine production. *J Biol Chem* 1992. **267**: 13656-13660.
- 75 **Koyasu, S., McConkey, D. J., Clayton, L. K., Abraham, S., Yandava, B., Katagiri, T., Moingeon, P., Yamamoto, T. and Reinherz, E. L.**, Phosphorylation of multiple CD3 zeta tyrosine residues leads to formation of pp21 in vitro and in vivo. Structural changes upon T cell receptor stimulation. *J Biol Chem* 1992. **267**: 3375-3381.
- 76 **Shores, E. W., Huang, K., Tran, T., Lee, E., Grinberg, A. and Love, P. E.**, Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science* 1994. **266**: 1047-1050.
- 77 **Shores, E. W., Tran, T., Grinberg, A., Sommers, C. L., Shen, H. and Love, P. E.**, Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med* 1997. **185**: 893-900.
- 78 **van Oers, N. S., Love, P. E., Shores, E. W. and Weiss, A.**, Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs. *J Immunol* 1998. **160**: 163-170.
- 79 **Sloan-Lancaster, J. and Allen, P. M.**, Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol* 1996. **14**: 1-27.
- 80 **Kimura, T., Kihara, H., Bhattacharyya, S., Sakamoto, H., Appella, E. and Siraganian, R. P.**, Downstream signaling molecules bind to different phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) peptides of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* 1996. **271**: 27962-27968.
- 81 **Rozdzial, M. M., Malissen, B. and Finkel, T. H.**, Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 1995. **3**: 623-633.

- 82 **Jensen, W. A., Pleiman, C. M., Beaufils, P., Wegener, A. M., Malissen, B. and Cambier, J. C.**, Qualitatively distinct signaling through T cell antigen receptor subunits. *Eur J Immunol* 1997. **27**: 707-716.
- 83 **Shores, E. W. and Love, P. E.**, TCR zeta chain in T cell development and selection. *Curr Opin Immunol* 1997. **9**: 380-389.
- 84 **Love, P. E., Shores, E. W., Johnson, M. D., Tremblay, M. L., Lee, E. J., Grinberg, A., Huang, S. P., Singer, A. and Westphal, H.**, T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 1993. **261**: 918-921.
- 85 **Liu, C. P., Ueda, R., She, J., Sancho, J., Wang, B., Weddell, G., Loring, J., Kurahara, C., Dudley, E. C., Hayday, A. and et al.**, Abnormal T cell development in CD3-zeta-/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *Embo J* 1993. **12**: 4863-4875.
- 86 **Liu, C. P., Lin, W. J., Huang, M., Kappler, J. W. and Marrack, P.**, Development and function of T cells in T cell antigen receptor/CD3 zeta knockout mice reconstituted with Fc epsilon RI gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 616-621.
- 87 **Yamazaki, T., Arase, H., Ono, S., Ohno, H., Watanabe, H. and Saito, T.**, A shift from negative to positive selection of autoreactive T cells by the reduced level of TCR signal in TCR-transgenic CD3 zeta-deficient mice. *J Immunol* 1997. **158**: 1634-1640.
- 88 **Lin, S. Y., Ardouin, L., Gillet, A., Malissen, M. and Malissen, B.**, The single positive T cells found in CD3-zeta/eta-/- mice overtly react with self-major histocompatibility complex molecules upon restoration of normal surface density of T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 1997. **185**: 707-715.
- 89 **Kersh, E. N., Shaw, A. S. and Allen, P. M.**, Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 1998. **281**: 572-575.
- 90 **Love, P. E. and Shores, E. W.**, ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 2000. **12**: 591-597.
- 91 **van Oers, N. S., Teh, S. J., Irving, B. A., Tiong, J., Weiss, A. and Teh, H. S.**, Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the murine T cell receptor zeta chain. *J Immunol Methods* 1994. **170**: 261-268.
- 92 **Wiest, D. L., Ashe, J. M., Abe, R., Bolen, J. B. and Singer, A.**, TCR activation of ZAP70 is impaired in CD4+CD8+ thymocytes as a consequence of intrathymic interactions that diminish available p56lck. *Immunity* 1996. **4**: 495-504.
- 93 **van Oers, N. S., Tohlen, B., Malissen, B., Moomaw, C. R., Afendis, S. and Slaughter, C. A.**, The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat Immunol* 2000. **1**: 322-328.
- 94 **Sloan-Lancaster, J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B. and Allen, P. M.**, Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994. **79**: 913-922.
- 95 **Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E. and Germain, R. N.**, Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 1995. **267**: 515-518.
- 96 **Reis e Sousa, C., Levine, E. H. and Germain, R. N.**, Partial signaling by CD8+ T cells in response to antagonist ligands. *J Exp Med* 1996. **184**: 149-157.
- 97 **La Face, D. M., Couture, C., Anderson, K., Shih, G., Alexander, J., Sette, A., Mustelin, T., Altman, A. and Grey, H. M.**, Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J Immunol* 1997. **158**: 2057-2064.

- 98 **Smith, J. A., Tso, J. Y., Clark, M. R., Cole, M. S. and Bluestone, J. A.,** Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J Exp Med* 1997. **185**: 1413-1422.
- 99 **Yagi, S., Suzuki, K., Hasegawa, A., Okumura, K. and Ra, C.,** Cloning of the cDNA for the deleted syk kinase homologous to ZAP-70 from human basophilic leukemia cell line (KU812). *Biochem Biophys Res Commun* 1994. **200**: 28-34.
- 100 **Rowley, R. B., Bolen, J. B. and Fargnoli, J.,** Molecular cloning of rodent p72Syk. Evidence of alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 1995. **270**: 12659-12664.
- 101 **Latour, S., Chow, L. and Veillette, A.,** Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein- tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996. **271**: 22782-22790.
- 102 **Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J. P. and Tybulewicz, V. L.,** Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 2000. **21**: 148-154.
- 103 **Hatada, M. H., Lu, X., Laird, E. R., Green, J., Morgenstern, J. P., Lou, M., Marr, C. S., Phillips, T. B., Ram, M. K., Theriault, K. and et al.,** Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995. **377**: 32-38.
- 104 **Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S. C., Chan, A. C. and Weiss, A.,** Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994. **263**: 1136-1139.
- 105 **Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H. and Cambier, J. C.,** Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 1995. **182**: 1815-1823.
- 106 **Ottinger, E. A., Botfield, M. C. and Shoelson, S. E.,** Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J Biol Chem* 1998. **273**: 729-735.
- 107 **Law, C. L., Sidorenko, S. P., Chandran, K. A., Draves, K. E., Chan, A. C., Weiss, A., Edelhoff, S., Distech, C. M. and Clark, E. A.,** Molecular cloning of human Syk. A B cell protein-tyrosine kinase associated with the surface immunoglobulin M-B cell receptor complex. *J Biol Chem* 1994. **269**: 12310-12319.
- 108 **Watts, J. D., Affolter, M., Krebs, D. L., Wange, R. L., Samelson, L. E. and Aebersold, R.,** Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* 1994. **269**: 29520-29529.
- 109 **Isakov, N., Wange, R. L., Burgess, W. H., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E.,** ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 1995. **181**: 375-380.
- 110 **Bu, J. Y., Shaw, A. S. and Chan, A. C.,** Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 5106-5110.
- 111 **Osman, N., Lucas, S. and Cantrell, D.,** The role of tyrosine phosphorylation in the interaction of cellular tyrosine kinases with the T cell receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *Eur J Immunol* 1995. **25**: 2863-2869.
- 112 **Koyasu, S., Tse, A. G., Moingeon, P., Hussey, R. E., Mildonian, A., Hannisian, J., Clayton, L. K. and Reinherz, E. L.,** Delineation of a T-cell activation motif required for binding of protein tyrosine kinases containing tandem SH2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 6693-6697.
- 113 **Kong, G. H., Bu, J. Y., Kurosaki, T., Shaw, A. S. and Chan, A. C.,** Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 1995. **2**: 485-492.

- 114 Vely, F., Nunes, J. A., Malissen, B. and Hedgecock, C. J., Analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) binding to ZAP-70 by surface plasmon resonance. *Eur J Immunol* 1997. **27**: 3010-3014.
- 115 Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S. and Samelson, L. E., Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J Biol Chem* 1993. **268**: 19797-19801.
- 116 Weiss, A., Signal transduction. Zapping tandem SH2 domains. *Nature* 1995. **377**: 17-18.
- 117 van Oers, N. S., Killeen, N. and Weiss, A., ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* 1994. **1**: 675-685.
- 118 Wange, R. L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E., Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem* 1995. **270**: 18730-18733.
- 119 Thome, M., Duplay, P., Guttinger, M. and Acuto, O., Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *J Exp Med* 1995. **181**: 1997-2006.
- 120 Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R. and Kurosaki, T., Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *Embo J* 1995. **14**: 2499-2508.
- 121 Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R. and Bolen, J. B., Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* 1995. **270**: 11590-11594.
- 122 Shiue, L., Zoller, M. J. and Brugge, J. S., Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* 1995. **270**: 10498-10502.
- 123 Chu, D. H., Spits, H., Peyron, J. F., Rowley, R. B., Bolen, J. B. and Weiss, A., The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *Embo J* 1996. **15**: 6251-6261.
- 124 Couture, C., Baier, G., Oetken, C., Williams, S., Telford, D., Marie, C. A., Baier, B. G., Fischer, S., Burn, P., Altman, A. and et, a. I., Activation of p56lck by p72syk through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 5249-5258.
- 125 Couture, C., Baier, G., Altman, A. and Mustelin, T., p56lck-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72syk by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 5301-5305.
- 126 Latour, S., Fournel, M. and Veillette, A., Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 1997. **17**: 4434-4441.
- 127 Furlong, M. T., Mahrenholz, A. M., Kim, K. H., Ashendel, C. L., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L., Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* 1997. **1355**: 177-190.
- 128 Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T. and Yamamura, H., Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* 1994. **179**: 1725-1729.
- 129 Keshvara, L. M., Isaacson, C., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L., Syk activation and dissociation from the B-cell antigen receptor is mediated by phosphorylation of tyrosine 130. *J Biol Chem* 1997. **272**: 10377-10381.
- 130 Zhao, Q., Williams, B. L., Abraham, R. T. and Weiss, A., Interdomain B in ZAP-70 regulates but is not required for ZAP-70 signaling function in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 948-956.

- 131 Fournel, M., Davidson, D., Weil, R. and Veillette, A., Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996. **183**: 301-306.
- 132 Kong, G., Dalton, M., Wardenburg, J. B., Straus, D., Kurosaki, T. and Chan, A. C., Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 5026-5035.
- 133 Zhao, Q. and Weiss, A., Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 6765-6774.
- 134 Lupher, M. J., Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C. and Band, H., The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* 1997. **272**: 33140-33144.
- 135 Rao, N., Lupher, M. L., Jr., Ota, S., Reedquist, K. A., Druker, B. J. and Band, H., The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. *J Immunol* 2000. **164**: 4616-4626.
- 136 Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T. and Liu, Y. C., The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999. **286**: 309-312.
- 137 Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S. and Yarden, Y., Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999. **4**: 1029-1040.
- 138 Law, C. L., Chandran, K. A., Sidorenko, S. P. and Clark, E. A., Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 1305-1315.
- 139 Katzav, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T. and Weiss, A., The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem* 1994. **269**: 32579-32585.
- 140 Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T. and Weiss, A., The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* 1997. **185**: 1877-1882.
- 141 Di Bartolo, V., Mege, D., Germain, V., Pelosi, M., Dufour, E., Michel, F., Magistrelli, G., Isacchi, A. and Acuto, O., Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 1999. **274**: 6285-6294.
- 142 Williams, B. L., Irvin, B. J., Sutor, S. L., Chini, C. C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A. C. and Abraham, R. T., Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *Embo J* 1999. **18**: 1832-1844.
- 143 Michel, F., Grimaud, L., Tuosto, L. and Acuto, O., Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem* 1998. **273**: 31932-31938.
- 144 Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H. and von Boehmer, H., Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988. **335**: 730-733.
- 145 Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. and von Boehmer, H., Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 1988. **333**: 742-746.
- 146 Gong, Q., Jin, X., Akk, A. M., Foger, N., White, M., Gong, G., Wardenburg, J. B. and Chan, A. C., Requirement for tyrosine residues 315 and 319 within zeta chain-associated protein 70 for T cell development. *J Exp Med* 2001. **194**: 507-518.

- 147 **Magnan, A., Di Bartolo, V., Mura, A. M., Boyer, C., Richelme, M., Lin, Y. L., Roure, A., Gillet, A., Arrieumerlou, C., Acuto, O., Malissen, B. and Malissen, M.,** T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *J Exp Med* 2001. **194**: 491-505.
- 148 **Di Bartolo, V., Malissen, M., Dufour, E., Sechet, E., Malissen, B. and Acuto, O.,** Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur J Immunol* 2002. **32**: 568-575.
- 149 **Duplay, P., Thome, M., Herve, F. and Acuto, O.,** p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J Exp Med* 1994. **179**: 1163-1172.
- 150 **Pelosi, M., Di Bartolo, V., Mounier, V., Mege, D., Pascussi, J. M., Dufour, E., Blondel, A. and Acuto, O.,** Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. *J Biol Chem* 1999. **274**: 14229-14237.
- 151 **Sada, K., Takano, T., Yanagi, S. and Yamamura, H.,** Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)* 2001. **130**: 177-186.
- 152 **Hitomi, T., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Takano, T. and Yamamura, H.,** Requirement of Syk-phospholipase C-gamma2 pathway for phorbol ester-induced phospholipase D activation in DT40 cells. *Genes Cells* 2001. **6**: 475-485.
- 153 **Mege, D., Di Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F. and Acuto, O.,** Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J Biol Chem* 1996. **271**: 32644-32652.
- 154 **Wange, R. L. and Samelson, L. E.,** Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 1996. **5**: 197-205.
- 155 **Wange, R. L.,** LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000. **2000**: RE1.
- 156 **Clements, J. L., Boerth, N. J., Lee, J. R. and Koretzky, G. A.,** Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 1999. **17**: 89-108.
- 157 **Deckert, M., Elly, C., Altman, A. and Liu, Y. C.,** Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1998. **273**: 8867-8874.
- 158 **Lupher, M. J., Reedquist, K. A., Miyake, S., Langdon, W. Y. and Band, H.,** A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with ZAP-70 in T cells. *J Biol Chem* 1996. **271**: 24063-24068.
- 159 **Ota, Y., Beitz, L. O., Scharenberg, A. M., Donovan, J. A., Kinet, J. P. and Samelson, L. E.,** Characterization of Cbl tyrosine phosphorylation and a Cbl-Syk complex in RBL-2H3 cells. *J Exp Med* 1996. **184**: 1713-1723.
- 160 **Ota, Y. and Samelson, L. E.,** The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 1997. **276**: 418-420.
- 161 **Deckert, M., Tartare, D. S., Couture, C., Mustelin, T. and Altman, A.,** Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 1996. **5**: 591-604.
- 162 **Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. and Bustelo, X. R.,** Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 1997. **385**: 169-172.
- 163 **Norcross, M. A.,** A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 1984. **135D**: 113-134.
- 164 **Paul, W. E. and Seder, R. A.,** Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994. **76**: 241-251.

- 165 van der Merwe, P. A., Modeling costimulation. *Nat Immunol* 2000. 1: 194-195.
- 166 Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A., Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998. 395: 82-86.
- 167 Delon, J. and Germain, R. N., Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 2000. 10: R923-933.
- 168 Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H. and Cahalan, M. D., Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996. 4: 421-430.
- 169 Wulfig, C. and Davis, M. M., A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 1998. 282: 2266-2269.
- 170 Bunnell, S. C., Kapoor, V., Tribble, R. P., Zhang, W. and Samelson, L. E., Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 2001. 14: 315-329.
- 171 Delon, J., Kaibuchi, K. and Germain, R. N., Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 2001. 15: 691-701.
- 172 Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. and Dustin, M. L., The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999. 285: 221-227.
- 173 Dustin, M. L. and Cooper, J. A., The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000. 1: 23-29.
- 174 Krummel, M. F. and Davis, M. M., Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 2002. 14: 66-74.
- 175 Bunnell, S. C., Hong, D. I., Kardon, J. R., Yamazaki, T., McGlade, C. J., Barr, V. A. and Samelson, L. E., T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 2002. 158: 1263-1275.
- 176 Bromley, S. K., Iaboni, A., Davis, S. J., Whitty, A., Green, J. M., Shaw, A. S., Weiss, A. and Dustin, M. L., The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2001. 2: 1159-1166.
- 177 Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X. Y., Toyo-Oka, K., Tai, X. G., Park, C. S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K. and Fujiwara, H., Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J Immunol* 2000. 164: 1251-1259.
- 178 Sperling, A. I., Sedy, J. R., Manjunath, N., Kupfer, A., Ardman, B. and Burkhardt, J. K., TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol* 1998. 161: 6459-6462.
- 179 Johnson, K. G., Bromley, S. K., Dustin, M. L. and Thomas, M. L., A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. 97: 10138-10143.
- 180 Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Muller, S. and Valitutti, S., Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Curr Biol* 2000. 10: 277-280.
- 181 Simons, K. and Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997. 387: 569-572.
- 182 Kabouridis, P. S., Magee, A. I. and Ley, S. C., S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *Embo J* 1997. 16: 4983-4998.
- 183 Janes, P. W., Ley, S. C. and Magee, A. I., Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 1999. 147: 447-461.

- 184 **Zhang, W., Tribble, R. P. and Samelson, L. E.**, LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 1998. **9**: 239-246.
- 185 **Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. and Lanzavecchia, A.**, T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 1999. **283**: 680-682.
- 186 **Xavier, R. and Seed, B.**, Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* 1999. **11**: 265-269.
- 187 **Lowin-Kropf, B., Shapiro, V. S. and Weiss, A.**, Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1998. **140**: 861-871.
- 188 **Kaga, S., Ragg, S., Rogers, K. A. and Ochi, A.**, Stimulation of CD28 with B7-2 promotes focal adhesion-like cell contacts where Rho family small G proteins accumulate in T cells. *J Immunol* 1998. **160**: 24-27.
- 189 **Bretscher, A.**, Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 1999. **11**: 109-116.
- 190 **Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R. and Trautmann, A.**, Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur J Immunol* 1998. **28**: 716-729.
- 191 **Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A. and Elias, L.**, Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 1998. **273**: 7594-7603.
- 192 **Nel, A. E.**, T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol* 2002. **109**: 758-770.
- 193 **Rudd, C. E.**, Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* 1999. **96**: 5-8.
- 194 **Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. and Weiss, A.**, LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 1998. **9**: 617-626.
- 195 **Kurosaki, T. and Tsukada, S.**, BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* 2000. **12**: 1-5.
- 196 **Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P.**, Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998. **395**: 645-648.
- 197 **Penninger, J. M. and Crabtree, G. R.**, The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 1999. **96**: 9-12.
- 198 **Baksh, S. and Burakoff, S. J.**, The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol* 2000. **12**: 405-415.
- 199 **Zhang, W., Sloan, L. J., Kitchen, J., Tribble, R. P. and Samelson, L. E.**, LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998. **92**: 83-92.
- 200 **Ward, S. G., June, C. H. and Olive, D.**, PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today* 1996. **17**: 187-197.
- 201 **Bruyns, E., Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Sagolla, K., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Bensussan, A., Meuer, S. and Schraven, B.**, T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* 1998. **188**: 561-575.
- 202 **Weiss, L., Whitmarsh, A. J., Yang, D. D., Rincon, M., Davis, R. J. and Flavell, R. A.**, Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. *J Exp Med* 2000. **191**: 139-146.

- 203 **Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M. and Saraste, M.,** The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem Sci* 1999. **24**: 441-445.
- 204 **Alessi, D. R. and Cohen, P.,** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 1998. **8**: 55-62.
- 205 **Genot, E. M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B. M., Weiss, A. and Kramer, I. M.,** The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2000. **20**: 5469-5478.
- 206 **Genot, E., Cleverley, S., Henning, S. and Cantrell, D.,** Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *Embo J* 1996. **15**: 3923-3933.
- 207 **Downward, J.,** Control of ras activation. *Cancer Surv* 1996. **27**: 87-100.
- 208 **Henning, S. W. and Cantrell, D. A.,** GTPases in antigen receptor signalling. *Curr Opin Immunol* 1998. **10**: 322-329.
- 209 **Nel, A. E., Gupta, S., Lee, L., Ledbetter, J. A. and Kanner, S. B.,** Ligation of the T-cell antigen receptor (TCR) induces association of hSos1, ZAP-70, phospholipase C-gamma 1, and other phosphoproteins with Grb2 and the zeta-chain of the TCR. *J Biol Chem* 1995. **270**: 18428-18436.
- 210 **Gupta, S., Weiss, A., Kumar, G., Wang, S. and Nel, A.,** The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. Evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant. *J Biol Chem* 1994. **269**: 17349-17357.
- 211 **Rincon, M., Flavell, R. A. and Davis, R. A.,** The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic Biol Med* 2000. **28**: 1328-1337.
- 212 **Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. and Ben, N. Y.,** JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994. **77**: 727-736.
- 213 **Kempiak, S. J., Hiura, T. S. and Nel, A. E.,** The Jun kinase cascade is responsible for activating the CD28 response element of the IL-2 promoter: proof of cross-talk with the I kappa B kinase cascade. *J Immunol* 1999. **162**: 3176-3187.
- 214 **Sadra, A., Cinek, T., Arellano, J. L., Shi, J., Truitt, K. E. and Imboden, J. B.,** Identification of tyrosine phosphorylation sites in the CD28 cytoplasmic domain and their role in the costimulation of Jurkat T cells. *J Immunol* 1999. **162**: 1966-1973.
- 215 **Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincon, M. and Flavell, R. A.,** Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 1998. **9**: 575-585.
- 216 **Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. and Flavell, R. A.,** Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998. **282**: 2092-2095.
- 217 **DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. and Karin, M.,** A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997. **388**: 548-554.
- 218 **Mercurio, F., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Young, D. B., Li, J. W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. and Manning, A. M.,** I kappa B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 1526-1538.
- 219 **Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C. A. and Nel, A. E.,** The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 2000. **165**: 6933-6940.
- 220 **Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L. and Littman, D. R.,** PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 2000. **404**: 402-407.

- 221 Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P. and Altman, A., A novel functional interaction between Vav and PKC $\theta$  is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* 2000. **12**: 151-160.
- 222 Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z. and Rothe, M., Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997. **90**: 373-383.
- 223 Khoshnan, A., Kempia, S. J., Bennett, B. L., Bae, D., Xu, W., Manning, A. M., June, C. H. and Nel, A. E., Primary human CD4+ T cells contain heterogeneous I kappa B kinase complexes: role in activation of the IL-2 promoter. *J Immunol* 1999. **163**: 5444-5452.
- 224 Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. and Thompson, C. B., CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995. **3**: 87-98.
- 225 van Lier, R. A., Brouwer, M., Rebel, V. I., van Noesel, C. J. and Aarden, L. A., Immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies induce accessory cell-independent lymphokine production, proliferation and helper activity in human T lymphocytes. *Immunology* 1989. **68**: 45-50.
- 226 Tite, J. P., Sloan, A. and Janeway, C. A., Jr., The role of L3T4 in T cell activation: L3T4 may be both an Ia-binding protein and a receptor that transduces a negative signal. *J Mol Cell Immunol* 1986. **2**: 179-190.
- 227 Bank, I. and Chess, L., Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J Exp Med* 1985. **162**: 1294-1303.
- 228 Kadota, S., Fantus, I. G., Deragon, G., Guyda, H. J., Hersh, B. and Posner, B. I., Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987. **147**: 259-266.
- 229 Fantus, I. G., Kadota, S., Deragon, G., Foster, B. and Posner, B. I., Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* 1989. **28**: 8864-8871.
- 230 Secrist, J. P., Burns, L. A., Karnitz, L., Koretzky, G. A. and Abraham, R. T., Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* 1993. **268**: 5886-5893.
- 231 Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kiriha, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B. and Ledbetter, J. A., ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem* 1994. **269**: 20718-20726.
- 232 Bei, L., Chen, M. and Whisler, R. L., Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *J Immunol* 1996. **157**: 160-169.
- 233 Chan, A. C., Kadlec, T. A., Elder, M. E., Filipovich, A. H., Kuo, W. L., Iwashima, M., Parslow, T. G. and Weiss, A., ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994. **264**: 1599-1601.
- 234 Hutchcroft, J. E., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L., Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J Biol Chem* 1992. **267**: 8613-8619.
- 235 Benhamou, M., Ryba, N. J., Kihara, H., Nishikata, H. and Siraganian, R. P., Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 1993. **268**: 23318-23324.

- 236 **Corey, S. J., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., Geahlen, R. L., Tkatch, L. S. and Tweardy, D. J.,** Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 4683-4687.
- 237 **Darby, C., Geahlen, R. L. and Schreiber, A. D.,** Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J Immunol* 1994. **152**: 5429-5437.
- 238 **Harrison, M. L., Isaacson, C. C., Burg, D. L., Geahlen, R. L. and Low, P. S.,** Phosphorylation of human erythrocyte band 3 by endogenous p72syk. *J Biol Chem* 1994. **269**: 955-959.
- 239 **Clark, E. A., Shattil, S. J. and Brugge, J. S.,** Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *Trends Biochem Sci* 1994. **19**: 464-469.
- 240 **Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N. and Yamamura, H.,** Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2000. **127**: 321-327.
- 241 **Wang, H. and Malbon, C. C.,** G(s)alpha repression of adipogenesis via Syk. *J Biol Chem* 1999. **274**: 32159-32166.
- 242 **Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S. and Yamamura, H.,** Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett* 2001. **489**: 129-133.
- 243 **Coopman, P. J., Do, M. T., Barth, M., Bowden, E. T., Hayes, A. J., Basyuk, E., Blancato, J. K., Vezza, P. R., McLeskey, S. W., Mangeat, P. H. and Mueller, S. C.,** The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000. **406**: 742-747.
- 244 **Orchansky, P. L., Matsuuchi, L., Ericsson, P. O. and Teh, H. S.,** Differential regulation of p72syk expression in naive and proliferating CD4-CD8+ T cells. *Mol Immunol* 1996. **33**: 835-846.
- 245 **Gong, Q., White, L., Johnson, R., White, M., Negishi, I., Thomas, M. and Chan, A. C.,** Restoration of thymocyte development and function in zap-70-/- mice by the Syk protein tyrosine kinase. *Immunity* 1997. **7**: 369-377.
- 246 **Cheng, A. M., Negishi, I., Anderson, S. J., Chan, A. C., Bolen, J., Loh, D. Y. and Pawson, T.,** The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 9797-9801.
- 247 **Cheng, A. M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J. B. and Pawson, T.,** Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995. **378**: 303-306.
- 248 **Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A. C. and Loh, D. Y.,** Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995. **376**: 435-438.
- 249 **Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. and Tybulewicz, V. L.,** Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995. **378**: 298-302.
- 250 **Mallick-Wood, C. A., Pao, W., Cheng, A. M., Lewis, J. M., Kulkarni, S., Bolen, J. B., Rowley, B., Tigelaar, R. E., Pawson, T. and Hayday, A. C.,** Disruption of epithelial gamma delta T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 9704-9709.
- 251 **Costello, P. S., Turner, M., Walters, A. E., Cunningham, C. N., Bauer, P. H., Downward, J. and Tybulewicz, V. L.,** Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 1996. **13**: 2595-2605.

- 252 Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer, A. C., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L. and DeFranco, A. L., A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997. **186**: 1027-1039.
- 253 Pingel, J. T. and Thomas, M. L., Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 1989. **58**: 1055-1065.
- 254 Koretzky, G. A., Picus, J., Thomas, M. L. and Weiss, A., Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* 1990. **346**: 66-68.
- 255 Koretzky, G. A., Picus, J., Schultz, T. and Weiss, A., Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. **88**: 2037-2041.
- 256 Shiroo, M., Goff, L., Biffen, M., Shivan, E. and Alexander, D., CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx. *Embo J* 1992. **11**: 4887-4897.
- 257 Volarevic, S., Niklinska, B. B., Burns, C. M., Yamada, H., June, C. H., Dumont, F. J. and Ashwell, J. D., The CD45 tyrosine phosphatase regulates phosphotyrosine homeostasis and its loss reveals a novel pattern of late T cell receptor-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Exp Med* 1992. **176**: 835-844.
- 258 Cahir McFarland, E. D., Hurley, T. R., Pingel, J. T., Sefton, B. M., Shaw, A. and Thomas, M. L., Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 1402-1406.
- 259 Peyron, J. F., Verma, S., de Waal Malefyt, R., Sancho, J., Terhorst, C. and Spits, H., The CD45 protein tyrosine phosphatase is required for the completion of the activation program leading to lymphokine production in the Jurkat human T cell line. *Int Immunol* 1991. **3**: 1357-1366.
- 260 Fargnoli, J., Burkhardt, A. L., Laverty, M., Kut, S. A., van, O. N., Weiss, A. and Bolen, J. B., Syk mutation in Jurkat E6-derived clones results in lack of p72syk expression. *J Biol Chem* 1995. **270**: 26533-26537.
- 261 Gluzman, Y., SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981. **23**: 175-182.
- 262 Kolanus, W., Romeo, C. and Seed, B., T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 1993. **74**: 171-183.
- 263 Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S. and Yamamura, H., Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 1991. **266**: 15790-15796.
- 264 Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. and Weiss, A., ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992. **71**: 649-662.
- 265 Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J. and Abraham, R. T., Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T- cell line. *Mol Cell Biol* 1998. **18**: 1388-1399.
- 266 Latour, S., Zhang, J., Siraganian, R. P. and Veillette, A., A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *Embo J* 1998. **17**: 2584-2595.
- 267 Zoller, K. E., MacNeil, I. A. and Brugge, J. S., Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 1997. **158**: 1650-1659.

- 268 Fischer, A., Hacein-Bey, S. and Cavazzana-Calvo, M., Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 615-621.
- 269 Elder, M. E., Lin, D., Clever, J., Chan, A. C., Hope, T. J., Weiss, A. and Parslow, T. G., Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994. **264**: 1596-1599.
- 270 Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A. and Roifman, C. M., Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994. **76**: 947-958.
- 271 Elder, M. E., Hope, T. J., Parslow, T. G., Umetsu, D. T., Wara, D. W. and Cowan, M. J., Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol* 1995. **165**: 110-117.
- 272 Gelfand, E. W., Weinberg, K., Mazer, B. D., Kadlecsek, T. A. and Weiss, A., Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J Exp Med* 1995. **182**: 1057-1065.
- 273 Monafo, W. J., Polmar, S. H., Neudorf, S., Mather, A. and Filipovich, A. H., A hereditary immunodeficiency characterized by CD8+ T lymphocyte deficiency and impaired lymphocyte activation. *Clin Exp Immunol* 1992. **90**: 390-393.
- 274 Roifman, C. M., Hummel, D., Martinez-Valdez, H., Thorner, P., Doherty, P. J., Pan, S., Cohen, F. and Cohen, A., Depletion of CD8+ cells in human thymic medulla results in selective immune deficiency. *J Exp Med* 1989. **170**: 2177-2182.
- 275 Noraz, N., Schwarz, K., Steinberg, M., Dardalhon, V., Rebouissou, C., Hipskind, R., Friedrich, W., Yssel, H., Bacon, K. and Taylor, N., Alternative antigen receptor (TCR) signaling in T cells derived from ZAP-70-deficient patients expressing high levels of Syk. *J Biol Chem* 2000. **275**: 15832-15838.
- 276 Matsuda, S., Suzuki-Fujimoto, T., Minowa, A., Ueno, H., Katamura, K. and Koyasu, S., Temperature-sensitive ZAP70 mutants degrading through a proteasome-independent pathway. Restoration of a kinase domain mutant by Cdc37. *J Biol Chem* 1999. **274**: 34515-34518.
- 277 Elder, M. E., Skoda-Smith, S., Kadlecsek, T. A., Wang, F., Wu, J. and Weiss, A., Distinct T cell developmental consequences in humans and mice expressing identical mutations in the DLAARN motif of ZAP-70. *J Immunol* 2001. **166**: 656-661.
- 278 Wiest, D. L., Ashe, J. M., Howcroft, T. K., Lee, H. M., Kemper, D. M., Negishi, I., Singer, D. S., Singer, A. and Abe, R., A spontaneously arising mutation in the DLAARN motif of murine ZAP-70 abrogates kinase activity and arrests thymocyte development. *Immunity* 1997. **6**: 663-671.
- 279 Katamura, K., Tai, G., Tachibana, T., Yamabe, H., Ohmori, K., Mayumi, M., Matsuda, S., Koyasu, S. and Furusho, K., Existence of activated and memory CD4+ T cells in peripheral blood and their skin infiltration in CD8 deficiency. *Clin Exp Immunol* 1999. **115**: 124-130.
- 280 Knobloch, C., Goldmann, S. F., Harpprecht, J. and Friedrich, W., Coexistence of donor and host T lymphocytes following HLA-different bone marrow transplantation into a patient with cellular immunodeficiency and nonfunctional CD4+ T cells. *Transplantation* 1991. **52**: 491-496.
- 281 Kadlecsek, T. A., van Oers, N. S., Lefrancois, L., Olson, S., Finlay, D., Chu, D. H., Connolly, K., Killeen, N. and Weiss, A., Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J Immunol* 1998. **161**: 4688-4694.
- 282 Miller, A. D., Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992. **357**: 455-460.
- 283 Mulligan, R. C., The basic science of gene therapy. *Science* 1993. **260**: 926-932.
- 284 Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L. and et al., Gene transfer into humans--immunotherapy

of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990. **323**: 570-578.

285 **Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P. and et al.**, T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995. **270**: 475-480.

286 **Tiberghien, P., Reynolds, C. W., Keller, J., Spence, S., Deschaseaux, M., Certoux, J. M., Contassot, E., Murphy, W. J., Lyons, R., Chiang, Y. and et al.**, Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* 1994. **84**: 1333-1341.

287 **Stockhammer, G., Brothi, J., Leblanc, R., Bernstein, M., Schackert, G., Weber, F., Ostertag, C., Mulder, N. H., Mellstedt, H., Seiler, R., Yonekawa, Y., Twerdy, K., Kostron, H., De Witte, O., Lambermont, M., Velu, T., Laneuville, P., Villemure, J. G., Rutka, J. T., Warnke, P., Laseur, M., Mooij, J. J., Boethius, J., Mariani, L., Gianella-Borradori, A. and et al.**, Gene therapy for glioblastoma [correction of glioblastoma] multiform: in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *J Mol Med* 1997. **75**: 300-304.

288 **Izquierdo, M., Cortes, M. L., Martin, V., de Felipe, P., Izquierdo, J. M., Perez-Higueras, A., Paz, J. F., Isla, A. and Blazquez, M. G.**, Gene therapy in brain tumours: implications of the size of glioblastoma on its curability. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1997. **68**: 111-117.

289 **Bordignon, C., Notarangelo, L. D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P. and et al.**, Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 1995. **270**: 470-475.

290 **Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C. and Bordignon, C.**, HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997. **276**: 1719-1724.

291 **Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J. M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., Juttner, C., Reynolds, C. W., Longo, D. L., Herve, P. and Cahn, J. Y.**, Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 2001. **97**: 63-72.

292 **Sitbon, M., Denesvre, C., Dardalhon, V., Battini, J.L. et Mougel, M.**, Les rétrovirus leucémogènes murins: pathogènes, gènes et outils génétiques. *Virologie* 2001. **5**: 265-293.

293 **Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. and Charneau, P.**, HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 2000. **101**: 173-185.

294 **Zennou, V., Serguera, C., Sarkis, C., Colin, P., Perret, E., Mallet, J. and Charneau, P.**, The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 2001. **19**: 446-450.

295 **Dvorin, J. D., Bell, P., Maul, G. G., Yamashita, M., Emerman, M. and Malim, M. H.**, Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 2002. **76**: 12087-12096.

296 **Limon, A., Nakajima, N., Lu, R., Ghory, H. Z. and Engelman, A.**, Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J Virol* 2002. **76**: 12078-12086.

297 **Vogt, V. M.**, in J.M. Coffin, S. H. H. a. H. E. V. E. (Ed.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory press, New York 1997, p. 27.

- 298 Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D. and Cunningham, J. M., A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989. **57**: 659-666.
- 299 Wang, H., Paul, R., Burgeson, R. E., Keene, D. R. and Kabat, D., Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require a limiting accessory factor. *J Virol* 1991. **65**: 6468-6477.
- 300 Miller, D. G., Edwards, R. H. and Miller, A. D., Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 78-82.
- 301 van Zeijl, M., Johann, S. V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T. B. and O'Hara, B., A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 1168-1172.
- 302 Rein, A. and Schultz, A., Different recombinant murine leukemia viruses use different cell surface receptors. *Virology* 1984. **136**: 144-152.
- 303 Ott, D., Friedrich, R. and Rein, A., Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia viruses: close relationship to mink cell focus-inducing viruses. *J Virol* 1990. **64**: 757-766.
- 304 Tailor, C. S., Nouri, A., Lee, C. G., Kozak, C. and Kabat, D., Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 927-932.
- 305 Battini, J. L., Rasko, J. E. and Miller, A. D., A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 1385-1390.
- 306 Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984. **312**: 763-767.
- 307 Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. and Montagnier, L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984. **312**: 767-768.
- 308 Miller, A. D. and Rosman, G. J., Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 1989. **7**: 980-982, 984-986, 989-990.
- 309 Bender, M. A., Palmer, T. D., Gelinis, R. E. and Miller, A. D., Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region. *J Virol* 1987. **61**: 1639-1646.
- 310 Krall, W. J., Skelton, D. C., Yu, X. J., Riviere, I., Lehn, P., Mulligan, R. C. and Kohn, D. B., Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells. *Gene Ther* 1996. **3**: 37-48.
- 311 Riviere, I., Brose, K. and Mulligan, R. C., Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 6733-6737.
- 312 Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. and Fischer, A., Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000. **288**: 669-672.
- 313 Laker, C., Meyer, J., Schopen, A., Friel, J., Heberlein, C., Ostertag, W. and Stocking, C., Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 1998. **72**: 339-348.

- 314 **Challita, P. M., Skelton, D., el-Khoueiry, A., Yu, X. J., Weinberg, K. and Kohn, D. B.,** Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J Virol* 1995. **69**: 748-755.
- 315 **Sitbon, M., Sola, B., Evans, L., Nishio, J., Hayes, S. F., Nathanson, K., Garon, C. F. and Chesebro, B.,** Hemolytic anemia and erythroleukemia, two distinct pathogenic effects of Friend MuLV: mapping of the effects to different regions of the viral genome. *Cell* 1986. **47**: 851-859.
- 316 **Cohen-Haguenaue, O., Restrepo, L. M., Masset, M., Bayer, J., Dal Cortivo, L., Marolleau, J. P., Benbunan, M., Boiron, M. and Marty, M.,** Efficient transduction of hemopoietic CD34+ progenitors of human origin using an original retroviral vector derived from Fr-MuLV-FB29: in vitro assessment. *Hum Gene Ther* 1998. **9**: 207-216.
- 317 **Zhao-Emonet, J. C., Marodon, G., Pioche-Durieu, C., Cosset, F. L. and Klatzmann, D.,** T cell-specific expression from Mo-MLV retroviral vectors containing a CD4 mini-promoter/enhancer. *J Gene Med* 2000. **2**: 416-425.
- 318 **Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D.,** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996. **272**: 263-267.
- 319 **Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H. and Verma, I. M.,** Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 10319-10323.
- 320 **Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D. and Nagy, D.,** Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998. **72**: 9873-9880.
- 321 **Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. and Hope, T. J.,** Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999. **73**: 2886-2892.
- 322 **Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M. and Naldini, L.,** Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2000. **25**: 217-222.
- 323 **Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A. and Charneau, P.,** The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000. **96**: 4103-4110.
- 324 **Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. and Collins, M. K.,** High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 1995. **69**: 7430-7436.
- 325 **Kinsella, T. M. and Nolan, G. P.,** Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 1996. **7**: 1405-1413.
- 326 **Lam, J. S., Reeves, M. E., Cowherd, R., Rosenberg, S. A. and Hwu, P.,** Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope. *Hum Gene Ther* 1996. **7**: 1415-1422.
- 327 **Porter, C. D., Collins, M. K., Taylor, C. S., Parkar, M. H., Cosset, F. L., Weiss, R. A. and Takeuchi, Y.,** Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Hum Gene Ther* 1996. **7**: 913-919.
- 328 **Emi, N., Friedmann, T. and Yee, J. K.,** Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1991. **65**: 1202-1207.

- 329 **Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J. K.,** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 8033-8037.
- 330 **Mastromarino, P., Conti, C., Goldoni, P., Hauttecoeur, B. and Orsi, N.,** Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol* 1987. **68 ( Pt 9)**: 2359-2369.
- 331 **Arai, T., Matsumoto, K., Saitoh, K., Ui, M., Ito, T., Murakami, M., Kanegae, Y., Saito, I., Cosset, F. L., Takeuchi, Y. and Iba, H.,** A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable repackaging cell lines. *J Virol* 1998. **72**: 1115-1121.
- 332 **Ory, D. S., Neugeboren, B. A. and Mulligan, R. C.,** A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 11400-11406.
- 333 **Kim, S. H., Yu, S. S., Park, J. S., Robbins, P. D., An, C. S. and Kim, S.,** Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 1998. **72**: 994-1004.
- 334 **Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. and Trono, D.,** Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997. **15**: 871-875.
- 335 **Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L. and Kay, M. A.,** Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 2000. **24**: 49-52.
- 336 **Neil, S., Martin, F., Ikeda, Y. and Collins, M.,** Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J Virol* 2001. **75**: 5448-5456.
- 337 **Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H. and Verma, I. M.,** Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997. **17**: 314-317.
- 338 **Bosch, A., Perret, E., Desmaris, N., Trono, D. and Heard, J. M.,** Reversal of pathology in the entire brain of mucopolysaccharidosis type VII mice after lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 2000. **11**: 1139-1150.
- 339 **Haas, D. L., Case, S. S., Crooks, G. M. and Kohn, D. B.,** Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000. **2**: 71-80.
- 340 **Verma, I. M. and Somia, N.,** Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 1997. **389**: 239-242.
- 341 **Lehrman, S.,** Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999. **401**: 517-518.
- 342 **Editorial,** Gene therapy--a loss of innocence. *Nat Med* 2000. **6**: 1.
- 343 **Buckley, R. H.,** Gene therapy for human SCID: dreams become reality. *Nat Med* 2000. **6**: 623-624.
- 344 **Dick, J. E.,** Gene therapy turns the corner. *Nat Med* 2000. **6**: 624-626.
- 345 **Williams, D. A., Orkin, S. H. and Mulligan, R. C.,** Retrovirus-mediated transfer of human adenosine deaminase gene sequences into cells in culture and into murine hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986. **83**: 2566-2570.
- 346 **Lim, B., Williams, D. A. and Orkin, S. H.,** Retrovirus-mediated gene transfer of human adenosine deaminase: expression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells in vivo. *Mol Cell Biol* 1987. **7**: 3459-3465.
- 347 **Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D. and Chang, A. E.,** Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 11307-11311.

- 348 Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J. and Wilson, J. M., Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994. **6**: 335-341.
- 349 Amado, R. G., Mitsuyasu, R. T., Symonds, G., Rosenblatt, J. D., Zack, J., Sun, L. Q., Miller, M., Ely, J. and Gerlach, W., A phase I trial of autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells transduced with an anti-HIV ribozyme. *Hum Gene Ther* 1999. **10**: 2255-2270.
- 350 Lamothe, B. and Joshi, S., Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front Biosci* 2000. **5**: D527-555.
- 351 Stroncek, D. F., Hubel, A., Shankar, R. A., Burger, S. R., Pan, D., McCullough, J. and Whitley, C. B., Retroviral transduction and expansion of peripheral blood lymphocytes for the treatment of mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Transfusion* 1999. **39**: 343-350.
- 352 Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C. S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A., Eissa, N. T. and Danel, C., Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994. **8**: 42-51.
- 353 Boucher, R. C., Knowles, M. R., Johnson, L. G., Olsen, J. C., Pickles, R., Wilson, J. M., Engelhardt, J., Yang, Y. and Grossman, M., Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity. The University of North Carolina at Chapel Hill. *Hum Gene Ther* 1994. **5**: 615-639.
- 354 Caplen, N. J., Alton, E. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffery, P. K., Hodson, M. E., Coutelle, C. and et al., Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1995. **1**: 39-46.
- 355 Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., Accart, N., Layani, M. P., Aymard, M., Bernon, H., Bienvenu, J., Courtney, M., Doring, G., Gilly, B., Gilly, R., Lamy, D., Levrey, H., Morel, Y., Paulin, C., Perraud, F., Rodillon, L., Sene, C., So, S., Touraine-Moulin, F., Pavirani, A. and et al., Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 1997. **8**: 15-25.
- 356 Lu, D. R., Zhou, J. M., Zheng, B., Qiu, X. F., Xue, J. L., Wang, J. M., Meng, P. L., Han, F. L., Ming, B. H., Wang, X. P. and et al., Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B* 1993. **36**: 1342-1351.
- 357 Qiu, X., Lu, D., Zhou, J., Wang, J., Yang, J., Meng, P. and Hsueh, J. L., Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J (Engl)* 1996. **109**: 832-839.
- 358 Malech, H. L., Maples, P. B., Whiting-Theobald, N., Linton, G. F., Sekhsaria, S., Vowells, S. J., Li, F., Miller, J. A., DeCarlo, E., Holland, S. M., Leitman, S. F., Carter, C. S., Butz, R. E., Read, E. J., Fleisher, T. A., Schneiderman, R. D., Van Epps, D. E., Spratt, S. K., Maack, C. A., Rokovich, J. A., Cohen, L. K. and Gallin, J. I., Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 12133-12138.
- 359 Hirschhorn, R., Yang, D. R., Puck, J. M., Huie, M. L., Jiang, C. K. and Kurlandsky, L. E., Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 1996. **13**: 290-295.
- 360 Youssoufian, H., Natural gene therapy and the Darwinian legacy. *Nat Genet* 1996. **13**: 255-256.
- 361 Kredich, N. M. and Hershfield, M. S., S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979. **76**: 2450-2454.

- 362 **Giblett, E. R., Anderson, J. E., Cohen, F., Pollara, B. and Meuwissen, H. J.**, Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972. **2**: 1067-1069.
- 363 **Valerio, D., McIvor, R. S., Williams, S. R., Duyvesteyn, M. G., van Ormondt, H., van der Eb, A. J. and Martin, D. W., Jr.**, Cloning of human adenosine deaminase cDNA and expression in mouse cells. *Gene* 1984. **31**: 147-153.
- 364 **Hershfield, M. S.**, Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy. *Semin Hematol* 1998. **35**: 291-298.
- 365 **Onodera, M., Nelson, D. M., Sakiyama, Y., Candotti, F. and Blaese, R. M.**, Gene therapy for severe combined immunodeficiency caused by adenosine deaminase deficiency: improved retroviral vectors for clinical trials. *Acta Haematol* 1999. **101**: 89-96.
- 366 **Kohn, D. B., Weinberg, K. I., Nolta, J. A., Heiss, L. N., Lenarsky, C., Crooks, G. M., Hanley, M. E., Annett, G., Brooks, J. S., el-Khoureiy, A. and et al.**, Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995. **1**: 1017-1023.
- 367 **Hoogerbrugge, P. M., van Beusechem, V. W., Fischer, A., Debree, M., le Deist, F., Perignon, J. L., Morgan, G., Gaspar, B., Fairbanks, L. D., Skeoch, C. H., Moseley, A., Harvey, M., Levinsky, R. J. and Valerio, D.**, Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 1996. **3**: 179-183.
- 368 **Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., Nolta, J. A., Crooks, G., Kapoor, N., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Madsen, E., Snyder, F. F., Bastian, J., Muul, L., Blaese, R. M., Weinberg, K. and Parkman, R.**, T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA- deficient SCID neonates. *Nat Med* 1998. **4**: 775-780.
- 369 **Aiuti, A., Vai, S., Mortellaro, A., Casorati, G., Ficara, F., Andolfi, G., Ferrari, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Ochs, H. D., Notarangelo, L. D., Roncarolo, M. G. and Bordignon, C.**, Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 2002. **8**: 423-425.
- 370 **Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G. and Bordignon, C.**, Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002. **296**: 2410-2413.
- 371 **Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W. and Leonard, W. J.**, Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993. **73**: 147-157.
- 372 **Fischer, A.**, Primary immunodeficiencies: molecular aspects and treatment. *Bone Marrow Transplant* 1992. **9 Suppl 1**: 39-43.
- 373 **de Saint Basile, G., Arveiler, B., Oberle, I., Malcolm, S., Levinsky, R. J., Lau, Y. L., Hofker, M., Debre, M., Fischer, A., Griscelli, C. and et al.**, Close linkage of the locus for X chromosome-linked severe combined immunodeficiency to polymorphic DNA markers in Xq11-q13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. **84**: 7576-7579.
- 374 **Puck, J. M., Deschenes, S. M., Porter, J. C., Dutra, A. S., Brown, C. J., Willard, H. F. and Henthorn, P. S.**, The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency. SCIDX1. *Hum Mol Genet* 1993. **2**: 1099-1104.

- 375 **Puck, J. M.**, IL2RGbase: a database of gamma c-chain defects causing human X-SCID. *Immunol Today* 1996. **17**: 507-511.
- 376 **Stephan, V., Wahn, V., Le Deist, F., Dirksen, U., Broker, B., Muller-Fleckenstein, I., Horneff, G., Schrotten, H., Fischer, A. and de Saint Basile, G.**, Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl J Med* 1996. **335**: 1563-1567.
- 377 **Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L. and Cavazzana-Calvo, M.**, Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002. **346**: 1185-1193.
- 378 **Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M. and Fischer, A.**, A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003. **348**: 255-256.
- 379 **Yssel, H., de Vries, J. E., Koken, M., Van Blitterswijk, W. and Spits, H.**, Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J Immunol Methods* 1984. **72**: 219-227.
- 380 **Dardalhon, V., Noraz, N., Pollok, K., Rebouissou, C., Boyer, M., Bakker, A. Q., Spits, H. and Taylor, N.**, Green fluorescent protein as a selectable marker of fibronectin- facilitated retroviral gene transfer in primary human T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 1999. **10**: 5-14.
- 381 **Puisieux, I., Bain, C., Merrouche, Y., Malacher, P., Kourilsky, P., Even, J. and Favrot, M.**, Restriction of the T-cell repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from nine patients with renal-cell carcinoma. Relevance of the CDR3 length analysis for the identification of in situ clonal T-cell expansions. *Int J Cancer* 1996. **66**: 201-208.
- 382 **Pannetier, C., Even, J. and Kourilsky, P.**, T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995. **16**: 176-181.
- 383 **Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D. and Mak, T. W.**, Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995. **42**: 455-500.
- 384 **Taylor, N., Bacon, K. B., Smith, S., Jahn, T., Kadlecsek, T. A., Uribe, L., Kohn, D. B., Gelfand, E. W., Weiss, A. and Weinberg, K.**, Reconstitution of T cell receptor signaling in ZAP-70-deficient cells by retroviral transduction of the ZAP-70 gene. *J Exp Med* 1996. **184**: 2031-2036.
- 385 **Sloan-Lancaster, J., Presley, J., Ellenberg, J., Yamazaki, T., Lippincott-Schwartz, J. and Samelson, L. E.**, ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol* 1998. **143**: 613-624.
- 386 **Neumeister, E. N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A. C. and Shaw, A. S.**, Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 3171-3178.
- 387 **Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K. R., Weiss, A. and Kipps, T. J.**, Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002. **100**: 4609-4614.
- 388 **Guntermann, C. and Alexander, D. R.**, CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 2002. **168**: 4420-4429.
- 389 **Brockdorff, J., Williams, S., Couture, C. and Mustelin, T.**, Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 2539-2550.

- 390 **Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M. and Morgan, R. A.**, High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 7739-7743.
- 391 **Ramiro, A. R., De Yebenes, V. G., Trigueros, C., Carrasco, Y. R. and Toribio, M. L.**, Enhanced green fluorescent protein as an efficient reporter gene for retroviral transduction of human multipotent lymphoid precursors. *Hum Gene Ther* 1998. **9**: 1103-1109.
- 392 **Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R. A., Kato, I. and Williams, D. A.**, Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 1997. **8**: 2193-2206.
- 393 **Cantrell, D.**, T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996. **14**: 259-274.
- 394 **Otsu, M., Anderson, S. M., Bodine, D. M., Puck, J. M., O'Shea, J. J. and Candotti, F.**, Lymphoid development and function in X-linked severe combined immunodeficiency mice after stem cell gene therapy. *Mol Ther* 2000. **1**: 145-153.
- 395 **Otsu, M., Sugamura, K. and Candotti, F.**, Lack of dominant-negative effects of a truncated gamma(c) on retroviral-mediated gene correction of immunodeficient mice. *Blood* 2001. **97**: 1618-1624.
- 396 **Di Santo, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. and Rajewsky, K.**, Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 377-381.
- 397 **Hacein-Bey, H., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Dautry-Varsat, A., Hivroz, C., Riviere, I., Danos, O., Heard, J. M., Sugamura, K., Fischer, A. and De Saint Basile, G.**, gamma-c gene transfer into SCID X1 patients' B-cell lines restores normal high-affinity interleukin-2 receptor expression and function. *Blood* 1996. **87**: 3108-3116.
- 398 **Muul, L. M., Tuschong, L. M., Soenen, S. L., Jagadeesh, G. J., Ramsey, W. J., Long, Z., Carter, C. S., Garabedian, E. K., Alleyne, M., Brown, M., Bernstein, W., Schurman, S. H., Fleisher, T. A., Leitman, S. F., Dunbar, C. E., Blaese, R. M. and Candotti, F.**, Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 2003. **101**: 2563-2569.
- 399 **Furger, A., Monks, J. and Proudfoot, N. J.**, The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation. *J Virol* 2001. **75**: 11735-11746.
- 400 **Zaiss, A. K., Son, S. and Chang, L. J.**, RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol* 2002. **76**: 7209-7219.
- 401 **Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A. and von Kalle, C.**, Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003. **101**: 2099-2114.
- 402 **Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. and Montserrat, E.**, ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003. **348**: 1764-1775.
- 403 **Marodon, G., Mouly, E., Blair, E. J., Frisen, C., Lemoine, F. M. and Klatzmann, D.**, Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 2003. **101**: 3416-3423.
- 404 **Min, B., McHugh, R., Sempowski, G. D., Mackall, C., Foucras, G. and Paul, W. E.**, Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 2003. **18**: 131-140.

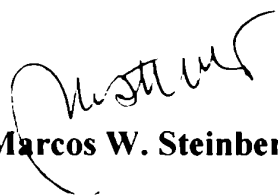
- 405 Laufs, S., Gentner, B., Nagy, K. Z., Jauch, A., Benner, A., Naundorf, S., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Ho, A. D., Zeller, W. J. and Fruehauf, S., Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 2003. **101**: 2191-2198.
- 406 Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F., HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002. **110**: 521-529.

*que el trabajo realizado en esta Tesis pueda contribuir de alguna manera al establecimiento de un tratamiento eficaz para todos aquellos niños que sufren de una inmunodeficiencia.*

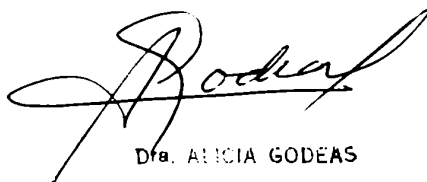
**Marcos W. Steinberg**

***Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier***  
**CNRS UMR 5535**

***Facultad de Ciencias Exactas y Naturales***  
**UBA**

  
**Marcos W. Steinberg**

  
**Naomi Taylor**

  
**Dra. ALICIA GODEAS**

## ***Informe N°3***

***Período:*** febrero 2001 / febrero 2003

**Tercero y cuarto año de Tesis**

**Título:**

**Estudios preclínicos de terapia génica para la deficiencia en Zap-70 : El rol de las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk en la activación y apoptosis de células T.**

**Director de Tesis:** Dra. Naomi Taylor ( IGM-CNRS-UMR5535. Francia)

**Codirector de Tesis:** Dr. Osvaldo Podhajcer ( Campomar-UBA. Argentina)

**Lugar de trabajo:** Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier.  
CNRS-UMR5535  
1919, Route de Mende 34293 Montpellier cedex 5  
FRANCIA

## Introducción:

Las inmunodeficiencias combinadas severas (SCID) comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes genéticos caracterizados por la función defectiva de linfocitos T y B. Una variante de SCID es causada por una mutación autosómica y recesiva en el gen de ZAP-70. ZAP-70 es una proteína tirosina quinasa (PTK) de la familia Syk, que participa en la activación y el desarrollo de las células T<sup>1</sup>.

Los pacientes que presentan una deficiencia en ZAP-70 desarrollan una SCID caracterizada por una incapacidad selectiva de producir células T CD8 simple positivas y por la presencia de células T CD4 simple positivas no funcionales<sup>2-4</sup>. Esta enfermedad comienza a manifestarse durante el primer año de vida de los niños que la padecen, generalmente cuando los efectos protectores de los anticuerpos maternos disminuyen. Estos pacientes frecuentemente presentan infecciones persistentes y recurrentes<sup>2-4</sup>.

La inmunodeficiencia en ZAP-70 es una enfermedad fatal en la infancia al menos que el paciente reciba un trasplante de médula ósea a partir de donantes histocompatibles<sup>5</sup>. Desafortunadamente para la mayoría de los pacientes la disponibilidad de donantes histocompatibles es limitada y otros tipos de trasplantes a partir de médulas no histocompatibles provocan serias complicaciones inmunológicas<sup>6-8</sup>. El desarrollo de estrategias alternativas podría aportar diferentes beneficios para estos pacientes.

La terapia basada en la introducción de genes sanos mediante técnicas de transferencia génica podría representar un alternativo y exitoso tratamiento para dichos pacientes. Este tipo de terapia se denomina terapia génica, en la cual un gen mutado puede ser sustituido por un gen sano (wild-type), restaurando la función biológica del mismo.

Considerando que los linfocitos tienen una vida media elevada lo que les permite permanecer durante años en la sangre periférica, la introducción de ZAP-70 en células T CD4<sup>+</sup> extraídas de pacientes podría reestablecer la habilidad de las mismas para responder a diferentes antígenos y desarrollar una respuesta inmune. Este tipo de terapia basada en células T CD4<sup>+</sup> permitiría a los pacientes evolucionar hacia un estado de salud apropiado para intentar otras posibles terapias alternativas. Si bien la presencia de células CD4<sup>+</sup> funcionales, en ausencia de células CD8<sup>+</sup> es completamente compatible con la vida tanto en humanos

como en ratones<sup>9,10</sup>, es importante remarcar que los pacientes deficientes en ZAP-70 carecerán siempre de células CD8<sup>+</sup>.

Considerando que todas las células que conforman el sistema hematopoyético proceden de células progenitoras pluripotenciales de la médula ósea, la transferencia del gen wild-type de ZAP-70 hacia estas últimas posibilitaría un tratamiento definitivo para los pacientes deficientes en ZAP-70. La terapia génica sobre las células pluripotenciales permitiría reconstituir la población CD8<sup>+</sup> deficiente y al mismo tiempo restaurar las funciones defectuosas de las células CD4<sup>+</sup>.

Hasta hace unos pocos años, la terapia génica solamente había sido empleada en el tratamiento de un número reducido de inmunodeficiencias primarias. Hoy en día, la terapia génica se ha convertido en una terapéutica importante en enfermedades causadas por problemas genéticos.

Recientemente el equipo liderado por el Dr. Fischer desarrolló un exitoso tratamiento de terapia génica en pacientes con una SCID caracterizada por la ausencia de linfocitos T debido a la deficiencia en la proteína  $\gamma_c$ . En dicho tratamiento células progenitoras de la médula ósea deficientes en  $\gamma_c$  fueron transducidas con un vector retroviral conteniendo el gen sano de la proteína e reintroducidas en los pacientes<sup>11</sup>. Los análisis realizados en los mismos hasta dos años después de iniciado el tratamiento muestran que al igual que un individuo sano, la totalidad de las células T de los pacientes tratados expresan  $\gamma_c$ .

Las células progenitoras de la médula ósea pueden ser identificadas gracias a la presencia de marcadores presentes sobre la superficie de las mismas. Si bien la transferencia de genes hacia estas células puede realizarse de manera eficaz, aún existen varios interrogantes sobre cuales podrían ser los efectos de la expresión del gen wild-type de ZAP-70 sobre el desarrollo y el funcionamiento de las diferentes poblaciones de células hematopoyéticas que derivarán de estas. Para responder a los mismos es necesario experimentar en modelos *in vitro* e *in vivo*, donde todo el desarrollo del sistema hematopoyético pueda ser monitoreado y donde la expresión del transgen pueda ser estudiada paso a paso. Existen modelos *in vitro* donde se puede estudiar el desarrollo de las diferentes poblaciones celulares que derivan de células progenitoras. Estos sistemas se basan en el establecimiento de un timo artificial mantenido *in vitro* bajo condiciones de cultivo especiales<sup>12,13</sup>. Los estudios *in vivo* en modelos animales permiten desarrollar las

experiencias en un contexto mas fisiológico. Existen numerosos modelos animales para el estudio de las inmunodeficiencias primarias. Para el caso particular de la inmunodeficiencia en ZAP-70, ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> han sido creados y el fenotipo de los mismos ha sido bien caracterizado<sup>14,15</sup>. A diferencia de la deficiencia humana en ZAP-70, los ratones deficientes en ZAP-70 son incapaces de producir células T. Es decir que dichos ratones no desarrollan ni células T CD8<sup>+</sup> ni células T CD4<sup>+</sup>. En consecuencia estos ratones presentan una SCID y los mismos deben ser tratados bajo condiciones especiales<sup>14,15</sup>.

### **Objetivos:**

La terapia génica para pacientes deficientes en la proteína ZAP-70 podría representar una solución definitiva para el tratamiento de los mismos. Para planificar un protocolo de terapia génica aplicable a humanos, un requisito previo es probar el sistema en un modelo animal y asegurar que la estrategia elegida no produzca efectos no deseados o perjudiciales en los animales tratados.

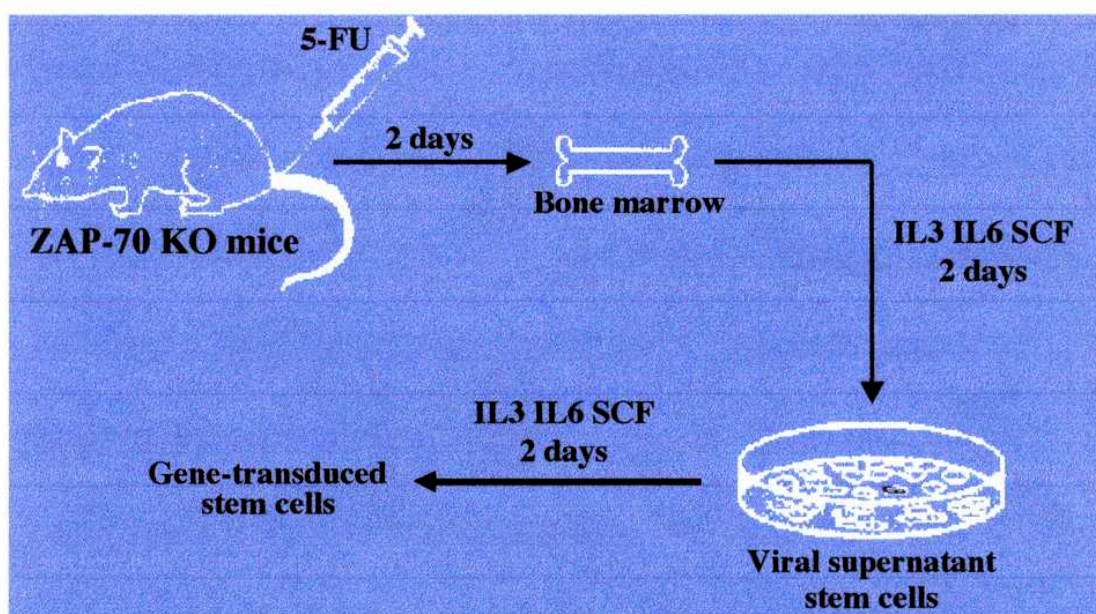
El objetivo principal de mi trabajo serán los estudios *in vivo* en ratones deficientes en ZAP-70 (ZAP-70 KO). En un primer tiempo estudiaré la posibilidad de transducir células pluripotenciales de los mismos utilizando un vector retroviral conteniendo el gen wild-type de ZAP-70. Posteriormente introduciré las células transducidas en ratones ZAP-70 KO con el fin de estudiar si mediante esta estrategia es posible reconstituir el sistema hematopoyético de los ratones, incluyendo el desarrollo de células T. Al mismo tiempo estudiaré si la expresión del gen wild-type de ZAP-70 se limita solamente a las células T o si bien el mismo es expresado en otros tipos de células hematopoyéticas y como esta expresión afectará el funcionamiento de las mismas.

### **Resultados:**

***Obtención de células progenitoras pluripotenciales a partir de ratones deficientes en ZAP-70.***

Los modelos animales han contribuido marcadamente al desarrollo de la ciencia y la medicina moderna. Gracias a un trabajo en colaboración con los laboratorios del doctor Candotti y del doctor Singer en el National Institute of Health (NIH) en USA, pudimos tener acceso a ratones deficientes en ZAP-70. En un comienzo me concentré en el aislamiento y

purificación de células progenitoras de la médula ósea. Para la obtención de las mismas, ratones deficientes en ZAP-70 fueron inyectados con 5-FU. Este compuesto elimina las células en proliferación, dejando intactas aquellas quiescentes, característica exclusiva de las células pluripotenciales. 48 horas después de la inyección los ratones fueron sacrificados y los fémures y tibias de los mismos fueron recolectados para la extracción de la médula ósea, lugar donde se encuentran la casi totalidad de células progenitoras. Trabajando en condiciones de esterilidad, la médula ósea presente en dichos huesos fue aislada y resuspendida en medio de cultivo suplementado con factores de crecimiento específicos para células pluripotenciales. De esta manera las células fueron capaces de proliferar volviéndose susceptibles a la infección (transducción) por el vector retroviral. Luego de 48 horas de incubación las células fueron infectadas con sobrenadantes conteniendo los vectores retrovirales (Figura 1).

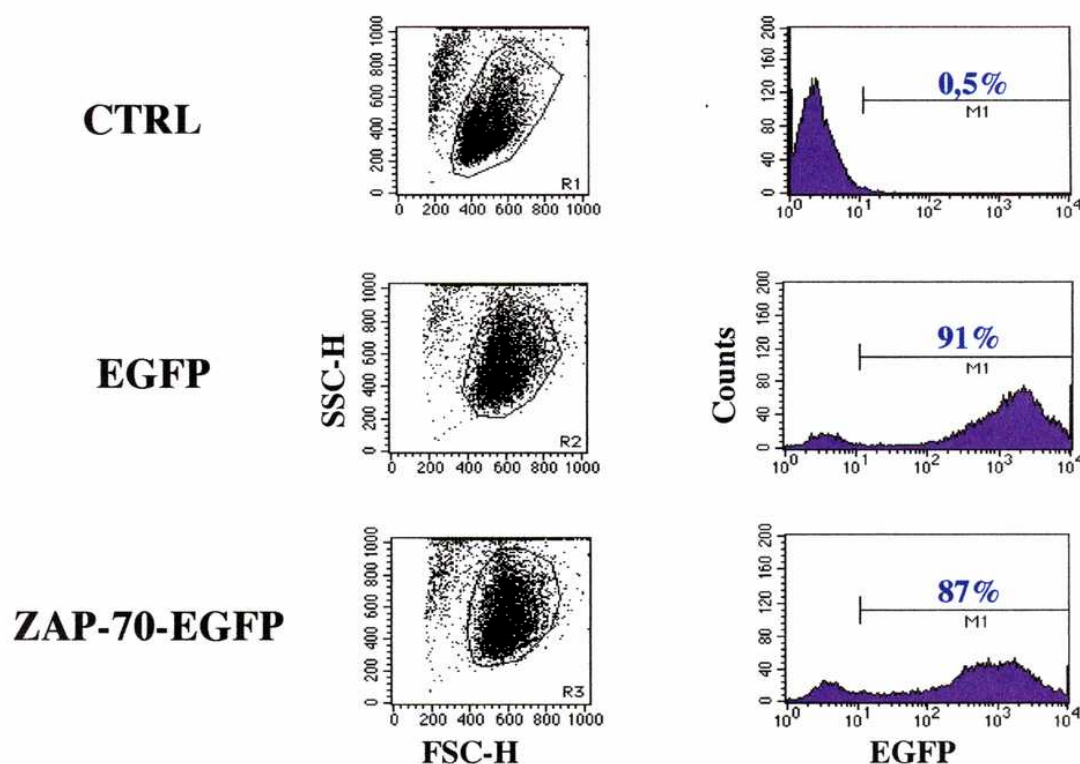


**Figura 1: Aislamiento y transducción de células progenitoras de la médula ósea**

Los vectores retrovirales utilizados fueron LZRS y MND, ambos dos derivados del virus de la leucemia murina (MuLV). LZRS contiene la secuencia que codifica la proteína ZAP-70 wild-type clonada anterior a la EGFP (ver ref.8). El otro vector, MND, fue utilizado como control ya que solo contiene el gen de la EGFP.

La transducción de las células fue realizada en medio de cultivo conteniendo los factores de crecimiento específicos para células progenitoras y en presencia de fibronectina, la cual permite una mayor eficacia de infección.

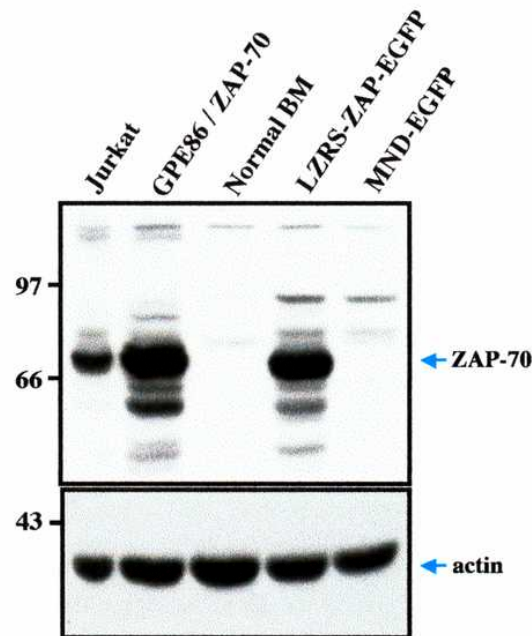
Tres días después de la infección, el porcentaje de células expresando la EGFP fue calculado por citometría de flujo utilizando un FACScan. Mientras que las células no transducidas fueron EGFP negativas, 91% y 87% de las células transducidas con el vector EGFP o con el vector ZAP-70-EGFP respectivamente, expresaron la EGFP (Figura 2). Es importante remarcar que el porcentaje de células EGFP<sup>+</sup> fue sumamente alto lo que muestra que los sobrenadantes conteniendo las partículas retrovirales son altamente eficaces para la infección de células progenitoras murinas.



**Figura 2: Transducción de células progenitoras murinas con los vectores retrovirales MND-EGFP y LZRS-ZAP-70-EGFP**

Para confirmar que ZAP-70 fue expresada solamente en aquellas células conteniendo el vector LZRS-ZAP-70-EGFP, experiencias de western blot fueron realizadas. Como control se utilizaron células T Jurkat, una línea celular que expresa la proteína ZAP-70. Como se puede observar en la figura 3, ZAP-70 fue expresada en estas células. ZAP-70 también fue expresada en aquellas células transducidas con el vector conteniendo el gen wild-type de ZAP-70, mientras que las células no transducidas o transducidas con el vector MND-EGFP no expresaron cantidades detectables de la proteína (figura 3).

En una segunda etapa, las células transducidas fueron inyectadas en ratones ZAP-70 KO. Mas precisamente, las células progenitoras transducidas con el vector EGFP o con el vector ZAP-70-EGFP y las células control (aisladas de un ratón sano), fueron inyectadas en ratones ZAP-70 KO previamente irradiados con dosis letales de rayos  $\gamma$  para impedir el desarrollo de las células progenitoras endógenas. Las células control, las cuales contienen el gen ZAP-70 fueron utilizadas como un control positivo. En este caso, todo el sistema hematopoyético de los ratones debería desarrollarse de manera normal.



**Figura 3: Expresión de ZAP-70 en células progenitoras transducidas con el gen wild-type de ZAP-70**

Una vez que todos los ratones fueron inyectados, los mismos fueron trasladados a un bioterio donde serán tratados en condiciones de esterilidad y cuidados de manera rigurosa. Por el momento la totalidad de los ratones tratados se encuentran en un buen estado general, sin sintomatología alguna que pudiera indicar anomalías fisiológicas.

### **Perspectivas:**

Las perspectivas son muchas para la continuación de este trabajo. Para comenzar, realizaré análisis de sangre de los ratones ZAP-70 KO inyectados con células progenitoras

transducidas y con las células control. Estos análisis se realizarán a los 2 y 4 meses después de la inyección y el objetivo de los mismos será determinar las diferentes poblaciones hematopoyéticas presentes en la sangre de los ratones tratados. Para identificar las mismas utilizaré anticuerpos capaces de reconocer marcadores de superficie presentes en los distintos tipos celulares. Posteriormente estudiaré la funcionalidad de estas poblaciones, como así también la capacidad de los ratones para montar una respuesta inmune contra un antígeno determinado. Al mismo tiempo estudiaré si la expresión del transgen (ZAP-70) se limita a las células T o si bien el mismo es expresado en otros tipos de células. Todos estos análisis permitirán determinar cuales son los efectos *in vivo* de un tratamiento de terapia génica para la deficiencia en ZAP-70. Este tipo de experiencias son un paso necesario y primordial que determinarán si en el futuro se pueden imaginar ensayos clínicos en pacientes deficientes en ZAP-70.

### **Bibliografía:**

1. Chan AC *et al. Cell* 1992; **71**:649-662
2. Arpaia E *et al. Cell* 1994; **76**: 947-958
3. Chan AC *et al. Science* 1994; **264**:1599-1601
4. Elder ME *et al. Science* 1994; **264**:1596-1599
5. Steinberg M *Informe N°2*
6. Friedrich W *et al. Immunodeficiency* 1993; **4**:315-322
7. Fischer A *et al. Lancet* 1990; **336**:850-854
8. O'Reilly RJ *et al. Immunodeficiency Rev* 1989; **1**:273-309
9. de la Salle H. *et al., Science* 1994; **265**: 237-241
10. Raulet DH. *et al., Adv. Immunol* 1994; **55**: 381-421
11. Cavazzana-Calvo M *et al., Science* 2000; **288**: 669-672
12. Rosenzweig M *et al., Blood* 1996; **87**: 4040-4048
13. Poznansky MC. *et al., Nature Biotechnol.* 2000; **18**: 729-734
14. Negishi I. *et al., Nature* 1995; **376**: 435-438
15. Kadlecsek TA. *et al., J Immunol* 1998; **161**: 4688-4694

Mayo 2003