



**Universidade de Santiago de Compostela**

Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular

Facultade de Bioloxía

# **Rafts lipídicos e IL-12R: nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12**

*Memoria presentada por*

*Ana Canda Sánchez*

*para optar al grado de Doctora en Biología.*





Universidade de  
Santiago de Compostela

Departamento de Bioquímica e  
Biología Molecular

Facultade de Biología

Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n  
15782, Santiago de Compostela

Tel 981563100 Ext13301 Fax981596904

E-mail: [bnlmna@usc.es](mailto:bnlmna@usc.es)

La *Dra. Montserrat Nogueira Álvarez*, Profesora Titular y el *Dr. Francisco Javier Salgado Castro*, Profesor Contratado Doctor, del Departamento de Bioquímica e Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada “*Rafts lipídicos e IL-12R: nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12*”, presentada por *Doña. Ana Canda Sánchez* para optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica e Biología Molecular de la Facultad de Biología en esta Universidad y reúne los requisitos necesarios para ser valorada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos se firma el presente informe.

En Santiago de Compostela, a

Dra. Montserrat Nogueira Álvarez

Dr. Francisco J. Salgado Castro



# *Agradecimientos*

---

*Asumo que todo el mundo, llegado este momento, sabe exactamente qué decir pero los sentimientos siempre son difíciles de recoger en palabras, y para una chica de “ciencias” como yo aún más. Una de las citas hace referencia a enseñar al niño recién parido, y esta tesis es mi “hija” particular. Si soy tremendamente sincera conmigo misma debo empezar asumiendo que ésta es la única parte que de verdad interesa, la que se lee todo el mundo porque es la única escrita en un idioma comprensible para la mayor parte de los mortales... bueno, puede que alguien opine además sobre la coordinación cromática de las gráficas. Lo malo de que se lo lea todo el mundo es si alguien se siente olvidado, malo. Por eso espero que nadie piense que lo mío es negligencia o desidia, más bien es la falta de fósforo y de oxígeno que restan agilidad a mis neuronas.*

*La verdad es que si debo empezar por agradecer algo a alguien debe ser a mi “Jefa”, a Montse Nogueira. Sin ella no hubiera sido posible este trabajo, primero porque accedió a mi incorporación al grupo y segundo porque ha dirigido mis pasos en esto tan raro de la investigación científica. Ella me ha prestado su apoyo en muchos aspectos (muchos no científicos) y ha peleado como poca gente lo haría para que yo pudiera seguir adelante, buscando información y financiación debajo de las piedras. Ella me ha iniciado en un camino lleno de sorpresas asombrosas como es el de la ciencia. Espero poder algún día llegar a corresponder tanta confianza depositada en mí.*

*El otro director de tesis es Fran, así sin más. Pero lo siento, tú nunca serás mi jefe. Tú me has enseñado casi todo, desde mi beca de colaboración cuando me enseñabas a poner cultivos, citometría (tú no te acordarás de un día que abrías la puerta y me regaste con los tubos de citometría, yo sí), y más cosas raras... Has sido y serás un apoyo, el que intenta animarme (sobre todo en esos días...), el que logra sobreponerme a las malas rachas. Eres el compañero de trabajo, de lágrimas, de fatigas, de sufrimientos, de peleas con los resultados, de elucubraciones metafísicas y disquisiciones varias. Te considero un verdadero amigo.*

*Y qué decir de mis niñas: Pilar, Amparo y Carla. La primera es única para echarle una mano si hace falta, siempre espero que vuelva pronto de alguno de sus viajes y nos regale con más manjares de delicatessen. Amparo es la alegría personificada, una sonrisa en sí misma que llena de color nuestro laboratorio y que nos mantiene en contacto con esa realidad autóctona/autónoma que muchas veces ignoramos por desconocimiento. Carla siempre nos recuerda que no hay nada como divertirse para que las penas lo sean menos, y nunca deja de preocuparse por los demás en las 2-dimensiones de la vida (trabajo y lo demás). A las tres debo agradecer el hacerme mucho más llevadero el encierro en ese segundo hogar que son las cuatro paredes sin ventanas de nuestro laboratorio. Por supuesto, no me quiero olvidar del resto de personas que han pasado por el laboratorio y que en su momento fueron también mis compañeros: Alicia, Begoña y Juan.*

*Y qué decir de esas voces que se oyen en el laboratorio que, a veces, se materializan corpóreamente: los “outsiders”, esos otros individuos con los que compartimos pasillo y cuarto de baño. En la sala de cultivos, Macamen (raras veces hemos coincidido fuera de la campana y, mira tú por dónde, lo hacemos en el tiempo de entregar nuestras tesis). Por el medio del pasillo están los maníacos “pecerreadores” que secuencian y cultivan cosas raras: Jorge (mi compañero de horas intempestivas), Rodrigo (esas orejitas...), Alberto (y su mujer, dos encantadores importados de Chile), Pedro (con nuestros pulpitos) y Paco (y Tamara, ambas sabemos que la paciencia es una gran virtud). Y en el otro lado, los “BornToClone” que trabajan tanto que sólo mirarlos cansa: Paula (reina de la noche, guapa por dentro y de labia ácida como ella sola), Paco (qué poderío en la voz) y Jaime (el decano); a Miguel y a Carmen los pongo a parte por el cariño especial que tengo a esta pareja con la que me inicié en la Biología (allá por octubre de 1996), espero no perderos nunca de vista. Todos ellos han contribuido a aligerar las horas pasadas en el departamento y por ello creo menester obligarlo el nombraros.*

*No puedo entregar esta tesis sin mencionar aquí a algunos de aquellos que he conocido a través de Precarios-Galicia y la Federación de Jóvenes Investigadores. Hemos compartido asambleas, Jornadas, peleas y mails kilométricos, me habeis permitido desarrollar una capacidad de síntesis y lectura rápida de gran utilidad para esta tesis. Gracias a vosotros en*

*España se empiezan a dar cuenta que el capital humano no se paga sólo con dinero, y que los laboratorios vacíos no sirven de nada. Hay tantos nombres que no sé por quién empezar, y seguro que muchos se me escapan: Miguel Cid (y su chica Elvira), Marta, Vila, Jorge Pérez, Eva Peiteado, Lidia Martínez, Oriol Ramos, David Lozano (entre muchos otros andaluces), Santi Barroso (y todos los de Joves), Ignacio Segura, Iñaki Ochoa, Aurelia Hernández, y un largo etc. Hago un alto para acordarme de Xosé Afonso (Piño), mi presidente de la FJI favorito, al que le tengo en gran aprecio y estima, y que, creo, puedo considerar un verdadero amigo.*

*Y como voy a olvidarme de mis compañeras en la vida: Rosa y Ana (y vuestros respectivos Jose y Luis). Desde que nos conocimos en la infancia habeis sido mi apoyo y mi paño de lágrimas, me habeis acompañado en la incubación de esta tesis desde que empecé mi escolaridad. Sois unas amigas como pocas se encuentran en el camino de la vida. Gracias por simplemente estar ahí.*

*Y desde luego, a quien más debo agradecer su constante presencia, energía, consuelo, y sostén es a mi familia, por eso os dedico este trabajo fruto del esfuerzo de años. A ti, Suso porque las horas que te he robado para realizar este trabajo pienso compensártelas toda mi vida. A ti, Paula, mi hermana, porque eres una gran amiga, siempre dispuesta a ayudar y a escuchar (aunque no entiendas nada). A vosotros, Papá y Mamá, porque me habeis dado la oportunidad de una inmejorable educación, nunca escatimando en recursos porque el conocimiento no tiene precio, y porque a pesar de todo lo que os he hecho sufrir nunca me habeis abandonado. Sin ninguno de vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí.*



### Financiación

El trabajo de investigación presentado en esta memoria ha sido financiado con un proyecto de la Xunta de Galicia (PGIDIT05PXIB20001PR)

Durante la realización de este trabajo Doña Ana Canda Sánchez ha disfrutado de una Beca predoctoral de la Xunta de Galicia (Octubre 2001-Marzo 2006)



*Dedicado a  
mi familia*



Al mismo río entras y no entras, pues eres y no eres.  
**Heráclito**

*No existe ningún gran genio sin un toque de demencia. **Séneca***

En los momentos de crisis sólo la imaginación es más importante que el conocimiento.  
**Albert Einstein**

No existe lo desconocido, sólo lo temporalmente desconocido  
**James T. Kirk**

Los sueños pueden ser realidades. Son lo que nos guía por la vida hacia una gran felicidad. **Deborah Norville**

*Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar. **Hípatia de Alejandría***

*Citas*

Una vez descartado lo imposible, lo que queda, por improbable que parezca, debe ser la verdad. **Sir Arthur Conan Doule**

En el fondo los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo queramos durante toda la vida. **Lee Smolin**

No pienses en hacer lo que deberías hacer. Trata de hacer lo que te atrae; piensa en el misterio y no en la maestría.

**Julia Cameron**

El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños. **Eleanor Roosevelt**

El mundo exige resultados. No le cuentes a otros tus dolores del parto, muéstrales al niño.  
**Indira Gandhi**

*Como siempre: lo urgente no deja tiempo para lo importante. **Mafalda***



# ÍNDICE

---

Abreviaturas .....	7
<b>1 Introducción .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 La transducción de señal .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Transducción de la señal a través de receptores de citokinas ....	21
1.1.1.1 Inicio de la transducción de la señal por los receptores de citokinas.....	22
1.1.1.2 Receptores de citokinas .....	23
1.1.1.3 Activación de las tirosín kinasas asociadas al receptor .....	24
1.1.1.4 Rutas de transducción de las citokinas .....	26
1.1.2 La vía Ras/MAPK.....	26
1.1.2.1 Proteínas Adaptadoras en la ruta de las Ras/MAPK .....	27
1.1.2.2 Efectores <i>downstream</i> de la activación de Ras .....	29
1.1.2.3 ERK1/ERK2 .....	33
1.1.3 JAK-STAT .....	34
1.1.3.1 STAT: Transductores de la señal y activadores de la transcripción .....	34
1.1.4 Regulación negativa de la activación de las kinasas .....	37
<b>1.2 Rafts.....</b>	<b>41</b>
1.2.1 Breve historia de los rafts. ....	41
1.2.1.1 Papel de los rafts lipídicos en la iniciación de la señalización en células T.....	46
1.2.1.2 Cuestiones sin resolver acerca de la naturaleza de los rafts...	48

1.2.2	Limitaciones de los métodos de análisis de los rafts lipídicos ..	50
1.2.3	La compartimentalización de la membrana determinada a través del seguimiento de una única partícula o “ <i>single particle tracking</i> ”. .....	52
1.2.4	La función de los rafts en la iniciación de la señalización TCR: un modelo integrado .....	56
1.2.5	Rafts lipídicos y señalización por citokinas.....	59
1.2.5.1	La Interleukina 2.....	60
1.2.5.2	El Interferón gamma.....	61
1.2.5.3	Otras citokinas, quimiokinas y factores de crecimiento.....	62
<b>1.3</b>	<b>La interleukina 12 y su familia .....</b>	<b>63</b>
1.3.1	La familia de citokinas heterodiméricas .....	64
1.3.2	Expresión de los miembros de la familia de la interleukina 12 y sus receptores .....	66
1.3.3	Regulación de la producción de IL-12.....	68
1.3.4	Regulación negativa de la producción de IL-12 .....	72
1.3.5	Actividad biológica de la interleukina 12 .....	74
1.3.5.1	Efectos en la hematopoyesis.....	74
1.3.5.2	Inducción de citokinas .....	75
1.3.5.3	Producción de IFN $\gamma$ .....	77
1.3.5.4	Aumento de la citotoxicidad celular.....	79
1.3.5.5	Efectos mitogénicos sobre células T y NK .....	81
1.3.5.6	IL-12 y la respuesta Th1 .....	83
1.3.5.7	Funciones de IL-12 en linfocitos B .....	86
1.3.6	Transducción de señal de la IL-12 .....	87
1.3.6.1	Identificación y estructura de STAT4 .....	88
1.3.6.2	Otras rutas de señalización activadas por IL-12.....	92
1.3.6.3	Regulación negativa de la señalización por IL-12 .....	96

1.3.7	Actividad biológica de los otros miembros de la familia de IL-12: IL-23 e IL-27 .....	98
1.3.7.1	Interleukina 23 .....	98
1.3.7.2	Interleukina 27 .....	102
<b>1.4</b>	<b>CD26 y CD45: dos moléculas con importantes funciones en el Sistema Inmune reguladas por Interleukina 12 .....</b>	<b>105</b>
1.4.1	CD26 .....	105
1.4.2	CD45 .....	110
<b>2</b>	<b>Material y métodos .....</b>	<b>117</b>
<b>2.1</b>	<b>Células empleadas .....</b>	<b>117</b>
2.1.1	Purificación de células mononucleares de sangre periférica ...	118
2.1.2	Cultivos celulares .....	121
<b>2.2</b>	<b>Citometría de flujo .....</b>	<b>123</b>
2.2.1	Marcaje en superficie .....	125
2.2.2	Localización del receptor de interleukina 12 .....	126
2.2.3	Detección de moléculas intracelulares .....	128
2.2.4	Análisis mediante el CBA Flex Set .....	129
2.2.5	Ensayos de proliferación celular .....	132
<b>2.3</b>	<b>Marcaje celular en microscopía confocal .....</b>	<b>134</b>
<b>2.4</b>	<b>Aislamiento de los microdominios raft mediante gradientes de densidad .....</b>	<b>135</b>

<b>2.5</b>	<b>Electroforesis y Western Blot</b> .....	136
2.5.1	Preparación de las muestras para análisis de proteínas fosforiladas: .....	136
2.5.2	Detección de las proteínas aisladas en gradientes de sacarosa: 138	
2.5.3	Análisis de las proteínas resistentes a la extracción con M $\beta$ CD: 139	
2.5.4	“Stripping” y “reprobing” de las membranas. ....	140
<b>3</b>	<b>Resultados y Discusión</b> .....	143
<b>3.1</b>	<b>Expresión y localización del Receptor de IL-12</b> .....	143
3.1.1	La expresión de IL-12R está fuertemente regulada. Cinética de expresión de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2. ....	143
3.1.1.1	La expresión de IL-12R $\beta$ 2 es muy dependiente del grado de activación celular.....	144
3.1.1.2	Optimización de la expresión del receptor de alta afinidad: IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2. ....	148
3.1.1.3	Incremento de la IMF de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 a bajas concentraciones de activación. ....	149
3.1.2	IL-12R $\beta$ 1 se halla en zona no-raft, mientras que IL-12R $\beta$ 2 se encuentra en microdominios raft y se aleja de ellos en respuesta a la IL-12.....	151
3.1.2.1	Estudios de localización utilizando técnicas indirectas: citometría de flujo y Western Blot. ....	153
3.1.2.2	Localización de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 mediante técnicas de visualización directa: microscopía confocal. ....	160
3.1.3	Discusión de los resultados de expresión y localización del Receptor de IL-12. ....	169

<b>3.2</b>	<b>Proliferación e IL-12</b> .....	171
3.2.1	La MAPK ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12 .....	171
3.2.1.1	La estimulación de linfoblastos con IL-12 provoca la fosforilación en residuos de tirosina de múltiples proteínas .....	172
3.2.1.2	IL-12 provoca la activación de la vía de MAPK Raf-Mek1/2-ERK1/2.....	175
3.2.1.3	ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12: Estudios de cinética mediante citometría de flujo.....	178
3.2.1.4	ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12: Cuantificación de la respuesta mediante el uso del CBA FlexSet. ....	179
3.2.2	IL-12 provoca un incremento de la proliferación en linfoblastos humanos .....	184
3.2.2.1	La concentración celular y la dosis de PHA influye en el grado de proliferación de los linfocitos T. ....	185
3.2.2.2	Optimización de las condiciones de cultivo para maximizar el efecto proliferativo inducido por IL-12.....	186
3.2.2.3	JAK2 media la respuesta proliferativa activada por IL-12. .	188
3.2.2.4	CD26 es marcador de proliferación en respuesta a la IL-12.	189
3.2.2.5	ERK1/2 media el efecto proliferativo de la IL-12.....	193
3.2.2.6	La fosforilación de ERK1/2 está ligada a la estabilidad de los rafts lipídicos y está mediada por IL-12R $\beta$ 2 y JAK2. ....	194
3.2.2.7	c-Myc no es diana de ERK1/2, pero está relacionado con la proliferación inducida por IL-12 .....	198
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES Y MODELO FINAL</b> .....	207
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	215



---

*ABREVIATURAS*



<b>ADA</b>	Adenosine DeAminase.	Adenosina deaminasa.
<b>APC</b>	Antigen Presenting Cell.	Célula presentadora de antígeno.
<b>BCR</b>	B-Cell Receptor.	Receptor de células B.
<b>BSA</b>	Bovine SeroAlbumine.	Seroalbúmina bovina.
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester [5(6)].	Succinimidil éster de carboxifluoresceín diacetato [5(6)].
<b>CIA</b>	Collagen Induced Arthritis.	Artritis inducida por colágeno.
<b>CSF</b>	Colony Stimulating Factor.	Factor estimulante de colonias.
<b>CTB</b>	Choleric Toxin B-Subunit.	Subunidad B de la toxina colérica.
<b>CTLs</b>	Cytotoxic T Cells.	Células T citotóxicas.
<b>DCs</b>	Dendritic Cells.	Células Dendríticas.
<b>DNA</b>	DeoxyriboNucleic Acid.	Ácido desoxirribonucleico.
<b>DPPIV</b>	Dipeptidylpeptidase IV.	Dipeptidilpeptidasa IV.

<b>EAE</b>	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.	Encefalitis experimental autoinmune.
<b>ERK</b>	Extracellular signal Regulated Kinase.	Kinasa regulada por señales extracelulares.
<b>FcR</b>	Fc Receptor	Receptor de la parte constante de las inmunoglobulinas (Fc).
<b>FITC</b>	Fluorescein IsoThioCyanate.	Isotiocianato de fluoresceína.
<b>FRAP</b>	Fluorescence Recovery After Photobleaching.	Recuperación de fluorescencia tras el “fotolavado”.
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer.	Transferencia de energía en resonancia de fluorescencia.
<b>GAP</b>	GTPase-Activating Proteins	Proteína activada por una GTPasa.
<b>GEF</b>	GDP-Exchange Factor.	Factor intercambiador de GDP, es una proteína que favorece la liberación de GDP

		unido a las proteínas con actividad GTPasa.
<b>GM1</b>	Monosialotetrahexosylganglioside.	Gangliósido de membrana.
<b>GPI</b>	Glycophosphatidyl Inositol.	Glicofosfatidil Inositol.
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus.	Virus de la inmunodeficiencia humana.
<b>IBD</b>	Inflammatory Bowel Disease.	Enfermedad inflamatoria intestinal.
<b>IFN</b>	Interferon.	Interferón.
<b>IL</b>	Interleukin.	Interleukina (Ej. IL-2).
<b>IL-12R</b>	Interleukin-12 Receptor.	Receptor de Interleukina 12.
<b>IMF</b>	(MFI) Mean Fluorescence Intensity.	Intensidad Media de Fluorescencia.
<b>JAK</b>	Janus Activated Kinase.	Kinasa de la familia de las Janus.
<b>JNKs</b>	c-Jun N-terminal Kinases.	MAPKs con dominio N-terminal tipo c-Jun.

<b>LAKs</b>	Lymphokine Activated Killer cells.	Células asesinas activadas por linfocinas.
<b>Lck</b>	Leukocyte-specific protein tyrosine kinase.	Proteín kinasa específica de linfocitos.
<b>Linfocito Be</b>	B effector lymphocyte.	Linfocito B efector.
<b>Linfocito Tc</b>	T cytotoxic lymphocyte.	Linfocito T citotóxico.
<b>Linfocito Th</b>	T helper lymphocyte.	Linfocito T <i>helper</i> o ayudante.
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide.	Lipopolisacárido.
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	Methyl $\beta$ -cyclodextrin.	Metil $\beta$ CicloDextrina.
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase.	Proteín Kinasa activada por mitógenos.
<b>MC</b>		Medio Completo.
<b>MEK</b>	Mitogen activated/Extracellular-signal regulated protein Kinase.	Kinasa regulada por señales extracelulares y mitógenos.
<b>NK</b>	Natural Killer.	Células asesinas.

<b>P90-RSK</b>	Ribosomal S6 Kinase.	Kinasa de la proteína ribosomal S6.
<b>PBL</b>	Peripheral Blood Lymphocytes.	Linfocitos de sangre periférica.
<b>PBMCs</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells.	Células mononucleares de sangre periférica.
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline.	Tampón fosfataasa alcalina.
<b>PE</b>	PhycoErythrin.	Ficoeritrina.
<b>PFA</b>	Paraformadehyde.	Paraformaldehido.
<b>PI3K</b>	PhosphoInositol 3 Kinase.	Kinasa de 3-fosfoinositol
<b>Raf</b>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase.	Kinasa homóloga a un oncogén viral.
<b>Ras</b>	RAt Sarcoma.	Proteína identificada en sarcoma de rata, tiene actividad GTPasa con función señalizadora.
<b>RNA</b>	RiboNucleic Acid.	Ácido ribonucleico.
<b>mRNA</b>	messenger RiboNucleic Acid.	Ácido ribonucleico mensajero.

<b>SAPK</b>	Stress Activated Protein Kinase.	Kinasa activada por señales de stress.
<b>SOCS</b>	Supressors Of Cytokine Signaling.	Proteínas supresoras de la señalización de citokinas.
<b>SPE</b>	Streptavidin-PhycoErytrin conjugated.	Estreptavidina conjugada a ficoeritrina.
<b>Src</b>	Rous SaRComa virus.	Motivo estructural inicialmente descubierto en proteínas del virus de sarcoma de Rous.
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription.	Son moléculas transductoras de la señal y, a la vez, factores de transcripción.
<b>TCR</b>	T-Cell Receptor.	Receptor de células T.
<b>TGF</b>	Tumor Growth Factor.	Factor de crecimiento tumoral.
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor.	Receptor tipo Toll.

<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor.	Factor de necrosis tumoral.
<b>TX100</b>	Triton-X-100.	Tritón-X-100.



# Capítulo 1.

## INTRODUCCIÓN

---

1.1 La transducción de señal

1.2 Rafts

1.3 La Interleukina 12 y su familia

1.4 CD26 y CD45R0: dos moléculas con importantes

funciones en el Sistema Inmune reguladas por IL-12.



# 1 Introducción

## 1.1 La transducción de señal

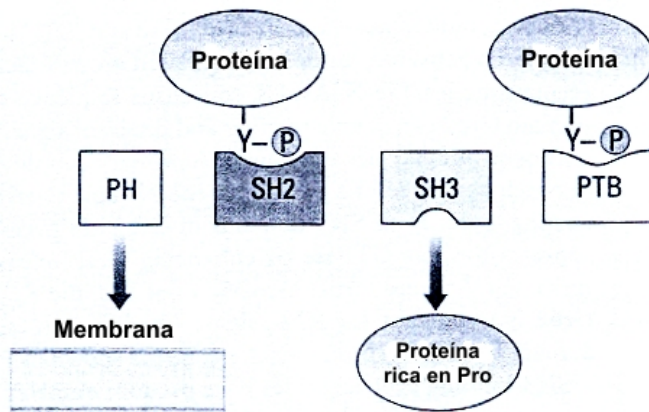
La célula debe relacionarse con el medio que la rodea, necesita recibir información del exterior para poder adaptarse a los cambios que en él se producen. La forma que tiene de hacerlo es a través de la membrana plasmática, ella recibe los estímulos y los transforma en señales reconocibles para el interior celular que desembocan en las adaptaciones necesarias para sobrevivir en las nuevas condiciones. Las señales pueden ser eléctricas, o bien a través de moléculas; éstas últimas se clasifican, a su vez, en hidrófobas, con un tránsito libre a través de la membrana, e hidrófilas, que no pueden atravesar la membrana y que por ello necesitan la presencia de un receptor.

Los receptores se clasifican en cuatro grandes clases: los ligados a proteínas G, que intercambian GDP por GTP al activarse; los canales de iones, que permiten el paso a determinados iones; los que tienen actividad enzimática, como la tirosín kinasa; y los receptores intracelulares, que se unen directamente al DNA y cuyos ligandos son moléculas hidrófobas que pueden atravesar directamente la membrana.

La transducción de la señal es un proceso en el que una molécula se une a su receptor en la célula diana y ésta responde activando una serie de mecanismos moleculares que darán lugar a la respuesta celular. Los receptores de membrana responden a una gran variedad de señales extracelulares, desde la luz y olores a hormonas, factores de crecimiento o

citokinas. Durante la transducción se producen una serie de mecanismos que amplifican a señal, las proteínas que responden a ellos son tan diversas como los estímulos iniciales que desencadenan la respuesta

Las cascadas de transducción de la señal se construyen a partir de multitud de componentes que se unen a través a sus dominios estructurales. Dentro de los receptores con actividad enzimática propia se hallan los RTKs “Receptor Tyrosine Kinases” reclutan proteínas con motivos estructurales [1] como el “Src (Rous SaRComa virus)- homology2 (SH2)”, “Src-homology3” (SH3), “pleckstrin-homology” (PH) o el de unión a fosfotirosina (PTB, “PhosphoTyrosine Binding”). Con ayuda de estos motivos, las moléculas adaptadoras enlazan el receptor con otras proteínas reguladoras en la célula, construyendo así las redes de señalización. Muchas de estas proteínas no tienen actividad enzimática y funcionan como adaptadores, mientras que otras son kinasas o fosfatasa citosólicas, monómeros de unión a GTP y sus reguladores, factores de intercambio de GDP (GEFs, “GDP-Exchange Factor”) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs, “GTPase-Activating Proteins”). Estos eslabones juegan un papel principal porque son los responsables no sólo de transmitir y controlar la señal del receptor, sino también de amplificarla. Cada dominio PH, SH2, SH3 y PTB reconoce su región complementaria: los dominios SH2 y PTB reconocen fosfotirosinas, el dominio SH3 secuencias de poli-prolina y el dominio PH se une a fosfolípidos de membrana. Muchas proteínas adaptadoras tienen más de un módulo estructural distinto, lo que les permite tener diferentes preferencias a la hora de unirse a otras proteínas y construir las cascadas de señalización [2, 3].



**Figura 1. Motivos característicos de moléculas adaptadoras.** Cada dominio reconoce una secuencia proteica que complementa a la que se une. [1].

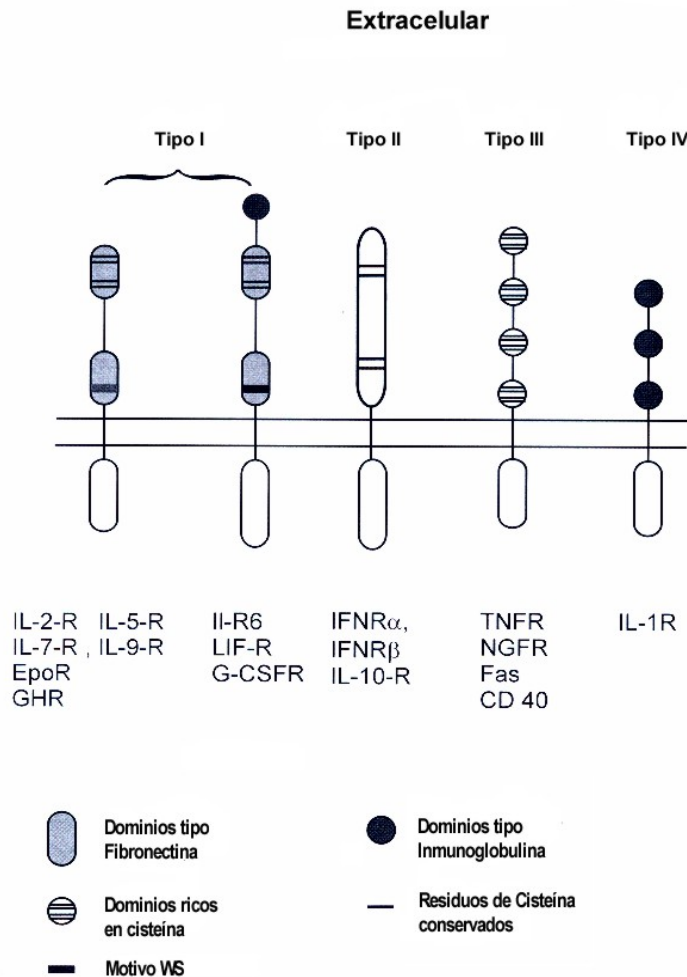
### 1.1.1 Transducción de la señal a través de receptores de citokinas

Las citokinas son proteínas que producen ciertos tipos celulares en respuesta a una gran variedad de estímulos. La naturaleza de las citokinas así como sus efectos sobre las células vienen determinados por la presencia de receptores específicos que pueden encontrarse en la superficie de las propias células que las producen, de células vecinas o de otros órganos y tejidos.

Las citokinas son, por tanto, mediadores de la comunicación celular, que se encargan de regular y controlar la respuesta inmune: desde la diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotenciales iniciales, pasando por la selección clonal (destrucción de linfocitos autorreactivos), a la diferenciación final en células especializadas (linfocitos Th1 y Th2, por ejemplo).

### 1.1.1.1 Inicio de la transducción de la señal por los receptores de citocinas

Para iniciar la vía de señalización intracelular se requieren dos condiciones, la primera es que la citokina se una a su receptor, y la segunda que esta unión active una serie de tirosín kinasas que, a su vez, fosforilen al receptor y a las moléculas señalizadoras, permitiendo la transducción de la señal. Los receptores representan una forma de comunicación entre el exterior celular y la respuesta intracelular [4, 5].



**Figura 2. Familias de receptores de citocinas y algunos ejemplos.**  
 Los diferentes dominios aparecen representados con sus diferentes símbolos [4].

### 1.1.1.2 Receptores de citokinas

Están compuestos de dos dominios, uno extracelular de unión a la citokina y otro intracelular que inicia el proceso de respuesta. Basándonos en la conservación de las estructuras moleculares podemos distinguir 4 subclases [6]. Los receptores tipo I tienen dominios similares a los de la fibronectina, comprenden los receptores de las ILs (interleukinas) y GM-CSFs (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors), que no señalizan a través de RTKs, y poseen unas regiones intracelulares próximas a la membrana (Box1 y Box2) que sirven de anclaje para la tirosín kinasa JAK2; también se incluyen entre ellos receptores de moléculas como la EPO (eritropoyetina), GH (hormona del crecimiento) y PRL (prolactina). Los receptores tipo II engloban a los receptores de IFNs (interferones) y la IL-10. Los receptores tipo III tienen dominios ricos en cisteína y están representados por los receptores de los TNFs (factores de necrosis tumoral, “Tumour Necrosis Factor”) sin actividad tirosín kinasa, así como los receptores que desencadenan apoptosis (CD40, CD95R/FasR). Por último, el grupo IV está reservado a los receptores de IL-1, con dominios tipo inmunoglobulina.

A pesar de todos estos subtipos, los receptores de citokinas comparten características comunes. Primero, los receptores suelen funcionar como complejos de varias subunidades, e incluso algunas de ellas son compartidas por diferentes citokinas, como es el caso de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 que emplean la subunidad gamma común ( $\gamma_c$ ). Segundo, los dominios citoplasmáticos de los receptores pueden contener subdominios críticos para la activación de la respuesta celular, como es el caso de la

proliferación y la diferenciación; así, por ejemplo, los receptores de IL-2 e IL-4 contienen residuos de tirosina que se fosforilan en respuesta a la unión de sus moléculas señalizadoras. Tercero, los dominios citoplasmáticos no tienen actividad tirosín kinasa endógena capaz de catalizar la fosforilación del receptor; de hecho, ésta se debe a las kinasas asociadas al receptor en estos dominios citoplasmáticos.

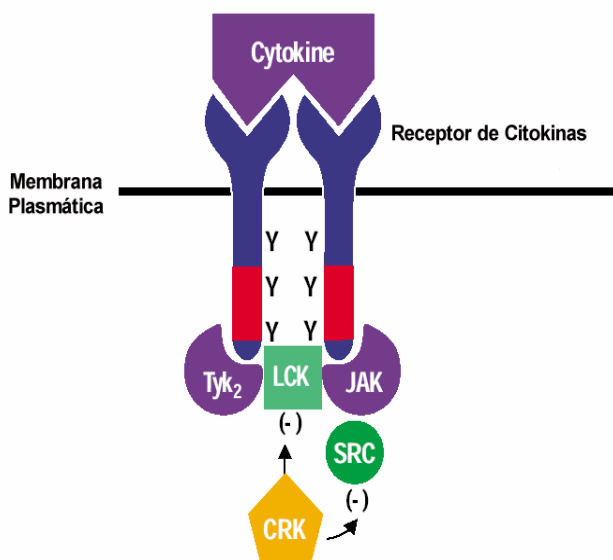
### 1.1.1.3 Activación de las tirosín kinasas asociadas al receptor

Las citokinas inician la señalización intracelular a través de la unión y oligomerización de las subunidades de los receptores. La unión de la citokina puede desencadenar bien una heterodimerización del receptor (como en el caso de los que comparten la cadena  $\gamma_c$ ), bien una homodimerización (como la GH), o bien una trimerización (TNFs). Al final, el resultado es la activación de la tirosín kinasa asociada al receptor y la fosforilación del resto de los sustratos celulares. Las dos familias implicadas en esta reacción son las JAK y las Src kinasas.

Las JAK kinasas (“Janus Activated Kinases” denominadas así por Jano, el Dios romano de las dos caras) tienen dos dominios catalíticos y se asocian a los receptores del tipo I y II. Se han descrito 4 JAKs: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 [7, 8]. Las JAKs se asocian a las colas citoplasmáticas del receptor y se cree que su activación es debida a la fosforilación cruzada tras la oligomerización del receptor después de la unión de la citokina. Aunque diferentes JAKs se asocian con diferentes receptores, no está muy claro si son necesarias para el inicio de determinadas cascadas intracelulares. Sí se sabe que son imprescindibles para la activación de la

ruta de los transductores de la señal y activadores de la transducción (STATs).

Las Src kinasas, al contrario que las JAKs, están implicadas en multitud de procesos celulares. Muchos miembros de esta familia, como Lck, Src, Fyn y Lyn, están implicados en la transducción de la señal de las citocinas y poseen muy bien conservados los dominios SH2 y SH3. Aunque muchos de sus sustratos están aún por descubrir, se sabe que algunas de estas proteínas están implicadas en la fosforilación de subunidades específicas de los receptores, tal es el caso de la Lck [9]. Esta clase de fosforilación permite la unión de determinadas moléculas al receptor a través de estos residuos de tirosina fosforilados. Una vez unidas al receptor, estas moléculas son fosforiladas por las kinasas asociadas al mismo, y les permite fosforilar a su vez a otras moléculas señalizadoras. De esta forma la oligomerización del receptor y la activación de las kinasas terminan en una serie de interacciones que forman una ruta de señalización. La respuesta que se desencadene va a depender de las funciones individuales de cada una de las moléculas activadas en cada ruta.



**Figura 3. Activación de tirosín kinasas asociadas a un receptor de citocinas.** Los residuos de tirosina fosforilados del receptor aparecen representados como Y. La CRK es una cinasa específica de las Src kinasas que tiene como característica principal la de fosforilar un residuo de tirosina en el extremo C-terminal de éstas kinasas que las mantiene inactivadas hasta que una fosfatasa libere este residuo de tirosina [13].

#### 1.1.1.4 Rutas de transducción de las citokinas

Aunque los efectos biológicos de las diferentes citokinas pueden ser muy variados, es importante destacar que las rutas individuales que se activan son, generalmente, indistinguibles. Lo único que se puede deducir de una citokina es el reflejo de la serie de rutas que se activan y la interacción entre ellas. Está claro que la respuesta celular que se produce por la activación de las citokinas puede ser clasificada en: proliferación, activación de determinados genes y, en algunos casos, muerte de la célula. Las rutas de señalización han sido identificadas y cada vez parece más claro que no son exclusivas y que se intersectan en un gran número de puntos clave.

### **1.1.2 La vía Ras/MAPK**

Es una de las más estudiadas y más complejas rutas de señalización. La ruta Ras/MAPK (“Mitogen Activated Protein Kinase”) es, además, una de las más conservadas evolutivamente: está presente en la mosca de la fruta, gusanos y mamíferos. Aunque la activación de esta ruta suele estar ligada a la proliferación y la diferenciación (depende de la célula y del estímulo), en la activación por citokinas suele tener como efectos la proliferación y prevención de la apoptosis. Muchas citokinas activan esta ruta, pero algunas de ellas sólo lo hacen en determinados tipos celulares, por ejemplo, la IL-4 la activa en los linfocitos B pero no en otros tipos celulares hematopoyéticos [10, 11].

La ruta Ras/MAPK fue una de las primeras en las que se describió la relación entre una señal extracelular y los cambios en la expresión génica del núcleo. Los principales componentes de esta ruta son una serie de pequeñas proteínas de 21kDa con actividad GTPasa (proteínas G) [12]. La mejor caracterizada es Ras (“RAAt Sarcoma”, porque fue descrito como el producto de un protooncogen de rata). Existen otras GTPasas relacionadas con Ras que están implicadas en otras rutas similares a la Ras/MAPK, como Rho, Rac y Rap-1; en concreto, las dos primeras parecen implicadas en la ruta de señalización de citokinas inflamatorias.

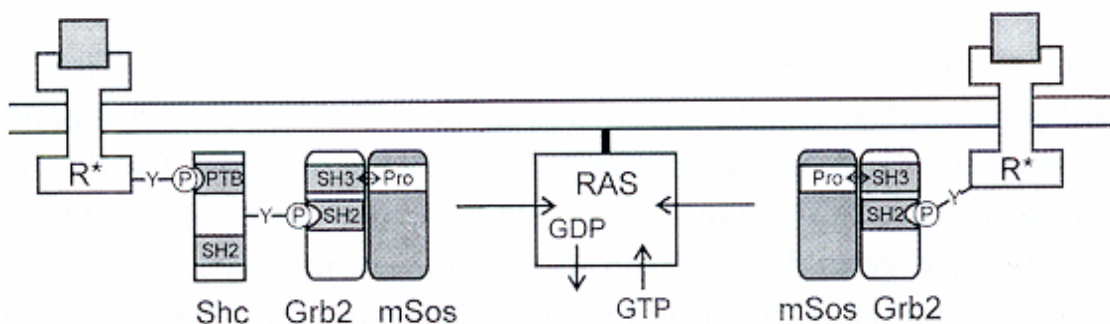
Ras sufre una modificación post-traducciona, una isoprenilación, que la ubica anclada a la membrana. Allí está unida a GTP, que luego hidroliza a GDP debido a su actividad GTPasa. En células no estimuladas la tasa de disociación de GDP de Ras es muy lenta, de forma que la mayor parte de Ras está unida a GDP [13]. La señal de una citokina produce un incremento rápido en la cantidad de Ras-GTP, la forma activa que inicia la cascada *downstream* de las MAPKs. Dado que Ras está anclada en la membrana, es allí donde interactúa con ciertas proteínas adaptadoras que reclutan los GEFs y GAPs para regular su actividad.

#### 1.1.2.1 Proteínas Adaptadoras en la ruta de las Ras/MAPK

La función de los adaptadores es la de hacer de puente entre los receptores activados y las proteínas con alguna actividad catalítica intrínseca. Estos adaptadores no tienen actividad enzimática propia, pero sí una serie de dominios reconocibles por otras moléculas [14].

Crk, Vav y Shc fueron identificados inicialmente como protooncogenes retrovirales. La secuencia de Crk es muy similar a la de la PLC (fosfolipasa C). Vav tiene muchos motivos estructurales diferentes lo que la convierte en un “*linker*”, transmisor de la señal y regulador de la transcripción génica en linfocitos y otras células mieloides. Shc se une a receptores de factores de crecimiento cuando ya están autofosforilados y activados, además de ayudar a la unión de la proteína monomérica Ras a los RTKs [1].

Crk, Shc y Grb2 tienen funciones similares. Cuando Shc o alguna molécula similar se une a los receptores fosforilados, éstas se fosforilan a su vez, de forma que Shc puede unirse al dominio SH2 del adaptador Grb2. Al mismo tiempo, Grb2 presenta un dominio SH3 que puede reclutar a otras proteínas como SOS (es el producto del gen “Son Of Sevenless” de *Drosophila melanogaster*). SOS es un GEF y, por tanto, un regulador de la actividad de Ras. Grb2 también puede unirse a GAPs a través de ese motivo SH3. Estas conexiones tienen a las proteínas G, como Ras, bajo el control de las señales extracelulares y hacen de ellas un punto clave de regulación de la vía Ras/MAPK [4, 5, 13].



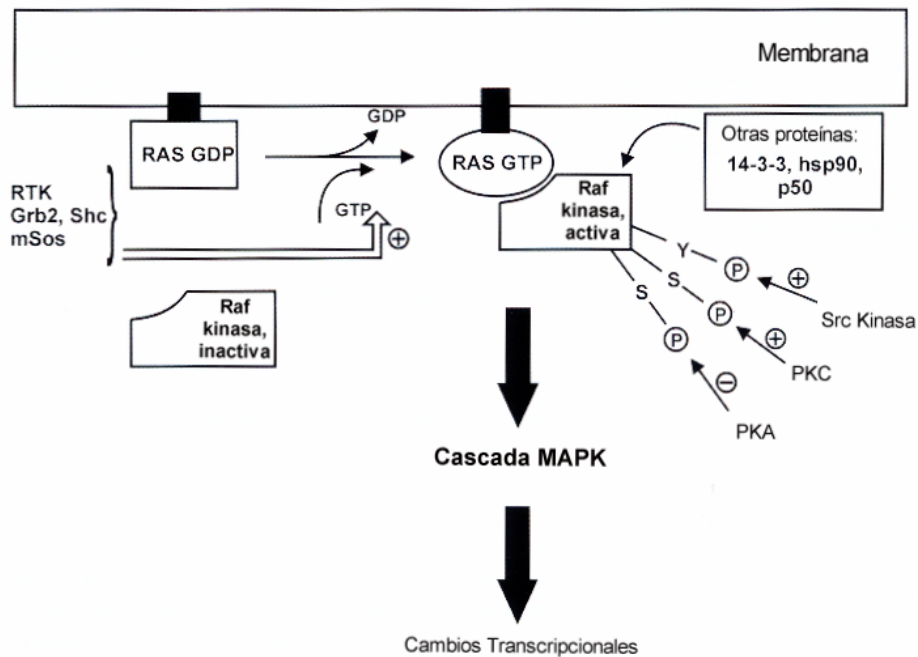
**Figura 4. Esquema de activación de Ras mediante adaptadores.** La unión de los mismos mediante el reconocimiento de los dominios correspondientes lleva a la formación de la forma activa Ras-GTP y la liberación de GDP [1].

### 1.1.2.2 Efectores *downstream* de la activación de Ras

Una vez que se ha formado el complejo Ras-GTP, éste inicia una serie de fosforilaciones que llevan la señal desde la membrana hasta el núcleo. La cascada Ras/MAPK consiste en una secuencia de kinasas que comienza con las MAPKKKs (MAP kinasa de kinasa de kinasas), continua con las MAPKKs (MAP kinasa de kinasas) y termina con MAPKs (MAP kinasas) en el núcleo, que a su vez fosforilarán a factores de transcripción.

La principal diana de Ras son las Raf kinasas, unas MAPKKK citosólicas que fosforilan sus dianas en residuos de Ser/Thr. Las Raf kinasas son activadas en la membrana por Ras. No se sabe cómo la interacción con Ras produce la activación de Raf porque, aunque necesaria, no es suficiente. Además, dado que a su vez Raf es fosforilado en las posiciones Ser338 y Tyr341, se supone que dicha activación requiere la participación de kinasas. De estos puntos de fosforilación parece que el más importante es la del residuo de Ser/Thr, dado que existen otras proteínas como las 14-3-3 que están implicadas en la regulación de Raf y PKC y que se unen a Ras-Raf tanto en su forma no fosforilada como cuando sólo lo está en el residuo de Ser [15].

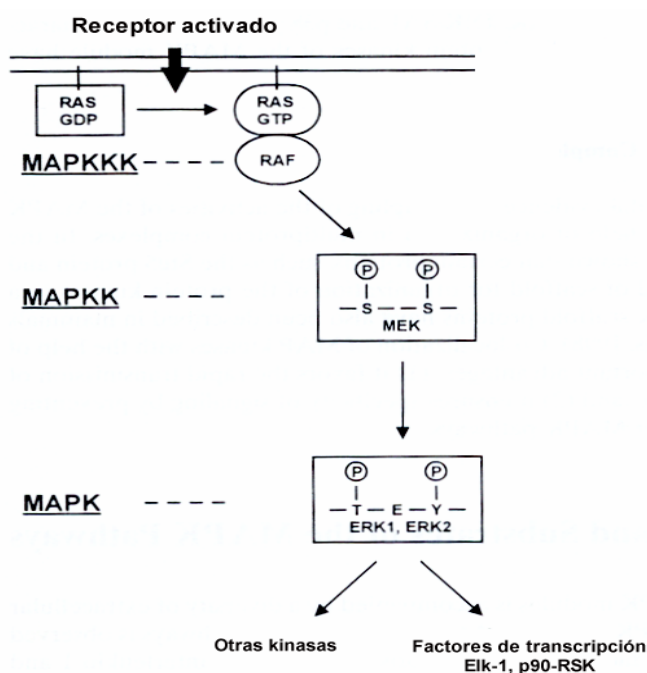
Otras dianas de Ras son las PI3Kinasas, cuyos principales sustratos son los fosfoinositoles y sus derivados fosforilados. El resultado de la acción de la PI3K es un fosfoinosítido, que es degradado por la fosfolipasa C (PLC) a diacilglicerol (DAG) e inositol 3 fosfato (IP<sub>3</sub>). Tanto estas kinasas como sus mensajeros lipídicos juegan un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular y otras respuestas como a la insulina. Esta vía es particularmente importante en la cascada de transducción de señal de la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 y GM-CSF [4, 5].



**Figura 5. Activación de Raf.** En la activación de Raf por Ras participan otras moléculas como las proteínas 14-3-3, que sirven para estabilizar el complejo Ras-Raf. No se sabe exactamente qué moléculas son las responsables de la fosforilación de Raf pero sí que entre ellas están las Src Kinasas y la PKC (Proteín Kinasa C) y que como regulador negativo se halla la PKA (Proteín Kinasa A) [1].

El siguiente paso en la activación sería la activación de las MAPKKs, también llamadas MEKs (MAP/ERK Kinasas). Se encuentran en un nivel inmediatamente anterior a las MAPKs en la cascada de señalización y reciben la señal directamente de Raf (porque es una MAPKKKs). También tienen actividad dual, fosforilando residuos de Tyr y Ser/Thr. No se conocen los determinantes estructurales que especifican el reconocimiento de sus dianas MAPK, pero sí que la especificidad y la selectividad de este reconocimiento es sorprendente, dada la gran variedad de señales a las que Raf y las demás MAPKKKs responden. Además existen controles que impiden las reacciones cruzadas, dado que, por ejemplo, Ras/Raf/MAPK es activada por muchas señales y es posible obtener diferentes respuestas biológicas incluso en la misma célula. De este modo cada MAPKK fosforila generalmente a sólo una MAPK, lo que

determina en gran parte qué cascada de fosforilación se va a seguir y, por tanto, qué efectos biológicos se producirán [15]. Este paso de activación de las MAPKKs es el más relevante desde el punto de vista de la actividad intracelular, ya que es donde se produce la amplificación de la señal (porque las MAPKKs son más abundantes que las MAPKKKs).



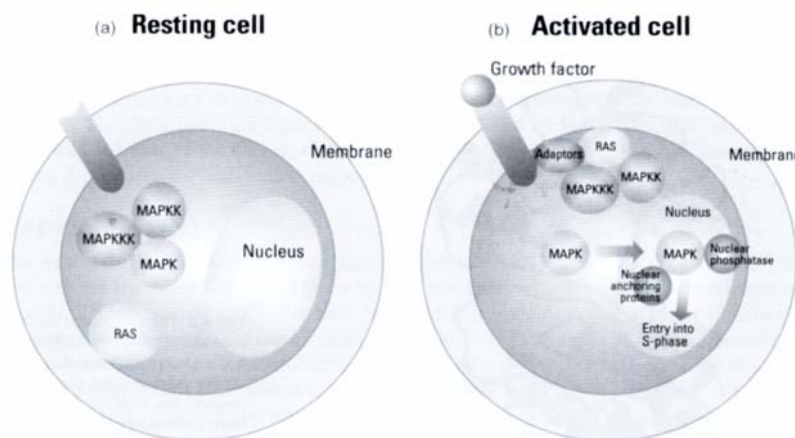
**Figura 6. Esquema de activación de la ruta de MAPKs.** Una activado Ras, se fosforilan las MAPKKKs, en este caso Raf. Ésta, a su vez, activa la MAPKKs MEK1, fosforilándola en dos residuos Ser (S). Finalmente, MEK1 activa la MAPK ERK1/2, mediante la fosforilación en un residuo de Tyr (Y) y Thr (T), que se presenta con una secuencia característica T-X-Y (donde X es cualquier aminoácido) [1].

El siguiente paso en la cascada de fosforilación implica la activación de las MAPKs (“Mitogen Activated Protein Kinases”). Hay tres tipos de MAPKs: las ERKs, la p38 y las JNKs (“Jun N-terminal Kinases”, Jun es un factor de transcripción universal), esta última también denominada SAPK (“Stress Activated Protein Kinase”). Todas ellas son serín-treonín kinasas y se activan por fosforilación en un residuo de tirosina y de treonina.

Hay tres principales rutas Ras/MAPK, cada una con una diferente MAPK terminal y cada uno está asociada con respuestas celulares diferentes:

1. p42-p44 MAPK ó ERK1/2
2. p38 MAPK
3. p46-p54 JNKs ó SAPKs

Las MAPKs son muy específicas en la selección de sus sustratos, y están bastante especializadas en cuanto a las respuestas en las que se activan. Así, las JNKs/SAPKs y p38 transmiten señales principalmente en respuesta a citocinas y estrés ambiental, mientras que los factores de crecimiento activan la ERK1/2, que regula principalmente la progresión del ciclo celular y la proliferación [16]. Como característica más importante hay que destacar que todas son citoplasmáticas, pero una vez activadas se translocan al núcleo, siendo éste un paso necesario para una respuesta positiva, por ejemplo, a los factores de crecimiento [15]. Cuando ERK1/2 es retenida en el citoplasma, no se pasa a la fase S del ciclo celular y, por tanto, no hay síntesis de DNA; del mismo modo, se ha comprobado es necesaria su dimerización además de la fosforilación antes de pasar al núcleo, al menos en el caso de ERK1/2 [1].



**Figura 7. Activación del ciclo celular.** Sólo cuando las MAPKs penetran en el núcleo se pasa a la fase S de síntesis de DNA, el paso previo para la división celular [13].

### 1.1.2.3 ERK1/ERK2

ERK1/2 es una MAPK clave en la mayor parte de respuestas proliferativas. Su ruta de activación suele ser: Ras-Raf-MEK1/MEK2-ERK1/2, pero no es exclusiva. Esta MAPK está compuesta de dos isoformas muy similares ERK1 y ERK2, de 44 y 42kDa respectivamente, y por eso nos referimos a ella como ERK1/2. Su activación está marcada por el hecho de que primero se produce la fosforilación en tirosina 204 antes que la de treonina 202. El resultado de este proceso es el establecimiento de un umbral: la fosforilación en tirosina permite la acumulación de formas no activas de la proteína, que una vez fosforilada en treonina, se activa rápidamente. En el sistema inmune la forma más abundante es la ERK2 (o p42 MAPK).

MEK1 y MEK2 son las MEKs encargadas de su activación. Ambas fosforilan tanto a ERK1 como a ERK2 indistintamente. Sus residuos fosforilados, que determinan por tanto su activación por Raf, son dos serinas localizadas en las posiciones 217 y 221. Parece ser que sólo las isoformas de Raf son capaces de activar a MEK1 y MEK2 y, por tanto, de incrementar la actividad de ERK1/2 de forma exclusiva.

La familia Raf está compuesta por RafA, RafB y Raf1, aunque la mayor parte de los estudios se han centrado en Raf1 porque es la que se expresa de forma más ubicua (RafA aparece en tejido urogenital y RafB en tejido neuronal y testicular). Raf1 forma un complejo con otras proteínas como hsp90 (heat shock protein 90), p50 y varias 14-3-3, esta última parece estabilizar Raf1 tanto en su estado fosforilado como en su

interacción con Ras, también parece tener cierta especificidad en el reclutamiento de Raf1 a complejos proteicos de mayor tamaño.

### **1.1.3 JAK-STAT**

La señalización vía Ras-MAPK tiene como función principal la de inducir la proliferación en respuesta a las citocinas y eso implica, en último caso, la activación de la expresión génica. Una característica de las citocinas es un rápido incremento de la actividad transcripcional de determinados genes; este proceso está mediado por una serie de factores de transcripción citoplasmáticos que se activan por fosforilación de las kinasas asociadas a los receptores de citocinas. Una vez activos, estos factores se translocan al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de DNA en las regiones del promotor de los genes de respuesta a citocinas y, por tanto, inician su transcripción.

#### **1.1.3.1 STAT: Transductores de la señal y activadores de la transcripción**

Las STAT son moléculas activadas por los receptores de citocinas, como éstos también activan las tirosín kinasas JAK, a esta vía se la conoce como la ruta de las JAK-STAT. Muchas veces esto es causa de confusión porque la activación por fosforilación de las STAT no es debida únicamente a la función de las JAK kinasas, aunque sí son necesarias para ella [17].

Se han identificado siete genes que codifican para las STAT: STAT1 y STAT2 fueron las primeras en ser descritas, las demás fueron

identificadas mediante la búsqueda de genes homólogos para estas dos primeras: STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. De todas éstas se han encontrado alternativas generadas por *splicing*. Tanto la estructura molecular como el mecanismo de activación está muy conservado en términos evolutivos, lo que nos da una idea de lo importante que es esta vía; se han encontrado genes para las STAT incluso en *Drosophila melanogaster* [18].

El mecanismo de activación de las STAT es el siguiente: tras la unión de la citokina a su receptor, se activan las JAKs asociadas a éste y fosforilan sus dominios citoplasmáticos. Es entonces cuando se unen las STAT a estos residuos del receptor, lo que permite a las kinasas fosforilar el residuo de tirosina del extremo C-terminal de las STAT; llegado este punto se liberan del receptor y forman homodímeros. También puede producirse la formación de heterodímeros cuando una misma citokina activa varias STAT, y en el caso de la STAT2 la formación del heterodímero es fundamental para que se produzca la unión al DNA. El dímero de STATs se transloca al núcleo donde se une a motivos específicos dentro del promotor de genes de respuesta a citoquinas. El mecanismo exacto por el que las STAT activan la transcripción no está muy claro, parece que activan la maquinaria transcripcional pero también forman complejos con otros factores de transcripción (como c-Jun, SP1, etc.) en lo que podría denominarse un proceso de tipo cooperativo. Se han descrito alternativas a este mecanismo general, así STAT1, en respuesta al IFN $\alpha$ , se activa por unión al receptor ya asociado a STAT2 más que con el receptor en sí, etc.

Hay muchas citokinas que emplean las STAT1, STAT3 y STAT5, pero no tantas utilizan STAT2, STAT4 y STAT6. La especificidad de las

STAT se obtiene a varios niveles [4, 5]. El control primario de la activación es a través del reconocimiento de la secuencia fosforilada del receptor por los dominios SH2 de las STAT; pero también se controla por la limitación en la expresión de los receptores de citocinas que utilizan las mismas STAT, de forma que receptores diferentes que activen a una misma STAT no se expresan en la misma célula.

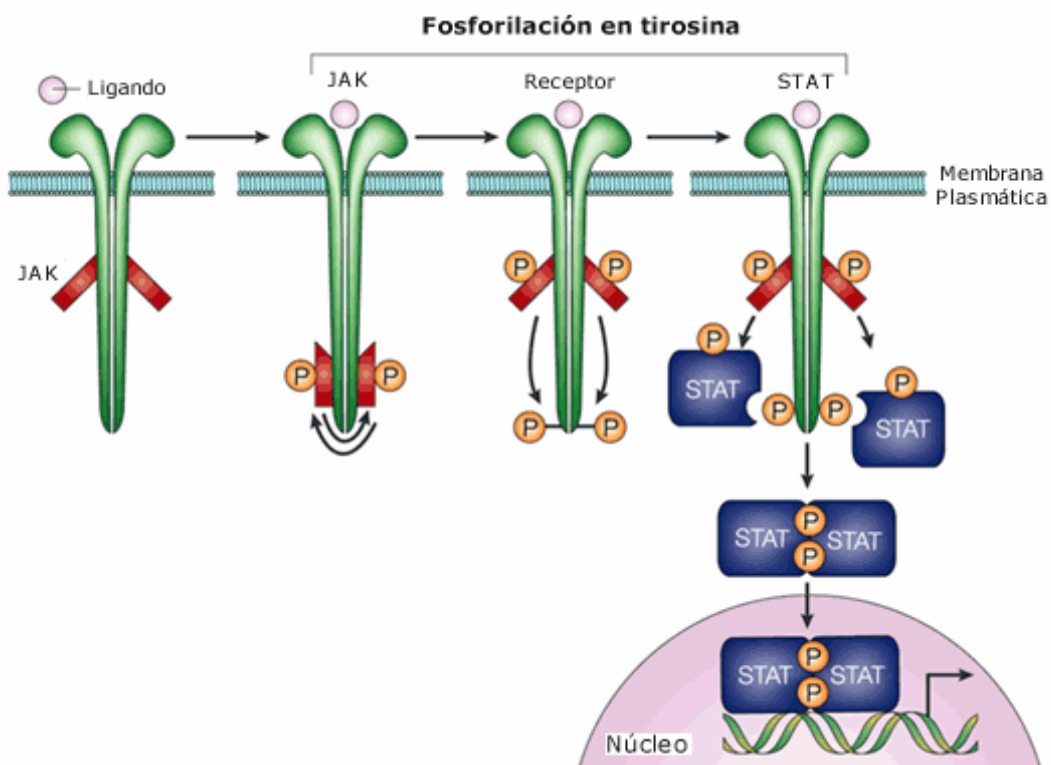


Figura 8. Representación esquemática de la transducción de señal vía JAK-STAT [7].

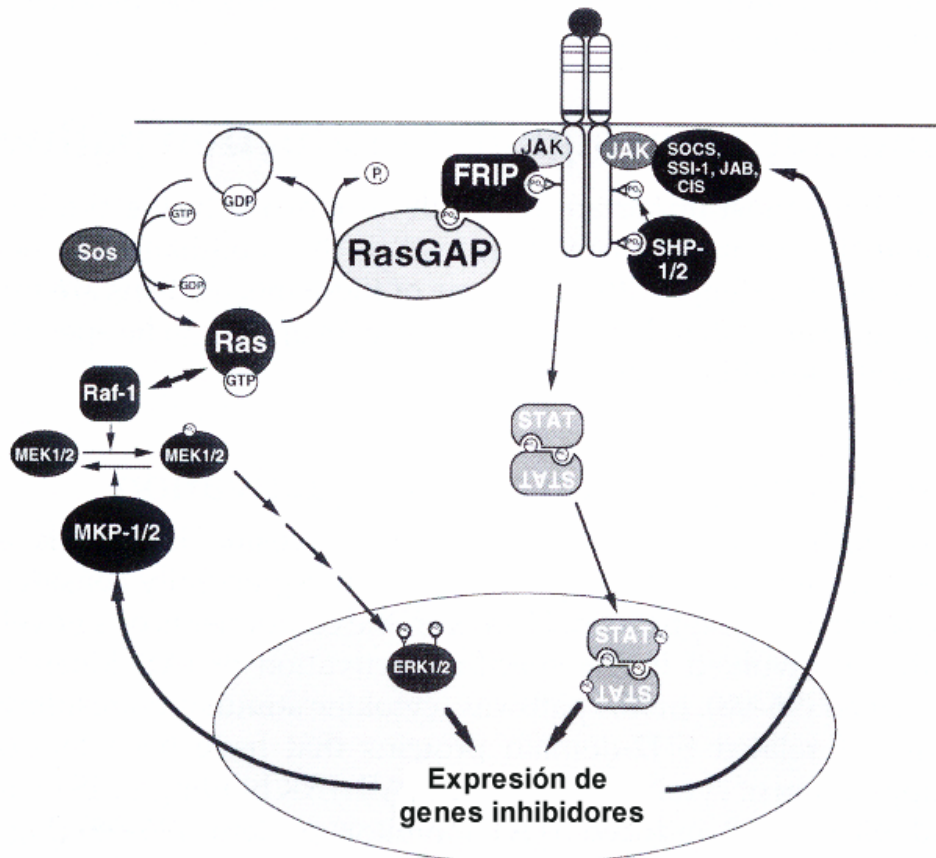
Las citocinas activan también rutas de transducción adicionales que contribuyen a al efecto de esta vía JAK-STAT. Un ejemplo de esto es la activación de la vía Ras/MAPK para el funcionamiento completo de las moléculas STAT1 $\alpha$  y STAT3. En particular, el residuo de serina que se encuentra en el extremo C-terminal de STAT1 $\alpha$  es fosforilado en algún momento por la vía Ras/MAPK, posiblemente por la acción de ERK1/2

[19]. Ni el IFN $\alpha$  ni el IFN $\beta$  actúan de forma eficiente sobre la vía Ras/MAPK, pero la estimulación de sus receptores provoca que la subunidad  $\alpha$  de éstos active la ERK2; así, se ha demostrado que STAT1 $\alpha$  es fosforilado en serina por la ERK2 en respuesta al IFN $\beta$ . Por otro lado, la fosforilación en serina de STAT3 es necesaria para su unión al DNA (no es el caso de STAT1 $\alpha$ ), en su ausencia puede actuar como una molécula adaptadora que une la subunidad  $\alpha$  del receptor del IFN $\alpha$  y el IFN $\beta$  con la subunidad p85 de la PI3K y que resulta en la activación de esta última [4, 5].

### **1.1.4 Regulación negativa de la activación de las quinasas**

La inactivación de las quinasas asociadas a los receptores es un mecanismo de control crítico en todas las vías de señalización y generalmente se considera que ocurre mediante la intervención de fosfatasas. Aún así, se han descrito nuevos mecanismos regulatorios dado que la estimulación por citocinas produce la activación de una serie de proteínas con dominios SH2 que se han denominado SOCS-1, -2, -3, (Supressors Of Cytokine Signaling), JAB (JAK Binding), CIS (Cytokine Induced SH2) y SSI-1 (STAT-induced STAT Inhibitor) [20-23]. Una vez expresadas, estas proteínas bien compiten con las STATs por los residuos de fosfotirosina del recepto, bien se unen a las JAKs inhibiéndolas [24]. La expresión de los genes que codifican estas proteínas representa un clásico mecanismo regulatorio de retroalimentación negativo donde la inducción de la ruta JAK/STAT acaba siendo inactivada por la expresión de SOCS, JAB, CIS y SSI. De esta forma, la expresión de los inhibidores disminuye

la activación de la ruta JAK-STAT hasta llegar a unos niveles que le permitan reactivarla en caso de que una nueva señal alcance la membrana.



**Figura 9. Inhibición de la transducción de la señal.** La expresión de estas proteínas inhibitoras (SOCS, SSI-1, JAB, CIS) está regulada por un clásico mecanismo de retroalimentación negativa. En este esquema se puede observar como, aunque la expresión de estos genes está controlada principalmente por las STAT, la ruta de las MAPKs también está implicada [22].

Del mismo modo también hay una regulación específica de la ruta Ras/MAPK; en particular, de los genes que codifican determinadas fosfatasas específicas que catalizan la hidrólisis de los residuos serina y tirosina de las MAPK activadas. Interesantemente dos de ellas, MKP-1 y

MKP-2 son inducidas vía Ras/MAPK, lo que puede ser otro caso de regulación por retroalimentación negativa.

Otro punto de regulación negativa de la ruta Ras/MAPK se produce al nivel de Ras. Dado que para su activación se requiere la actividad de determinadas de proteínas adaptadoras, se ha descubierto que el control a este nivel puede ser el responsable del estado de anergia de los linfocitos T (estado en el que no hay respuesta a un estímulo, importante en la inhibición de la proliferación de las células T autorreactivas y, por ende, en la regulación de la autoinmunidad). Así, la hiperfosforilación de Cbl (un adaptador) puede llevar a la activación de Rap1 (una proteína muy similar a Ras), esta proteína no está en la membrana y se asume que actúa como competidor de Ras en la unión a moléculas efectoras. En células anérgicas la hiperfosforilación de Cbl tiene como objetivo la hiperactivación de Rap1 y, por tanto, la inhibición de la vía de Ras/MAPK [25].



## 1.2 Rafts

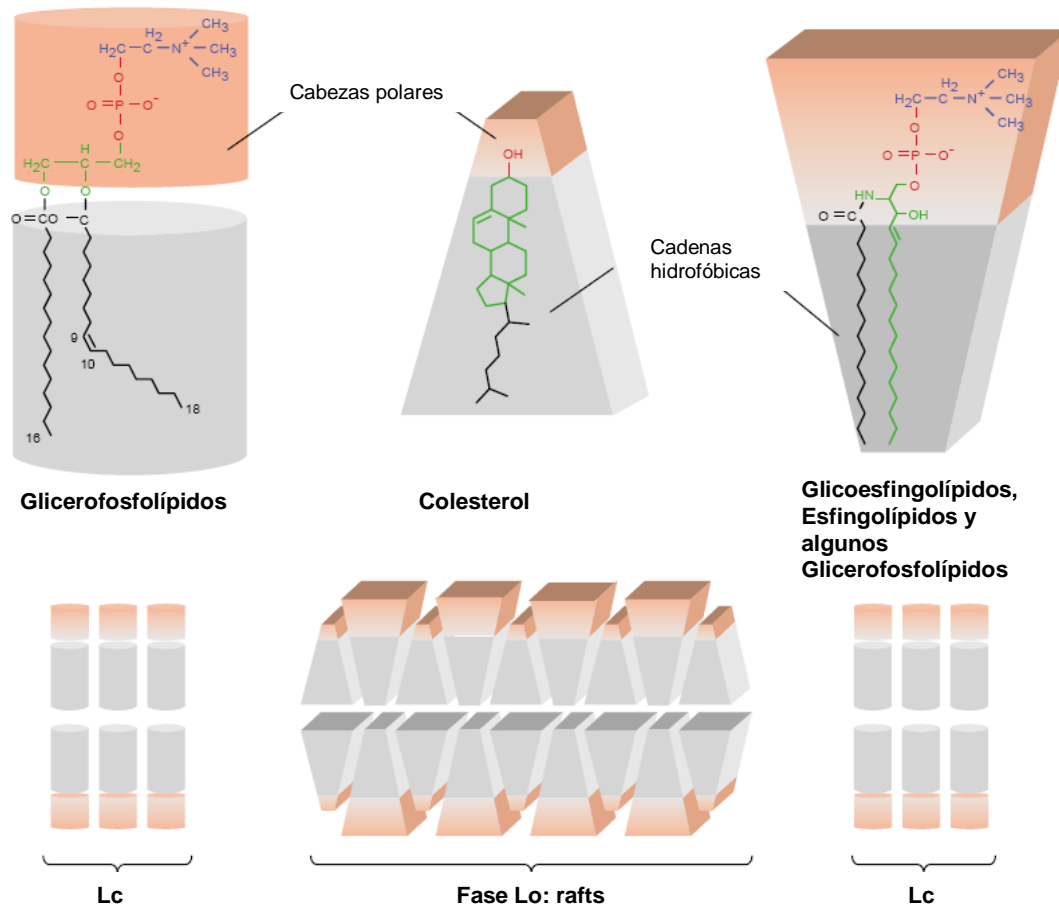
### 1.2.1 Breve historia de los rafts.

El concepto de los también llamados “microdominios lipídicos” fue sugerido por primera vez hace más de dos décadas, basándose en el análisis de la distribución heterogénea y los ensayos de perturbaciones estructurales en biomembranas [26]. Estas observaciones, entre otras, hacen referencia a un patrón de distribución de proteínas no-aleatorio en la superficie de las células vivas, mediante el uso de la técnica de Transferencia de Energía Fluorescente en Resonancia (FRET) [27-30] y cuestiona desde muchos aspectos el ampliamente aceptado modelo de “mosaico fluido” de las biomembranas [31].

Aunque exhaustivas investigaciones bioquímicas y biofísicas posteriores, tanto en modelos como en biomembranas, han confirmado que la membrana plasmática presenta una considerable micro-heterogeneidad lateral [32], nuestro concepto de la “microestructura” de la membrana sólo ha logrado cambiar a partir de los trabajos realizados a mediados de la década de los 90 gracias al desarrollo de dos líneas de trabajo sobre membranas. Una línea se basó en la aplicación de nuevas técnicas de alta resolución (principalmente microscópicas) para poder visualizar la localización, distribución y movilidad (difusión lateral) de moléculas individuales de membrana [33-35]. La otra línea partía del estudio de *Brown and Rose* [36] que describe como ciertas fracciones de membrana son resistentes a la solubilización por detergentes no-iónicos en frío. Estas fracciones son ricas en glicolípidos, por ello se llamaron inicialmente “complejos ricos en glicolípidos insolubles en detergentes” (DIGs). Más

adelante, se demostró que los DIGs tienen una composición lipídica única en una gran variedad de células eucarióticas, y que están altamente enriquecidas en esfingolípidos (glicolípidos/gangliósidos) y colesterol. Otros nombres también empleados para estos microdominios son “membranas resistentes a detergentes” (DRMs), “membranas enriquecidas en glicolípidos” (GEMs), etc.

Tras estudios sistemáticos en el tráfico intracelular mediado por lípidos y la distribución de proteínas de membrana, Simon *et al.* [37] formularon la “hipótesis de los rafts”, refiriéndose a los DIGs como pequeños microdominios de membrana que contienen ciertas proteínas, de modo que pueden actuar como potenciales plataformas de señalización y/o internalización. Otro tipo de DIGs fueron descritos como “invaginaciones de membrana similares a cuevas” de 60 a 90nm, fácilmente observables al microscopio electrónico. La asociación de las proteínas de unión al colesterol de la familia de la caveolina a estos dominios es crucial para la formación de estas estructuras denominadas “caveolas”, una propiedad que las distingue de otros DIGs [38]. En el Sistema Inmune, únicamente ciertos tipos celulares muestran estas caveolas en su superficie, como son los macrófagos o los granulocitos, mientras que las células mononucleares (linfocitos T y B, monocitos) sólo presentan microdominios “planos” o rafts.



**Figura 10. Organización de los lípidos en un microdominio raft: un modelo simplificado basado en la forma teórica de los lípidos de la membrana.** La organización de los lípidos en la membrana depende de su carácter anfipático (cabezas polares y colas hidrofóbicas), que intenta excluir el mayor número de moléculas de agua del interior de la misma. La forma Líquido Cristalina (Lc) parece ser la más estable desde el punto de vista termodinámico para los lípidos “cilíndricos” como los glicerofosfolípidos. En la fase Líquido Ordenada (Lo), la inclusión de colesterol entre los glicoséfolípidos rellenaría los “huecos” que éstos dejan en la membrana. [125].

En los últimos años han proliferado los trabajos que aúnan el conocimiento en las técnicas de estudio y sobre los rafts lipídicos [39-47]. La mayor parte de las investigaciones realizadas hasta el momento destacan que los rafts lipídicos son estructuras evolutivamente conservadas y se han centrado fundamentalmente en investigar su papel en múltiples procesos de señalización en gran variedad de tipos celulares. Estos estudios incluyen el receptor EGF, el receptor de insulina y las integrinas (entre otros) [45, 48-51], o se centran en su papel en la señalización vía TCR y la formación de la sinapsis inmunológica [52, 53]. De forma general, se puede decir que los

rafts lipídicos en su parte exterior (o hemimembrana externa), están compuestos principalmente de esfingolípidos con cadenas muy saturadas que se empaquetan fuertemente en microdominios con consistencia de gel, estabilizados por la presencia de colesterol (a veces en conexión con proteínas de unión a éste como las caveolinas); por ello, también se la conoce como “fase líquido-ordenada”. Se diferencian de la bicapa de glicerofosfolípidos circundante, porque ésta última permanece en una fase líquido-desordenada debido a las cadenas insaturadas de los glicerofosfolípidos. Se puede decir que los rafts lipídicos son dominios relativamente ordenados, que flotan en la bicapa desordenada de los glicerofosfolípidos. Esta diferente distribución de los esfingolípidos permite que el glicoesfingolípidos GM1, que se une a la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica, sea usado con frecuencia como marcador de zona raft. La hemi-capa interna de los rafts es menos conocida, pero se cree que esta compuesta de fosfolípidos saturados. Ambas capas pueden existir independientes, pero se acoplan para la señalización [54].

La separación de ambas fases produce la compartimentalización de proteínas asociadas a raft y su segregación espacial de las proteínas excluidas. Estas propiedades sugieren que los rafts lipídicos pueden ser de una importancia crucial en los procesos de transducción de señal acercando los receptores a sus moléculas transmisoras de señales, mientras excluyen de forma temporal a otras (Ej.: moléculas de regulación negativa) [55]. Las proteínas asociadas con la cara externa de los rafts lo hacen a través de su unión al glicofosfatidilinositol (GPI), de forma que es este lípido el que posiciona preferentemente a las proteínas en los rafts [56]. Los ejemplos de receptores inmunes asociados a GPI incluyen CD14 (receptor para los lipopolisacáridos bacterianos), CD16 (FcR); y CD48 y CD58 (moléculas de adhesión/coestimulación). Aunque no poseen un dominio transmembrana o

citoplasmático, muchas de estas proteínas de unión a GPI, son capaces mediante su entrecruzamiento provocar la transducción de señal.

Las proteínas citoplasmáticas se asocian con la cara interna de los rafts a través de acilaciones. Las proteínas que son doblemente aciladas por ácidos grasos saturados (N-miristoil y S-palmitolación) se posicionan en los rafts, mientras que los ácidos grasos no saturados o grupos prenilos se excluyen [47, 57]. De forma significativa, la mayor parte de las kinasas de la familia de las Src-Kinasas están doblemente aciladas y asociadas a rafts [58-61]. También la GTPasa H-ras, que tiene un residuo palmitoilo y farnesilo, se encuentra en los rafts lipídicos, mientras que K-ras, que sólo tiene el farnesilo, se asocia con la cara interna de membrana pero es excluida de los rafts lipídicos [62]. Dado que la palmitoilación es un proceso post-traducciona l y lábil, el proceso es reversible, lo que da a las células el potencial de modificar y así controlar, la asociación a rafts. Además, la S-acilación de las proteínas con ácidos grasos insaturados parece ser un mecanismo muy común por el cual las células regulan la transducción de señal mediante la asociación de proteínas a rafts [63, 64].

La gran mayoría de las proteínas transmembrana se excluyen de la zona raft de forma constitutiva y no son incluidas en ella tras la oligomerización de las mismas [48]. Un pequeño número de ellas, en cambio, se posiciona en rafts constitutivamente y suelen requerir de acilación, generalmente S-palmitoilación. Podemos hablar de importantes ejemplos de éstas últimas en el Sistema Inmune como LAT (“linker for activation in T cells”)[65], CD4 y CD8 [66, 67]. Algunas proteínas integrales de membrana constitutivamente se encuentran fuera de zona raft, pero se asocian a ella cuando se activan [48]; un ejemplo son las MIRRs (*Multichain Immune Recognition Receptor*) [49]. La capacidad para

asociarse con los rafts lipídicos tras el entrecruzamiento proteico parece ser una característica de tan sólo una pequeña parte de estas proteínas, y muchas de ellas como CD45 y el receptor de tipo I IL-1, cuando lo hacen, no se asocian a rafts [68, 69]. La mayor parte de los estudios realizados con proteínas quiméricas indican que los dominios transmembrana podrían ser los puntos clave que determinasen la localización de una proteína en zona raft o no [68, 70].

#### 1.2.1.1 Papel de los rafts lipídicos en la iniciación de la señalización en células T

Como muchas proteínas transmembrana, los componentes del receptor de la célula T (TCR) se hallan fuera de los rafts lipídicos, y espacialmente separados de las moléculas residentes en rafts que median los procesos de señalización citosólica. La primera fase de la señalización inducida por el TCR implica la fosforilación de motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAMs) por kinasas de la familia de Src, principalmente Lck. La fosforilación de estos ITAMs media en el reclutamiento de ZAP-70 (de la familia de las Syk kinasas) y su activación por fosforilación en tirosina dependiente de Lck, lo que lleva al acoplamiento y activación de otras moléculas con dominios SH2 implicadas en la hidrólisis de fosfolípidos, movilización de  $\text{Ca}^+$  y activación de la cascada Ras/MAPK [71]. Un sustrato de ZAP-70 es LAT [65], que tras la fosforilación en tirosina se encarga de reclutar moléculas con dominio SH2 y así ensamblar múltiples moléculas de señalización dentro del llamado “*signalsome*” o “plataforma de señalización” [72].

La pista decisiva para un modelo común de cómo la unión de un ligando al TCR media la señalización intracelular se obtuvo observando que, dependiendo de la actividad de la kinasa de la familia Src, las cadenas fosforiladas del CD3 $\zeta$  se podían hallar dentro de los rafts tras la estimulación del TCR conjuntamente con la kinasa ZAP-70 fosforilada y activada [73]. Es decir, parece plausible que tras la unión de ligando el complejo TCR/CD3 sea reclutado a los rafts y se mueva desde un ambiente con fosfatasas inhibitoras como CD45 (fuera de rafts) a zonas confinadas con actividad señalizadora reforzada (rafts). En este sentido, se ha publicado que la fosfatasa CD45 predominantemente activa a Lck mediante la inducción de cambios conformacionales, y que pequeñas cantidades de CD45 son localizadas en los rafts mediante la extracción con Triton X-100. Se ha interpretado que el papel del CD45 localizado en rafts podría ser mantener en equilibrio la activación de Lck, respecto a su kinasa desactivadora: Csk [74, 75].

El concepto de los rafts lipídicos como microdominios funcionales de señalización fue corroborado mediante la desintegración de éstos utilizando la extracción de colesterol por la M $\beta$ CD o anti fúngicos como el filipin, que alteran la señalización mediada por el TCR [76]. Dado que sólo el CD3 $\zeta$  fosforilado es reclutado en los rafts y, debido a la localización en ellos de Lck, se supone que la fosforilación del CD3 sólo sucede en estos microdominios. Permanece sin aclarar el mecanismo que puede mediar la translocación de estos componentes del TCR a los rafts.

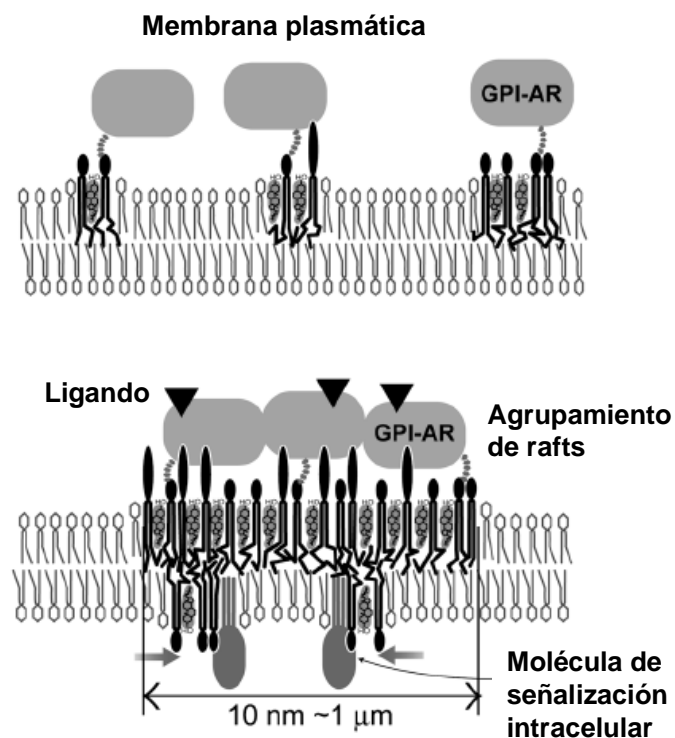
Más allá del papel de los rafts en la iniciación de los primeros procesos de señalización, está su función como estabilizadores y amplificadores de señales gracias a su agregación en complejos mayores acompañados de un reclutamiento de importantes mediadores de

señalización como LAT y otras moléculas asociadas [77], así como componentes del TCR [78]. A estos complejos se les ha dado nombre de “plataformas de señalización” [79]. Es muy importante destacar que los rafts y los filamentos de actina (F-actina) colocalizan [80] y que es el citoesqueleto el que dirige la agregación de los rafts lipídicos [78, 81, 82]. Más aún, el movimiento de las moléculas de membrana dirigido por el citoesqueleto es capaz de incrementar la amplitud y duración de la señalización en células T [83]. Estos movimientos inducen una acumulación de moléculas en la zona de unión entre la célula T y la APC, bajo el que subyace el concepto de sinapsis inmunológica (por analogía a la sinapsis neurológica). Paralelamente a esta función del citoesqueleto como responsable de la agregación de los rafts, también estos movimientos son necesarios para activar el esqueleto de actina y proveer de las señales estimuladoras de esta reorganización [84].

#### 1.2.1.2 Cuestiones sin resolver acerca de la naturaleza de los rafts

Un requisito previo para la función propuesta de los rafts lipídicos como plataformas de señalización es la asociación de las dos capas lipídicas de la membrana, que permita a las proteínas residentes en los rafts de la hemi-membrana exterior colocalizar con las proteínas de la hemi-membrana interior y cruzarse entre sí. Se debe destacar que, además del colesterol, el principal lípido organizador de los rafts son los esfingolípidos, que se localizan de forma exclusiva en la capa exterior; y que en un modelo de bicapa lipídica cuya composición lipídica sea similar a la zona interior, el colesterol no induce dominios similares [85]. Se ha propuesto que esta formación de la hemi-membrana exterior es capaz de

organizar los lípidos de la interior como un dominio rico en colesterol; en particular, gracias a la gran longitud de las cadenas de los esfingolípidos, que les permiten interdigitarse con los lípidos de la zona interna [37, 86]. De todos modos, esta interdigitación se reduce en presencia del colesterol [86], y aunque las proteínas transmembrana pueden, teóricamente, facilitar la formación de los rafts en las membranas biológicas, en realidad no hay una explicación clara para la existencia de rafts lipídicos en la parte interna de la membrana. Un estudio reciente confirma, sin embargo, que dependiendo de su contenido en colesterol, la cara interna se conecta físicamente con la externa, lo que hace surgir nuevas preguntas dado que se demuestra que el agrupamiento de los rafts inducido por el TCR es independiente de colesterol [54].



**Figura 11. Modelo de interacción entre los dominios rafts de ambos lados de la membrana.** Los pequeños microdominios de la hemimembrana externa (10nm) que poseen Receptores anclados a GPI (GPI-AR) pueden formar dominios más grandes (10nm-1mm) por el agrupamiento de varios de ellos en respuesta a la unión del ligando. Éstos deben ser capaces de reclutar a los microdominios de la hemimembrana interna que contiene las moléculas de señalización ligadas a lípidos, posiblemente mediante la interdigitación de los lípidos de ambas caras de la membrana plasmática [100].

Otra cuestión importante acerca de los rafts lipídicos es cuán preciso es el modelo para describir la distribución de las proteínas de membrana, ya que sólo una pequeña proporción de las proteínas de la membrana se encuentra en la fracción rafts insoluble en detergentes [87]. Una proteína es a menudo considerada como proteína raft incluso si sólo un 10-30% de la misma se halla en la fracción resistente a los detergentes, particularmente en el caso de proteínas transmembrana o citosólicas. Dependiendo del área de membrana cubierta por los rafts lipídicos, una proporción considerable de las llamadas proteínas raft podrían encontrarse en la fracción soluble de la membrana. La cuestión aún sin resolver de la frecuencia relativa de los rafts lipídicos dentro de la membrana celular puede cuestionar la idea de que distintas proteínas estén altamente concentradas dentro de los rafts. Así, el sencillo modelo estático de los rafts lipídicos describe insuficientemente la situación que más probablemente ocurre en las membranas biológicas, independientemente de las lagunas que surjan en los métodos más usados para el análisis de los rafts.

### **1.2.2 Limitaciones de los métodos de análisis de los rafts lipídicos**

Muchos de los problemas del modelo de raft lipídicos surgen de la naturaleza del método bioquímico estándar utilizado para el aislamiento de los mismos como la flotabilidad de las fracciones de membrana resistentes a los detergentes. Primero, las proteínas pueden ser resistentes a la extracción con detergentes debido propiedades bioquímicas generales como la hidrofobicidad más que debido a su distribución en los microdominios de membrana de la célula viva. Más aún, la presencia de detergentes no-

iónicos como el TX100 puede crear dominios en fase gel en una bicapa lipídica homogénea que resista una solubilización por el detergente [88]. Paralelamente a este fenómeno, pueden ocurrir un gran número de reordenaciones no-fisiológicas de la bicapa durante la extracción con detergentes. Y lo más importante, el comportamiento de los lípidos es muy dependiente de la temperatura y por ello, la usual extracción a 4°C es fuente de controversia sobre la existencia de los rafts. Un trabajo reciente muestra como las temperaturas bajas son suficientes para la agregación de los rafts en células T vivas, lo que resulta en una inducción de los procesos de señalización [89]. Por otro lado, los microdominios de membrana que contienen proteínas ancladas a GPI junto con kinasas de la familia de las Src puede ser aislados también en la ausencia de detergentes y los microdominios de membrana insolubles pueden ser extraídos de las células a temperaturas fisiológicas cuando se usa el detergente adecuado [90].

También los métodos ópticos son insuficientes para un análisis preciso de los microdominios de membrana, dado que la microscopia inmunofluorescente va acompañada de la fijación de las células a temperaturas bajas y, a menudo, usa anticuerpos bivalentes, lo que genera artefactos debido a la redistribución desencadenada por la temperatura, los mismos anticuerpos o una fijación inadecuada [91]. Nuevas técnicas como el FRET, FRAP o “single particle tracking” (seguimiento de una única molécula) han reafirmado la existencia de estos artefactos, aunque son capaces de superarlos dado que se puede trabajar con células vivas a una temperatura fisiológica de 37°C y, por tanto, corroboran la existencia de los rafts [92-95].

La extracción de colesterol utilizando M $\beta$ CD en células vivas frecuentemente se usa como confirmación de la función de proteínas de

señalización situadas en rafts. Sin embargo, esta técnica por sí sola es capaz de alterar los flujos de calcio independientemente de la llegada de una señal a la membrana dado que es capaz de vaciar los depósitos intracelulares [96]. A pesar de todo esto, el empleo de otras técnicas como FRAP han demostrado que esta extracción no altera la activación de las células mediante fosforilaciones en tirosina [97].

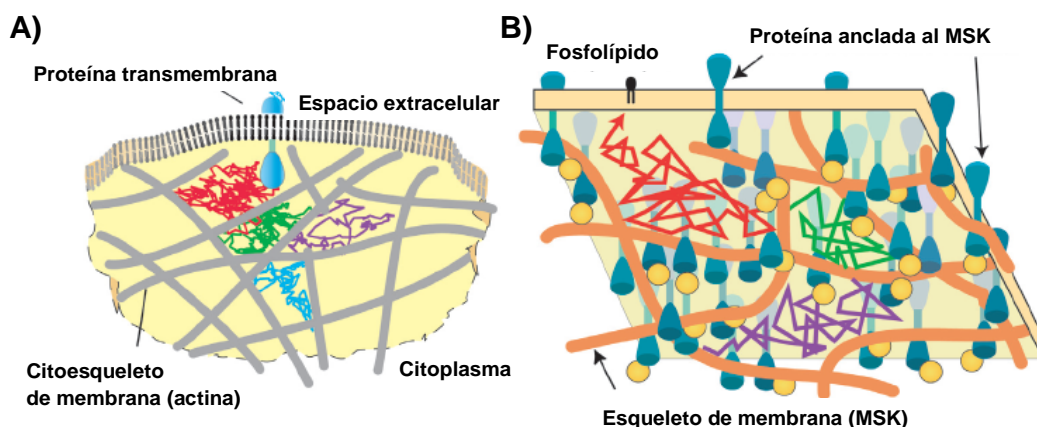
Aunque un gran número de experimentos en la disrupción/modificación de los rafts lipídicos en las células vivas apuntan a un papel funcional de los rafts en la señalización de células T, a menudo se correlacionan con evidencias bioquímicas microscópicas de alteraciones de los rafts. Sin embargo, aunque estos experimentos no dan pruebas explícitas de la función de los rafts lipídicos en la célula, no hacen más que apoyar la existencia de los mismos aunque la naturaleza de la compartimentalización permanezca elusiva [98].

### **1.2.3 La compartimentalización de la membrana determinada a través del seguimiento de una única partícula o “*single particle tracking*”.**

Una forma diferente de analizar las propiedades de la membrana es el análisis de los movimientos de una única molécula. Esto se logra mediante el uso de sondas fluorescentes (variantes optimizadas de GFP o métodos de tinción) u oro coloidal. Aunque las partículas de oro coloidal parecen ser bastante grandes (~40nm), la difusión de este marcaje en la membrana no difiere del fluorescente [99, 100].

De los primeros estudios sobre la dinámica de las moléculas de membrana usando FRAP se sabe que las moléculas en las membranas biológicas difunden sorprendentemente más lentas que en los modelos de membrana [101, 102], con coeficientes de difusión de las moléculas reducidos del orden de 5-50 veces. Un segundo paradigma surge cuando nos encontramos que la difusión molecular se reduce drásticamente por la oligomerización mucho más de lo predicho por el modelo fluido continuo en dos dimensiones de las bicapas lipídicas [103]. Estas observaciones mediante FRAP fueron confirmadas por espectroscopia de correlación fluorescente [104]. Sólo la gran resolución temporal ( $25\mu\text{s}$ ) de las técnicas de seguimiento de una única molécula han explicado este fenómeno [99, 105]. Así, siguiendo un único lípido de membrana se ha observado el comportamiento característico de estas moléculas. En un período del orden de milisegundos las moléculas difunden en un área reducida de 30 a 230nm de diámetro y después “saltan” al siguiente compartimento, donde están atrapadas hasta siguiente salto [99, 105]. De ahí que la baja difusión observada previamente de las moléculas en las membranas biológicas sea el resultado de un promedio de estas “difusiones a saltos” a lo largo del tiempo y por muchas moléculas bajo observación; estos datos se correlacionan, además, con los estudios previos de seguimiento de una única molécula transmembrana [106, 107]. Mientras que la compartimentalización de las proteínas de transmembrana puede ser explicada como “vallas” citoesqueléticas en el lado citoplasmático de la membrana celular [108], la observación de que también los lípidos de la zona externa realizan esta difusión “a saltos” demandan postular la existencia de unos postes para estas vallas, que serían diversas proteínas transmembrana ancladas al entramado del esqueleto de actina denominadas “estacas” [99].

De acuerdo con los resultados de los experimentos de seguimiento de una única molécula, los lípidos y las proteínas están atrapados en zonas confinadas entre estas vallas y estacas, donde difunden libremente. Con distinta probabilidad estadística, las moléculas rompen esta barrera (“saltan sobre las vallas”) y pasan al compartimento vecino, donde vuelven a estar confinadas por un período de tiempo diferente. Este modelo también da una explicación plausible para el descenso de la difusión inducido por la oligomerización de las moléculas de receptor, no la difusión *per se* sino la probabilidad de que los complejos rompan estas barreras de vallas y estacas y que, por ello, la tasa de difusión media se reduzca drásticamente.



**Figura 12. Modelo de Vallas y Estacas.** A) Modelo de “vallas”: las proteínas transmembrana sobresalen por el extremo citoplasmático, donde “chocan” con el esqueleto de membrana lo que la confina en los compartimentos delimitados por éste. Estas proteínas son capaces de “saltar” al compartimento contiguo cuando el filamento de actina se rompe de forma temporal, se aleja de la cara interna de la membrana (y permitiría el paso de la proteína) y/o la proteína reúne la suficiente energía cinética para empujar la barrera cuando esta en su proximidad. B) Modelo de “estacas” proteicas: las proteínas transmembrana ancladas y alineadas a lo largo de la estructura de actina (esqueleto de la membrana), actúan como estacas que confinan de forma temporal a los fosfolípidos (incluso los de la cara externa) y a las proteínas en los compartimentos que ambos, proteínas transmembrana y actina, delimitan por medio del impedimento estérico y los efectos de los choques contra las proteínas “estaca”. [100].

Estos resultados de seguimiento de una única molécula provienen de aquellas que no están consideradas residentes en los rafts lipídicos. El seguimiento de sondas lipídicas con cadenas saturadas e insaturadas en

células vivas revela una difusión confinada o predominantemente no-confinada, respectivamente, indicando un comportamiento dependiente de rafts de los lípidos saturados de la membrana [109]. Sin embargo, los estudios analizando los movimientos de una única molécula anclada a GPI o transmembrana revelan comportamientos similares de las proteínas raft y no-raft y no aportan evidencias de un confinamiento específico de las proteínas raft [110, 111]. Los resultados se confirmaron mediante FRAP, indicando que la asociación a rafts no es el principal determinante de la difusión de proteínas de membrana [94]. En conclusión, las moléculas de raft son altamente móviles, lo que contrasta con la visión clásica acerca de los rafts lipídicos, aunque, como se menciona antes, la fase gel puede no ser suficiente para alterar significativamente la difusión de las moléculas [112, 113].

Un análisis de los movimientos de una única molécula de Lck revela que tras la estimulación del TCR en un determinado punto de la superficie celular, se acerca a las proximidades del complejo TCR independientemente de su actividad kinasa [114]. Una reorganización rápida de la actina inducida por el TCR [83, 115] puede explicar este movimiento inicial de la Lck. La formación de un gran entramado de vallas y estacas alrededor del complejo del TCR puede facilitar que las moléculas de Lck queden atrapadas. Aunque estos reajustes del citoesqueleto pueden, teóricamente, suceder incluso en ausencia de los rafts, los complejos moleculares dentro de rafts son más susceptibles a mínimos cambios en la densidad de los filamentos de actina de lo que son las moléculas monoméricas [114]. Así, debe haber una interacción funcional muy cercana entre vallas y estacas y rafts lipídicos para mediar la proximidad de las kinasas y sus sustratos, necesarios para la inducción de la señalización en células T.

### 1.2.4 La función de los rafts en la iniciación de la señalización TCR: un modelo integrado

El modelo de difusión “a saltos” no está en discrepancia con la existencia de los rafts, pero los “reduce” a un tamaño muy pequeño o a una vida media muy corta. De acuerdo con esto, los análisis iniciales de una única molécula sugieren un tamaño de rafts en células *resting* entre 50 y 200nm [116, 117]. Sorprendentemente, parece que cuánto mejor se mira, los rafts parecen más pequeños. Así, estas novedosas técnicas y los experimentos basados en FRET muestran que las agrupaciones de proteínas ancladas a GPI consisten en únicamente unas pocas moléculas (hasta 4) y suceden en períodos del orden de milisegundos [95, 96]. Es probable que la organización de las moléculas en tan pequeños grupos no interfiera con la difusión, incluyendo la difusión a saltos, en la membrana. Es destacable que estas agrupaciones son sensibles a la eliminación de colesterol [95], lo que nos podría permitir clasificarlas como rafts lipídicos. Existe un intercambio frecuente entre las moléculas de diferentes rafts así como en la fracción no-raft pero, en cualquier caso, su posicionamiento en los rafts produce una mayor probabilidad de que las moléculas residentes en ellos permanezcan allí e interactúen entre sí.

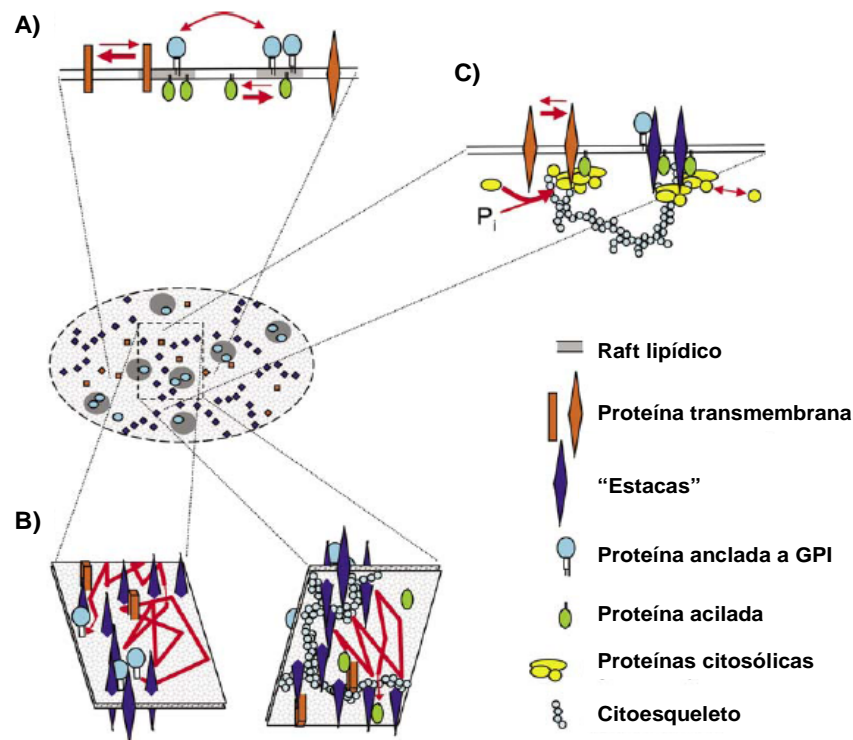
Aunque esta visión integradora de la organización de la membrana no implica confinamientos espaciales estables, sí apoyan la existencia de confinamientos espaciales altamente dinámicos como resultado de una elevada probabilidad de que las especies moleculares localizadas en los rafts se encuentren cerca entre sí pero con un rápido intercambio de moléculas individuales. Este modelo integrado enfatiza la función de los rafts lipídicos en la señalización celular proveyendo de un entorno que

facilita la proximidad selectiva de distintas proteínas señalizadoras (localizadas en rafts). Es importante tener en cuenta que debemos entender a los rafts lipídicos como estructuras dinámicas que refuerzan la probabilidad de que distintas moléculas se pongan en contacto entre sí.

El modelo integrado derivado de estos nuevos descubrimientos sobre la organización de la membrana, cuestiona múltiples conceptos previos pero explica otras cuestiones previas que permanecían sin resolver. Teniendo en cuenta la heterogeneidad que presenta los rafts [118, 119] se deduce que la simple localización en rafts no es suficiente para concentrar las proteínas dado que ellas pueden localizarse en diferentes tipos de rafts, por lo que las interacciones proteína-proteína son necesarias para la construcción de complejos de señalización. Existe una predominancia de las interacciones proteína-proteína en la formación de la sinapsis inmunológica, ya que tanto proteínas no-raft (CD45) como proteínas raft (Lck y LAT) tienen un elevado grado de movilidad en la membrana hasta que la estimulación del TCR las inmoviliza; esto depende tanto de los distintos sitios de activación dentro de las mismas como, interesantemente, también de la actina F [35].

Los mecanismos basados en la interacción proteína-proteína concuerdan con la función de los rafts en la inducción de la señalización, ya que éstos facilitarían las distintas interacciones incrementando su concentración local y, por tanto, la probabilidad del contacto de las moléculas transductoras. Es más, los resultados del seguimiento de una única molécula indican que la activación del receptor induce la estabilización de los rafts, como pasa con la proteína ligada a GPI CD59; y ésta, a su vez, facilita la formación de unas estructuras mayores y más estables, pero aún dinámicas. La inducción de la estabilización se puede

explicar como pequeños cambios de energía producidos por el agrupamiento del receptor, lo que provocaría que los lípidos de los rafts y el colesterol quedasen atrapados en los inicialmente rafts de reducido tamaño [120]. Aunque el impacto exacto de esta estabilización en la inducción y magnificación de la señal generada por el TCR no este aún establecido, se puede especular con que los rafts estabilizados son la base de la agregación dirigida por el citoesqueleto que formaría las plataformas de señalización.



**Figura 13. Integración de los principios organizadores de la membrana.** A) Rafts lipídicos: las proteínas se encuentran próximas gracias al anclaje GPI o la acilación. B) Vallas y Estacas: el citoesqueleto y proteínas asociadas a él limitan la difusión de las proteínas a ciertas áreas de la membrana, de la que sólo pueden salir "a saltos". C) Las interacciones proteína-proteína inducidas por asociación (Ej.: fosforilación en tirosina) llevan a la formación de las plataformas de señalización, donde el citoesqueleto actúa como una red de interconexión. Las flechas indican movimiento de moléculas, su grosor la probabilidad del movimiento [98].

En resumen, el modelo integrado de organización de la membrana, apunta a tres mecanismos diferentes que actuarían en paralelo para compartimentalizar las moléculas de membrana facilitando la activación de las células T: i) los rafts lipídicos, ii) vallas y estacas que producen la difusión a saltos, y iii) interacciones proteína-proteína que incluirían no sólo la asociación de proteínas de señalización, sino que también se relacionaría con el citoesqueleto de actina (que a su vez controla la difusión a saltos y la agregación de los rafts). A pesar de todo esto, son necesarios más estudios que corroboren o ayuden a aclarar los principios organizadores que contribuyen a la señalización en células T.

### **1.2.5 Rafts lipídicos y señalización por citokinas**

La mayor parte de los estudios acerca de los rafts se han centrado en los linfocitos T, donde son críticos para la formación e inducción de la sinapsis inmunológica en la región de contacto entre las células T y APC durante la presentación del antígeno [48, 98, 121]. Pero si se considera los rafts como una plataforma que facilita la interacción entre moléculas de señalización, es lógico pensar que estén implicados en cualquier tipo de transducción de señal. Hay datos que relacionan estas estructuras con la entrada de patógenos, además del transporte intracelular [51, 122-125].

La mayor parte de los estudios sobre rafts lipídicos y transducción de señal de citokinas se han centrado en la interleukina-2 [126-130], aunque cada vez hay más trabajos que estudian el papel de estos microdominios en la señalización celular independientemente del TCR [131-134]. Dada la poca cantidad de estudios sobre este tema, se muestra a continuación un resumen de los datos obtenidos hasta el momento.

### 1.2.5.1 La Interleukina 2

La interleukina-2 tiene unos efectos muy destacados sobre las células en activación, diferenciación, y homeostasis. Su receptor consta de tres cadenas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  [135]. La cadena  $\alpha$  sólo se expresa tras la estimulación vía TCR o por la propia citokina, y aumenta la afinidad del receptor, pero no está directamente relacionada con la señalización y presenta una estructura diferente de las otras dos subunidades del receptor [136]. Por el contrario, las cadenas IL-2R $\beta$  y  $\gamma$  pertenecen a la superfamilia de receptores de citokinas-hematopoyetina y también participan en la formación de receptores de otras citokinas, de ahí que también se conozca a la última como la cadena  $\gamma$  común de receptores de citokinas:  $\gamma_c$  [136, 137]. La dimerización y fosforilación en tirosina de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de alta afinidad de IL-2 parecen ser los primeros pasos de la transducción de señal [135, 137]. Tras la unión al ligando, las tres subunidades son internalizadas juntas con la IL-2, aunque posteriormente tengan diferentes destinos intracelulares [138]; en su internalización no parecen estar implicadas las caveolas o las vesículas recubiertas de clatrina, como ocurre con otros receptores [139, 140].

Las cascadas de señalización activadas por IL-2 son muy conocidas y estudiadas [9, 136, 141]. Implican la inducción de muchos factores de transcripción como STAT5 y c-Myc, así como la mediación de múltiples quinasas, incluyendo la quinasas de Serina-Treonina Akt [142], y miembros de la familia de las GTPasas: Ras [136, 143].

Se ha descrito que la cadena IL-2R $\beta$  se encuentra localizada en los rafts, y se desplaza hacia la zona no-raft tras la unión del ligando, sobre

todo cuando se utiliza TX100 como detergente [127]. En cambio, empleando un detergente más débil, también se puede detectar la presencia de IL-2R $\alpha$  en rafts [126]. Además la alteración de estos microdominios por la M $\beta$ CD, atenúa la señalización de IL-2 [46, 144] así como la expresión en superficie de IL-2R $\beta$  [127]. Muchas de las kinasas y moléculas adaptadoras asociadas a la cadena IL-2R $\beta$ , colocalizan con ésta antes y después de la estimulación con IL-2 [127]. Entre estas moléculas se haya Lck [145], una kinasa de linfocitos asociada con la proteína CD4 y a otros receptores como IL-2R $\beta$ , y que es ampliamente utilizada como marcador raft por su presencia mayoritaria en ellos [45, 48, 121, 136, 143]. Del mismo modo que ocurre para el TCR [98], los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son capaces de alterar la composición de los rafts lipídicos y de desplazar a IL-2R $\beta$  y sus moléculas de señalización fuera de zona raft, lo que se traduce en una atenuación de la señal de IL-2, y explica, en parte, los efectos inmunosupresores de los PUFA [146, 147].

#### 1.2.5.2 El Interferón gamma

El IFN $\gamma$  es una citokina con un papel fundamental en la respuesta inmune innata y adaptativa, cuyo receptor (IFNGR) heterodimérico consta de dos subunidades: las glicoproteínas IFNGR1 e IFNGR2, que, a su vez, están asociadas con las JAK kinasas JAK1 y JAK2, y son responsables de la activación del factor de transcripción STAT1 en células del Sistema Inmune (excluidas las células T) y las células epiteliales [134, 148]. De forma similar a la IL-2, los microdominios raft y las caveolas también están implicados en la señalización del IFNGR [134, 148].

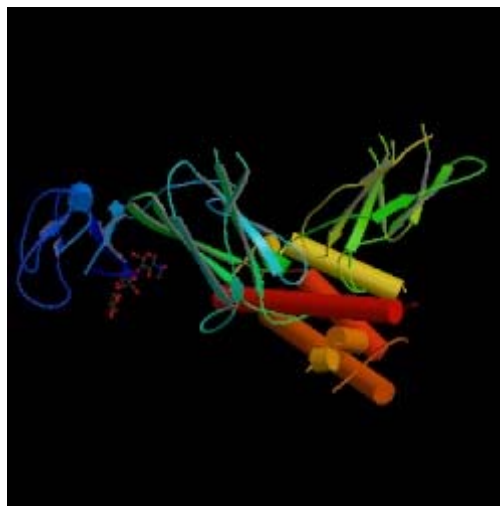
### 1.2.5.3 Otras citokinas, quimiokinas y factores de crecimiento

Se ha identificado que la cadena IL-4R $\alpha$ , similar en estructura y función a IL-2R $\beta$ , también utiliza la cadena  $\gamma_c$  para formar el complejo de alta afinidad IL-4R en la fracción raft de células T humanas; sin embargo, no se ha podido encontrar en zona raft otras cadenas de receptores como IL-7R ó IL-15R $\alpha$ , que también utilizan la cadena  $\gamma_c$  [127].

Otros estudios se han centrado en el papel que estos microdominios desempeñan en la función de los receptores de quimiokinas, especialmente en relación con la implicación de muchos de estos receptores ligados a proteínas G en la internalización del VIH [133] y en el reconocimiento de las bacterias por la respuesta inmune innata [149]. También se ha estudiado la relación de los rafts en la señalización de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [150].

## 1.3 La interleukina 12 y su familia

La interleukina 12 fue descubierta durante un análisis de factores secretados por líneas celulares transformadas por el virus de Epstein Bar (EBV). Inicialmente, se identificó como un factor estimulador de células *Natural Killer* (“Natural Killer Stimulatory Factor”, NKSF) con estructura heterodimérica; los genes que codificaban ambas cadenas se clonaron [151, 152] y se obtuvo NKSF biológicamente activo. Más adelante, se aisló un factor de maduración de linfocitos citotóxicos (“Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor”, CLMF) en base a su capacidad para sinergizar con la IL-2 en la inducción de células asesinas activadas por citocinas (“Lymphokine Activated Killer cells”, células LAK) [153]. Cuando se purificó y clonó éste último se vio que ambos eran idénticos [151, 154-156] y se le empezó a denominar Interleukina 12 [156].



**Figura 14. Representación 3D de la Interleukina 12.** Se observa claramente la existencia de dos subunidades, la p35 con forma globular (4  $\alpha$ -hélices) (Banco de Datos de proteínas (PDB) <http://www.rcsb.org>).

### **1.3.1 La familia de citokinas heterodiméricas**

IL-12 es un heterodímero de unos 70kDa (p70), compuesto de dos subunidades glicosiladas de aproximadamente 40 y 35kDa (p40 y p35, respectivamente), que se encuentran unidas covalentemente [157]. La cadena p35 es un polipéptido de 219 aminoácidos, mientras que la p40 tiene 328 [151, 156]; sus genes se encuentran, respectivamente, en 3p12-3q13.2 y 5q31-q33 [158]. Se ha descrito la presencia de hasta tres genes diferencialmente regulados de IL-12p40 en la carpa común (*Cyprinus Carpio*), que además conservan residuos claves implicados en la formación de puentes disulfuro inter e intracatenales, así como la organización génica, que es similar a la del resto de vertebrados. La presencia de múltiples y sustancialmente diferentes genes de interleukina 12 ya entre los peces óseos, implica una considerable expansión de la familia de citokinas heterodiméricas entre los vertebrados [159, 160].

La secuencia de p35 muestra una gran homología con la IL-6 y el G-CSF [161] y presenta una estructura de cuatro hélices  $\alpha$  típica de las citokinas. La secuencia de p40 sin embargo, es homóloga a la familia del receptor de la hematopoyetina, en particular con la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-6 [162]. Por tanto, la IL-12 representa una citokina con una cadena (p35) con una estructura típica de citokina mientras que la otra (p40) es similar en su estructura a un receptor. La presencia de un puente disulfuro entre ambas cadenas de la interleukina 12 hace que la interacción sea irreversible. La capacidad de unión de estas subunidades recuerda a la interacción entre un receptor y su ligando, y se mantiene en el dímero no ligado covalentemente: se ha observado como una mezcla de ambas subunidades es capaz de mediar las funciones biológicas de la IL-12,

aunque a concentraciones mayores que las del dímero con el puente disulfuro [163].

Se cree que la interleukina 12 puede haber evolucionado a partir de la familia de la IL-6/IL-6R [164], y ha desarrollado una familia propia. En el año 2000, se encontró una nueva molécula heterodimérica con una estructura p19p40, la interleukina 23 [165]. Dos años más tarde se describió la interleukina 27, que consiste en una subunidad similar a la p40 (EBI3) unida no-covalentemente a una subunidad p28 [166]. De forma que todos los miembros de esta familia poseen una subunidad, la p40 o la EBI3, similar a un receptor, y otra subunidad con la estructura típica redondeada con cuatro hélices  $\alpha$  de las citocinas (p35, p19 y p28).

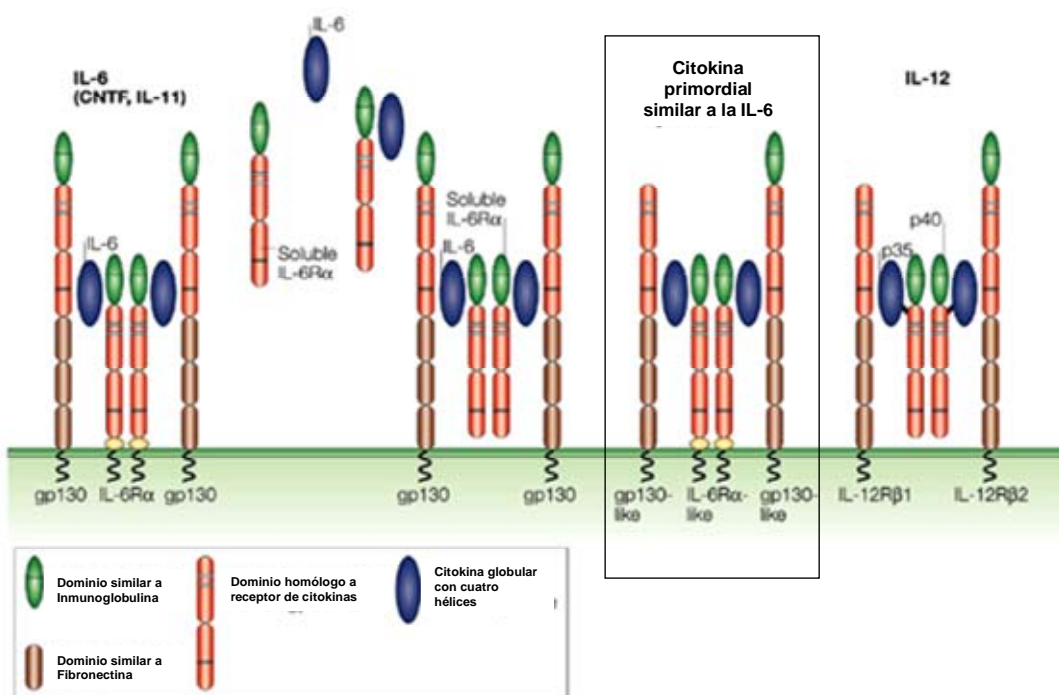


Figura 15. La familia de citocinas de la IL-12 y sus receptores. [166].

### 1.3.2 Expresión de los miembros de la familia de la interleukina 12 y sus receptores

Todos los miembros de la familia de la interleukina 12 son secretados por células dendríticas activadas (DCs) y macrófagos, que funcionan como células presentadoras de antígeno. Las subunidades p35, p19, y p28 se expresan en muchos tipos celulares diferentes, mientras que la transcripción de p40 parece estar restringida a las células presentadoras de antígeno. Los estímulos que desencadenan la expresión de los miembros de la familia de la interleukina 12 incluyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son ligandos para los receptores de tipo *Toll* (TLRs) en los fagocitos y DCs. Además, la óptima producción de IL-12 (y probablemente también de IL-23 e IL-27) requiere de otras citocinas (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-13) [167]. Las células activadas pueden reforzar la producción de interleukina 12, no sólo mediante la secreción de citocinas sino también en el contacto directo célula-célula mediante la interacción CD40L/CD40 [168].

La coexpresión de ambas cadenas de IL-12, IL-23, e IL-27 en una única célula es el requisito para generar la forma activa [156, 165, 166]. Sólo la subunidad p40 puede ser secretada como monómero, como dímero o polímero en una proporción de 10 a 1000 veces en exceso la cantidad relativa de la forma heterodimérica (IL-12 o IL-23) [152, 153, 169, 170]. Cuando esta subunidad, secretada por monocitos humanos o DCs, es inmunoprecipitada con anticuerpos específicos, sólo las cadenas p35 y p19 co-inmunoprecipitan, lo que indica que la cadena p40 es secretada en exceso sobre el heterodímero como cadenas libres [171]. p40 es producida por células transfectadas como un homodímero (unido con puentes disulfuro, en ratones han sido observados *in vivo* [172]) o como monómero,

este homodímero no es biológicamente activo, pero sí se une a IL-12R $\beta$ 1 en sistema murino con una afinidad similar a la del heterodímero compitiendo, por tanto, con él. Basándose en estos datos se ha propuesto que el homodímero de p40 es un inhibidor natural de IL-12 e IL-23 [173]. De todos modos, los homodímeros de p40 se unen con menor afinidad a IL-12R $\beta$ 1 en humanos que en ratones, siempre con respecto al heterodímero, y nunca se ha observado producción del mismo en células humanas no-transfectadas, incluso en condiciones donde la cadena p40 libre era ampliamente expresada [171]. Así, se puede afirmar que, en humanos, el homodímero IL-12p40 no es un antagonista fisiológico de la IL-12.

Las células diana para todos los miembros de la familia de la interleukina 12 son las células NK y las células T [174]. Además, parece que los macrófagos y DCs presentan receptores funcionales para IL-12 y la IL-23 [175-177]. También se ha descrito un receptor para la IL-27 en monocitos, células de Langerhans, DCs activadas, y células endoteliales [178, 179]. La actividad de IL-12 está mediada por un receptor de alta afinidad compuesto de dos subunidades, designadas IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 [180]. Ambas cadenas del receptor son miembros de la familia de receptores de citocinas de clase I, y están relacionadas con la glicoproteína gp130, la cadena  $\beta$  común de la superfamilia de citocinas similares a la IL-6. El receptor de IL-23 está formado por la cadena IL-12R $\beta$ 1 y una nueva subunidad denominada IL-23R, similar a gp130 [165, 181]. En el caso del receptor de IL-27, una de las cadenas es WSX-1/TCCR [166] y, en el año 2004, se descubrió que la segunda cadena del receptor era gp130 [178]. Los miembros de la familia de la interleukina 12 muestran actividades que se superponen, pero también otras claramente diferenciadas. Esto se debe en parte a los distintos componentes de los receptores que expresados en

diferentes células diana intervienen en varios estadios su desarrollo (Ej: células Th *naïve* respecto a células Th de memoria).

### 1.3.3 Regulación de la producción de IL-12

IL-12 se conoce por ser principalmente un producto de células activadas con propiedades pro-inflamatorias (monocitos, macrófagos, neutrofilos, microglía y DCs). Aunque la producción de IL-23 e IL-27 no ha sido estudiada con detalle, las células y estímulos que desencadenan su producción parecen corresponderse con los de IL-12 [165, 166].

La capacidad que tienen las células dendríticas de producir IL-12 durante las interacciones con las células T e inducir una respuesta tipo Th1 se demostró primeramente *in vitro* [182]. Posteriormente, se comprobó que *in vivo*, las DCs CD8 $\alpha^+$ , y no los macrófagos, son las primeras células en sintetizar IL-12 en el bazo de ratones expuestos al extracto soluble de *Toxoplasma gondii* o a lipopolisacáridos (LPS)[183]. La producción inicial de IL-12 ocurre rápidamente, y se ha demostrado que es independiente de IFN $\gamma$  y otras señales de células T [184, 185], aunque la producción del heterodímero es facilitada por CD40L [168]. Muchos estímulos microbianos inducen la síntesis temprana de IL-12 por las DCs CD8 $\alpha^+$ ; patógenos como *Brucella abortus* o DNA bacteriano rico en CpG lo hacen además tanto en células dendríticas CD8 $\alpha^+$  como CD8 $\alpha^-$ . En respuesta a muchas infecciones virales, tanto la IL-12 como el IFN $\alpha$  son producidos principalmente por DCs plasmacitoides o mIPCs (un nuevo tipo celular descrito en ratón que libera IFNs de tipo I). Las células dendríticas “mieloides” CD8 $\alpha^-$ CD11 $\beta^+$  también generan IL-12 en respuesta a virus,

pero esta producción es suprimida por el IFN $\alpha$  liberado por las mIPCs [186].

Hay muchas diferencias entre la regulación de la producción de IL-12 por células dendríticas y fagocitos que pueden ser responsables de la activación inicial de las primeras en la iniciación de la respuesta inflamatoria, e, incluso, inmune. La producción del heterodímero de IL-12 por las DCs parece ser menos dependiente de la presencia de IFN $\gamma$  que de otras citocinas, en contraposición a lo que ocurre con los fagocitos [168, 187]. Debe destacarse que la mayor parte de los estudios sobre los requerimientos de IFN $\gamma$  y otras señales de células T por las DCs *in vivo* han sido realizados usando *T. gondii* como estímulo – un organismo que utiliza unos mecanismos para inducir la producción de IL-12 diferentes de otros ligandos TLR, como se desprende de su requerimiento de señalización vía CCR5 (“CC-Chemokine receptor 5”) [188] – así que, podría no ser posible extrapolar estos datos a otros patógenos. Entre las diferencias observadas entre DCs y fagocitos se encuentra que mientras en los macrófagos c-REL es necesario para la producción de p40, no lo es en las DCs CD8 $\alpha^+$ , en las que c-REL sólo se requiere para la transcripción de p35 [189]. La señalización vía proteínas G $_{\alpha i}$  tiene un papel fisiológico en la limitación de la producción de IL-12 tanto en fagocitos como en macrófagos, dado que se refuerza la misma por ambos tipos celulares en ratones “*knockout*” para esta proteína. Aún así, existen otras proteínas (como MCP, “Monocyte Chemotactic Protein”) y ligandos capaces de inhibir la producción de IL-12 por los macrófagos, pero no en DCs, lo que indica que existen receptores ligados a proteínas G implicados en la regulación de la producción de la IL-12 [167].

Ya hemos comentado anteriormente que la expresión de ambos genes, p35 y p40, en una misma célula es necesaria para la producción del heterodímero activo de la IL-12. En ausencia de la subunidad IL-12 p35 ó IL-23 p29, p40 es secretado como monómero u homodímero, pero éstas sólo son secretadas asociadas a p40 [151]. El mRNA de la subunidad p35 está presente en muchos tipos celulares que se sabe no producen IL-12, pero no ha sido posible detectarlo en sobrenadantes mediante radioinmunoensayos específicos para p35. Por el contrario, el mRNA de p40 parece restringido a células que producen el heterodímero activo [169]. La casi ubicuidad del mRNA de p35 hace difícil analizar su regulación cuando se analizan poblaciones celulares mixtas; cuando éstas son purificadas (por ejemplo, monocitos o DCs), parece que la transcripción de ambos genes es inducida por la activación celular [190]. Dada la baja presencia del mRNA de p35, incluso en células inflamatorias activadas, se ha propuesto que su expresión es la limitante de la producción del heterodímero activo [191], aunque también haya mecanismos de control post-transcripcionales.

De forma similar a otras citocinas proinflamatorias, la producción de IL-12 está estrictamente regulada de forma positiva y negativa por diferentes mecanismos. Los productos de microorganismos (como bacterias, parásitos intracelulares, hongos, RNA de doble cadena, DNA bacteriano, y oligonucleótidos que contienen CpGs) son fuertes inductores de la síntesis y liberación de IL-12 por macrófagos, monocitos, neutrofilos y DCs [190]; la eficiencia relativa de algunos inductores depende de los TLRs expresados como respuesta a éstos en los diferentes tipos celulares [192, 193]. Aún así, particularmente para los fagocitos, los ligandos de TLR por sí solos no son suficientes para inducir la producción de IL-12 y, a menudo, sólo expresan una pequeña cantidad de p40. Citocinas como el

IFN $\gamma$  y la IL-4 pueden incrementar la capacidad de estas células de producir IL-12 [194, 195]; el IFN $\gamma$  aumenta la transcripción de los genes que codifican p35 y p40, con un efecto destacado en la producción del heterodímero; queda por determinar si lo hace induciendo una ratio óptima entre los transcritos de ambas subunidades o afectando a mecanismos post-traduccionales [195]. La capacidad del IFN $\gamma$  de promover un aumento de la producción de IL-12 genera un mecanismo de retroalimentación positiva durante la inflamación y la respuesta Th1. De forma sorprendente, dos citocinas claramente de tipo Th2, como son IL-4 e IL-13, también aumentan la producción de IL-12 [196]. Los efectos de estas citocinas en la expresión del gen de p40 son bimodales: al principio del tratamiento (menos de 24h) inhiben su producción, mientras que más tarde la refuerzan. IL-4 e IL-13 actúan amplificando la transcripción de p40 y, sobre todo, p35; además, este aumento de producción del heterodímero es más eficiente que el inducido por IFN $\gamma$  [196, 197]. El efecto de estas citocinas es particularmente notable en el caso las células dendríticas, porque generalmente se usa IL-4 e IL-13 para la producción de DCs *in vitro* a partir de monocitos o precursores hematopoyéticos, explicando así la capacidad de las DCs obtenidas en estos cultivos de producir más IL-12 que las purificadas *ex vivo* [198, 199].

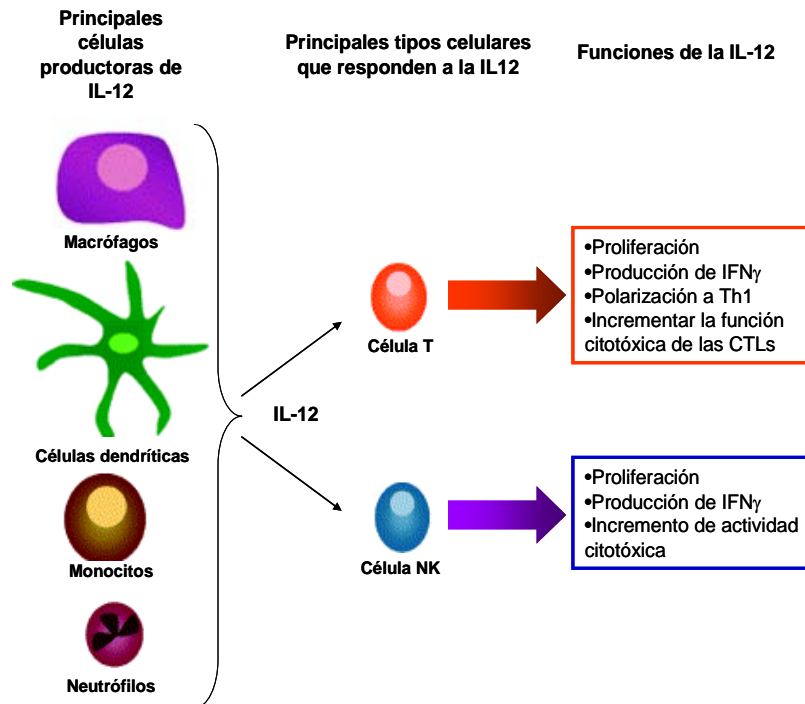
Las células T aumentan la producción de IL-12 no sólo a través de la síntesis de citocinas como el IFN $\gamma$  e IL-4, sino también mediante las interacciones intercelulares, que la mayor parte de las veces están mediadas por ligandos de la familia del TNF; el mejor ejemplo de ello es la interacción del CD40L de células T activadas con la proteína CD40 de las APCs (DCs o macrófagos) [182, 186]. Este efecto potenciador de la formación del heterodímero de IL-12 se atribuyó a la inducción de la transcripción preferente del gen de p35 en DCs [186]; aunque otros

estudios en macrófagos indican que la señal desencadenada por CD40 podría afectar a p40 y no a p35 [200], y que los transcritos de p35 inducidos por CD40L son peor traducidos que los inducidos por LPS [201]. Las señales secundarias para la producción de IL-12 podrían no venir únicamente de las células T liagadas a la inmunidad adaptativa, sino también de células efectoras de la resistencia innata como las células NK, ambas a través de la secreción de IFN $\gamma$  e IL-13, y de señales células a célula.

### **1.3.4 Regulación negativa de la producción de IL-12**

La IL-10 es un factor crucial para mantener el fino equilibrio entre la resistencia efectora contra los patógenos y el detrimento de la inflamación sistémica, también es un potente inhibidor de la producción de IL-12 mediante el bloqueo de la transcripción de sus genes a través de la síntesis de una proteína no identificada [202, 203]. El papel esencial de IL-10 como regulador se observa claramente en las respuestas inflamatorias sistémicas incontroladas y letales que sufren los ratones deficientes en IL-10 [204-206]. EL TGF $\beta$  también es un inhibidor de la producción de IL-12 que, al contrario que IL-10, reduce la estabilidad del mRNA de p40 [207]. Aunque IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  también tienen funciones que recuerdan a las de la IL-12, como son la producción de IFN $\gamma$  y la inducción de la respuesta Th1, suprimen la producción de IL-12 [208]. Sorprendentemente, también el TNF, que está estrechamente ligado a la IL-12 en la regulación de la respuesta inflamatoria y la producción de IFN $\gamma$ , reduce la secreción de IL-12 [190].

La producción de IL-12 es inhibida por la unión del ligando a los GPCRs unidos a  $G_{\alpha s}$ , principalmente por la inducción de AMPc [209]. Esto se ha confirmado para los receptores de prostaglandina E, receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, receptor A2a de adenosina, receptor  $H_2$  de histamina y el receptor del péptido vasoactivo, entre otros [209-211]. La eficacia de esta inhibición se corrobora por la capacidad de la toxina colérica, un activador de  $G_{\alpha s}$ , de inhibir la producción de IL-12 y la respuesta Th1 tanto *in vivo* como *in vitro*. La señalización a través de muchos, pero no todos, receptores  $G_{\alpha i}$  también tiene este efecto; así, las quimioquinas CCL2, CCL8, CCL7 y CCL13, y el componente C5a del complemento tienen este efecto en macrófagos pero no en DCs [209]. Una importante excepción a la capacidad inhibitoria de las proteínas  $G_{\alpha i}$  en DCs, es su necesaria participación en la señalización del receptor de CCR5 (ligado a  $G_{\alpha i}$ ) para inducir la producción de IL-12 en un tipo de DCs  $CD8\alpha^+$  en ratones inyectados con un extracto de *T. gondii* [188]. La inhibición en APCs también está ligada a otro tipo de moléculas de superficie, como la activación de CD46 por el virus del sarampión y C3b, la de CR3 por iC3b, la de receptores Fcs por inmunocomplejos, etc. En muchas de estas condiciones se induce la producción de IL-10 [190], y, aunque muchos de los mecanismos estudiados de inhibición de IL-12 son independientes de IL-10, estos resultados indican que la regulación recíproca de ambas proteínas es muy importante.



**Figura 16.**  
Representación esquemática de las principales características de la IL-12.

Adaptado de [174].

### 1.3.5 Actividad biológica de la interleukina 12

#### 1.3.5.1 Efectos en la hematopoyesis

La interleukina 12 actúa sinérgicamente con el ligando de *kit* (“steel factor”, SF), IL-3 y otros factores hematopoyéticos para reforzar la supervivencia y proliferación de las células madre en cultivo, y para incrementar el número y el tamaño de las colonias formadas por las células progenitoras hematopoyéticas pluripotentes tempranas así como los precursores de las diferentes líneas [212-215]. El efecto de la IL-12 es directo en células NK [216] y en las células progenitoras purificadas [212, 214]. Las células NK, en respuesta a la IL-12, producen los factores inhibidores de la hematopoyesis, por ello, en su presencia, la IL-12 tiene una función inhibidora de la formación de colonias [215]. Estos efectos

antagonistas de la interleukina 12 en la hematopoyesis probablemente se reflejan en su efecto *in vivo* en ratones, ya que inyecciones repetidas de interleukina 12 tienen como resultado una reducción de la hematopoyesis en la médula ósea, con neutropenia y anemia. Estos efectos se acompañan de hematopoyesis extramedular: en el hígado, donde se asocian con una hepatotoxicidad manifiesta acompañada de necrosis focal y elevación de las transaminasas; y, particularmente, en el bazo donde se induce una esplenomegalia significativa [217]. En cultivos de timo fetal, la interleukina 12 determina un descenso de todos los subtipos linfoides, excepto los CD8<sup>+</sup> que se incrementan; y, en combinación con otras citocinas, causa la proliferación de los timocitos CD8<sup>+</sup> maduros así como de las células T triple negativas.

#### 1.3.5.2 Inducción de citocinas

La interleukina 12 induce la producción de múltiples citocinas en células T y NK, incluyendo el IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-8, e IL-2 [151, 152, 218-222]. Interleukina 12 es particularmente efectiva en inducir la producción de IFN $\gamma$ , porque i) lo hace de una forma más efectiva que la IL-2 [218], además de inducir otras citocinas; y ii) sinergiza con otros estímulos para generar sus niveles máximos [152, 218]. La producción de IFN $\gamma$  es quizás el efecto fisiológico más relevante de la IL-12, muchas de sus funciones *in vivo* son mediadas, al menos en parte, por ella. En las células T, la interleukina 12 sinergiza con la IL-2, diésteres de forbol, lectinas mitógenicas, y el estímulo del receptor de células T (TCR)/CD3 (como los anticuerpos anti-CD3 y los antígenos) [218, 219]; en las células NK la interleukina 12 sinergiza con la IL-2, diésteres de forbol, ligandos del receptor Fc, y células diana sensibles a NK [218, 219].

Tanto las células T como las NK, tanto activadas como *resting*, responden a la interleukina 12 con la producción de interferón gamma. En cualquier caso, la secreción de interferón gamma por estos tipos celulares en preparaciones frescas de linfocitos de sangre periférica (PBLs) requiere la presencia de células accesorias HLA-DR<sup>+</sup> (que no presenten marcadores de células B) o de monocitos [218]. La neutralización del TNF $\alpha$  o la IL-1 $\beta$  en cultivos de PBLs inhibe de forma significativa la inducción de IFN $\gamma$  [203]; sin embargo en células de bazo murino el TNF $\alpha$  sinergiza con la IL-12 en la producción de esta citokina [223]. Las células accesorias HLA-DR<sup>+</sup> pueden producir TNF $\alpha$  e IL-1, ambos son co-factores que promueven la secreción de interferón gamma mediada por la interleukina 12. Más aún, la interacción de CD28 con su ligando B7 (o la estimulación de las células T con anticuerpos anti-CD28) también refuerza esta producción de IFN $\gamma$ , lo que sugiere que una de las funciones de las células accesorias puede ser proporcionar el cofactor B7 para maximizarla [212, 221, 224]. Dado que en las moléculas de la familia B7 se expresan en células APC, la estimulación, durante la presentación del antígeno, debe estar acompañada de esta interacción entre B7 y CD28, y por el factor derivado de células APC: IL-12; todo ello explicaría porqué la producción IFN $\gamma$  observada es máxima sólo cuando estos tres estímulos se presentan de forma simultánea en las células T [221, 224].

Las células presentadoras de antígeno no-profesionales (como los queratinocitos tratados con IFN $\gamma$ ) que producen muy poca IL-12, son ineficaces como inductores de la producción de IFN $\gamma$ , aún expresando moléculas B7; para obtener este efecto debe añadirse interleukina exógena [225]. Tanto en humanos como en el ratón, la capacidad de la interleukina

10 de inhibir la producción de interferón gamma por las células T se debe principalmente a la supresión de la síntesis de interleukina 12 en las células accesorias, pero también a la inhibición de la secreción de los cofactores TNF $\alpha$  e IL-1 y de la expresión de moléculas B7 en la superficie de estas células [203, 221, 224]. Es típico en la producción de interferón gamma el efecto sinérgico de la IL-12 e IL-2 con otros estímulos, que están casi ausentes o muy reducidos en el caso de otras citokinas inducidas por IL-12 [220]; de cualquier modo, la coestimulación de las células T con IL-12 y la unión B7/CD28 induce también elevados niveles de GM-CSF y TNF $\alpha$  [221]. El mecanismo molecular que subyace la sinergia observada entre IL-12 e IL-2 nos indica que la interleukina 12 es la responsable de la transcripción del gen del IFN $\gamma$ , y ambas citokinas conjuntamente aumentan la vida media del mRNA pero no aumentan la tasa de transcripción debida a la IL-12 sola [226]. Estos resultados indican que existe una regulación de la expresión de este gen por mecanismos tanto transcripcionales como post-transcripcionales.

### 1.3.5.3 Producción de IFN $\gamma$

La interleukina 12 es un requisito indispensable para una producción óptima de IFN $\gamma$ , tanto *in vivo* como *in vitro* [152, 218, 221]. Requiere como cofactores bajos niveles de TNF e IL-1, que normalmente son secretados de forma autocrina por las células T y NK [184, 203, 204]. La importancia de la IL-12 como promotora de la síntesis de IFN $\gamma$  está no sólo en su elevada eficiencia a bajas concentraciones, sino también en su sinergia con muchos otros estímulos [226]. Para las células T, IL-12 sinergiza con la IL-2, la estimulación del complejo CD3/TCR y el receptor CD28 en la rápida y eficiente producción de IFN $\gamma$  [218, 226]. Para las células NK, IL-12

potencia la acción de la IL-2, inmunocomplejos y células diana [226]. Aunque la inducción de la expresión de IFN $\gamma$  sucede principalmente a un nivel transcripcional, la sinergia con ligandos de CD28 e IL-2 es, sobre todo, post-transcripcional, implicando un aumento de la estabilidad y una movilización desde el núcleo del mRNA [226-228].

En 1995, se descubrió otro factor inductor de IFN $\gamma$ : la IL-18, que es requerida durante el shock endotóxico [229]. IL-18 es un miembro de la familia de la IL-1 que se produce en condiciones de activación similares a las de IL-12 [230]. Aunque esta citokina por sí sola es inefectiva respecto al IFN $\gamma$ , sinergiza con la IL-12 induciendo un aumento de su transcripción y promoviendo la unión de factores de transcripción como STAT4 y AP1 [227, 231]. En cualquier caso, si STAT4 tiene un papel directo en la activación del promotor de IFN $\gamma$  o no, está en entredicho [232]. Es esencial en esta sinergia la inducción de las dos cadenas del receptor de IL-18 por IL-12: una cadena relacionada con el IL-1R (IL-18R $\alpha$ ) y una proteína similar a la proteína accesoria del IL-1R (IL-18R $\beta$ ) [232]. De forma similar, IL-18 promueve la expresión de IL-12R $\beta$ 2 en las células *resting* [233]. Así, ambas citokinas están íntimamente relacionadas, y existe casi un requerimiento obligatorio de su presencia para maximizar la producción de IFN $\gamma$  [229]; éste es particularmente evidente en macrófagos, DCs, o células B, que no son consideradas fuentes convencionales de esta citokina. En cualquier caso, la IL-18 no induce una respuesta tipo Th1 y, en ausencia de IL-12, incluso estimula la Th2 [234, 235]. Se ha demostrado que la IL-27 sinergiza fuertemente con IL-12, en presencia o ausencia de IL-18 o estimulación vía CD28, para inducir la producción de IFN $\gamma$  por células T *naïve* [166].

Aunque IFN $\gamma$  es producida por las células T y NK, entre otras, parece estar regulada superficialmente de una forma similar, y las diferencias empiezan ahora a ser descubiertas. En las células T, y probablemente en NKs, existen dos vías para inducir la producción de IFN $\gamma$ : una es inducida por estimulación del TCR, CD3, receptores Fc, ésteres de forbol e ionomicina y es sensible a la ciclosporina A; y la otra es promovida únicamente por la IL-12, o en combinación con IL-18 o ligandos de CD28, y es resistente a la ciclosporina A [221, 236]. La expresión del IL-12R también es regulada diferencialmente, IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$  inducen la expresión de IL-12R $\beta$ 2 en células T, pero no en células NK [237]; mientras que ambas citocinas regulan positivamente la expresión del IL-18R en ambos tipos celulares [238]. La estimulación de CD28 también estimula positivamente la expresión de IL-12R y vuelve a las JAKs y/o STAT4 sensibles a la estimulación con IL-12 en las células T [239]; aún así, en células T de ratones deficientes en CD28, la expresión de IL-12R $\beta$ 2 es equivalente a la de ratones normales, mientras que la expresión de IL-12R $\beta$ 1 está alterada en las células CD4<sup>+</sup>, y no en las CD8<sup>+</sup> [240]. Interesantemente, en ambos tipos celulares, STAT4 es necesario para la producción de IFN $\gamma$  en respuesta al estímulo vía TCR [241]. Estas diferencias entre ambos tipos celulares que productores de IFN $\gamma$  indican que las rutas alternativas son importantes a la hora de responder a diferentes patógenos, dependiendo del subtipo linfocitario predominante responsable de la protección contra la infección.

#### 1.3.5.4 Aumento de la citotoxicidad celular

El tratamiento con interleukina 12 de PBLs o de células NK purificadas induce, en unas pocas horas, un aumento de su actividad

citotóxica [152, 242]; aún así, este efecto es menor que el observado en tratamientos con IL-2 y comparable al observado con el IFN $\alpha$  [152]. El máximo de la citotoxicidad mediada por células NK se observa cuando se añade al cultivo IL-12 e IL-2; este efecto conjunto parece más aditivo que sinérgico [152, 243], y no requiere de la presencia de células accesorias [242, 244]. La interleukina 12 dota a las células T de la capacidad de mediar la lisis de células diana con receptores Fc, recubiertas de anticuerpos anti-CD3 [244]. También aumenta la generación de células CD8<sup>+</sup> citotóxicas [216], y refuerza *in vitro* la generación de CTLs aloespecíficos en ratones y humanos, así como células LAK [245, 246]. El aumento de la citotoxicidad de CTLs y NKs es en parte debido a la inducción de genes que codifican moléculas asociadas a gránulos citotóxicos, como las perforinas y granzimas, así como al aumento de la presencia de ciertas moléculas de adhesión [247].

Sin embargo, los efectos sobre la proliferación de CTLs en respuestas antígeno específicas *in vivo* o *in vitro* no están claros. Hay resultados que indican que IL-12 es un buen coadyuvante como impulsor de las respuestas citotóxicas en términos de proliferación y producción de IFN $\gamma$ , sobre todo en células con afinidad intermedia a baja por el antígeno como las CTLs asociadas a auto-antígenos tumorales. Sin embargo, en el caso de CTLs de alta afinidad por su antígeno, no se observa un incremento significativo de la actividad citotóxica, proliferación o producción de IFN $\gamma$  [248].

### 1.3.5.5 Efectos mitogénicos sobre células T y NK

La interleukina 12 tiene un efecto proliferativo muy leve o inexistente en células T o NK *resting*, pero refuerza la proliferación de células T en respuesta a PHA, aloantígenos, anti-CD3, diésteres de forbol, o la IL-2 [152, 155, 219, 249]. Excepto en el caso de los diésteres de forbol, el aumento de la proliferación no se observa los primeros días de cultivo. Este desfase puede alcanzar hasta 6 días en el caso de PHA o aloantígenos, y entre 7 a 11 en el caso de la IL-2, que se corresponde con la capacidad que tienen estos estímulos de inducir la aparición de sitios de unión a IL-12 [250]. Al contrario que con las células *resting*, la IL-12 induce de forma directa la proliferación de células T y NK preactivadas [155, 219]. En el caso de blastos activados con PHA o células NK activadas, los niveles proliferativos máximos para la IL-12 son sólo del orden del 10% al 50% de los obtenidos con IL-2. En las líneas CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, o en los clones Th1 de ratón, la IL-12 induce la proliferación sólo cuando las células son pre o co-estimuladas con el antígeno o anticuerpos anti-CD3, lo que sugiere que la expresión del IL-12R requerida para inducir la proliferación está más regulada por la activación TCR/CD3 de lo que lo está la del receptor de IL-2. La estimulación de células T activadas con IL-12 e IL-2 conjuntamente resulta en un efecto aditivo de la proliferación [219]; aún así, en las células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, en algunos cultivos de células CD8<sup>+</sup> y en NKs, la IL-12 inhibe la proliferación inducida por altos niveles de IL-2 hasta niveles similares a los de la IL-12 sola [219, 242]. Este efecto antagonista de la IL-12 en la proliferación inducida por la IL-2 es dependiente del estado de activación de los linfocitos, y no se observa a bajas concentraciones de IL-2, donde hemos dicho que es aditivo. Además,

este antagonismo es neutralizado con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  y, de todos modos, dado que el TNF $\alpha$  por sí solo no tiene efectos inhibitorios, es muy probable que tanto la IL-12 como el TNF $\alpha$  sean necesarios en conjunto para este efecto [219]. La IL-4, que es capaz de inhibir la activación de células NK por la IL-2, no tiene este efecto en la activación de las mismas, más bien sinergiza con ella para inducir su proliferación. La IL-4 modula la expresión del receptor de IL-12, pero sí refuerza la de su propio receptor en presencia de IL-12, lo que puede explicar el efecto sinérgico observado [251].

La estimulación de las células T con B7/CD28 e IL-12 eleva los niveles de proliferación de las células T a valores que superan aquellos observados a concentraciones óptimas de IL-2, en concentraciones de 3 a 4 órdenes de magnitud menores [221]. La capacidad de la IL-12 para inducir proliferación en las células T es independiente de la producción de IL-2, aunque sí regula positivamente las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-2R [242, 252]. El efecto sinérgico de IL-12 y B7/CD28 en la proliferación está presente tanto en células T activadas como en PBMCs frescas, aunque se retrasa un poco en éstas últimas; el estímulo proliferativo no es bloqueado por la ciclosporina A y no requiere la presencia de antígenos específicos, lo que puede implicarlo en la activación no-específica de células T durante la respuesta inmune. Se requiere la activación de la vía CD3/TCR por antígenos, lectinas o anticuerpos para un efecto máximo de estas dos moléculas tanto en humanos como en ratones [221]. Así, la expresión de B7 en la superficie de las APCs y la secreción de IL-12 tiene un efecto sinérgico con la estimulación del TCR/CD3 durante la presentación del antígeno, no sólo en la producción de IFN $\gamma$  sino también en la proliferación [221, 224].

### 1.3.5.6 IL-12 y la respuesta Th1

IL-12 es un potente inductor de la respuesta Th1 [253, 254], y se requiere para un óptimo desarrollo de estas células durante la respuesta inmune frente a patógenos [247]. Este papel ha sido estudiado mediante el empleo de IL-12 recombinante *in vitro* e *in vivo*, y la inhibición de la respuesta Th1 en animales tratados con anticuerpos neutralizantes para IL-12 o bien en animales transgénicos para p40, p35, IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2 o STAT4 [247]. La capacidad de IL-12 para permitir esta respuesta ha sugerido su posible uso como adyuvante en la vacunación para inducir una respuesta dirigida a producir células Th1 de memoria [255]. La diferenciación de las células Th se determina probablemente al principio de la infección por el balance entre los niveles de IL-12 o IL-4, que favorecen las respuestas Th1 o Th2 respectivamente. La IL-12, cuando está presente al principio de la expansión clonal, marca de forma irreversible a las células T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, para la producción de elevados niveles de IFN $\gamma$  tras la re-estimulación [256, 257]. Sin embargo, cuando se trata de expandir una única célula, la IL-12 tiene una capacidad limitada de reducir la secreción de IL-4, e, inesperadamente, induce la síntesis de una citokina de tipo Th2: la IL-10 [258]. El IFN $\gamma$  es un requerimiento para la inducción del fenotipo Th1 por la IL-12 en muchos modelos de ratón, pero no ha sido así en ninguno de los modelos humanos *in vitro* [254, 258, 259]. De forma que la IL-12, que se produce *in vivo* durante la fase de respuesta inflamatoria, induce la producción de IFN $\gamma$  en células T y NK. Además, posiblemente en combinación con el interferón, promueve que aquellos clones que se están expandiendo en respuesta al antígeno se diferencien en células Th1, generando la expresión de citocinas como el IFN $\gamma$  y otros

mecanismos de selección positiva o negativa, incluyendo la desaparición de las células productoras de IL-4 o la expansión preferencial de las células con fenotipo Th1 [167].

Aunque no hay dudas de que en presencia de IL-12 se obtengan respuestas de tipo Th1, sí hay múltiples evidencias que indican que puede que no sea absolutamente necesaria; esto hace surgir la duda, está la IL-12 más implicada en expandir o fijar el fenotipo de las células T a través de un proceso estocástico, o bien dando instrucciones que marquen este fenotipo de forma directa. La señalización vía TCR puede, en ausencia de la IL-12, polarizar hacia una respuesta tipo Th1[260]. Se ha sugerido que la clave está en regular el equilibrio entre las MAPK y la señalización de la calcineurina, que favorecen la polarización Th1, y la activación de la PKC, que lo hace a Th2 [257].

El desarrollo de las células CD4<sup>+</sup> a un fenotipo Th1 requiere IL-12, mientras que las CD8<sup>+</sup> necesitan de IL-4 para una respuesta Th2 [260]. En ratones deficientes para IL-12 p40, que no pueden resistir la infección con una dosis no-letal de *T. gondii* o repetidas inmunizaciones con un extracto soluble del patógeno, se produce un número sustancial (aunque bajo) de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  [204]. Aunque esta respuesta Th1 mínima no es suficiente para proteger a los animales de la infección, los ratones doblemente deficientes para IL-12 e IL-10 sí son capaces de sobrevivir, lo que indica que la IL-10 está implicada en la limitación de la efectividad de la respuesta Th1, como se ha visto con numerosos parásitos [204-206]. Al contrario que los IL-12p40<sup>-/-</sup>, los ratones deficientes en MyD88, cuando son expuestos a *T. gondii* o inmunizados con ovoalbúmina se encuentran totalmente incapaces de generar una respuesta Th1, pero sí de desarrollar una respuesta Th2 [204]. Por tanto, la señalización vía TLR,

que posiblemente induce la producción de otros factores pro-inflamatorios diferentes de la IL-12, sí es un requerimiento necesario para una respuesta Th1. Los ratones deficientes para el TCCR, una cadena del receptor de IL-27 [166], tienen alterada la respuesta Th1 temprana, lo que indica que IL-27 juega un importante papel en la generación de este tipo de respuestas.

Las células Th1 se caracterizan por la expresión de T-bet, un factor de transcripción de la familia T-box, que actúa, en parte, induciendo la expresión de IFN $\gamma$  [261]. La transducción del gen que codifica T-bet en células Th2 (CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>) induce la producción de IFN $\gamma$  y suprime la de IL-4 e IL-5 [261]. Aunque en un principio se creyó que la IL-12 era la responsable de la producción de T-bet, se ha visto que éste aparece tanto en células T que tienen bloqueada la ruta de esta citokina, como en ratones deficientes para STAT4 [261, 262]. Además, la IL-12 no puede repolarizar un fenotipo Th2 a productor de IFN $\gamma$ , pero T-bet sí, incluso cuando se expresa IL-12R $\beta$ 2 de forma artificial [263]. Así, en células T que se están polarizando, la expresión de T-bet es inducida bien de forma aleatoria o bien dirigida por otros estímulos (incluyendo probablemente a citocinas como el IFN $\alpha$  [264] y la fuerza y el tipo de señal TCR) y entonces se responsabiliza de la remodelación irreversible del gen del IFN $\gamma$  [262]. T-bet también regula positivamente la expresión de IL-12R $\beta$ 2 [265]. Por lo que, IL-12 induce la supervivencia y la división celular de las células Th1, y amplifica la síntesis de IFN $\gamma$  [262]. Aún así, aunque IL-12 no está relacionada con la producción de T-bet de forma eficiente, el IFN $\gamma$  sí en células linfoides y mieloides a través de STAT1, pero no de STAT4 [264]. De este modo, el eje IL-12-IFN $\gamma$  puede amplificar la diferenciación a Th1 en conjunción con la señalización vía TCR u otros receptores. Además, los ratones deficientes en T-bet tienen una expresión predominante de

citokinas Th2 [266], y un fenotipo que recuerda a los pacientes con asma agudo o crónico. Aún así, en estos ratones, hay una deficiente producción de IFN $\gamma$  sólo en células CD4<sup>+</sup> y NK, no en CD8<sup>+</sup>, lo que vuelve a demostrar que este último tipo celular se regula de forma diferente.

### 1.3.5.7 Funciones de IL-12 en linfocitos B

Los primeros estudios realizados sobre el papel de IL-12 en linfocitos B no mostraban un efecto destacable sobre éstos; sin embargo, el tema se ha retomado con interés debido a las amplias funciones descritas. Así, en sistema murino IL-12 refuerza la producción de la mayor parte de los isotipos de anticuerpos y cambia la distribución de la subclase de IgG durante las respuestas antígeno específicas [267]. En humanos, se ha demostrado que promueve la proliferación de linfocitos B pre-activados [268, 269], induce la diferenciación a células secretoras de anticuerpos, especialmente en combinación con IL-2 [268, 270], induce la expresión de ambas cadenas del IL-18R [235] y del IFN $\gamma$  [268, 271], refuerza la de CD25 [271] y estimula la de CD38 [272], y también inhibe la síntesis de IgE promovida por IL-4 [273].

Se ha descrito la existencia de dos tipos de poblaciones de células B efectoras, Be1 y Be2, que producen IFN $\gamma$  e IL-4, respectivamente [274]. Esto sugiere que el paradigma linfocitos Th1-Th2 también puede ser aplicado a los linfocitos B. De hecho, los linfocitos B además de expresar el receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2), aunque sólo es activo en células B *naïve* [235], son capaces de responder en sinergia con IL-18 para inducir la producción de IFN $\gamma$  [235, 275]. El mecanismo de señalización en linfocitos B es paralelo al de las células T, que desemboca en la generación del

fenotipo Th1 e implica su diferenciación a un fenotipo Be1; e incluye la activación de STAT4, la producción de IFN $\gamma$ , y la expresión de T-bet e IL-12R $\beta$ 2 (como ocurre con las células T) [276].

Una característica de los linfocitos B es que el gen IL-12R $\beta$ 2 está silenciado en las células B transformadas. Utilizando células tumorales de diversos desórdenes linfoproliferativos crónicos de células B que no expresan el gen IL-12R $\beta$ 2, se comprobó que IL-12 inhibía su proliferación y que su expresión en células tumorales transfectadas con este gen incrementaba la tasa de apoptosis. De modo que la expresión de este gen podría estar actuando como supresor de tumores en estos trastornos linfoproliferativos de células B [277, 278].

### **1.3.6 Transducción de señal de la IL-12**

Al igual que otros receptores de citokinas, los receptores de IL-12 (como los de IL-23 e IL-27) carecen de actividad enzimática intrínseca, por ello se encuentran asociados a kinasas de la familia de las Janus (JAK): IL-12R $\beta$ 1 interacciona con Tyk2, mientras que IL-12R $\beta$ 2 e IL-23R lo hacen con JAK2 [181, 279, 280]. La deficiencia de Tyk2 atenúa la señalización vía IL-12 [281]. La deficiencia de JAK2 tiene consecuencias más profundas, incluyendo la letalidad embrionaria debido a su importancia en la eritropoyesis [282], de ahí que no se haya podido examinar su papel *in vivo* en la señalización de IL-12 e IL-23. La transducción de señal de estas citokinas se inicia con una autofosforilación inducida por la unión del ligando y trans-fosforilación de las JAK kinasas asociadas al receptor; las JAKs son entonces responsables de fosforilar los residuos de tirosina del dominio intracelular de la subunidad del receptor. Estos residuos de tirosina

fosforilados se corresponden a los dominios SH2 que sirven de anclaje para los STATs (transductores de la señal y activadores de la transcripción, son factores de transcripción) y, de forma potencial, a otras moléculas señalizadoras [8]. En el caso de la IL-12, sólo la subunidad IL-12R $\beta$ 2 posee los residuos de tirosina [280], por lo que se anclan a ella las diferentes moléculas STAT implicadas en la transducción de señal de la IL-12: STAT1, STAT3, STAT4 y STAT5 [283]. La más importante a este respecto es STAT4, que es fosforilada concretamente por Tyk2 y está directamente relacionada con la producción de IFN $\gamma$  [284, 285], mientras que la función de JAK2 estaría más relacionada con STAT5 y la proliferación [284].

#### 1.3.6.1 Identificación y estructura de STAT4

Los primeros miembros de la familia de las STAT fueron identificados a través de la purificación de proteínas que se unían a los genes inducidos por IFN $\alpha$  [286]. En este momento hay 7 miembros reconocidos de esta familia de factores de transcripción, que comparten una serie de características críticas para su función: un dominio de dimerización en el extremo N-terminal, un dominio de unión a DNA, un dominio homólogo a las Src (SH2), un residuo de fosforilación de tirosina muy conservado, y un extremo C-terminal de transactivación. Una de las principales STATs activadas por IL-12 es STAT4 [287-292], aunque también es capaz de hacerlo con STAT1, STAT3, y STAT5 [283, 291-294].

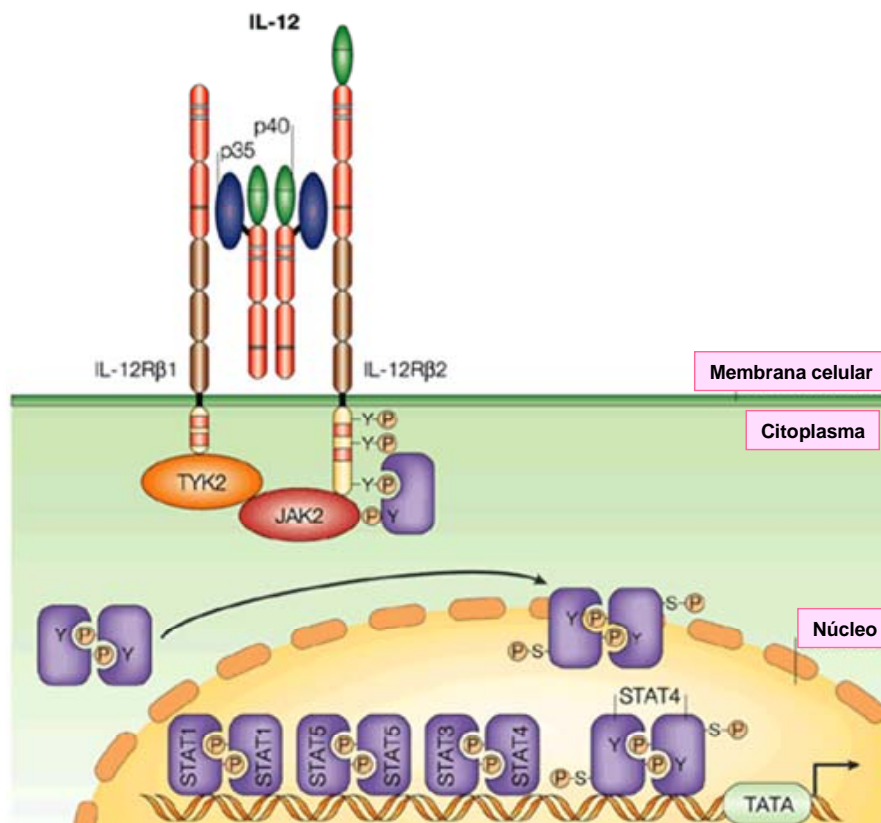


Figura 17. Transducción señal IL-12 [167].

En humanos, el residuo Tyr800 de la subunidad IL-12Rβ2 se ha demostrado crítico para la unión de STAT4 [295]; por el contrario, en sistema murino IL-12Rβ2 tiene 3 residuos de tirosina: 757, 804 y 811 (éste equivalente al Tyr800 de humanos), los cuales pueden unirse indistintamente a STAT4 [296]. La IL-23 también puede activar a STAT4 pero en menor medida que IL-12 [165, 181], aunque parece ser STAT3 el principal mediador de la respuesta a esta citokina [181].

Aunque STAT4 también se expresa en células mieloides, timo y testículos [297], la mayor parte de estudios se han centrado en sus funciones en células T, donde su principal efecto es inducir la expresión de IFNγ en respuesta a IL-12. La expresión de STAT4 en células T *resting* es muy reducida, pero la activación del TCR la aumenta considerablemente

[288]. Al revés que IL-12R $\beta$ 2, STAT4 se expresa en células Th1 y Th2, aunque hay cierta controversia sobre su expresión preferencial en células Th1. Inicialmente, se pensó que se expresaba preferentemente en ambos tipos Th1 y Th2, y que su principal función era la regulación de IL-12R $\beta$ 2 [298]. Más adelante, STAT4 pareció estar expresado preferentemente en Th1. Su función, independientemente de su capacidad para regular la expresión en superficie de IL-12R $\beta$ 2, se determinó en ratones transgénicos para IL-12R $\beta$ 2 [299, 300] y se demostró que la expresión de IL-12R $\beta$ 2 en ausencia de STAT4 no es suficiente para mantener la diferenciación a fenotipo Th1 [300]. Además de su papel en las células T, STAT4 también está implicada en la producción de IFN $\gamma$  por las células presentadoras de antígeno, una función ampliamente estudiada [301].

Tras la unión de las citocinas, las STATs se fosforilan en un residuo de tirosina muy conservado y forman dímeros a través de la asociación intermolecular del dominio SH2 de una molécula STAT con el residuo de tirosina fosforilado de otra. Mientras que éste es el clásico modelo de activación, hoy se sabe que las moléculas STAT no fosforiladas también pueden formar dímeros *in vivo* antes de la activación inducida por citocinas [302]. Las deleciones o mutaciones dentro del dominio N-terminal pueden impedir la fosforilación de STAT4 mediada por el receptor, lo que sugiere que la dimerización dependiente del dominio N-terminal e independiente de fosfotirosina puede facilitar la posterior interacción entre los dominios SH2/fosfotirosina [303, 304]. Estos datos hacen surgir la posibilidad que los dímeros STAT no fosforilados puedan acumularse en el núcleo y regular la transcripción génica.

Muchas STATs como STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B tienen formas alternativas de *splicing* que carecen del dominio c-

terminal responsable de la transactivación. Así, la forma completa de STAT4 se denomina STAT4a y la truncada STAT4b. Inicialmente, se pensó que estas formas B de las STATs no eran funcionales o bien eran un alelo dominante negativo. Sin embargo, estudios realizados con STAT3b demuestran que esto no es así [305]. En el caso de STAT4, las diferentes formas de *splicing* tienen roles que en parte se solapan y en parte son diferentes en la regulación génica. La forma normal, STAT4a, parece estar relacionada con la clásica inducción de IFN $\gamma$  por la IL-12, mientras que la STAT4b estaría ligada con la respuesta proliferativa a esta citokina [306]. De cualquier modo, en base a los resultados obtenidos con STAT3, deben realizarse más estudios al respecto.

El extremo C-terminal del dominio de transactivación de STAT1, STAT3, STAT4 y STAT5 posee un sitio consenso de fosforilación por MAPK (PMSP) [307]. Diversas kinasas son capaces de fosforilar este residuo de serina conservado en la secuencia de las STATs, en respuesta a citocinas de tipo I y de tipo II, entre otras [307]. En el caso de STAT1 y STAT3, se estableció su papel fisiológico mediante la generación de ratones “*knock in*” que expresaban un alelo Ser727-Ala (S727A). Los ratones con la mutación S727A en STAT1 no son capaces de obtener una respuesta inflamatoria ante lipopolisácaridos, reducen la expresión de los genes inducidos por IFN $\gamma$  en macrófagos, y son más susceptibles a la infección con *Listeria monocytogenes* [308]. La fosforilación en Ser de STAT3 es crítica para el desarrollo; los ratones con el alelo mutante S727A muestran un incremento de la mortalidad tras el nacimiento y un descenso en el peso y crecimiento entre la progenie que sobrevivía [309]. La fosforilación del residuo de serina correspondiente de STAT4 (S721) parece ser esencial para una actividad transcripcional completa. La reconstitución de células T deficientes en STAT4 con un mutante S727A

no permite la diferenciación a fenotipo Th1 dependiente de IL-12, así como la producción de IFN $\gamma$ ; este residuo S721 de STAT4 es fosforilado por la MAPK p38 [285, 310].

El fenotipo *knockout* de STAT4 en ratones es opuesto al papel de esta molécula como principal mediador de las funciones de IL-12. En respuesta a esta citokina se activan otras STATs [283] como STAT1 [291, 311], STAT3 [289], STAT5 [311], y bajo ciertas condiciones STAT6 [312]. La citokina IL-23 también activa estas STATs, aunque en el caso de STAT4 es mucho más débil que con IL-12, además se forman diferentes complejos STAT de unión a DNA [181]. También IL-27 puede activar STAT4 [313], así como IL-2, IL-15 e IL-21 [314, 315]. El papel de STAT4 en la respuesta a estas citokinas no ha sido aún analizado de forma sistemática. Además de estas citokinas, los IFNs de tipo I también emplean STAT4; inicialmente se creía que esto sólo pasaba en humanos y no en ratones, se ha visto que no es así y que STAT4 en ambas especies es importante para la producción de IFN $\gamma$  durante la infección [290, 316-320].

### 1.3.6.2 Otras rutas de señalización activadas por IL-12

Además de la ruta de señalización JAK/STAT, La IL-12 es capaz de activar otras moléculas y cascadas de transducción de señal. La kinasa Lck es fosforilada en tirosina en respuesta a la IL-12 tanto en células NK *resting* como activadas, y también es capaz de incrementar *in vitro* su autofosforilación [321]. Sin embargo, su papel en la señalización de IL-12 aún es desconocido.

La familia de las MAPK está muy conservada evolutivamente, e incluye las subfamilias de las 3 proteínas principales: ERK1/2, JNK y p38 [322]. Las MAPK son muy importantes en múltiples facetas de la inmunidad, englobando tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, lo que incluye la diferenciación a fenotipo Th1 [323, 324]. Los estudios realizados hasta el momento sobre IL-12 excluyen la activación de ERK1/2 [310, 325] y de JNK. Sin embargo, sí es conocida la implicación de p38 y su kinasa activadora MKK3/6, ambas son requeridas en la producción de IFN $\gamma$  [310, 311, 326]; su inhibición mediante compuestos como el SB203580 o en modelos transgénicos es capaz de impedir la producción de esta molécula [327]. Los ratones con deficiencia de MKK3/6 presentan una menor producción de IFN $\gamma$  y diferenciación a fenotipo Th1 [328]. Además, la MAPK p38 media la fosforilación en serina de STAT4 en respuesta a la estimulación con IL-12, una fosforilación que es requerida para maximizar la producción de IFN $\gamma$  [285, 310, 326].

Aunque la MAPK p38 parece ser importante para la producción de IFN $\gamma$  y la diferenciación a fenotipo Th1, no se conoce qué moléculas vinculan la activación del receptor de IL-12 con esta MAPK. Aún así, hay una serie de proteínas que parecen ser importantes para la activación de la p38: GADD45 $\beta$  y GADD45 $\gamma$  y la GTPasa Rac2. La sobreexpresión de GADD45 $\beta$  incrementa la activación de la MAPK p38 y la producción de IFN $\gamma$  en respuesta a la combinación de IL-12/IL-18 [329]; mientras que los ratones GADD45 $\gamma$ <sup>-/-</sup> presentan una menor activación de la p38 así como de la producción de IFN $\gamma$  [330]. De forma similar, los ratones Rac2<sup>-/-</sup>, o que expresan un alelo dominante negativo de Rac2, tienen una producción de IFN $\gamma$  más reducida [331]. Finalmente, aunque no se ha encontrado activación inducida por IL-12 de las JNK, tanto los ratones JNK1<sup>-/-</sup> como

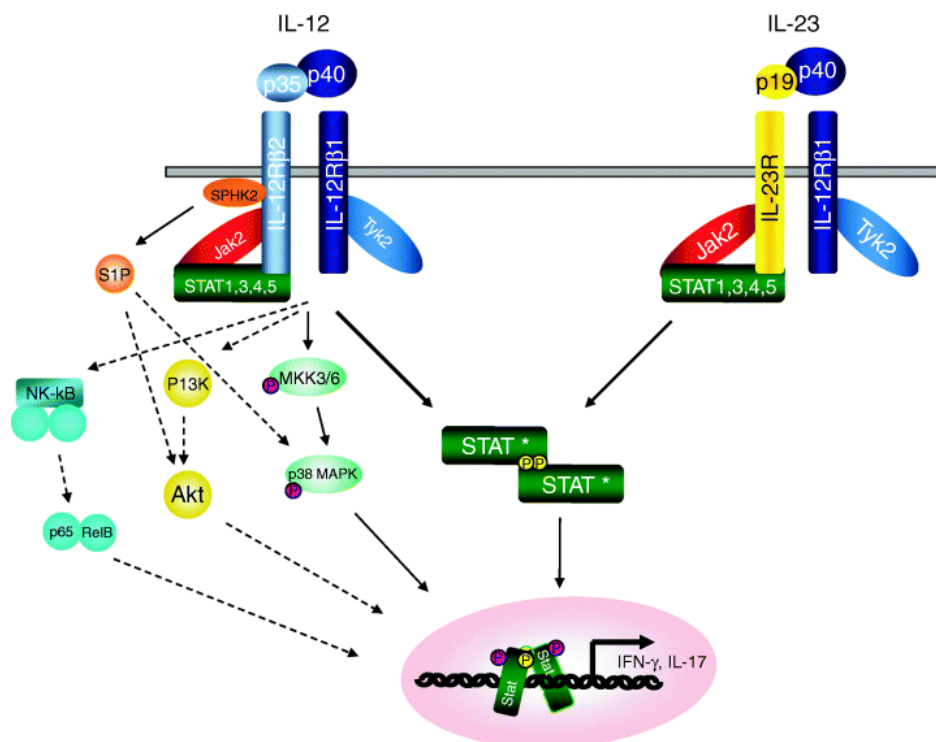
JNK2<sup>-/-</sup> presentan defectos en la diferenciación del fenotipo Th1 [332, 333]. Las células T JNK2<sup>-/-</sup> presentan una menor expresión de IL-12Rβ2, lo que sugiere que participan de forma indirecta [334]; cualquier otro rol debe ser determinado.

La señalización vía PI3K/Akt está presente en múltiples citocinas, como la IL-2, y participa en la proliferación y antagonizando la apoptosis [335]. Aún así, la capacidad de IL-12 para activar esta vía es controvertida, dado que hay datos discrepantes sin que se conozca el porqué [325, 336].

La esfingosina kinasa 2 (SPHK2) cataliza la fosforilación de la esfingosina a esfingosina-1-fosfato (S1P), ésta última es una molécula de la que se ha sugerido que es un importante mensajero intracelular que promueve la proliferación celular y la supervivencia [337]. Se ha visto que la SPHK2 está implicada en la señalización de IL-12 usando ensayos de doble híbrido en levaduras [338]. Así, se ha visto que la SPHK2 se asocia con IL-12Rβ1, y su expresión en un clon de células T incrementa la activación por IL-12 de STAT4 y la producción de IFNγ, sin ningún efecto en la proliferación [338]. S1P activa a la MAPK p38 en células endoteliales [339], lo que abre la posibilidad a que SPHK2 participe activando la vía MKK3/6-p38. Además, S1P también estimula la vía de PI3K/Akt en células no-linfoideas [340, 341]. Todo esto sugiere que esta molécula pudiera estar implicada en la señalización de IL-12 [342].

Hay datos que relacionan a muchas otras moléculas como necesarias en la señalización de IL-12, pero el mecanismo de su participación necesita ser elucidado. Así, por ejemplo, la inhibición de la sintasa de óxido nítrico tipo II (NOS2) conlleva una inmunidad innata y la señalización vía IL-12 defectuosas, incluyendo la imposibilidad de defensa frente a *Leishmania* y

la incapacidad para producir IFN $\gamma$  de las células NK [343]. Esos cambios se corresponden con una alteración en la fosforilación de Tyk2 y STAT4 en estas células T o NK deficientes en NOS2. Adicionalmente, los ratones carentes de la proteína de interacción con el receptor (RIP2 o RICK/CARDIAK) muestran una producción defectuosa en IFN $\gamma$  por las células Th1 y NK, lo que también está asociado con una reducción en la activación de STAT4 en respuesta a IL-12 [344]. Los miembros de la familia de factores de transcripción de NF- $\kappa$ B también están implicados en la señalización de la IL-12. En células dendríticas, IL-12 activa p50 y RelNF- $\kappa$ B [175], mientras que en neutrófilos activa a p50 [345]. El uso de NF- $\kappa$ B por células T o NK no ha sido demostrado de forma directa, aunque su inhibición impide la expansión de células efectoras y la producción de IFN $\gamma$  durante la infección con *Toxoplasma gondii* [346].



**Figura 18. Moléculas implicadas en la transducción de señal de la IL-12.** También IL-23 comparte moléculas de señalización, aunque principalmente su función es la de producir IL-17 [342].

### 1.3.6.3 Regulación negativa de la señalización por IL-12

La regulación negativa de la señalización de las citocinas es un tema que cada vez tiene mayor relevancia y las proteínas SOCS están implicadas en gran parte de estos procesos. En particular, SOCS-1 inhibe tanto la señalización de IFN $\gamma$  [347] como la señalización vía IL-12 [348]. Se ha demostrado que SOCS-3 se expresa en respuesta a la IL-12, efecto mediado por STAT5a [349], y que participa impidiendo la unión de STAT4 a la subunidad IL-12R $\beta$ 2 [350]. Se ha sugerido, además, que colabora en la diferenciación Th1/Th2, dado que se expresa de forma diferencial en las células Th2 [351-353]. Consistentemente con estas observaciones, los ratones transgénicos para SOCS-3 refuerzan la diferenciación a fenotipo Th2, y los que expresan alelos dominantes negativos de SOCS-3 presentan problemas para ella [351]. En contraste, SOCS-3 se expresa en la reestimulación de células polarizadas a Th1, pero no a Th2 [354]; además SOCS-3 se expresa de forma constitutiva en pacientes con la enfermedad de Crohn [355]. La delección de SOCS-3 en el hígado y en macrófagos resulta en algunos fenotipos sorprendentes, lo que podría ofrecer algunas sorpresas en células T también [356-358].

Otra familia de inhibidores transcripcionales, las proteínas inhibidoras de STATs activadas (PIAS), también regulan de forma negativa la señalización de citocinas [359, 360]. Se ha demostrado como PIASx inhibe esta función de IL-12 uniéndose a STAT4 e impidiendo la transcripción de los genes activada por ella [361].

También es posible regular STAT4 mediante la estabilidad proteica. La exposición prolongada a IL-12 hace disminuir los niveles de IFN $\gamma$ , lo que se corresponde con un descenso en los niveles de fosforilación de STAT4 [362]. La degradación de STAT4 es específica de la forma fosforilada, lo que indica que existe un mecanismo de regulación basado en la degradación; lo que no se conoce es si este mecanismo está mediado por SOCS, PIAS u otra familia de inhibidores desconocida.

## **1.3.7 Actividad biológica de los otros miembros de la familia de IL-12: IL-23 e IL-27**

### 1.3.7.1 Interleukina 23

#### A) Papel en la inflamación autoinmune.

Ya hemos comentado que IL-12 tiene un papel muy relevante como inductor de la producción de IFN $\gamma$ , y, por tanto la resistencia patógenos intracelulares. Desde un principio se observó una fuerte relación entre las enfermedades autoinmunes y la respuesta Th1 en modelos animales como los de diabetes, esclerosis múltiple, artritis, etc. El uso de ratones IL-12 p40<sup>-/-</sup> o anticuerpos contra esta subunidad deja claro su papel en las enfermedades mediadas por células T, como EAE (“Experimental Allergic Encephalomyelitis”, el modelo experimental en animales de la esclerosis múltiple humana), CIA (“Collagen Induced Arthritis”, artritis experimental) o IBD (“Inflammatory Bowel Disease”) [363-366]. Sin embargo, la respuesta obtenida en estos modelos, aunque acompañada de una mayor producción de IFN $\gamma$ , no parecía estar relacionada con esta citokina; una de las razones por las que se dudaba de su participación estaba en que aquellos modelos murinos en los que se bloqueaba la señalización de IFN $\gamma$  se seguían desarrollando las enfermedades, incluso de forma más severa [367-369]. Esta discrepancia entre el papel de IL-12p40 e IFN $\gamma$  en estos modelos inflamatorios es inconsistente con un modelo linear en el que IL-12 dirige una patología autoinmune de respuesta tipo Th1, e indica que la capacidad de IL-12 para promover la proliferación de las células T y su supervivencia era importante en estos modelos experimentales [370].

Siguiendo esta línea, se compararon los resultados obtenidos en modelos de ratón deficientes en IL-12p40 frente a los deficientes a IL-12p35 (similares a los  $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ ); éstos últimos desarrollaban una patología incluso más severa, mientras que los primeros quedaban protegidos en modelos de EAE [371, 372]. Cuando se descubrió que IL-12p40 es una subunidad compartida con la IL-23, se pensó que pudiera ser ésta la responsable de la disparidad. Más aún, cuando se estimulaban las células T activadas o de memoria en presencia de IL-23 (pero no IL-12), se observó que se producía IL-17, pero no  $\text{IFN}\gamma$  ni IL-4, lo que destacaba aún más su función única en el control de células T efectoras [373]. Cuando se generaron los primeros ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> se pudieron analizar comparativamente las funciones de IL-12 e IL-23 *in vivo*. Los primeros estudios establecieron que IL-12p40 e IL-23 p19, pero no IL-12p35, están implicadas en el desarrollo de la EAE [374]. Estudios posteriores aclararon que IL-23 no promueve el desarrollo de respuestas Th1, sino un subtipo de células T con un patrón de citocinas único (IL-6, IL-17A, IL-17F y TNF), suficiente para inducir una enfermedad neurológica [375]. Además, el bloqueo de IL-17A, pero no de  $\text{IFN}\gamma$ , disminuye la gravedad clínica de la enfermedad. De forma similar, los estudios con CIA revelan que la ausencia de IL-12p35 produce una artritis exacerbada, mientras que los ratones deficientes en IL-23 son resistentes al desarrollo de la patología en huesos y articulaciones [376]. Este descubrimiento se correlaciona con la ausencia de células  $\text{CD4}^+$  que produzcan IL-17, una citokina muy importante en el desarrollo de la artritis [377, 378]. Aunque éstos resultados (entre otros) clarifican el papel de la ruta IL-23-IL-17 en la inflamación autoinmune, no explican directamente cómo la ausencia de  $\text{IFN}\gamma$  o de su señalización en los modelos animales de EAE o CIA produce un agravamiento de su enfermedad. Es posible, por tanto, que el  $\text{IFN}\gamma$  sea

parte de un mecanismo regulador que contrarreste los efectos de IL-23 [379].

#### B) IL-23 en las enfermedades infecciosas.

A pesar de las diferencias observadas en la susceptibilidad a EAE o CIA entre ratones deficientes para IL-12p40 e IFN $\gamma$ , muchos estudios han mostrado que se comportan de forma similar en respuesta a un amplio rango de virus, bacterias y parásitos [380]. Aún así, al realizar más estudios comparativos se ha visto que existe un mecanismo IL-12p40 dependiente e IL-12p35 independiente implicado en la defensa frente a muchos microorganismos, entre ellos están *Francisella tularensis*, *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*), *Salmonella enteritidis*, *Mycobacterium spp.*, *T. gondii* y el citomegalovirus de ratón [381-386]. En algunos casos, las diferencias son muy pequeñas, manifestadas como cambios en la especificidad del tejido del parásito o la carga bacteriana. Actualmente, la base de estas observaciones permanece sin aclarar, pero parece que bien los monómeros u homodímeros de IL-12p40 refuerzan la inmunidad celular [384]; bien IL-12p40 dimeriza con IL-23p19, lo que explicaría de forma más conveniente la presencia de ese mecanismo independiente de IL-12p35.

El papel de IL-23 se ha estudiado en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Estudios previos parecían dar a IL-17 un papel muy importante en la resistencia a esta infección [387]; además, DCs estimuladas *in vitro* con *K. pneumoniae* producen IL-23, lo que incrementa el número de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17 [388]. En otros trabajos realizados con *T. gondii* en ratones deficientes para el receptor de IL-17, se observa una respuesta de los neutrófilos reducida y mayores cargas parasitarias [389].

Aún así, la infección en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> con *T. gondii* no ha revelado ningún defecto obvio en las respuestas agudas al parásito. En cualquier caso, si se administra IL-23 a ratones IL-12p40 deficientes se observa un aumento de la resistencia a la toxoplasmosis [386]; pero no está claro si es una consecuencia de la estimulación de la producción de IL-17 o de otras citocinas, como IL-6 o TNF, que se saben implicadas en promover la resistencia a este organismo intracelular [390-393].

### C) Mediadores de los efectos inflamatorios de IL-23.

Todos los datos comentados sugieren la existencia de un nuevo modelo en el que IL-23 estimula un tipo de células T único que producen IL-17, y que éstas contribuyen a la autoinmunidad o a la respuesta protectora durante la infección [379]. La identificación de esta vía ha hecho surgir nuevas preguntas acerca de la ontogenia de estas células en las patologías y los factores que regulan su actividad. Es probable que la cantidad relativa de IL-12 o IL-23 determine una producción por las células T dominante: IFN $\gamma$  o IL-17. De todos modos, aún hay pocos datos sobre estas cuestiones realizados *in vivo*. Además, dado que IL-12R $\beta$ 1 (compartido por IL-12 e IL-23) se expresa de forma constitutiva en células T CD4<sup>+</sup>, es probable que la expresión selectiva de IL-12R $\beta$ 2 ó IL-23R controle la sensibilidad a ambas citocinas. En los modelos propuestos, IL-12R $\beta$ 2 tendría bajos niveles de expresión o estaría ausente en células CD4<sup>+</sup> *naïve* o de memoria, y aumentarían sólo tras la presentación del antígeno; por el contrario, IL-23 estaría ausente de células *naïve* o efectoras, pero los niveles elevados estarían presentes en las células T de memoria. Aún así, dado que IL-23 induce una secreción de citocinas diferente, podría tratarse de un patrón más complejo [370].

### 1.3.7.2 Interleukina 27

#### A) Propiedades pro-inflamatorias.

Los primeros estudios realizados con esta citokina trataban de buscar su relación con la respuesta Th1 debido a su homología con IL-12; éstos mostraban que IL-27 incrementa la producción de IFN $\gamma$  en células CD4<sup>+</sup> *naïve* y que las células T deficientes en su receptor producían menos IFN $\gamma$  que las no-mutadas [394, 395]. Consistentemente con estas observaciones, la señalización a través del receptor de IL-27 activa STAT1 y, por tanto, Tbet, un factor de transcripción que, a su vez, promueve la expresión de componentes de la respuesta Th1 como IL-12R $\beta$ 2 e IFN $\gamma$  [313, 396-398]. Teniendo en cuenta los trabajos que observan un descenso de la expresión del receptor de IL-27 tras la activación de las células T [394], todo indica que esta citokina sensibiliza a las células T CD4<sup>+</sup> *naïve* hacia los efectos polarizadores de IL-12 de una respuesta Th1 [399]. Los estudios realizados en ratones infectados con *Leishmania major*, indican que el requerimiento de IL-27 en el desarrollo de la protección frente a este patógeno es pasajero [400-402]. Esta conclusión coincide con el hecho de que IL-27 no es requerida para promover las respuestas mediadas por IFN $\gamma$  en la mayor parte de sistemas experimentales en los que ha sido estudiada [179].

Aunque el papel de la IL-27 endógena, como promotora de las respuestas celulares, está poco estudiado durante la infección, hay estudios que indican que puede promover la inflamación en modelos de autoinmunidad o cáncer. La sobreexpresión en transgénicos de IL-27 durante la hepatitis viral o en carcinomas murinos, incrementa la producción de IFN $\gamma$  por las células CD8<sup>+</sup>, así como la citotoxicidad y la

eliminación del tumor [403-406]. Aunque estos estudios apoyan que IL-27 promueve la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup>, hay estudios que indican que las células tumorales podrían ser las dianas de IL-27 [407].

#### B) Propiedades anti-inflamatorias.

Los primeros datos que indicaban que IL-27 tiene un papel anti-inflamatorio provenían de modelos *in vivo* de infecciones parasitarias [408] con *T. gondii* en ratones deficientes para WSX-1, que eran incapaces de disminuir la respuesta adaptativa y desarrollaban una enfermedad inflamatoria letal dependiente de células T CD4<sup>+</sup>. Esta respuesta patológica es intrínseca de las células T y se caracteriza por un incremento de la proliferación de los linfocitos T, de la producción de IFN $\gamma$  e IL-2, y el mantenimiento de una población de células muy activadas (CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>), tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. De forma similar, se demostró que la infección con *Trypanosoma cruzi* de ratones WSX-1<sup>-/-</sup> desarrollaba respuestas de células T exageradas, incluyendo la producción de IL-4, IL-6, TNF e IFN $\gamma$  [409]. De forma similar ocurre cuando a estos ratones se les infecta con *Mycobacterium tuberculosis*, tienen una menor carga bacteriana, pero desarrollan una patología pulmonar más severa y sucumben a la infección, probablemente por esta hiperactivación inmune [410, 411]. Estos estudios sugieren que, en presencia de fuertes estímulos polarizantes, como los parásitos o infecciones bacterianas, la capacidad de IL-27 para promover respuestas Th1 se vuelve secundaria ante su papel como supresora de la proliferación y producción de citocinas por las células T efectoras. Dado que el receptor WSX-1 se encuentra a bajos niveles en células T *naïve* y elevados en células que ya han sido estimuladas por el antígeno [412], es probable que esta citokina ejerza su función en múltiples subtipos celulares (*naïve*, efectoras, reguladoras y de memoria) [412]. En

cualquier caso, hay evidencias que indican que IL-27 no sólo influye en la regulación de la respuesta Th1, sino que tiene además un efecto inhibitorio sobre la Th2 independientemente de su capacidad para reforzar la producción de IFN $\gamma$  [313, 401, 413].

### C) Efecto de IL-27 sobre la proliferación de las células T.

Todos estos datos apuntan a que la IL-27 regula la cinética y la intensidad de las respuestas de células T, y no parece estar restringido a un subtipo Th particular [179]. Para entender esta actividad de IL-27 debe tenerse en cuenta su papel en la regulación de la proliferación. Un hecho común en los estudios iniciales es que la ausencia del receptor de IL-27 lleva a un incremento de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> tras la estimulación *in vitro* [394, 395]. De forma paradójica, IL-27 puede aumentar la expansión clonal de células T CD4<sup>+</sup>, pero este efecto es más aparente en ausencia del factor de crecimiento de células T dominante: IL-2 [398, 414]. Una explicación para ésto se entiende cuando se observa que IL-2 regula de forma negativa el receptor de IL-27 [413], y de forma similar IL-27 suprime la producción de IL-2 por las células T CD4<sup>+</sup> [415]. De todos modos, se debe destacar que IL-27 tiene otros efectos inhibitorios en las células T. En cualquier caso, dado el importante papel de IL-2 como factor de crecimiento para las células T y su papel en el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2 [416], esta observación ofrece un primer acercamiento al efecto inhibitorio de IL-27 que ayudaría a explicar un efecto supresor más amplio en muchos modelos.

## **1.4 CD26 y CD45: dos moléculas con importantes funciones en el Sistema Inmune reguladas por Interleukina 12**

### **1.4.1 CD26**

CD26 es una proteína de aproximadamente 105 a 110kDa, cuyos 766 aminoácidos conforman una peptidasa integral de membrana de tipo II con actividad Dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) [417]. Esta actividad fue asignada a este marcador linfocitario tras el “4th Workshop on Leukocyte differentiation Antigens”. Se trata de una sialoglicoproteína de tipo II homodimérica cuya actividad enzimática se encuadra dentro de las serín proteasas debido a la estructura de su centro activo, que rodea a la Ser630, y con secuencia Gly-X-Ser-X-Gly [418]. CD26 tiene un motivo consensuado más extenso que es compartido por todos los miembros de la familia de las prolil oligoproteasas a la que también pertenece. La tríada catalítica de esta familia de peptidasas consiste en aminoácidos nucleófilo-ácido-base (correspondiente con Ser-Asp-His), lo que se corresponde con una conformación poco común a las serín proteasas clásicas como la tripsina o la quimiotripsina [419].

Desde un punto de vista estructural, posee un dominio intracelular muy pequeño, de tan sólo 6 aminoácidos, altamente conservado entre especies, sin residuos susceptibles de fosforilación. Esto contrasta con un dominio extracelular de 738 aminoácidos, y con la región hidrófoba

transmembrana situada entre los residuos 7-22. Se pueden considerar cuatro dominios en la región extracelular: un tallo flexible de 20 aminoácidos próximo a la membrana plasmática, una región altamente glicosilada que contiene 8 de los 10 residuos de N-glicosilación de la molécula, una región intermedia altamente conservada y rica en Cys responsable de la interacción con ADA, colágeno y fibronectina; y una última región catalítica C-terminal de 250 aminoácidos, que es la que posee una mayor tasa de conservación interespecífica [420, 421].

En cuanto su expresión, CD26 está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y murinos, y su actividad es detectada en el plasma sanguíneo asociada a una forma soluble secretada. La mayor concentración relativa de esta molécula se encuentra en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales de los túbulos corticales del riñón, constituyendo un 4% de la proteína total. También es muy abundante en los conductos y en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal, donde puede ejercer una importante función degradando proteínas como paso previo a la absorción intestinal. Igualmente, su presencia en la membrana plasmática es destacable en otras células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, linfocitos y algunos tipos neuronales [422-426].

Sin embargo, tan sólo en el caso de linfocitos, se observa una clara regulación positiva de la expresión de CD26 tras la activación celular [427-433]. No sólo se encuentra regulada su presencia en la superficie, sino que existe un importante tráfico de moléculas entre en la membrana plasmática y el aparato de Golgi, produciéndose cambios en el grado de glicosilación de las moléculas durante estos ciclos de endo y exocitosis [434]. Estos procesos de modificación post-traducciona parecen ser la causa más probable de la presencia de diferentes isoformas de CD26 durante la

activación de los linfocitos T, así como de la heterogeneidad entre los diferentes tejidos. Es patente el incremento de la sialización con la edad, un fenómeno que también está presente en los individuos infectados por HIV [435].

Originalmente, CD26 fue considerado una molécula de activación de células T. Actualmente, sin embargo, se la considera como un antígeno carente de linaje celular cuya expresión está regulada durante el proceso de activación y diferenciación de las células inmunes. A pesar de su ausencia inicial en células B en reposo y NK, su expresión es inducida, al igual que en las células T, por la estimulación antigénica [436]. En PBMCs, sólo una pequeña población de células T expresa en mayor proporción este antígeno [437]; esta subpoblación linfocitaria, englobada dentro de las células CD45R0<sup>+</sup>, presenta un fenotipo de memoria tardía y es responsable de la producción de la mayor parte de la IL-2, así como otras citocinas asociadas a la respuesta Th1, dado que CD26 se expresa de forma preferencial en células [438-440]. Estas células son importantes en la respuesta proliferativa de células alogénicas y de linfocitos de memoria de respuesta tardía, así como en la actividad de CTLs que responden mayoritariamente a aloantígenos [420]. Las células CD26<sup>bright</sup>, que pueden ser tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, son cruciales también para la síntesis de Igs y poseen capacidad de migración trans-endotelial y quimiotaxis hacia las zonas inflamadas [441, 442].

Existe un amplio rango de dianas potenciales para esta proteína, y muchas de ellas poseen una importancia clave relativa a su función y actividad biológica: citocinas, factores de crecimiento, neuropéptidos, etc. Por ello, CD26 se presenta como una proteína clave al influir en la vida media de estas moléculas, modificando así el tiempo durante el cual ejercen

su actividad biológica [443]. Se han llevado a cabo diversos estudios en relación a los efectos biológicos de la actividad enzimática DPPIV en la regulación del Sistema Inmunitario empleando inhibidores específicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, con diversas estructuras químicas y mecanismos de acción, dando como resultado la supresión de la proliferación de células T *in vitro* [444]. La inhibición de su actividad, en cultivos de linfocitos T, es capaz de provocar la supresión de la producción de IL-2, IL-10, IL-12 e IFN $\gamma$ , mientras que estimula la secreción de TGF $\beta$ ; esto sugiere un importante papel del TGF $\beta$  en la inmunosupresión resultante de la inhibición de la actividad enzimática de esta peptidasa [445, 446].

Los anteriores efectos, entre otros, sugieren que la actividad degradativa no tiene necesariamente que implicar un efecto positivo o negativo, sino que parece generar incluso modificaciones que alteran directamente el comportamiento y la actividad biológica del compuesto. Esto se ve reflejado, de modo práctico, en el papel que parece jugar CD26 en la entrada del HIV en los linfocitos T. Es destacable que las células CD26<sup>bright</sup> aparecen en porcentajes significativamente menores en pacientes infectados [437, 447], y dada su aparente importancia en la respuesta inmune mediada por la memoria inmunológica y la consiguiente reducción de los niveles de IL-2, se relaciona la pérdida de esta subpoblación celular con el deterioro progresivo de la función inmune en dichos pacientes [448].

De todos modos, la actividad de CD26 no está únicamente circunscrita a su capacidad de degradación de ciertas moléculas, sino que diversos estudios han puesto de manifiesto que este marcador de activación interviene directamente regulando el proceso de transducción de señal o, al menos, la intensidad y especificidad del mismo, en un proceso

independiente de su actividad enzimática. La estimulación simultánea de linfocitos T vía CD3 y CD26 provoca una mayor activación en ausencia de APCs [449]. Asimismo, se ha comprobado que diversos anticuerpos monoclonales contra CD26 poseen actividad coestimuladora de la activación mediada por CD3 en subpoblaciones puras de células Th y Tc [450]. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño del dominio intracelular de CD26 y que no se asocia directamente a la cadena  $\zeta$  del TCR, se ha sugerido la necesidad de una proteína adaptadora [451, 452].

CD26 es capaz de unirse a ADA [453, 454]. Parece que esta unión tiene importantes implicaciones en la regulación de los niveles extracelulares de adenosina en el microentorno cercano a la membrana de linfocito T, especialmente si tenemos en cuenta los potentes efectos inhibidores de la adenosina en estas células [455]. Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación indican que los niveles totales de ADA en la célula no parecen afectados por la acción de citocinas, pero que la regulación de la CD26 en la superficie por éstas puede ejercer cierto control de la actividad de ADA a nivel del microambiente autocrino en la membrana plasmática [431, 456].

CD26 también es capaz de asociarse con la isoforma de bajo peso molecular de CD45, denominada CD45R0, puesto que ambas son capaces de co-precipitar a partir de lisados celulares de PBMCs. Dado que ambas coexisten y son expresadas de modo preferencial en células de memoria [457, 458], una interacción entre estas moléculas podría afectar a la actividad tirosín kinasa, a la fosforilación de CD3 y a la movilización de calcio observada en fenómenos coestimulatorios del TCR relacionados con CD26 [432].

## 1.4.2 CD45

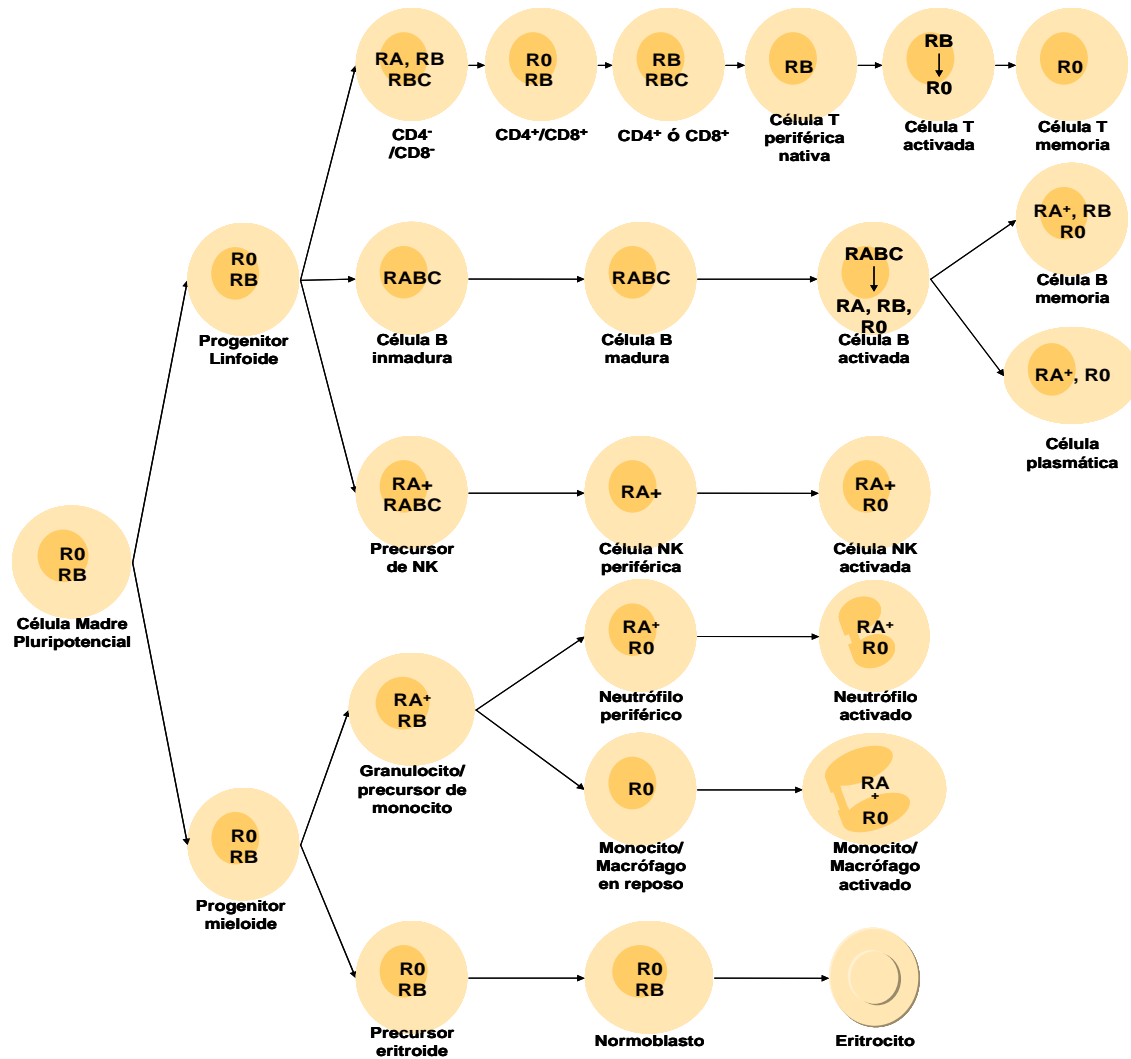
CD45, también llamado Antígeno Leucocitario Común (LCA), es una tirosín fosfatasa (EC 3.1.3.48) esencial en la regulación de las cascadas de transducción de señal en células del Sistema Inmune. Es una glicoproteína que se encuentra en la superficie celular, tan abundante que puede llegar a representar el 10% de la superficie de la membrana. Contiene una región fuertemente conservada, con un 95% de homología entre las especies del taxón Mammalia, mientras que sólo conserva un 35% de homología en su dominio extracelular [459-462].

El dominio expuesto en la superficie externa de la célula comprende un rango de 391 a 552 aminoácidos, cuya longitud depende de hasta cinco combinaciones conocidas (y ocho potenciales) de *splicing* alternativo durante la maduración del mRNA de CD45 [463, 464]. A continuación, presenta una región transmembrana de 22 aminoácidos, mientras que la región citoplasmática consta de 705 aminoácidos, con dos dominios estructurales homólogos de unos 300 aminoácidos cada uno denominados regiones D1 y D2 [465]. Tan sólo el dominio D1, por tener actividad enzimática, es necesario para la señalización vía TCR, como se ha observado en líneas celulares deficientes en CD45 [466]; la función del dominio D2 parece estar relacionada con la estabilidad molecular y funcional de la enzima [467-469].

El gen de CD45 puede dar lugar a variantes moleculares como consecuencia del *splicing* alternativo de tres exones denominados A, B y C, que se corresponden respectivamente con los exones 4, 5 y 6 de la secuencia del gen [470]. Éstos codifican para una fracción del dominio

extracelular cercana al extremo amino terminal. CD45 se encuentra fuertemente N-glicosilado en su dominio extracelular, y presenta O-glicosilaciones en los exones variables, de lo que se deriva la importancia antigénica del *splicing* alternativo. Estas glicosilaciones parecen ser también importantes para su funcionalidad [471-474].

La organización génica de esta proteína consiste en 34 exones contenidos en un gen de más de 120 kilobases. El exón 1 codifica para una secuencia 5' no traducida, y está duplicado en dos exones que se emplean alternativamente: el 1a, más frecuente, y el 1b, de modo que la transcripción puede comenzar en tres posiciones P1a, P1b o P2. Las posibles reorganizaciones del mRNA de CD45 pueden dar lugar a isoformas conteniendo uno de los exones (RA, RB, o RC), dos (RAB, RAC o RBC), tres (RABC) o ninguno (R0) [464, 475-477]. De ellas, las conocidas en leucocitos humanos son RA, RB, R0, RBC y RABC, que se distribuyen a lo largo del desarrollo de las células hematopoyéticas de un modo diferencial. Es destacable que en las células de la línea linfóide se produzca un incremento de los niveles de CD45 a lo largo del proceso de diferenciación [478-481]. En cambio, en las células de la línea mieloide, la diferenciación y especialización conllevan una reducción de la expresión de las isoformas de CD45 en la superficie celular, llegando incluso a desaparecer de la superficie de los eritrocitos [482-485].



**Figura 19. Patrón de expresión de las diferentes isoformas de CD45 en diversos linajes y estados de desarrollo / diferenciación de células hematopoyéticas y leucocitos.** Sólo 5 de las 8 isoformas potenciales de CD45 se encuentran representadas en el sistema linfocitario humano. La isoforma RA+ se corresponde a la variante altamente glicosilada (y con mayor peso molecular) de CD45RA.

Dado que CD45 juega un papel crucial en la transducción de señal de linfocitos, resulta de gran importancia dilucidar las causas de su comportamiento, sus sustratos y los procesos destinados a la regulación de su actividad en células del Sistema Inmunitario. Entre los posibles sistemas de regulación se encuentran la unión a ligandos, dimerización, modificación covalente e interacción con inhibidores específicos intracelulares u otras proteínas [459, 461, 486-488]. Se ha propuesto un mecanismo de control basado en la homodimerización no covalente de dos

moléculas de esta proteína, al observar que este fenómeno provoca una clara inhibición de su actividad enzimática [489, 490]. La dimerización constituye un método alternativo de regulación de la actividad proteica, de modo que CD45 es capaz de formar homodímeros con diferente afinidad dependiendo de la isoforma implicada, siendo la de menor peso molecular (R0) la más efectiva en este proceso. Las modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, también afectan a la formación de dímeros, de modo que la actividad tirosín fosfatasa en células T deficientes en CD45 es restituida más eficazmente por la isoforma RABC que por la R0. Esto concuerda con estudios que indican que las células T RA<sup>+</sup> *naïve* exhiben una mayor fosforilación en tirosina, flujo de calcio y generación de Inositol-3-fosfato que las células de memoria CD45R0<sup>+</sup> [491, 492].

Por otro lado, la propia actividad de compartimentalización de las proteínas de membrana parece poder controlar la función de CD45 sin afectar a la propia actividad fosfatasa. La asociación a los rafts del complejo supramolecular durante la formación de la sinapsis inmunológica puede provocar la separación o un acercamiento físico de CD45 a alguno de sus sustratos, evitando que estos sean defosforilados [34, 493-496].



## Capítulo 2.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 2.1 Células empleadas

### 2.2 Citometría de flujo

### 2.3 Marcaje de microscopía confocal

### 2.4 Aislamiento de los microdominios de membrana mediante gradientes de densidad

### 2.5 Electroforesis y Western Blot



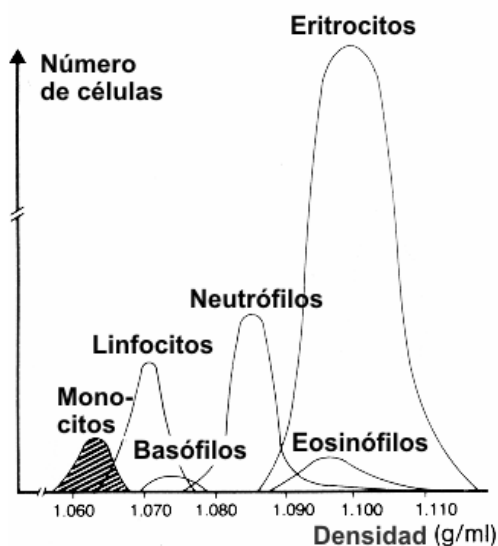
## 2 Material y métodos

### 2.1 Células empleadas

La casi totalidad del trabajo que se presenta en esta memoria fue realizado empleando cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica humana (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”, PBMCs). Dichas células fueron purificadas a partir de concentrados leucocitarios (“*buffy coats*”) por medio de gradientes de Ficoll™ Isopaque. Los *buffy coats* son suspensiones concentradas de células sanguíneas resultantes del fraccionamiento de donaciones anónimas, y fueron generosamente cedidos por el Centro de Transfusiones de Galicia. El proceso de fraccionamiento que allí se realiza consiste la separación de plasma sanguíneo y eritrocitos en bolsas de donación separadas y dispuestas para transfundir, que da como residuo una suspensión muy concentrada de eritrocitos, leucocitos y plaquetas que nosotros empleamos para el aislamiento y cultivo de las PBMCs. En otros casos, la purificación se realizó a partir de células de sangre recién extraída de donantes voluntarios (“sangre fresca”), por medio de tubos de heparina Vacutainer. En algunos experimentos, tal y como aparece indicado, se emplearon líneas celulares (Jurkat).

## 2.1.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica

De las diferentes técnicas existentes para la obtención de PBMCs hemos empleado la separación por medio de gradientes de densidad. Se trata de un método que aprovecha diferentes características celulares como densidad y tamaño para hacer efectiva esta separación. Como se puede observar en la Figura 20 en donde se muestran diferentes poblaciones celulares y su relación densidad-tamaño, éstas se distribuyen a lo largo de un gradiente de densidades continuo, que puede ser alterado por diferentes condiciones, como es el caso de la osmolaridad. Bøyum fue en 1968 el primero en emplear estos gradientes de densidad para separar las distintas poblaciones de células sanguíneas (32).



**Figura 20. Distribución de densidades de las células sanguíneas.** En este gráfico se puede observar como se distribuyen las PBMCs según su densidad. Los linfocitos y monocitos son las células de menor densidad, mientras que los eritrocitos y eosinófilos son los primeros en depositarse debido a su mayor densidad. Factores como la osmolaridad pueden afectar a la densidad que presenta cada una de las poblaciones.

En este trabajo se han usado los gradientes de Ficoll™-Paque PLUS (GE Healthcare), un polímero sintetizado por la copolimerización de sacarosa y epíclorohidín. Posee una densidad de 1.078g/ml y su

osmolaridad es de 312mOsm, lo que permite la separación de los linfocitos y monocitos (células mononucleares) del resto de las células sanguíneas en función de su flotabilidad. Todo el proceso de purificación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar Cultair BC100 (Cultek) para mantener las condiciones de esterilidad, necesarias para los experimentos posteriores.

La elevada concentración celular presente en los *buffy coats* hace necesaria su dilución en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) antes de la realización de los gradientes, si tenemos en cuenta el protocolo comercial de separación optimizado para la purificación a partir de sangre completa. Por ello, el primer paso consiste en la dilución 1:4 de la sangre del *buffy coats* en RPMI o bien 1:2 en el caso de sangre no fraccionada. A continuación, se deposita en el fondo de unos tubos Falcon (BD Biosciences) estériles, de 50ml, un volumen de 10ml de Ficoll™ a temperatura ambiente. Es importante que la temperatura sea lo más cercana a 20°C, dado que a ella este compuesto tiene la densidad adecuada para la separación de los componentes que nos interesan. Sobre el Ficoll™, se procede a depositar 20ml de la sangre diluida, manteniendo un flujo lento y constante que evita que ambas fases se mezclen (lo que impediría la correcta separación de los componentes celulares). El resultado final puede observarse en la Figura 21.



**Figura 21. Gradientes de Ficoll™ tras la centrifugación.**  
Arriba podemos observar una fotografía del gradiente y un esquema del mismo.

El gradiente es centrifugado a 500g durante 25-30min a 20°C y sin freno. Tras la centrifugación, podemos observar en el fondo del tubo un depósito rojo (Figura 21), en el que se encuentran los eritrocitos y polimorfosnucleares, una banda transparente correspondiente al Ficoll™, una blanquecina que se corresponde con los linfocitos, y una gran capa superior, o sobrenadante, que básicamente está compuesta de plasma sanguíneo, RPMI y plaquetas. Este sobrenadante se elimina con una pipeta Pasteur estéril y se deshecha. A continuación se recoge la banda de los linfocitos en uno o más tubos Falcon estériles.

Las células de la banda de PBMCs son lavadas en RPMI dos veces a 400g, durante 10min para eliminar los restos de Ficoll™ que puedan haber sido arrastrados al recoger la banda. Una vez lavadas, se resuspenden y se procede a su conteo y cálculo de la viabilidad de las células mediante la dilución de una alícuota de volumen conocido de las células, con Azul Tripán (0.1% peso/volumen en PBS: 137mM NaCl, 10mM tampón fosfato sódico pH 7.4, 2.7mM KCl). Este método permite reconocer las células dañadas, dado que el colorante penetrará en aquellas que tengan la membrana permeabilizada y que se reconocerán por su interior azulado. La cuantificación se realizó como se indica a continuación:

$$Viabilidad = \frac{n^{\circ} \text{vivas}}{n^{\circ} \text{vivas} + n^{\circ} \text{muertas}} \times 100$$

El conteo de las células con viabilidad superiores al 95% se realizó en una cámara de Neubauer por medio de un microscopio invertido (Wilowert) a 40x.

## 2.1.2 Cultivos celulares

Para los diferentes experimentos fue necesario realizar cultivos celulares. Se utilizó un medio de cultivo o medio completo: RPMI suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino Inactivado, 100µm/ml de streptomycin y 100UI/ml de penicilina (para la conservación del medio y reducir el riesgo de contaminación bacteriana).

La activación de los linfocitos se llevó a cabo añadiendo una lectina, PHA (fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, Sigma-Aldrich), a diferentes concentraciones según se indica para cada experimento. La PHA es un mitógeno que promueve la activación de las células linfoides por medio de la estimulación, entre otros, de la maquinaria de transducción de señales del Receptor de Células T (TCR), provocando a su vez la proliferación policlonal de los linfocitos presentes en el cultivo. A pesar de ser un mitógeno inespecífico, su efecto activador de la diferenciación y proliferación es especialmente efectivo sobre la población de linfocitos T, por lo que su empleo resulta óptimo para la obtención de cultivos enriquecidos en este tipo celular, sobre todo teniendo en cuenta que partimos de una población heterogénea como son las PBMCs. La inespecificidad de los mitógenos policlonales como la PHA reside en que generan activación de más de una vía de transducción de señales, a partir de su interacción con más de una molécula implicada en dicho proceso de señalización. Sin embargo, estos antígenos parecen disparar los mismos mecanismos de respuesta proliferativa que se observan en otros métodos específicos de activación policlonal, como el acoplamiento específico de las moléculas de TCR en los rafts (anti-TCR), y la cascada de activación de la sinapsis inmunológica desencadenada por anticuerpos anti-CD3.

Como método alternativo de activación celular se empleó anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) fijado a placa. Para ello se incubó la superficie del frasco de cultivo con sobrenadante del hibridoma que produce el anticuerpo durante 30min a 37°C. Tras varios lavados con RPMI, se procedió al cultivo de las células en las condiciones requeridas.

En algunos experimentos fue necesaria la adición de interleukinas como la IL-2 o IL-12 (ambas de PeproTech). La primera fue utilizada para potenciar la activación de células por la PHA. La segunda fue empleada, sobre todo, en experimentos de proliferación y de estimulación celular, dado que es el objeto de este trabajo.

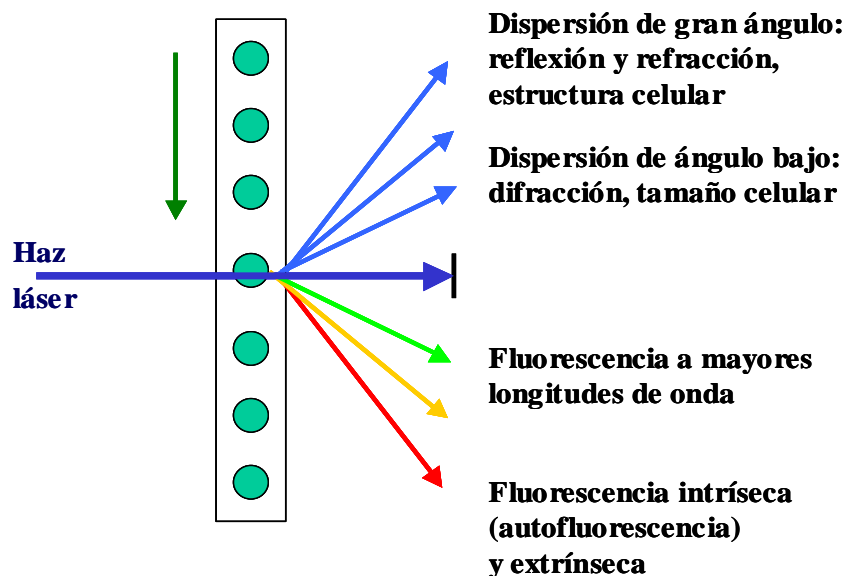
Las condiciones ambientales de cultivo fueron fijadas en una incubadora a 37°C (Heraeus BB16, Heraeus) que mantenía una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La duración de los cultivos fue variable de acuerdo con las condiciones requeridas para cada experimento. Una vez finalizado el período de cultivo, se evaluó tanto la viabilidad de las células como su número empleando una tinción con Azul Tripán igual que en el apartado anterior; se desecharon aquellos cultivos que presentaran una mortalidad superior al 5%.

## 2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de estudio y detección rápida y sencilla de determinados parámetros de células (o de partículas) cuando fluyen a través de un punto donde se cruzan con un láser. Esta característica permite que la detección y medida de dichos parámetros se realice de modo individual para cada una de las partículas implicadas, pudiendo así realizar un posterior análisis estadístico de los datos mucho más exhaustivo y preciso; además, el gran número de partículas analizadas de forma simultánea confieren a esta técnica una gran solidez. Mediante la citometría de flujo se pueden realizar numerosos tipos de ensayo, como la estimación del contenido en ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial membrana y pH, así como detección de antígenos tanto en la superficie como en el citoplasma y orgánulos de las células por medio de anticuerpos marcados directa o indirectamente con fluorocromos. La citometría de flujo también permite la separación física de subpoblaciones de células según las características antigénicas siempre que el citómetro disponga del sistema adecuado para ello.

La utilización de fluorocromos se basa en la particularidad de ciertas moléculas para emitir luz a una longitud de onda determinada cuando son excitadas por un haz de luz con menor longitud de onda (y por tanto con mayor capacidad energética). Estas propiedades se encuentran en moléculas como la fluoresceína (FITC) o la ficoeritrina (PE), u otros compuestos de nueva generación como pueden ser los Alexa-Fluor. Habitualmente estas moléculas se emplean unidas covalentemente a anticuerpos, estreptavidina o cualquier otra que reconozca específicamente la característica que tengamos la intención de analizar (una proteína, un

lípidos, etc). Además, la adecuada combinación de los fluorocromos y la detección de moléculas en las células permiten el análisis de varios parámetros de forma simultánea.



**Figura 22. Esquema del sistema de detección de fluorescencia por citometría de flujo.**

Cuando las células o partículas a analizar atraviesan el punto de detección, la luz del láser es dispersada por la propia célula detectándose tanto la dispersión frontal (“Forward Scatter” o FSC), que nos da una idea del volumen; como la dispersión lateral (“Side Scatter” o SSC), que nos informa de la complejidad. La representación gráfica de estos dos parámetros permite diferenciar las poblaciones a analizar y, en todo caso, permite descartar la información procedente de restos celulares, agregados del medio extracelular o células apoptóticas que puedan alterar el análisis. Si la intención es la de detectar una determinada molécula en particular, sólo se necesita utilizar un anticuerpo marcado con un fluorocromo. El citómetro detecta la emisión de luz del fluorocromo, cuando éste es activado por la luz del láser; esta señal de emisión es filtrada, amplificada y detectada a diferentes longitudes de onda, y toda esta información es procesada por un sistema informático.

En ese trabajo ha sido fundamental el empleo de esta técnica para detectar antígenos en la superficie celular, el grado de fosforilación de moléculas intracelulares, la viabilidad y grado de respuesta proliferativa de las células así como para el análisis de lisados celulares.

### **2.2.1 Marcaje en superficie**

Para detectar la expresión en superficie del receptor de interleukina 12 se empleó una técnica de marcaje indirecto que nos permitiese, de alguna forma, amplificar su señal. Para ello, las células cultivadas 3 días a  $10\mu\text{g/ml}$  de PHA, fueron lavadas con PBS pH7.4 ( $137\text{mM}$  NaCl,  $2.7\text{mM}$  KCl,  $8\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $11.5\text{mM}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) por centrifugación a  $400g$  durante  $7\text{min}$  a  $4^\circ\text{C}$ , contadas y el equivalente a  $1 \times 10^6$  células fue depositado en un tubo de citometría. A continuación, las células fueron fijadas utilizando una solución al 4% de Paraformaldehido (PFA) en PBS durante  $5\text{min}$  a temperatura ambiente (RT). Tras un nuevo lavado con un tampón de bloqueo (una solución PBS-BSA: 1%BSA y 0.05% de Azida Sódica), que reduce de forma significativa las uniones inespecíficas de los anticuerpos empleados, el sobrenadante fue eliminado por decantación. Se le añadió a cada tubo  $0.1\text{ml}$  de IgGs humanas (concentración final:  $400\mu\text{g/ml}$ ) diluidas en tampón PBS-BSA para bloquear los receptores Fc, dado que éstos aumentan la señal inespecífica. Tras una incubación de  $30\text{min}$  a  $4^\circ\text{C}$ , las células fueron nuevamente lavadas con tampón de bloqueo. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a cada una de las cadenas del receptor: IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 o su isotipo; todos estos anticuerpos son monoclonales (de BD Biosciences) y han sido desarrollados en rata. La incubación del anticuerpo

primario se realizó a una concentración final de 0.125µg/ml de anticuerpo por tubo, tal y como se determinó por titulación; la duración de este marcaje nunca fue inferior a 30min a 37°C. Tras un nuevo lavado con el tampón de bloqueo, las células se incubaron con anticuerpo de cabra biotinilado específico de inmunoglobulinas de rata (“GARat biotin”, BD Biosciences), también durante 30min a 37°C. Finalmente, y tras un nuevo lavado, las células se marcaron con estreptavidina unida a ficoeritrina (SPE, Serotec) por los mismos periodos de tiempo y a la misma temperatura, pero esta vez en oscuridad (para evitar la degradación por la luz del fluorocromo). Un último lavado, con tampón de bloqueo, y las células fueron llevadas a un citómetro (FACScalibur, BD Biosciences) para su análisis.

En el caso del marcaje con anti-CD26-FITC (clon TP1/16) y anti-CD45R0-PE (clon UCHL-1, BD Biosciences) se procedió de forma similar, pero dado que en este caso el marcaje fue directo no era necesaria la fijación, y de ahí que las incubaciones se realizaran a 4°C.

### **2.2.2 Localización del receptor de interleukina 12**

Para poder localizar ambas cadenas del receptor de interleukina 12 respecto a los rafts lipídicos, se utilizó un protocolo adaptado del descrito por Janes *et al.* [77], que ya ha sido empleado por nuestro grupo de investigación en otras ocasiones [432]. En este caso, su empleo hubo de adaptarse al protocolo de estimulación basado en el descrito por Hall *et al.* [492].

Para poner a punto el método, las células fueron, una vez finalizado el tiempo de cultivo (3 días y a una concentración de 10 $\mu$ g/ml de PHA), lavadas con RPMI y tratadas con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD o colesterol oxidasa (extracción de zona raft) en RPMI durante 15min a 37°C, o bien de TX100 (extracción de la región no-raft) diluido en PBS por 5min en hielo (todos de Sigma-Aldrich). Una vez finalizado el tratamiento de extracción, las células fueron fijadas y teñidas para poder evaluar la expresión de los marcadores de zona raft y no-raft. Los marcadores empleados fueron para zona raft: anticuerpo anti-CD59-FITC (BD Biosciences) o bien CTB-Alexa 488 (de Molecular Probes, la subunidad B de la toxina colérica, se une al gangliósido GM1, exclusivo de zona raft); para zona no-raft se empleó como marcador anticuerpo anti-CD71-PE (BD Biosciences).

Una vez puestas a punto las condiciones experimentales de extracción de los diferentes microdominios de membrana, se procedió a la estimulación previa de las células con interleukina 12 o no, durante 5 minutos, para evaluar si la preincubación con el ligando altera el posicionamiento de IL-12R $\beta$ 1 o IL-12R $\beta$ 2. De este modo, las células activadas con PHA (10 $\mu$ g/ml, 3 días) fueron lavadas con RPMI, resuspendidas en este medio y se les añadió (o no) 10ng de IL-12 (Peprotech), siempre a 37°C. Tras la incubación, las células se lavaron nuevamente con RPMI y trataron con la concentración elegida de M $\beta$ CD (2.5mM, 15min a 37°C) o bien de TX100 (0.1% en PBS, 5min en hielo). Después del lavado, las células fueron fijadas con PFA (4% PFA en PBS, 10min, RT) y marcadas para cada cadena del receptor como se ha descrito en el apartado anterior, teniendo en cuenta que, en el último paso (la incubación con SPE), se le añadía la concentración adecuada de CTB-Alexa488 o de anti-CD71-PE. De cada condición se realizaron triplicados,

que fueron marcados de forma independiente. La adquisición de los datos se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), mientras que el análisis se realizó con el software WinMDI (cedido por el Dr. Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA).

### **2.2.3 Detección de moléculas intracelulares.**

En ocasiones fue necesaria la detección de proteínas que se encontraban en el interior celular. Para el marcaje intracelular los cultivos celulares (3 días a 10µg/ml de PHA) fueron divididos en dos, depositando cada mitad en un tubo Falcon de 50 ml; en caso de que el volumen del cultivo fuese mayor que la capacidad del tubo, las células eran previamente concentradas y resuspendidas en medio completo. Uno de los tubos era considerado como control positivo, escogiéndose de la literatura aquel estímulo (PMA, TCR/CD3, IL-2, etc) que mejor desencadenara el efecto que adecuado a nuestro interés. El otro tubo era incubado con IL-12. En cualquier caso se mantenía estable la temperatura de 37°C. Las alícuotas se tomaron a los diferentes tiempos, asegurándose por conteo previo de que cada alícuota tenía un mínimo de  $3 \times 10^6$  células. Éstas fueron, inmediatamente, fijadas con 4% PFA en PBS a 37°C durante 5min; una vez finalizado el tiempo de la fijación, cada alícuota se dividió en tres partes iguales, de forma que en cada tubo de citometría hubiera  $1 \times 10^6$  células, y poder así hacer triplicados del marcaje. Tras el correspondiente lavado con tampón de bloqueo, las células fueron permeabilizadas con un 90% de metanol (Panreac) en hielo durante 30 minutos con agitación. Tras varios lavados las células se incubaron con el anticuerpo conjugado correspondiente, o un anticuerpo primario combinado con un secundario en caso del marcaje indirecto (siempre con su correspondiente isotipo para los

controles negativos). Tras el lavado final, la lectura del marcaje se realizó en un citómetro FACScalibur, y el análisis de los datos con el software WinMDI. En el tratamiento con inhibidores éstos fueron resuspendidos en DMSO (como indica el fabricante), y adicionados al medio en donde se resuspendieron las células antes de su estimulación (mínimo 10min).

Los anticuerpos empleados fueron:

- Anti-fosfo-ERK1/2 conjugado a Alexa 488 (BD Biosciences)
- Anti-fosfo-ERK1/2 (Cell Signaling) + Goat-Anti-Rabbit-FITC (anticuerpo secundario; Sigma-Aldrich)
- Anti-fosfo-c-Myc conjugado a FITC (Cell Signaling)
- Anti-c-Myc (Serotec) + Goat anti Mouse – FITC (anticuerpo secundario; Sigma Aldrich)

### **2.2.4 Análisis mediante el CBA Flex Set**

Dado que la citometría de flujo es una técnica analítica que permite discriminar diferentes partículas en base varios parámetros (tamaño, fluorescencia, etc), se han desarrollado diversos métodos que combinan la especificidad de los anticuerpos con intensidades de fluorescencia concretas, lo que permite la detección de múltiples analitos solubles tanto de una muestra de suero, como de plasma o sobrenadante de cultivo. El método BD CBA (“Cytometric Bead Assay”) integra la sensibilidad de la detección fluorescente para medir analitos con un método basado en el inmunoensayo sobre partículas. Este método combina el amplio rango dinámico en la detección de fluorescencia mediante citometría de flujo, y la captura eficiente y específica de las sustancias a analizar (mediante partículas en suspensión recubiertas con diferentes anticuerpos

específicos). Por ello, permite el empleo de menos diluciones de la muestra para determinar la concentración del analito, un protocolo considerablemente más rápido que un ELISA convencional. Podemos decir que se trata de un ELISA realizado con partículas en suspensión, en vez de sobre la superficie de un pocillo.

El BD CBA Flex Set permite combinar diferentes partículas o microesferas (cada una con un anticuerpo de captura diferente) para crear un ensayo combinado. Las estrategias para optimizar los pares de anticuerpos, y el uso de reactivos de detección marcados directamente con PE, han conseguido un ensayo muy consistente en el análisis de muestras biológicas complejas. En este caso, el método fue empleado para la detección y cuantificación de varias fosfoproteínas; esto último, mediante el empleo de una curva de estándares recombinantes fosforilados.

Este método utiliza microesferas de tamaño homogéneo y diferente intensidad de fluorescencia (mediante la combinación de diversas cantidades de 2 fluorocromos). Cada población de microsferas lleva acoplado un anticuerpo de captura concreto, de modo que cuando se incuban con la muestra a analizar de forma para que el analito quede capturado por el anticuerpo. Tras un lavado de las microsferas, se realiza una nueva incubación de la muestra con un anticuerpo de detección conjugado con PE; éste debe reconocer la misma proteína pero en un epítopo diferente. En nuestro caso, las células fueron, tras el cultivo de 3 días con 10µg/ml de PHA, divididas en cuatro tubos Falcon: en dos de ellos no se añadió ningún estímulo (tiempo cero), y los otros fueron estimulados con PMA (control positivo de activación) o con IL-12, respectivamente. Tras el tiempo de incubación (5min a 37°C) las células fueron lavadas con PBS frío, se eliminó por decantación el sobrenadante y los linfocitos fueron

lisados siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que el tampón de lisis estaba concentrado y tenía SDS, para la cuantificación mediante el método BCA (Pierce) fue necesario diluir una muestra. Una vez cuantificadas las diferentes muestras, e igualada la cantidad de proteína en caso necesario, se procedió a la incubación con las microesferas; de forma paralela, se elaboró una dilución seriada del estándar de proteína fosforilada recombinante, que también se incubó con las microesferas. Dado que el tampón de lisis contiene SDS hay que diluir la muestra antes de la incubación con las microesferas, por lo que la concentración proteica debe ser suficiente para el rango de detección de esta técnica. Tras el tiempo de incubación (1h a 4°C y en oscuridad), las muestras se lavaron con tampón de lavado (el mismo que se emplea para diluir los estándares) y se incubaron con el anticuerpo de detección ligado a PE (1h a 4°C en oscuridad). Las muestras se volvieron a lavar, como paso previo a la adquisición de datos en un citómetro FACScanto (BD Biosciences), en el CIC (Centro de Investigación contra el Cáncer de Salamanca). El análisis fue realizado con un software FCAP Array (BD Biosciences). En nuestro caso, los anticuerpos empleados nos permitieron analizar en una única muestra la activación de las tres principales MAPK: p38, JNK y ERK1/2.

### **2.2.5 Ensayos de proliferación celular**

El succinimidil éster de carboxifluoresceín diacetato [5(6)] o CFSE es un reactivo ampliamente utilizado para el análisis de la proliferación celular. Éste difunde libremente al interior celular, y no es fluorescente hasta que sus grupos acetato son procesados por esterasas intracelulares para formar un fluoróforo de alta intensidad. El CFSE (ya fluorescente) se une de forma espontánea e irreversible tanto a proteínas intracelulares como de la superficie, a través de una reacción con las cadenas laterales de lisina y otros grupos aminos disponibles. Cuando las células se dividen, este marcaje se distribuye de forma equitativa entre las células hijas, de modo que la intensidad de fluorescencia decae a la mitad con respecto a sus “progenitoras”. Como resultado, cada generación queda marcada con una fluorescencia concreta dentro de una población de células en constante proliferación, que, además, puede ser monitorizada mediante citometría de flujo. El número de divisiones que pueden ser seguidas sólo está limitado por el nivel de auto-fluorescencia de las células no marcadas y por la uniformidad en el tamaño de la población celular marcada [497].

Para conseguir nuestro objetivo, una vez purificadas las PBMCs mediante gradientes de Ficoll™, éstas fueron lavadas y resuspendidas en RPMI. Tras su conteo,  $1 \times 10^7$  células/ml se depositaron en un tubo de 15ml y se añadió CFSE hasta una concentración de trabajo de  $5 \mu\text{M}$  (stock:  $5 \text{mM}$  en DMSO). El marcaje se realizó durante 8 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Para parar la reacción se añadió un volumen igual al de las células pero de suero (FBS), las células fueron centrifugadas y se lavaron un mínimo de cuatro veces con medio completo. Al finalizar los lavados, las células fueron cultivadas en las condiciones requeridas para cada

experimento, garantizando siempre la existencia de triplicados. De forma general, las condiciones fueron: 1.25µg/ml PHA, en presencia o ausencia de 2ng/ml IL-12, y una concentración celular de  $0.25 \times 10^6$  células/ml. Una vez finalizado el cultivo, las células fueron lavadas con PBS y analizadas en un citómetro FACScalibur. Los datos adquiridos fueron estudiados empleando el software WinMDI. En los experimentos con inhibidores (tyrphostina A1 y B42, ERKi e inhibidor de c-Myc, todos de Calbiochem) éstos fueron resuspendidos en DMSO y adicionados al medio de cultivo al comienzo del mismo.

Para combinar los estudios de proliferación con los de mortalidad celular, se realizó un marcaje paralelo de las células con un reactivo capaz de unirse al DNA y que tiene la particularidad de ser fluorescente: el yoduro de propidio (IP). Teniendo en cuenta que este reactivo sólo puede atravesar la membrana celular y llegar al núcleo si la primera está dañada, las células que presenta este marcaje están en situación apoptótica o preapoptótica. En este caso el marcaje se realizó al finalizar el cultivo: las células fueron lavadas (PBS a 4°C) para eliminar restos de medio de cultivo, se adicionó 5mM de IP a cada tubo de citometría (20min a 4°C). Tras un lavado con PBS, las células se analizaron como anteriormente se ha descrito.

## **2.3 Marcaje celular en microscopía confocal**

Para microscopía confocal los linfoblastos fueron activados durante dos días con 10µg/ml de PHA y reestimulados durante 14-16 horas adicionales con 1ng/ml de IL-2 para aumentar, en la medida de lo posible, la expresión de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2. Teniendo en cuenta la gran variabilidad interindividual que presenta IL-12R, se monitorizó su expresión mediante citometría de flujo antes de la observación de las células en el microscopio. El marcaje se realizó de forma similar al de citometría de flujo, pero sustituyendo la SPE con estreptavidina conjugada con Alexa 633 (Molecular Probes) debido a la naturaleza fotolábil de la primera. Como marcador de zona raft se empleó CTB-conjugado con Alexa488, y de zona no-raft el marcador lipídico DiI (Vybrant® CM-DiI/C18, una sonda lipídica insaturada) [498], todo de Molecular Probes.

Dado que el marcador lipídico DiI necesita insertarse en las membranas, lo ideal sería trabajar a una temperatura en la que las membranas estuvieran lo más fluidas posibles; pero esto implica trabajar a 37°C donde las células pueden iniciar procesos de internalización del receptor. Por otro lado, fijar las células altera la permeabilidad de las membranas y el DiI (que es resistente a la fijación con paraformaldehído) penetra en el citoplasma tiñéndolo. Por ello, el marcaje se realizó de forma paralela al bloqueo de los FcRs, antes de la fijación con PFA y a 4°C. Teniendo todo esto en cuenta, el protocolo seguido fue: una vez finalizado el cultivo, las células se lavaron con RPMI a 37°C (en este punto se recogió una pequeña alícuota para monitorizar la expresión del receptor) y se

resuspendieron en 1ml de medio completo. A la mitad de las células (0.5ml) se le añadió RPMI (tiempo cero), y a la otra 10ng IL-12 durante 5min a 37°C para estimularlas. Las células, tratadas o no, fueron lavadas con abundante PBS frío (4°C) y mantenidas a esta temperatura durante el bloqueo de los FcRs con IgG humana, momento en el cual además se adicionaba DiI (2µl por tubo de citometría) durante 30min a 4°C y en oscuridad. Las células se lavaron con PBS y fueron fijadas con una solución al 4% de PFA en PBS a RT durante 10min. El resto de marcaje se realizó igual que para citometría de flujo, adicionandose CTB-Alexa488 (para marcar los rafts lipídicos) al mismo tiempo que la estreptavidina-Alexa 633 (para revelar la presencia del receptor). Tras el último lavado, las células se resuspendieron en el medio de montaje Immunofluore (ICN medical), y se depositaron en un portaobjetos delimitado con una solución grasa (Pap-Pen, DakoCytomation). El microscopio utilizado fue un Leica TCS-SP2 y el software utilizado LCS (ambos de LEICA Microsystems Heidelberg GmbH).

## **2.4 Aislamiento de los microdominios raft mediante gradientes de densidad**

El protocolo utilizado para el aislamiento de los microdominios raft es una adaptación de Ilangumaran *et al.* [499]. Los linfoblastos (mínimo de  $50 \times 10^6$  células) fueron lavados tras el cultivo (3 días con 10µg/ml PHA) y estimulados con IL-12, tal y como se ha descrito anteriormente. Después de lavados abundantes con PBS, para eliminar los restos de cultivo, las células fueron lisadas. La lisis se realizó utilizando tampón 0.5% TX100-TKM

(50mM Tris-HCl pH 7.4, 25mM KCl, 5mM MgCl, 1mM EDTA) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10µg/ml Leupeptina y 5µg/ml Aprotinina) donde fueron resuspendidas y mantenidas a 4°C en hielo con agitación ocasional durante 30min. El lisado se ajustó a una concentración del 40% en sacarosa, añadiendo igual volumen de una solución al 80% de sacarosa en TKM sin detergente. Los gradientes fueron preparados en tubos de ultracentrífuga de 5ml de capacidad, situando en el fondo un volumen de 0.675ml de lisado al 40% de sacarosa. Sobre él se deslizaron suavemente por la pared del tubo 2.7ml de una solución de TKM al 36% de sacarosa, con cuidado de no producir turbulencias en la interfase. Se repitió la operación depositando 1.575ml de TKM al 5% de sacarosa. Todas las soluciones empleadas se utilizaron a 4°C y contenían idénticas concentraciones de inhibidores que el tampón de lisis, para evitar la degradación de la muestra por la acción de las proteasas. Una vez equilibrados los tubos, se procedió a su centrifugación a 4°C durante 18 horas a 200.000g, utilizando un rotor de centrífuga SW55Ti (Beckman L8-M). Al finalizar se recogieron 11 fracciones de 450µl para su almacenamiento a -80°C.

## **2.5 Electroforesis y Western Blot**

### **2.5.1 Preparación de las muestras para análisis de proteínas fosforiladas:**

Los linfoblastos, activados durante tres días con 10µg/ml de PHA, fueron lavados con RPMI. Contadas y resuspendidas en medio completo siempre a 37°C, las células se mantuvieron en un baño a esta temperatura, y se recogieron las alícuotas: la primera representaba el tiempo cero (o sin

estimular), tras adicionar 10ng/ml de IL-12 se recogieron las demás a los distintos tiempos correspondientes. La lisis se obtuvo mediante el depósito de estas alícuotas de forma inmediata sobre un mismo volumen de tampón de muestra 2x o tampón SDS 2x (tampón de muestra para SDS-PAGE con pironina como marcador adicional: 312.5mM Tris-HCl pH6.8, 0.5% peso/volumen Glicerol, 10% peso/volumen SDS, 0.125% peso/volumen Azul de Bromofenol). Las proteínas (15µg por canal) se separaron en un gel SDS-PAGE con un 12% de acrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó con 1%(w/v) BSA-TBT-T (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl y 0.1% Tween20), y se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios, seguidos de los lavados con TBS-T, la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP pertinente (GAR-HRP ó GAM-HRP, ambos de GE Healthcare). Tras el último lavado las proteínas fueron visualizadas utilizando el método ECL Plus (GE Healthcare). La película de exposición utilizada fue de FujiFilm.

Para la detección de c-Myc se utilizó un método similar, aunque en este caso se trataba de blastos activados durante 5 días con 1.25µg/ml de PHA sin/con 2ng/ml IL-12. Las células fueron lavadas con PBS frío, contadas y lisadas, depositando un volumen igual en tampón de muestra 2x. Los geles empleados fueron del 10% de acrilamida y el bloqueo se realizó con un 10% de leche semidesnatada en TBS-T. En el resto de los pasos se procedió de igual manera que para las proteínas fosforiladas.

Los anticuerpos utilizados para este fin fueron:

- Anti-fosfotirosina (clon PY20, BD Transduction Labs)
- Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit (CellSignaling Technology)
- Anti-fosfo-ERK1/2 (BD Biosciences), para comprobar el resultado del CBA FlexSet.
- Anti-c-Myc (clon 9E10, Serotec)

### **2.5.2 Detección de las proteínas aisladas en gradientes de sacarosa:**

Se realizó un ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (BioRad) para localizar qué fracciones estaban enriquecidas en rafts lipídicos. Aquellas fracciones más enriquecidas en zona raft se juntaron y dado que la concentración proteica, estimada mediante el BCA Kit (Pierce), era muy baja se concentró la proteína utilizando microcones de 3000kDa de poro (Millipore). Tras una nueva cuantificación, se cargaron 10mg de proteína por canal en los geles de electroforesis (8% acrilamida). Tras la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF, los blots se bloquearon con 10% de leche semidesnatada en TBS-T toda la noche a 4°C. Después de los lavados pertinentes con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo primario (1h, RT) y, tras nuevos lavados, con el secundario correspondiente. Finalmente, se visualizaron utilizando el método ECLPlus.

Los anticuerpos empleados fueron:

- Anti-IL-12R $\beta$ 1 (clon C-20, Santa Cruz Biotechnologies).
- Anti-IL-12R $\beta$ 2 (clon 305719, R&D)
- Anti- $\beta$ -actina (clon AC-15, Sigma-Aldrich)

### **2.5.3 Análisis de las proteínas resistentes a la extracción con M $\beta$ CD:**

Linfoblastos activados 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, fueron lavados con RPMI a 37°C. Tras el conteo celular se dividió el cultivo en dos, una mitad fue estimulada con 10ng/ml de IL-12 5min a 37°C y la otra no. Cada una de estas mitades fue a su vez dividida en otras dos, una fue tratada simplemente con RPMI y la otra con 2.5mM M $\beta$ CD durante 15min a 37°C. Tras lavados abundantes con PBS a 4°C, las células fueron centrifugadas y el sobrenadante eliminado. Las células fueron lisadas en un tampón RIPA (1x PBS pH7.4, 1% v/v NP40, 0.5% p/v deoxicolato sódico, 0.1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas, durante 60 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 13000g (4°C) para eliminar los núcleos. La concentración proteica fue calculada utilizando el método BCA. Se añadió a las muestras tampón de muestra SDS-PAGE y se separaron las proteínas en geles de acrilamida (8%), antes de su transferencia a PVDF. La detección de las proteínas se realizó de forma paralela a la descrita en el apartado anterior. Los anticuerpos empleados fueron los mismos.

#### **2.5.4 “Stripping” y “reprobing” de las membranas.**

Cuando fue necesaria la cuantificación de la proteína en las membranas, se utilizó como marcador la  $\beta$ -actina. Para ello las membranas fueron “*strippeadas*” (se eliminó el anticuerpo de la mismas) utilizando 0.2N de NaOH durante 5min a RT. Tras lavados abundantes con TBS-T, la membrana fue bloqueada de nuevo e incubada con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich). Después de varios lavados se procedió a su incubación con anticuerpo secundario (GAM-HRP, GE Healthacare) y a su detección mediante quimioluminiscencia de la forma anteriormente descrita.

## Capítulo 3.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 3.1 Expresión y localización del Receptor de IL-12

### 3.2 Proliferación e IL-12



## 3 Resultados y Discusión

### 3.1 Expresión y localización del Receptor de IL-12

#### 3.1.1 La expresión de IL-12R está fuertemente regulada. Cinética de expresión de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2.

El receptor de IL-12 consta de dos cadenas, IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 [500], y la expresión de ambas da origen al receptor de alta afinidad. Los niveles de cada una de estas moléculas, en la superficie celular, son muy bajos en células T y B y algo superiores en células NK de fenotipo *resting* (sin activar); el incremento de los mismos está vinculado a la presentación del antígeno por las APC (estimulación vía TCR), y se ve reforzada por la coestimulación B7/CD28 [250, 251], además de por citocinas como la IL-2, IFN $\gamma$ , TNF, etc. [501, 502]. Sin embargo, ambas cadenas están reguladas de diferente forma: la cadena  $\beta$ 1 es expresada en una gran variedad de fenotipos de linfocitos T y células NK [249], mientras que la cadena  $\beta$ 2 tiene su expresión restringida al fenotipo Th1 [501, 502] y necesita de una mayor activación celular para su expresión [239, 503], presentando, además, una gran variabilidad interindividual [249, 250, 288, 504, 505].

Esta gran variabilidad interindividual en los niveles de expresión del receptor de la IL-12 hizo obligatorio un estudio preliminar de las condiciones de expresión de ambas cadenas adecuadas en nuestro sistema. Para optimizar y maximizar la presencia de ambas proteínas en la

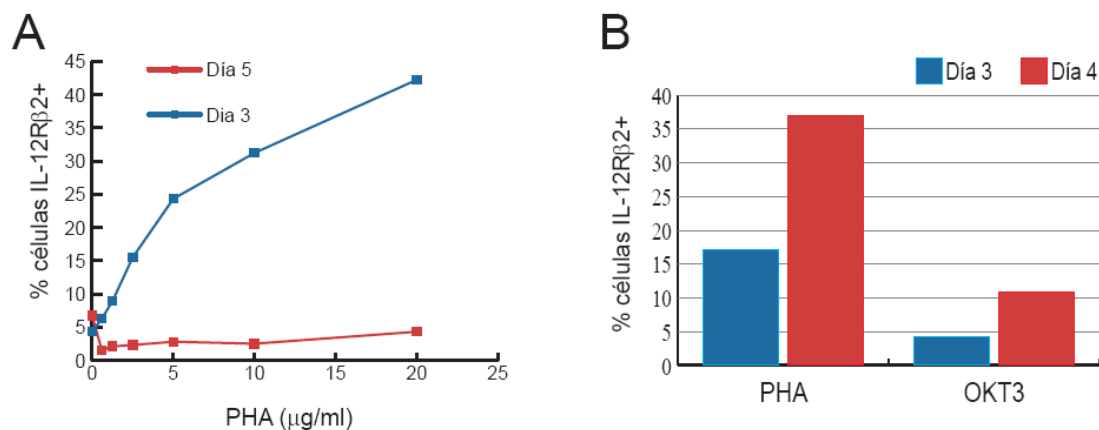
superficie de los linfocitos T, se realizaron cultivos de PBMCs a diferentes tiempos y condiciones de activación y se monitorizó su expresión mediante citometría de flujo.

### 3.1.1.1 La expresión de IL-12R $\beta$ 2 es muy dependiente del grado de activación celular.

Dado que la regulación de la expresión de la cadena  $\beta$ 2 del receptor de IL-12 es más dependiente de la activación celular que la  $\beta$ 1 [239, 503], y además presenta una gran variabilidad interindividual [249, 250, 288, 504, 505], se hizo necesario una puesta a punto previa de las condiciones de cultivo celular adecuadas a nuestro fin. Para determinar las condiciones de activación óptimas que maximizan la expresión de IL-12R $\beta$ 2, se cultivaron PBMCs ( $1 \times 10^6$  células/ml) procedentes de *buffy coats* a diferentes concentraciones de PHA durante 3 ó 5 días. De los resultados observados en la Figura 31A, se puede apreciar como las mayores condiciones de activación (20 $\mu$ g/ml de PHA) generan linfoblastos con un elevado porcentaje de expresión del IL-12R $\beta$ 2 y como, además, ésta es mayor a 3 que a 5 días. El que la expresión del IL-12R necesite de altas dosis de mitógeno (de hasta 40 $\mu$ g/ml, datos no mostrados) para maximizar su expresión no es sorprendente; de hecho, si la estimulación con PHA es lo suficientemente fuerte, se obtienen niveles de receptor similares a los obtenidos mediante la co-estimulación del complejo TCR junto con CD28 [239, 503, 506].

Comparamos, además, dos formas diferentes de estimulación del TCR, bien utilizando PHA o bien el anticuerpo OKT3 (anticuerpo monoclonal que reconoce la cadena CD3 del complejo TCR) fijado a placa,

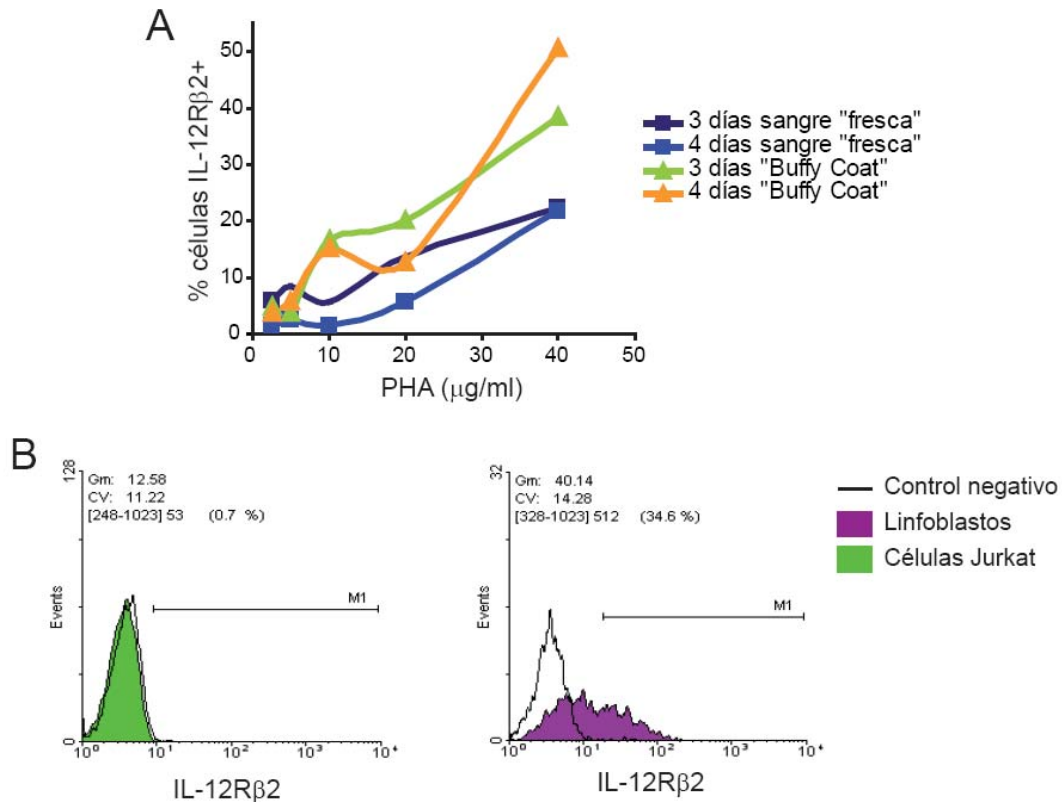
para comprobar cuál de los dos métodos era más eficaz (Figura 31B). Como puede observarse, los mayores niveles de expresión de IL-12R $\beta$ 2 se obtienen nuevamente con 20 $\mu$ g/ml de PHA, mientras que el OKT3 apenas tiene efecto. Estos datos confirman que la mejor forma de activación es utilizando el mitógeno PHA en grandes concentraciones.



**Figura 23. La expresión de IL-12R $\beta$ 2 es altamente dependiente del grado de activación celular.** A) Experimento de dosis-respuesta con la expresión de IL-12R $\beta$ 2 en linfoblastos cultivados con diferentes concentraciones de PHA durante 3 ó 5 días. B) Expresión de IL-12R $\beta$ 2 en linfoblastos activados con PHA (20 $\mu$ g/ml) o con OKT3 fijado a placa.

Otro punto importante que se decidió analizar fue la posible influencia del origen de las células en la expresión del receptor. Se compararon los niveles del receptor en células T de diferente origen: *buffy coats* (un concentrado de componentes celulares procedentes de la donación), sangre total recién extraída de voluntarios (sangre “fresca”) y línea celular Jurkat (como prototipo de línea celular de linfocitos T) (Figura 24). Para ello se realizaron cultivos celulares con cada una de ellas en presencia de diferentes concentraciones de PHA y se monitorizó la expresión del IL-12R $\beta$ 2 mediante citometría de flujo. Las diferencias con la línea celular Jurkat, IL-12R $\beta$ 2 negativas, fueron bastante obvias, pero en el caso de las células recién extraídas o el *buffy coat*, las diferencias sólo

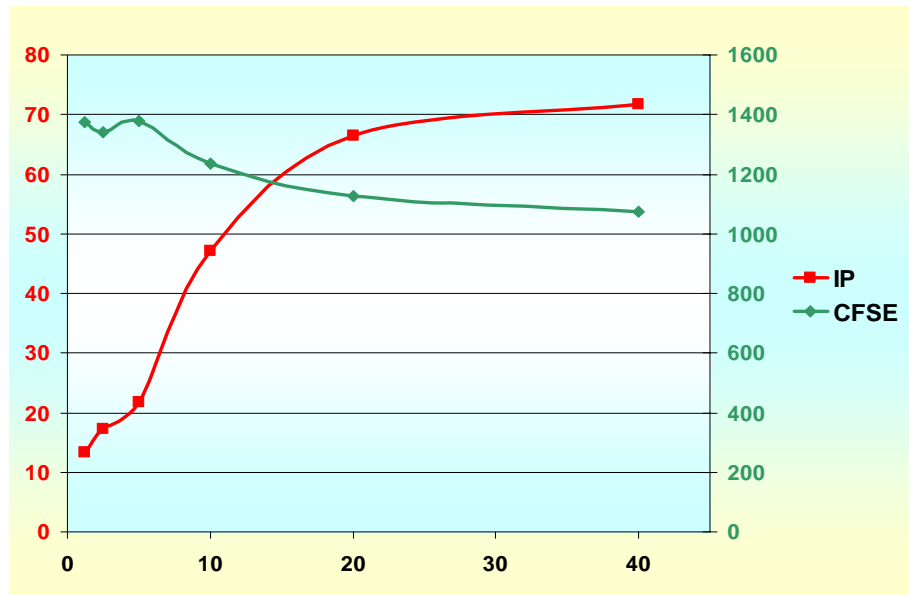
eran claras utilizando grandes concentraciones de PHA (40 $\mu$ g/ml). Nos decantamos por trabajar con PBMCs procedentes de *buffy coats* porque expresaban cantidades ligeramente mayores de nuestro receptor, y porque la disponibilidad, en número, de células para los futuros experimentos era mayor que en el caso de la sangre recién extraída.



**Figura 24. El origen de las células influye en el grado de expresión de IL-12R $\beta$ 2.**  
 A) Cultivos de PBMCs de sangre recién extraída y *buffy coat* cultivadas con diferentes concentraciones de PHA durante 3 ó 4 días. Se observa como la concentración de 40 $\mu$ g/ml de PHA produce los mejores rendimientos en la expresión de IL-12R $\beta$ 2. B) Expresión de IL-12R $\beta$ 2 en linfoblastos activados 3 días a 40 $\mu$ g/ml comparados con la expresión de las células Jurkat.

Los datos obtenidos hasta este momento indicaban que la mayor expresión de IL-12R $\beta$ 2 se correspondía con concentraciones de mitógeno muy elevadas, pero se observaba una notable disminución en el número de células recuperadas al finalizar los 3 días óptimos de activación (del orden del 50 al 60% del número inicial). Por ello, quisimos valorar el porcentaje de proliferación de los linfoblastos en diferentes condiciones de activación

con PHA, así como la viabilidad que presentaban estas células al finalizar el tiempo de cultivo. Para estudiar el grado de proliferación de los cultivos, las PBMCs recién extraídas fueron marcadas con CFSE, una molécula fluorescente que se une covalentemente a las proteínas; cuando las células se dividen y reparten el citoplasma equitativamente entre las células hijas, la intensidad media de fluorescencia (IMF) de éstas decae a la mitad, y, así, de forma sucesiva en las generaciones siguientes. Esta técnica permite hacer, por tanto, un seguimiento de los ciclos celulares mediante la citometría de flujo. Como marcador de viabilidad se utilizó otra molécula capaz de ser detectada en el citómetro: el Ioduro de Propidio (IP), que se une al DNA cuando está accesible, es decir, cuando la membrana plasmática celular se encuentra dañada, lo que es indicativo de apoptosis (o necrosis). Puede observarse, en la Figura 25, como cuanto mayor es el porcentaje de PHA utilizado aumenta de forma muy significativa el daño celular, lo que nos obliga a trabajar con condiciones de activación de 10µg/ml. En estas condiciones se mantiene un buen porcentaje de proliferación aunque sin obtener el máximo de expresión de IL-12Rβ2; aún así, sigue siendo una activación suficiente para no ser necesaria la coestimulación del CD3 y de CD28.

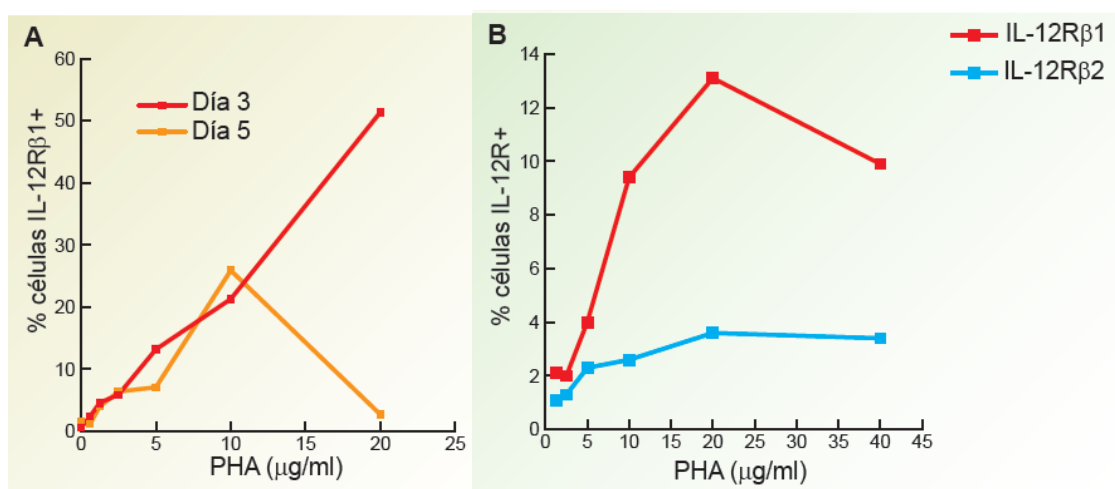


**Figura 25.** Las condiciones óptimas de activación celular para lograr elevados niveles de IL-12R $\beta$ 2 provocan un descenso de la viabilidad de las células en cultivo. Los linfoblastos cultivados durante 3 días marcados con CFSE o bien marcados con IP al finalizar el mismo, se analizaron por citometría de flujo. A la izquierda se representa el porcentaje de células positivas para IP; a la derecha, la IMF (relativa) de las células marcadas con CFSE.

### 3.1.1.2 Optimización de la expresión del receptor de alta afinidad: IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2.

Tal y como aparece descrito en la literatura, y comprobado a lo largo de este trabajo, la expresión de la cadena  $\beta$ 2 del receptor de IL-12 es el factor limitante a la hora de optimizar los cultivos, ya que debemos conseguir maximizar su expresión pero manteniendo una elevada viabilidad celular. Así que, una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión de la cadena IL-12R $\beta$ 2, se validaron para IL-12R $\beta$ 1. Podemos observar en la Figura 26, como la cinética de expresión de IL-12R $\beta$ 1 es similar a la de IL-12R $\beta$ 2 en cuanto que mayores cantidades de mitógeno generan mayor expresión del receptor. Sin embargo, la presencia de IL-12R $\beta$ 1 no se correlaciona con la de IL-12R $\beta$ 2 (Figura 26B) ya que una

elevada presencia de la primera no implica elevada expresión de la segunda. Éste resultado concuerda con estudios previos que relacionan la expresión de IL-12R $\beta$ 2 con un fenotipo Th1 (y dado que es responsable de la mayor parte de los efectos de IL-12, la respuesta a esta citokina), mientras que IL-12R $\beta$ 1 también estaría expresándose en el fenotipo Th2 [501, 502, 507, 508], así como en más tipos celulares por ser co-receptor de otras citokinas como IL-23 [181].

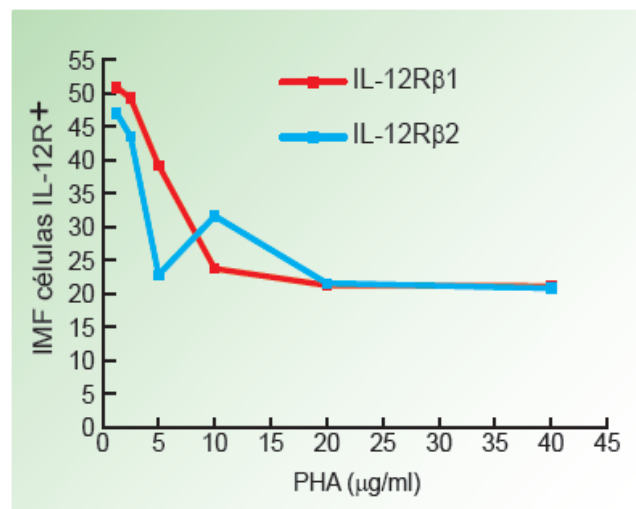


**Figura 26. Experimentos de dosis-respuesta comparando la expresión de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2.** A) Niveles de IL-12R $\beta$ 1 en linfoblastos cultivados con diferentes concentraciones de PHA, durante 3 ó 5 días. B) Expresión de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 en linfoblastos activados durante 3 días con diferentes concentraciones de mitógeno.

### 3.1.1.3 Incremento de la IMF de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 a bajas concentraciones de activación.

Un efecto curioso de la activación celular con PHA es que a muy bajas concentraciones (0.6 $\mu$ g/ml, 1.25 $\mu$ g/ml), donde el porcentaje de células positivas para el receptor está cercano al 1%, la fluorescencia del receptor en esas células se eleva por encima de la media de las demás concentraciones de PHA empleadas en el cultivo (Figura 27). Es decir, hay

muy pocas células que expresen el receptor pero éstas lo hacen con mucha intensidad. Este efecto tan llamativo podría deberse a la existencia de células ya diferenciadas a fenotipo Th1, que responderían a la presencia de bajas cantidades de mitógeno expresando su receptor característico: IL-12R. En cualquier caso, el porcentaje de células que presentan este incremento de la IMF es tan bajo que hace muy difícil su estudio con profundidad.



**Figura 27. La Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 es mayor con menores concentraciones de PHA.** La IMF se corresponde con aquellas células que expresan positivamente el receptor correspondiente, en linfoblastos cultivados durante 3 días con diferentes concentraciones de PHA.

### **3.1.2 IL-12R $\beta$ 1 se halla en zona no-raft, mientras que IL-12R $\beta$ 2 se encuentra en microdominios raft y se aleja de ellos en respuesta a la IL-12**

La membrana plasmática, según el modelo de mosaico fluido de *Singer y Nicolson* [31], consta de una bicapa de fosfolípidos en la que se hayan embebidas las proteínas. Sin embargo, en el año 1997 se describió la existencia de unas zonas especializadas de la membrana con unas características físico-químicas propias y diferentes de la membrana circundante. Estas estructuras han sido denominadas microdominios raft: regiones de la membrana de baja densidad, ricas en colesterol y glicoesfingolípidos y resistentes a detergentes no-iónicos, por ello, también llamadas fracción insoluble de la membrana [37, 47, 509]; su función parece estar relacionada con la regulación de la transducción de señal, ya que se han encontrado gran cantidad de moléculas señalizadoras asociadas a ellos (Src kinasas, intercambiadores de GTP, etc.). Su papel fisiológico es controvertido ya que, en algunos casos, se ha encontrado que pudieran actuar como plataformas aglutinadoras de estas moléculas (facilitando el acceso para iniciar la cascada de transducción de señal) [47], o bien como estructuras que secuestran estas proteínas, impidiendo una señalización no deseada [150, 510].

La posición de una proteína en los rafts lipídicos está relacionada con la conformación de su zona hidrofóbica, o región transmembrana de la misma [511]. Esta posición puede verse alterada según modificaciones postraduccionales [511], o por su asociación con otras proteínas (como ocurre con CD26 y CD45R0 [432]). Uno de estos últimos casos es el de la unión de un ligando a su receptor, como el caso de IL-2 e IL-15, donde la

cadena  $\alpha$  específica para cada una de estas interleukinas (comparten las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$ ) se encuentra en zona raft [126, 130] y se desplaza hacia zona no-raft tras la unión de la interleukina [126], aunque sobre este último punto hay datos contradictorios [127, 129]. De la interleukina 12 se sabe que son necesarias la co-expresión de las dos cadenas del receptor (receptor de alta afinidad) para maximizar sus efectos [180], y que la expresión de IL-12R $\beta$ 2 está directamente relacionada la activación de la ruta JAK/STAT [298, 501, 512]. La localización de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 en la superficie celular, antes y después de la unión a la interleukina, nos ayudará a comprender mejor su proceso de transducción de señal.

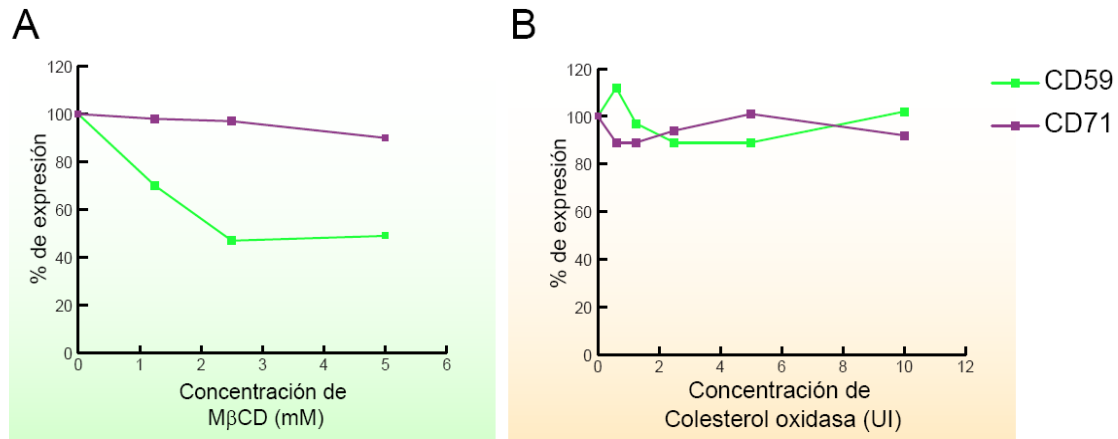
Las técnicas empleadas para estudiar la presencia/ausencia de una molécula en los microdominios raft se basan en sus características físico-químicas: son ricas en colesterol, resistentes a la solubilización con detergentes no-iónicos y presentan una menor densidad, lo que permite su separación mediante gradientes de densidad; es posible, además, utilizar técnicas de microscopía confocal para establecer su proximidad con moléculas marcadores de zona raft o zona no-raft.

### 3.1.2.1 Estudios de localización utilizando técnicas indirectas: citometría de flujo y Western Blot.

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de un gran número de células a la vez, lo que da gran robustez estadística a los resultados. Combinando el tratamiento de las células con agentes desestabilizadores de la membrana y el marcaje con anticuerpos fluorescentes, se puede inferir la posición de una molécula respecto a los rafts. De este modo, se utilizó M $\beta$ CD, una molécula que tiene la capacidad de intercalarse entre los esfingolípidos de la membrana, presentes sobre todo en las regiones raft, extrayendo el colesterol de las mismas. Dado que el colesterol actúa como un agente estabilizador de la membrana, esta extracción provoca la alteración de su estructura y afecta, sobre todo, a estos dominios ricos en glicoesfingolípidos (y colesterol). La disrupción de la estructura de los rafts provoca la liberación de parte de las moléculas presentes en ellos [513]. Y, dado que son unas regiones de membrana resistentes al tratamiento con detergentes no-iónicos, se empleó TX100 para eliminar, por solubilización de la membrana, las proteínas de las regiones no-raft [514]. El objetivo del primer tratamiento es enriquecer las células con las proteínas de regiones no-raft, y el del segundo, aumentar la proporción de proteínas de regiones raft.

Para poder analizar la respuesta de las células a la alteración de los rafts lipídicos primero estudiamos cómo afectaban al comportamiento de los marcadores de zona raft (CD59) y zona no-raft (CD71) el uso de dos métodos de extracción de colesterol de la membrana, bien mediante M $\beta$ CD o bien mediante el enzima colesterol oxidasa (que elimina el colesterol

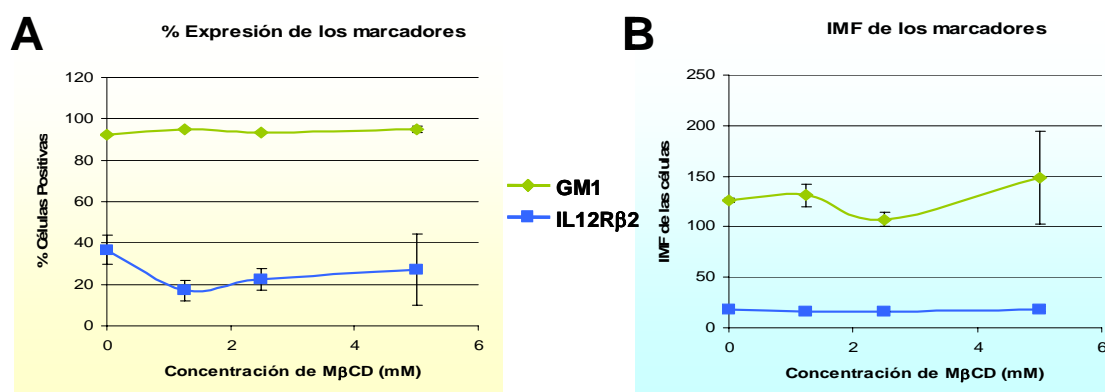
modificándolo químicamente). Como se puede ver en la Figura 28, la respuesta a diferentes dosis, de M $\beta$ CD o colesterol oxidasa, en ambos marcadores parece mucho más clara en el caso de la dextrina. La concentración óptima para la extracción del marcador CD59 fue de 2.5mM, a la que CD71 prácticamente no se vió afectado (como se esperaba).



**Figura 28. Niveles de expresión de los marcadores de zona raft (CD59) y no-raft (CD71) respecto a los tratamientos con M $\beta$ CD y colesterol oxidasa.** Los linfoblastos cultivados 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, fueron tratados con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD (A) o de colesterol oxidasa (B), antes de su marcaje con anti-CD59-FITC o anti-CD71-PE. Los porcentajes de expresión han sido relativizados, asignando el valor 100 a la expresión del marcador en ausencia del tratamiento.

También observamos resistencia del marcador CD59 a concentraciones de M $\beta$ CD superiores a 2mM. La explicación a este resultado podría ser que dado que en ausencia de activación un porcentaje de CD59 se halla en el núcleo (*core*) del raft, una región insensible al efecto de la M $\beta$ CD, en condiciones de elevada activación, como las nuestras, su presencia en el *core* podría reforzarse. Es por ello, que se decidió usar otro marcador de zona raft, en este caso el gangliósido GM1, un lípido exclusivo de zona raft al que se une de forma específica la subunidad B de la toxina colérica. Esta particularidad que se aprovechó para su marcaje utilizando esta toxina conjugada a un fluorocromo (CTB-

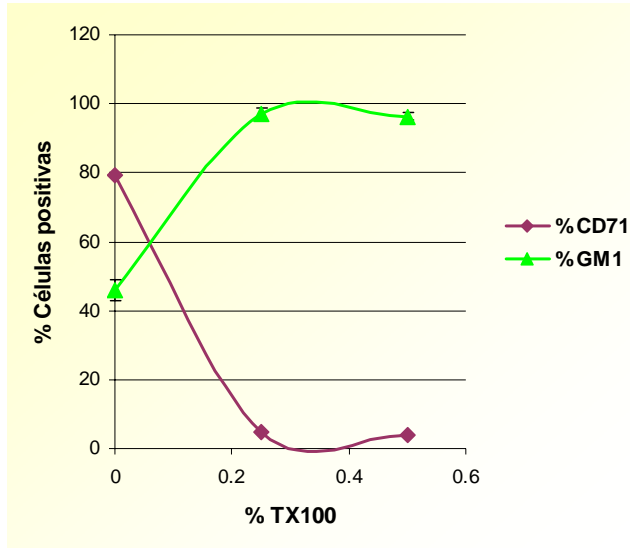
Alexa 488). Como se puede observar en la Figura 29, en células activadas durante 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, para GM1 la concentración óptima de M $\beta$ CD para eliminar el marcador GM1 vuelve a ser de 2.5mM. Además, se comparó la eficacia de la extracción de IL-12R $\beta$ 2 con la efectividad del tratamiento, observándose que IL-12R $\beta$ 2 es una proteína sensible al efecto de este agente; y que elevadas concentraciones de M $\beta$ CD (5mM) incrementan la desviación típica de los resultados, lo que hace inexacta la medida.



**Figura 29** Respuesta a la extracción de colesterol por M $\beta$ CD de IL-12R $\beta$ 2 y el marcador de zona raft GM1. Los linfoblastos cultivados 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA fueron tratados con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD. A) Porcentaje de expresión de GM1 e IL-12R $\beta$ 2. B) Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de GM1 e IL-12R $\beta$ 2. Los niveles de expresión de GM1 posiblemente no desciendan debido a la movilización de reservas procedentes del aparato de Golgi, sin embargo el descenso sí es notorio si se analiza la IMF.

En el caso del TX100, también utilizando GM1 y CD71 como marcadores de zona raft y no-raft respectivamente, se optimizaron las condiciones de solubilización de las regiones no-raft empleando diferentes concentraciones del detergente. Como puede observarse en la Figura 30, la extracción de fosfolípidos con un porcentaje de TX100 inferior al 0.25%, en hielo, es suficiente para lograr una notable reducción de los niveles de CD71 y un aumento de los de GM1. Decidimos utilizar una concentración

del 0.1% de TX100 por ser la menor requerida para el objetivo del experimento, y generar una menor distorsión en la morfología de las células.

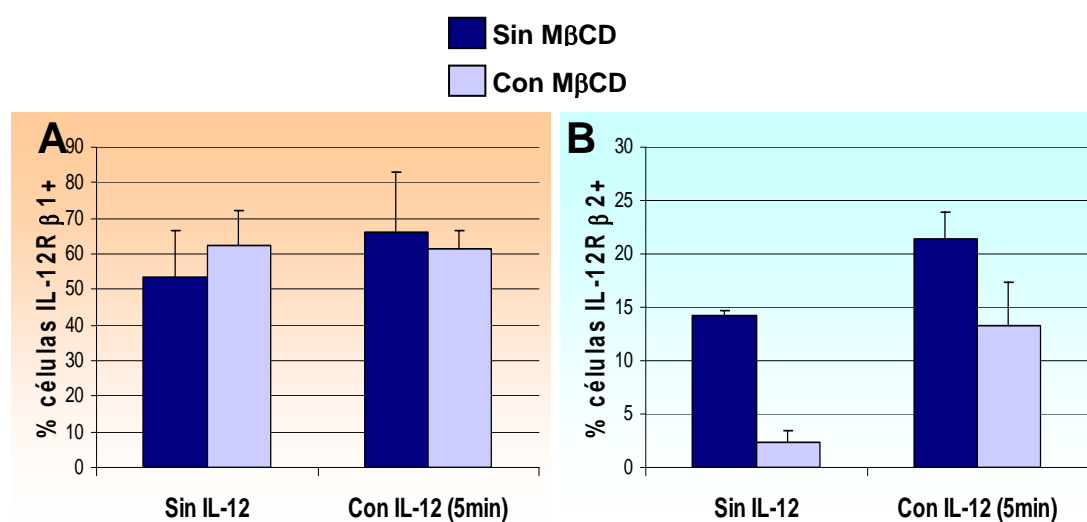


**Figura 30. Niveles de expresión de los marcadores de zona raft (GM1) y no-raft (CD71) frente a diferentes concentraciones de TX100.** Los linfoblastos activados 3 días con 10µg/ml de PHA fueron tratados con las concentraciones finales de detergente indicadas antes de su marcaje y lectura en un citómetro de flujo.

Una vez establecidas las condiciones de extracción de proteínas de zona raft (con MβCD) o no raft (con TX100) adecuadas para nuestro sistema, se procedió al estudio de la localización del receptor. Dado que es obvio que la funcionalidad de un receptor está claramente condicionada a su unión a un ligando, y que la interacción entre ambos puede desencadenar cambios conformacionales que alteren su localización en la membrana, se realizaron los experimentos preincubando o no las células con IL-12. De esta forma, se pretende analizar si la IL-12, al igual que ocurre con la IL-2, provoca cambios en la localización de las cadenas del receptor.

Para los experimentos realizados con MβCD (Figura 31A) utilizamos, al igual que antes, blastos activados 3 días con 10µg/ml de PHA y tratados con 2.5mM MβCD (15min a 37°C). Tras el marcaje de las células (incluidos los marcadores GM1 y CD71) y su análisis por citometría de flujo se puede observar como los niveles en superficie de la

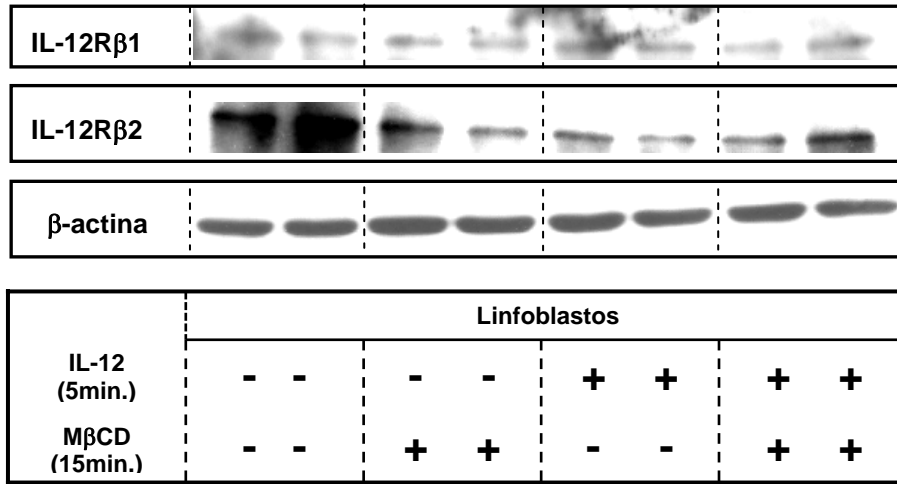
cadena IL-12R $\beta$ 1 se mantienen incluso en presencia de IL-12; y dado que es resistente al tratamiento podemos inferir que IL-12R $\beta$ 1 se halla en zona no-raft o en una región resistentes a la M $\beta$ CD, como es el *core* del raft. En el caso de IL-12R $\beta$ 2 (Figura 31B), vemos como el tratamiento con M $\beta$ CD sólo altera la presencia de esta cadena en ausencia de IL-12, lo que parece indicar que tras la exposición de las células a la interleukina, la cadena  $\beta$ 2 se desplaza hacia zona no-raft (se hace menos sensible a la M $\beta$ CD).



**Figura 31. El tratamiento con M $\beta$ CD altera los niveles de IL-12R $\beta$ 2 en ausencia de IL-12, pero no de IL-12R $\beta$ 1.** Los linfoblastos fueron estimulados o no con IL-12, y tratados con M $\beta$ CD. El análisis de los resultados de citometría de flujo nos permite observar como en A) los niveles de IL-12R $\beta$ 1 permanecen inalterados por el tratamiento mientras que en B) IL-12R $\beta$ 2 sí es susceptible a la extracción con M $\beta$ CD en ausencia de IL-12 pero no tras la estimulación con la interleukina. Experimentos representativo de 3 con resultados similares; los resultados se corresponden con la media y desviación estándar de triplicados.

Estos mismos resultados se observaron con lisados post-nucleares de células tratadas con M $\beta$ CD (2.5mM, 15min a 37°C) que fueron analizados mediante Western Blot. En la Figura 32 se puede observar cómo la banda de 94kDa, correspondiente a IL-12R $\beta$ 1, no sufre ningún tipo de alteración en sus niveles con el tratamiento, mientras que IL-12R $\beta$ 2 (122kDa)

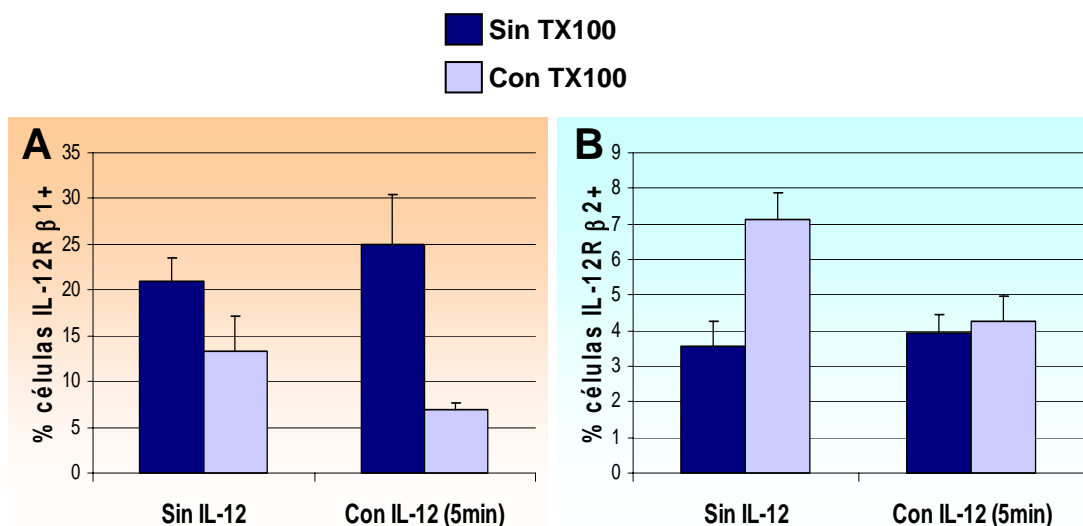
presenta una disminución en su intensidad antes de la preincubación con IL-12, pero no después.



**Figura 32. La cadena IL-12Rβ1 es resistente al tratamiento con MβCD e IL-12Rβ2 sólo en ausencia de la interleukina.** Al igual que en la Figura 31 se utilizaron linfoblastos incubados con IL-12 y tratados con MβCD. Las células fueron lisadas y analizadas mediante WB. Se puede observar como la presencia de IL-12Rβ1 no varía con el tratamiento de MβCD, mientras que IL-12Rβ2 sí en ausencia de la interleukina, confirmando los datos obtenidos mediante citometría de flujo. La β-actina es utilizada como control de cantidad de proteína.

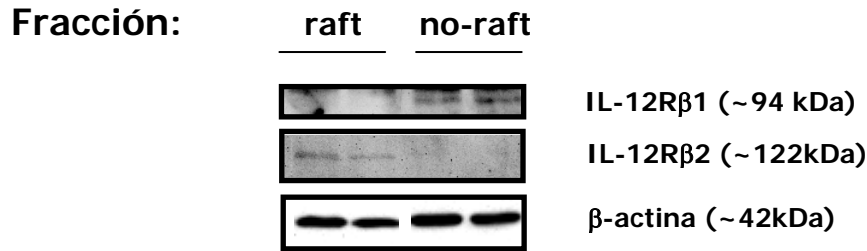
Para comprobar estos resultados realizamos el experimento contrario: solubilizar la zona no-raft de membrana empleando TX100. Las células activadas 3 días con 10µg/ml de PHA, fueron tratadas o no con IL-12 y con TX100, marcadas con los correspondientes anticuerpos (incluidos los controles GM1 y CD71) y analizadas en un citómetro de flujo. Podemos observar como IL-12Rβ1 (Figura 33A) sí es sensible a este tratamiento, tanto antes como después de la incubación con IL-12, algo previsible teniendo en cuenta que es lo contrario a lo observado con la MβCD. El mismo efecto contrapuesto se observa para IL-12Rβ2, que no es extraída de la membrana antes del tratamiento con IL-12 y, sin embargo, después no presenta la misma resistencia a la extracción con el detergente (Figura 33B), lo que coincide con los datos obtenidos con el tratamiento con

M $\beta$ CD: la IL-12 modifica la posición de la cadena  $\beta$ 2 respecto a los rafts lipídicos.



**Figura 33. El tratamiento con TX100 reduce los niveles de expresión de IL-12R $\beta$ 1, y sólo los de IL-12R $\beta$ 2 tras la estimulación.** Las células fueron cultivadas estimuladas o no con IL-12 y tratadas con TX100. En el análisis de los datos de citometría de flujo podemos ver como la reducción significativa de IL-12R $\beta$ 1 (A) se produce antes y después de la estimulación con la interleukina. Las células se enriquecen con IL-12R $\beta$ 2 (B) en ausencia de estímulo luego esta proteína está en zona raft; sin embargo, este efecto no se observa en presencia de la IL-12 por lo que parece haberse desplazado de los microdominios. Se muestran los resultados de media y desviación estándar procedente de triplicados. El experimento es representativo varios con resultados similares (n=3).

Con el fin de asegurar la existencia de segregación diferencial de las cadenas del receptor de IL-12 en distintos microdominios de membrana nos planteamos aislar estos microdominios rafts combinando dos de sus propiedades: su resistencia a detergentes no iónicos, como el TX100, y su menor densidad. Este método se empleó para purificar raft de linfoblastos humanos (3 días a 10 $\mu$ g/ml de PHA) y comparar, mediante Western Blot, la presencia/ausencia en estos microdominios de ambas cadenas del receptor. Puede observarse en la Figura 34 como IL-12R $\beta$ 1 está presente en zona no-raft, mientras que la cadena IL-12R $\beta$ 2 lo está en rafts lipídicos. Estos resultados confirmaron los obtenidos en los tratamientos con M $\beta$ CD.



**Figura 34. El aislamiento de los microdominios rat confirma la localización de IL-12Rβ1 en zona no-raft y de IL-12Rβ2 en zona raft.** Linfoblastos activados 3 días con PHA fueron lisados con tampón conteniendo TX100 y sometidos a ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa. Las fracciones raft (3 a 6) y no-raft (10-11) fueron juntadas, se cuantificó la cantidad de proteína presente en ellas y se sometieron a electroforesis y WB. De este modo se confirmaron los resultados obtenidos por citometría de flujo. La β-actina es utilizada como control de carga proteica.

### 3.1.2.2 Localización de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 mediante técnicas de visualización directa: microscopía confocal.

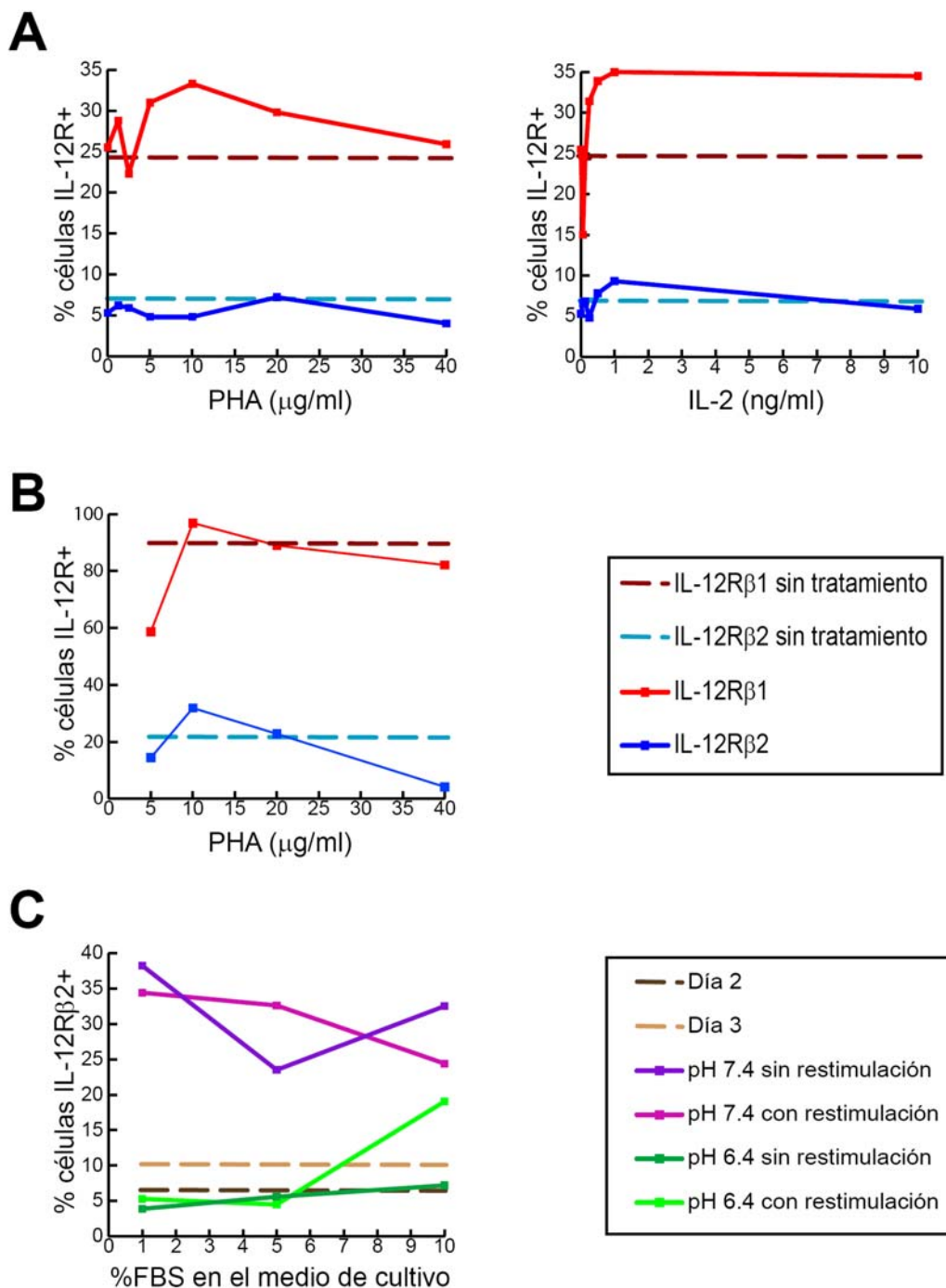
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos hablar de una cadena del receptor (IL-12Rβ1) situada en zona no-raft antes y después de la estimulación con IL-12. Sin embargo, la otra (IL-12Rβ2) se posicionaría antes de la incubación con la citokina en zona raft y después en zona no-raft, presumiblemente asociada con IL-12Rβ1. Pero ¿es esto así? La citometría de flujo es capaz de permitir el análisis de miles de células pero requiere la alteración de la membrana con la MβCD y el TX100, lo mismo ocurre con los Western Blot realizados a partir de muestras pretratadas con ellos. Uno de los grandes problemas que presentan los tratamientos con agentes desestabilizantes de la membrana como éstos, es que podrían dar lugar a artefactos, y que, por tanto, los movimientos de las moléculas que observamos sean, en realidad, un reflejo de la alteración y no del cambio en su posición. La mejor forma de evitar estos problemas es visualizar

directamente ambas cadenas del receptor, y establecer el grado de cercanía físico existente entre las moléculas mediante microscopía confocal.

Para poder analizar las células en un microscopio confocal, éstas no sólo deben expresar el receptor sino que debemos de hacerlo con intensidades de fluorescencia y de porcentaje lo más elevadas que sea posible. Las condiciones anteriormente empleadas se demostraron insuficientes dado que, como se ha comentado anteriormente, IL-12R $\beta$ 2 muestra una gran variabilidad en su expresión [239, 249, 250, 288, 501-505]. Por ello, fue necesario probar nuevas formas de estimulación celular que la mejoraran, bien incrementando el grado de activación celular mediante la reestimulación con PHA o Interleukina 2, bien encambiando otros parámetros, (menor cantidad de suero, pH ligeramente ácido), que se han demostrado útiles en el caso de otros receptores como los TGF-R [515].

Para comprobar si la reestimulación es efectiva como método para incrementar los niveles de expresión del receptor de IL-12, se probaron dos condiciones diferentes: reestimulando con IL-2 o bien con PHA. Para ello, las células fueron activadas policlonalmente con PHA 2 días, lavadas y reestimuladas durante 15h a diferentes concentraciones de ambas. En la Figura 35A podemos ver cómo este efecto reestimulador es claramente positivo, y algo mayor con 1ng/ml de IL-2. Incluso cuando se probó a activar con diferentes concentraciones de PHA 2 días, y luego la reestimulación con 1ng/ml de IL-2 (Figura 35B) los mejores resultados volvieron a obtenerse con la concentración utilizada anteriormente de 10 $\mu$ g/ml de PHA. En el caso de algunos receptores, la reestimulación tras un lavado en condiciones ligeramente ácidas, combinadas con una menor cantidad de suero en el medio durante algunas horas, provoca un aumento

en los niveles de los mismos, de ahí que se haya probado la combinación de estos factores con la reestimulación con PHA (10 $\mu$ g/ml). Los resultados de la Figura 35C (se muestra sólo los datos correspondientes a IL-12R $\beta$ 2 por ser la proteína de mayor interés) nos vuelven a indicar que la restimulación es un buen método para incrementar la expresión del receptor, pero el pH del medio de cultivo no influye en la expresión de esta cadena del receptor; del mismo modo, tampoco resulta particularmente beneficioso disminuir el porcentaje del suero del medio de cultivo. También se comprobó que la densidad celular inicial del cultivo no afecta a la expresión del receptor (datos no mostrados). Por todo lo anterior se establecieron las mejores condiciones de cultivo para el estudio de microscopía confocal como: activación dos días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, lavado con RPMI (a 37°C, para mantener estable la temperatura) y la restimulación durante 15h con 1ng/ml de IL-2.



**Figura 35. Optimización de las condiciones de cultivo para microscopía confocal.**

A) Las células activadas 2 días con PHA fueron reestimuladas con diferentes concentraciones de PHA (izquierda) o IL-2 (derecha) durante 15h. B) Linfoblastos activados durante dos días con diferentes concentraciones de PHA, fueron lavados con RPMI y reestimulados con 1ng/ml IL-2 durante 15h. En A y en B los lavados se realizaron con RPMI pH 7.4. En línea discontinua se indican los niveles de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 sin lavar ni reestimar. C) Células cultivadas durante 2 días con 10μg/ml de PHA fueron lavadas a 37°C con abundante RPMI pH 7.4 o ligeramente ácido (pH 6.4). Después fueron cultivadas durante 15h en presencia de 10μg/ml de PHA en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de suero; se indican los porcentajes de expresión de IL-12Rβ2 en las células sin lavar ni reestimar el día 2 v 3 de cultivo.

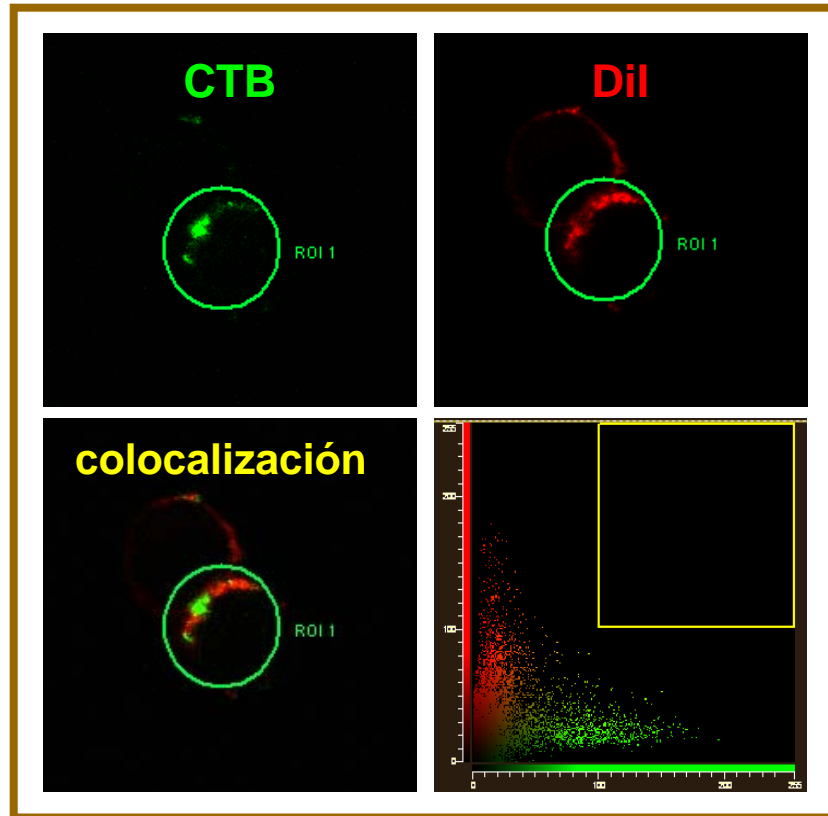
Para poder ubicar ambas cadenas del receptor respecto a los distintos microdominios de membrana, es necesario contar con unos buenos marcadores de zona raft y no-raft. En los anteriores experimentos se ha utilizado GM1, un glicosfingolípido considerado residente de zona raft, y CD71, considerada una proteína exclusiva de zona no-raft; sin embargo, cuando se realizaron las primeras pruebas con éste último anticuerpo (anti-CD71 conjugado a PE), comprobamos que no era válido para nuestras intenciones, ya que su señal decaía muy rápidamente (debido a la fotolabilidad de la ficoeritrina). Para sustituir a CD71 utilizamos DiI (Vybrant® CM-DiI/C18), un lípido que por sus características (grado de insaturación, etc) se incluye de forma específica en zona no-raft, y que tienen la particularidad de ser fluorescente en la misma longitud de onda que la ficoeritrina. Por estas características es considerado como sonda lipídica, y permite su uso en combinación con otros marcadores para determinar la posición relativa de las moléculas en la superficie celular [498]. Aunque en un principio este lípido está optimizado para el marcaje de las células antes de su cultivo, esto provoca aparición de unas vesículas fluorescentes en el interior celular, posiblemente debido al reciclaje de membrana, que entorpecen el análisis microscópico. Así que decidimos emplearlo como si fuera un anticuerpo; se optimizó a 4°C, para no dañar las células, y dado que tenía que incluirse en el interior de la membrana (no como la CTB que se une al gangliósido en superficie), sus incubaciones fueron realizadas a tiempos más largos (30min) de lo recomendado inicialmente por el fabricante.

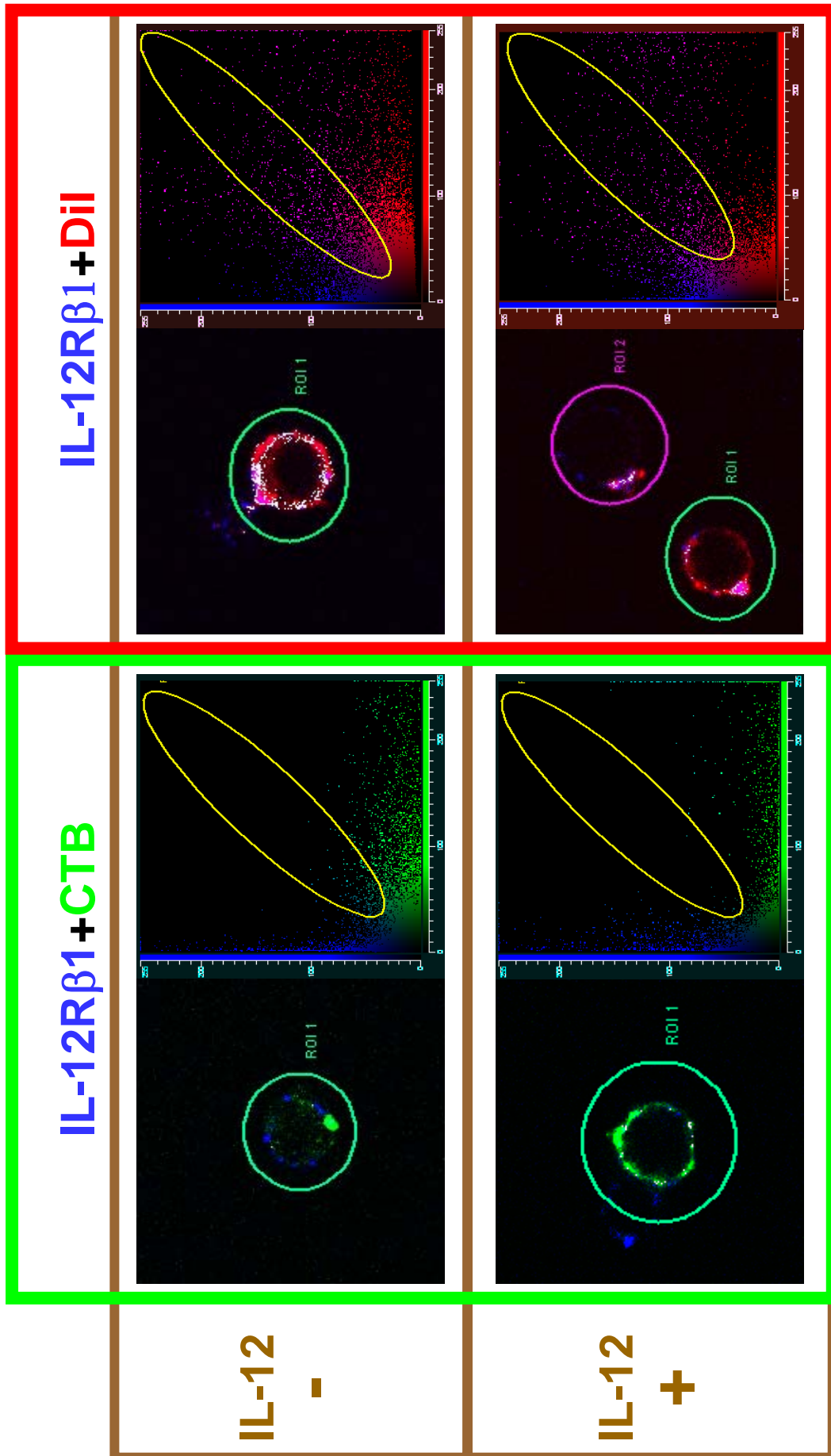
Una vez puesta a punto tanto las condiciones óptimas para la expresión del receptor como el marcaje, las células fueron analizadas por microscopía confocal. Los resultados obtenidos pueden observarse en la

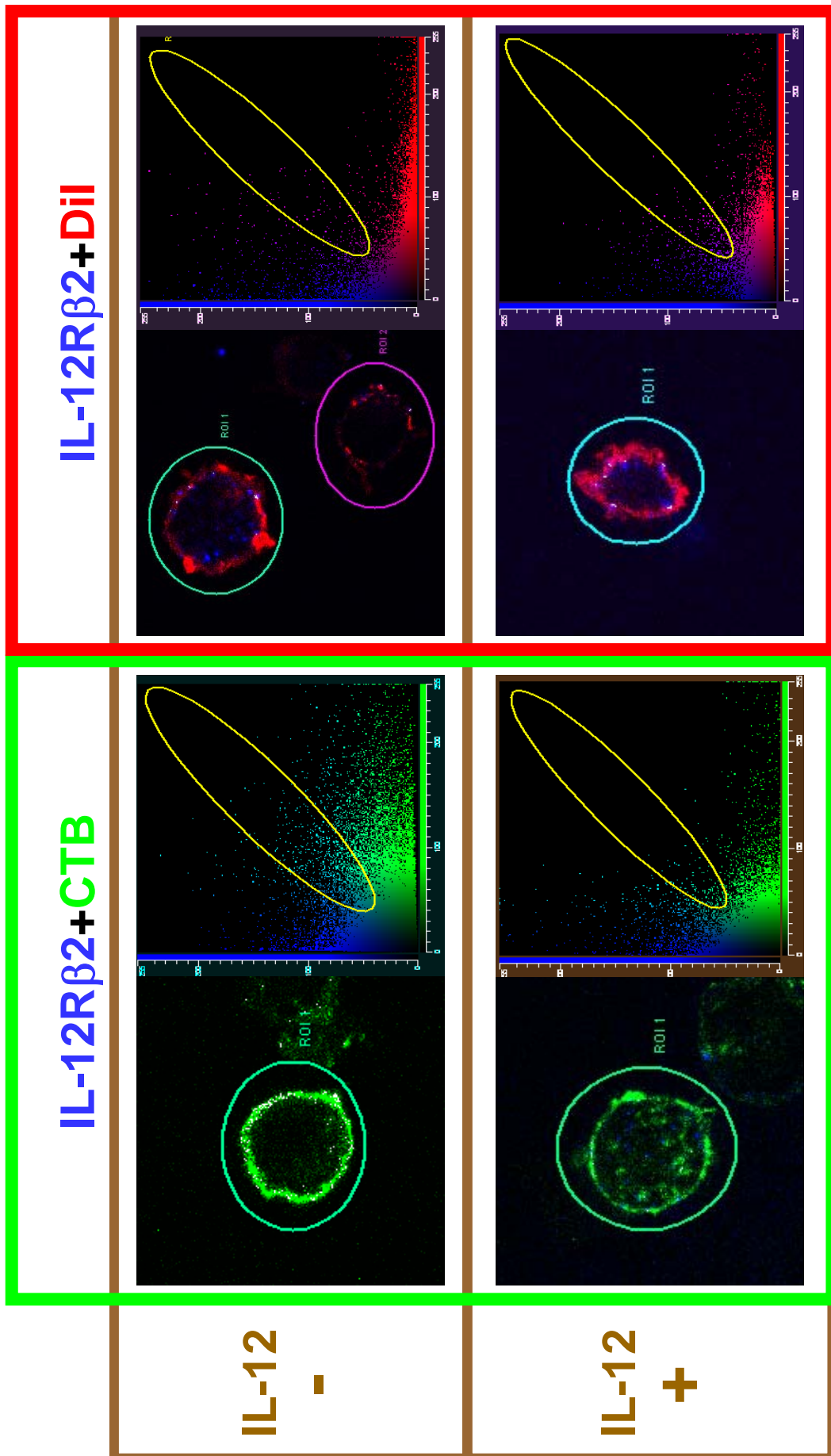
Figura 36. Los marcadores de zona raft y no raft empleados (pág. 166), GM1 en verde y DiI en rojo, observándose tanto en el solapamiento de la señal (“merged”, color pseudoamarillo) como en el citofluorograma que la colocalización es nula, lo que confirma que son idóneos para este tipo de experimentos. En la página siguiente (pág. 167) se puede ver el marcaje de IL-12R $\beta$ 1 y, a continuación, el de IL-12R $\beta$ 2 (pág. 168) en combinación con los marcadores GM1 (CTB Alexa-488) y DiI, preincubados o no con IL-12; los puntos en blanco han sido incluídos para destacar aquellas regiones donde existe solapamiento de color. Tal y como era de esperar, la intensidad de fluorescencia de los receptores cuando las células eran preincubadas con IL-12 fue menor, un efecto probablemente debido a que la interleukina es parcialmente bloqueante sobre la unión entre el anticuerpo y el epítopo, seguramente porque éste último es compartido por ambos [504, 508].

Los resultados obtenidos para ambas cadenas del receptor de IL-12 confirman los análisis realizados con M $\beta$ CD y TX100. Como puede observarse en la Figura 36 (pág. 167), IL-12R $\beta$ 1 sólo colocaliza con DiI, el marcador de zona no raft. Por el contrario, IL-2R $\beta$ 2 (pág. 168) presenta cierto grado de colocalización con el marcador de zona raft GM1 (marcado con CTB-Alexa 488) antes de la incubación con IL-12, y, sin embargo, esta tendencia se invierte cuando las células son expuestas a la interleukina ya que el solapamiento de fluorescencias parece reducirse con CTB y aumentar con DiI.

**Figura 36. Colocalización de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 con los marcadores de zona raft (GM1, CTB-Alexa-488) y no-raft (Dil) en microscopía confocal.** Las células fueron cultivadas dos días a 10 $\mu$ g/ml de PHA, y reestimuladas durante 15h con IL-2 (1ng/ml), después fueron incubadas o no con 10ng de IL-12 antes de su marcaje. Se muestra la colocalización de IL-12R $\beta$ 1 (página 167) e IL-12R $\beta$ 2 (página 168) con los respectivos marcadores empleados. En la página actual se demuestra la ausencia de colocalización entre CTB y Dil. En blanco se representan los puntos de solapamiento de la señal.







### **3.1.3 Discusión de los resultados de expresión y localización del Receptor de IL-12.**

El Control de la expresión es clave en los procesos biológicos para determinar la capacidad de respuesta celular a un determinado estímulo. Así, es lógico comprobar como determinadas moléculas se hayan fuertemente reguladas. Como ya se ha comentado anteriormente, IL-12R $\beta$ 1 puede hallarse en la superficie de diferentes tipos celulares sin necesidad de estimulación previa, dado que además es una molécula receptora de la señal de otras interleukinas. Sin embargo, IL-12R $\beta$ 2 es una de esas moléculas fuertemente reguladas, como se acaba de mencionar, con sus niveles de expresión disminuidos en condiciones patológicas, por ejemplo. El papel clave de esta cadena como efectora de la señal de IL-12 justifica, sobradamente, la necesidad de centrar en ella nuestros esfuerzos.

Aún a pesar de lo complejo que resulta la optimización de unas condiciones de cultivo generales para una molécula con tanta variabilidad interindividual en su expresión como es IL-12R $\beta$ 2, se han logrado establecer unas condiciones de activación suficientes para su estudio sorteando este pequeño inconveniente. Esto nos ha permitido analizar la posición en superficie de ambas cadenas del receptor respecto a los rafts lipídicos, una cuestión que cada vez más destaca por sus implicaciones en la transducción de señal. Así, la presencia o ausencia de una molécula en los microdominios raft, en este caso un receptor, se asocia a determinadas enfermedades como la resistencia a la insulina [516], enfermedades crónicas [517, 518], cánceres [519], Alzheimer [520], Lupus Eritematoso Sistémico [521-524], distrofias musculares, enfermedades cardiovasculares, etc [525]. En nuestro caso, hemos logrado establecer que,

en condiciones no patológicas, IL-12R $\beta$ 1 se halla en la zona no-raft, mientras que IL-12R $\beta$ 2 sí se encuentra en rafts lipídicos. Tras la unión de IL-12, se produce un desplazamiento hacia zona no-raft de la cadena  $\beta$ 2. Este movimiento no es extraño, dado que ya ha sido descrito para la cadena  $\alpha$  del IL-2R (también conocido como CD25) por *Marmor y Julius* [126], que describe un movimiento similar de zona raft a zona no-raft, en donde se uniría a las otras dos cadenas del IL-2R $\gamma$  e IL-2R $\beta$  (aunque hay trabajos que indican que la unión podría producirse en zona raft [127, 129, 130]); en este caso, además, se determinó que la transducción de señal se producía en la zona no-raft, pero en la mayor parte de los estudios se ha asociado la transducción de señal de citocinas vía JAK/STAT con la presencia de estas moléculas en zona raft [526, 527]. En cualquier caso, no tenemos datos que nos indiquen si la transducción de señal de la IL-12 se inicia en zona raft o no, pero sí podemos suponer un mecanismo regulador de la misma basado en la posición de ambas cadenas del receptor al igual que sucede con IL-2 e IL-15.

## 3.2 Proliferación e IL-12

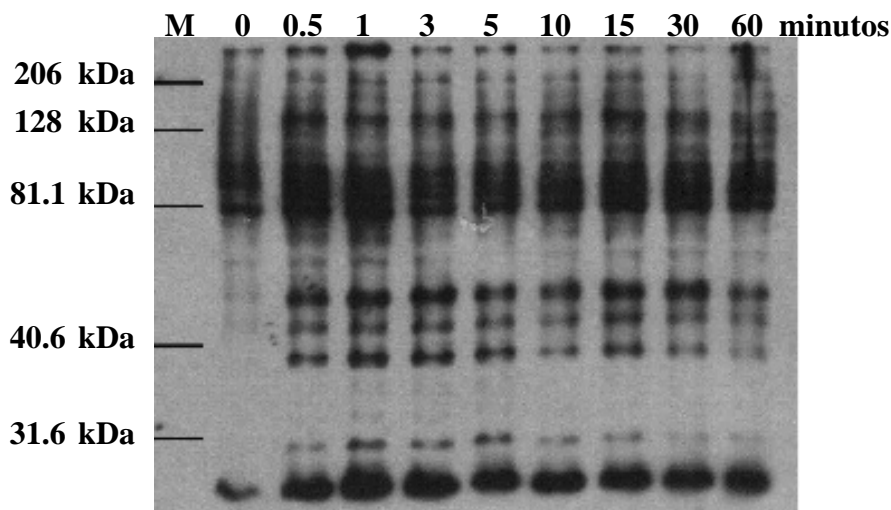
### 3.2.1 La MAPK ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12

La presencia de un receptor en la superficie celular determina que una célula pueda responder a su ligando. Pero cada vez es más importante el papel que desempeña la localización de los receptores sobre la superficie de la membrana plasmática, sobre todo con respecto a su posicionamiento/compartimentalización en los microdominios raft o no [528-532]. Tal y como hemos visto, de las dos cadenas del receptor, IL-12R $\beta$ 1 se halla en zona no raft, mientras que IL-12R $\beta$ 2 es capaz de desplazarse desde los microdominios raft hacia los no-raft tras la unión de la interleukina. ¿Cómo afecta esto a la transducción de señal de la citokina? Se sabe que, en la misma, intervienen dos kinasas JAK asociadas a los receptores, JAK2 y Tyk2 [279], que a su vez, son responsables de la fosforilación de un factor de transcripción, STAT4 [288, 290, 533], necesario para la producción de IFN $\gamma$  por las células [534, 535]; para maximizar este efecto STAT4 debe, además, ser fosforilado por la MAPK p38 [310]. Sin embargo, este modelo tan simple tiene lagunas importantes porque sólo explica la producción de IFN $\gamma$  [285], olvidándose de la activación de otras proteínas como STAT1, STAT3, STAT5 [283], y del posible papel que éstas puedan desempeñar en el resto de funciones de la IL-12. Nuestro objetivo se centra en el papel proliferativo que tiene esta interleukina porque aunque no pueda ser considerada como un estímulo mitogénico para las células T (como la IL-2), su presencia es determinante

para la expansión del fenotipo Th1 y el desarrollo de una respuesta tipo celular en la defensa frente a patógenos intracelulares [379, 536].

### 3.2.1.1 La estimulación de linfoblastos con IL-12 provoca la fosforilación en residuos de tirosina de múltiples proteínas

La fosforilación proteica en residuos de tirosina ha sido propuesta, desde su descubrimiento, como un importante mecanismo de transducción de señal regulando, principalmente, la respuesta inmediata a un estímulo. Tiene un papel clave en el control del ciclo celular, la diferenciación celular o la regulación de la traducción proteica. Por ello, se empezó diseñando un experimento sencillo que mostrara la respuesta a la IL-12. Se escogió la fosforilación en tirosina porque es un proceso implicado en prácticamente todos los tipos de respuesta celular. Para ello, partiendo de linfoblastos activados durante 3 días, en las condiciones antes descritas para maximizar la expresión del receptor de IL-12 (apartado 3.1), se realizaron análisis de fosforilación en tirosina en respuesta a IL-12 a diferentes tiempos mediante Western Blot, utilizando para su revelado un anticuerpo pan-fosfotirosina (clon PY20). Como se puede observar en la Figura 37, la presencia de IL-12 provoca un cambio importante en el patrón de proteínas fosforiladas de los linfoblastos. Los estudios realizados a diferentes tiempos indican una cinética muy rápida y sostenida en el tiempo. El nivel basal de fosforilación, que aparece a tiempo cero (sin estímulo), se explica con la actividad remanente del mitógeno empleado en el cultivo (PHA), además de que pueden tratarse de niveles basales de fosforilación de mantenimiento de la maquinaria metabólica de la célula.



**Figura 37. Aumento de la fosforilación en tirosina tras la activación por IL-12.** PBMCs humanos activados con PHA durante 3 días y posteriormente incubados con IL-12 durante los intervalos de tiempo indicados. Las muestras fueron lisadas y sometidas a Western blot. Para el revelado se utilizó el anticuerpo PY20. Este resultado confirma que la fosforilación de residuos de tirosina es un mecanismo de señalización en la transducción de la señal de esta citokina (n=3).

Para identificar algunas de las proteínas que pudieran estar implicadas en la transducción de señal de IL-12, se calculó el peso molecular de aquellas bandas que mostraban una inducción clara en respuesta a la citokina. Para ello se empleó un patrón de proteínas de peso molecular conocido. En la Tabla 1 podemos ver los pesos moleculares de estas proteínas, así como una inducción clara de las fosforilaciones en de especies proteicas de bajo peso molecular.

	Tiempo en minutos								
	0	0.5	1	3	5	10	15	30	60
Peso molecular (kDa)		275	275	275	275	275	275		
		133	133	133	133	133	133	133	133
		73	73	73	73	73	73	73	73
		64	64	64	64	64	64	64	64
		58	58	58	58	58	58	58	58
		56	56	56	56	56	56	56	56
		43	43	43	43	43	43	43	43
		38	38	38	38	38	38	38	38
		34	34	34	34	34	34	34	34
		31	31	31	31	31	31	31	31
			24	24	24	24	24	24	24
		22	22	22	22	22	22	22	22

**Tabla 1.** Pesos moleculares de las proteínas que aparecen fosforiladas en respuesta a la IL-12 de la Figura 37.

Algunas de las proteínas que presentan una inducción manifiesta de la fosforilación en tirosina coinciden con proteínas conocidas y relacionadas con IL-12:

- 133kDa, podría corresponderse con Tyk2, ya que su peso molecular coincide con esta kinasa y se fosforila en Tyr en respuesta a IL-12 [279].
- 56kDa: podría tratarse de la Lck, una kinasa src en la que la fosforilación y defosforilación determina enormemente su actividad. Su activación ya fue descrita en células NK [321].

- 43kDa: podríamos relacionarla con la MAPK ERK1/2, con peso molecular de 44/42kDa descrita por Pignata *et al.* en 1994 [537] utilizando también linfoblastos humanos.
- 38kDa: se correspondería con otra MAPK, p38, ya descrita en linfoblastos humanos [310, 311, 326, 538]. Aunque se ha descartado su participación en los procesos proliferativos asociados a esta interleukina [285] parece ser importante en la producción de IFN $\gamma$ .

### 3.2.1.2 IL-12 provoca la activación de la vía de MAPK Raf-Mek1/2-ERK1/2.

El uso de anticuerpos específicos de la forma fosforilada y activa de una proteína permite tener una imagen más cercana de lo que ocurre en la transducción de señal, y permiten, además, medir el nivel de actividad de una determinada vía reguladora más allá del simple análisis de expresión de RNA [539-543]. Un fallo en estas vías reguladoras puede dar lugar a una respuesta descontrolada, alterando el metabolismo o, incluso, generando tumores. Por tanto, es posible valorar la progresión de un tumor y su invasividad midiendo el estado de fosforilación de sus proteínas [544-547].

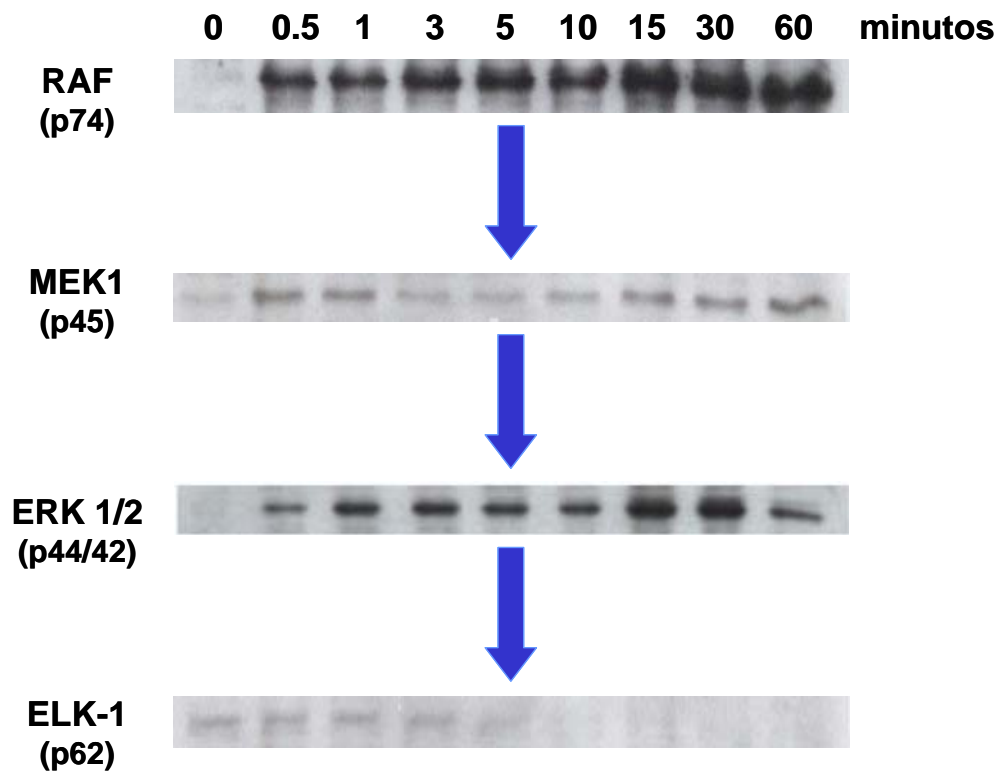
De las 3 MAPKs conocidas: p38, JNK y ERK1/2, la primera ya ha sido implicada en la producción de IFN $\gamma$  [326]. Sin embargo, es ERK1/2 la que más interés despertó en nuestra investigación, dado que está implicada en la mayor parte de rutas proliferativas y de expresión proteica [15]. Para comprobar si ERK1/2 formaba parte del mecanismo de transducción de

señal de la IL-12, se realizaron experimentos similares a los de fosforilación en tirosina, pero esta vez utilizando un anticuerpo fosfoespecífico para cada una de las proteínas implicadas en la ruta de activación y alguna de las posibles dianas de esta MAPK. Las proteínas y residuos fosforilados reconocidos por los anticuerpos son:

- Raf (Ser338)
- MEK1 (Ser217/Ser221)
- ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
- ELK1/2 (Ser383)
- p90-Rsk (Ser380)

En la Figura 38, puede observarse la activación secuencial de la vía de ERK1/2. Los linfoblastos fueron estimulados a diferentes tiempos con IL-12. Mediante un Western Blot con los anticuerpos fosfoespecíficos antes mencionados se puede observar como esta vía sí se halla activada en respuesta a la IL-12, de una forma sostenida y prolongada en el tiempo. El máximo de activación de Raf parece estar en los 15 minutos a partir del cual se estabiliza. En el caso de ERK1/2 hay un aumento claro y notorio de la fosforilación a partir de los 30s y hasta 1 hora. Aunque no se aprecie un cambio significativo en la activación de MEK1, es lógico pensar que si su predecesora en la cascada (Raf) y su sucesora (ERK1/2) están activas, también lo debería estar ella. Es muy probable que la ausencia de señal de MEK1 se deba a un problema más metodológico que experimental, ya que una baja afinidad del anticuerpo fosfoespecífico por el epitopo fosforilado, explicaría porque ni cambiando las condiciones de *stripping*, ni revelando directamente con este anticuerpo (sin el *stripping* previo) se observa un aumento de la señal. Por lo que respecta a las posibles dianas estudiadas de

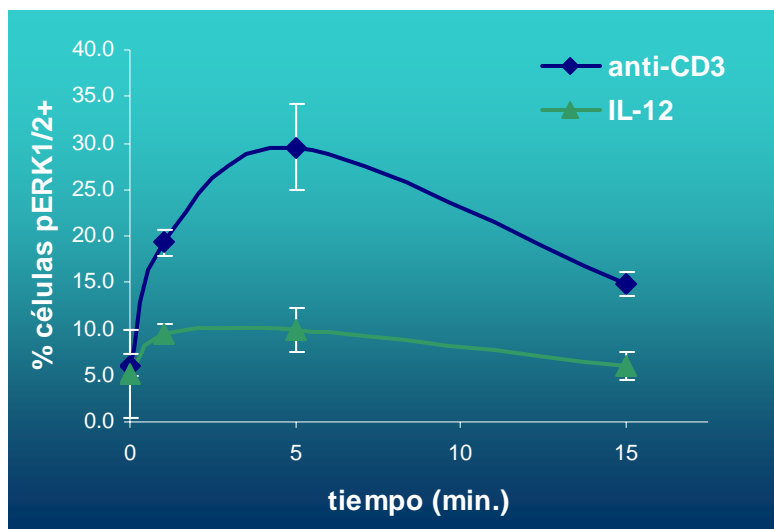
ERK1/2 (p90-Rsk y ELK-1) ninguna de ellas presenta aumento de fosforilación; podemos suponer, por tanto, que ninguna de ellas se activa en respuesta a la IL-12 y que son otros factores de transcripción o proteínas los mediadores de la función de ERK1/2.



**Figura 38. Cascada de fosforilación de la ERK1/2.** Las flechas indican el sentido de la vía. Las distintas bandas han sido obtenidas de los Western Blot revelados con los anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las proteínas que aparecen indicadas a la izquierda. Cada proteína fue analizada en un mínimo de tres sangres diferentes.

### 3.2.1.3 ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12: Estudios de cinética mediante citometría de flujo.

Los datos obtenidos por Western Blot son evidentes acerca de la activación de la ruta de ERK1/2, sin embargo presentan un problema respecto de cuantificación de la cantidad de proteína: su homogenización en todos los canales de la electroforesis. Este inconveniente metodológico puede evitarse utilizando la citometría de flujo, donde se puede monitorizar el grado de fosforilación de muchas células, y en cada una de ellas de forma individualizada [548]. Por ello, linfoblastos activados para maximizar la expresión del receptor de IL-12 (y, por tanto, la señalización) fueron activados con IL-12 a diferentes tiempos. Para detener la reacción de fosforilación, las células fueron fijadas con paraformaldehído de forma inmediata y permeabilizadas. El marcaje intracelular, Figura 39, muestra como claramente hay un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a IL-12, que luego desciende a partir de los 5 minutos. Posiblemente, este descenso (no observado en el Western Blot) se deba a que ERK1/2 penetra en núcleo tras su fosforilación para, a su vez, fosforilar factores de transcripción como c-jun [549]. Dada la comodidad de esta técnica, al poder combinar el marcaje intracelular con el de superficie, decidimos emplearla en los sucesivos experimentos, utilizando 5 minutos como tiempo óptimo de referencia.

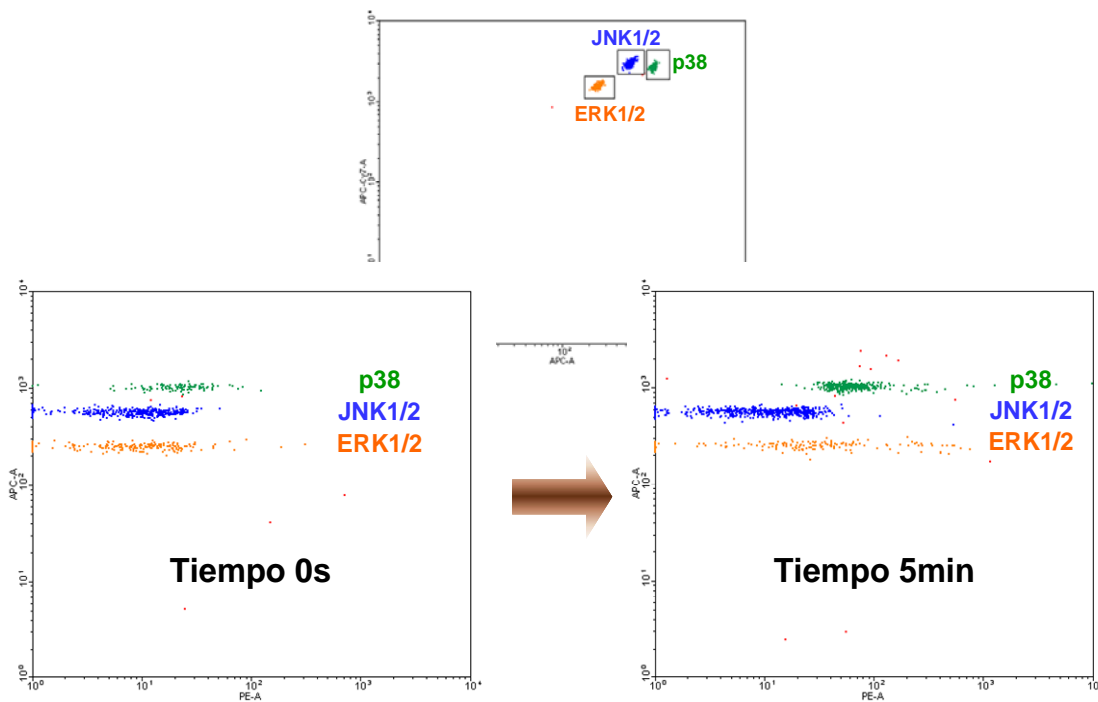


**Figura 39. Cinética de activación de ERK1/2 mediante citometría de flujo.** Linfoblastos activados 3 días con PHA, fueron estimulados con anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) o bien con IL-12. La reacción fue parada a diferentes tiempos, fijando las células con PFA antes del marcaje intracelular (anticuerpo fosfoespecífico de ERK1/2 (T202/Y204) conjugado con Alexa 488). Se muestra la media de triplicados; n=3.

#### 3.2.1.4 ERK1/2 se activa en respuesta a la IL-12: Cuantificación de la respuesta mediante el uso del CBA FlexSet.

Una alternativa que permite compatibilizar el uso de lisados con la sensibilidad de la fluorescencia, y que es, además, capaz de cuantificar la cantidad de proteína presente, es el CBA FlexSet de BD Biosciences. En este método se utilizan unas microesferas con una determinada cantidad de dos fluorocromos, combinados para que la intensidad de fluorescencia de cada uno determine una diferente posición (x,y) en la pantalla del citómetro. Cada posición está asignada a una proteína, y, por tanto, esa microesfera tiene en su superficie un determinado anticuerpo de captura. Una vez incubadas las esferas con el lisado, se procede al marcaje con un anticuerpo que reconoce otro epítipo de la misma proteína conjugado con

un tercer fluorocromo, que es el que determina la cantidad de proteína de nuestro interés que hay en la muestra. Es un modelo tipo “sándwich” que tiene la misma sensibilidad que un Elisa; además, esta combinación de anticuerpos y fluorocromos permite el análisis en una misma muestra de diferentes proteínas a la vez. En nuestro caso se empleó esta técnica para medir el grado de fosforilación de las MAPK: p38, JNK y ERK1/2. Para ello, cultivamos durante 3 días PBMCs en presencia de 10µg/ml de PHA, después las células fueron estimuladas (o no) con IL-12 (10ng/ml) o PMA (20mM, control positivo) durante 5min a 37°C. Una vez lavadas las células con PBS frío, se lisaron con el tampón de lisis con base SDS (suministrado por el fabricante), el DNA se rompió pasando la muestra por una jeringa de insulina y se comprobó la cantidad de proteína del lisado mediante BCA. Una vez igualada la cantidad de proteína, se realizaron las incubaciones con las microesferas siguiendo las instrucciones indicadas. Puede verse en la Figura 40 como el desplazamiento a la derecha de la fluorescencia es notorio en respuesta a la IL-12 para p38 y ERK1/2, lo que indica una activación de estas MAPK, lo que no ocurre, sin embargo para JNK.



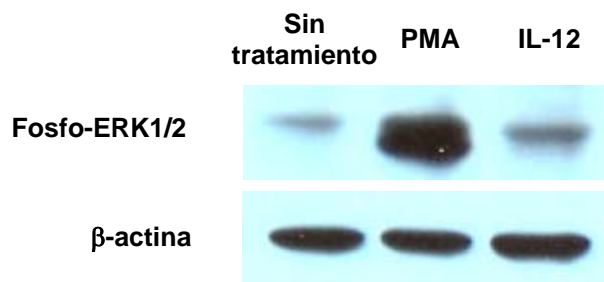
**Figura 40. Análisis de la activación de las 3 MAPK (p38, JNK1/2 y ERK1/2) mediante CBAFlexSet.** Los linfoblastos fueron activados con IL-12 y lisados, antes de la captura de las proteínas fosforiladas (fosfo-p38, fosfo-JNK1/2 y fosfo-ERK1/2) y su revelado. El incremento de la fluorescencia medido a los 5 minutos, es obvio para p38 y ERK1/2. La cuantificación se realizó utilizando una recta patrón para cada una de estas proteínas.

La cuantificación es posible por la extrapolación de la cantidad de proteína capturada (tercer fluorocromo) con el valor obtenido en una recta patrón. Como se puede ver en la Tabla 2, la activación con IL-12 provoca un aumento significativo de la fosforilación de p38 (como era esperado) y de ERK1/2 (lo que confirma nuestros datos anteriores). Por supuesto, esta activación no es tan llamativa como la del control positivo de PMA (73 vs. 13 veces); pero no hay que olvidar que las citocinas ejercen su acción modulando la respuesta inmune de una forma más discreta, y que, aún así, la activación de ERK1/2 es muy importante.

IL-12				PMA
	T=0 min	T=5 min	%	%
<b>p38</b>	135.23 pg/ml	575.96 pg/ml	4.25	2.72
<b>JNK</b>	11.53 pg/ml	12.71 pg/ml	1.10	1.70
<b>ERK</b>	19.24 pg/ml	251.85 pg/ml	13.10	72.74*

**Tabla 2.** Cuantificación de la activación de las MAPK: p38, JNK1/2 y ERK1/2. El porcentaje se calculó dando al tiempo cero un valor relativo de 1 (tanto por uno).\* Valor fuera de rango.

Como comprobación de los resultados del CBA Flex Set, se realizó un Western Blot de los mismos lisados utilizando el mismo anticuerpo fosfoespecífico que empleamos en la técnica. Para ello, los lisados fueron mezclados con tampón de muestra, se cargaron 10µg de proteína por canal en un gel del 12% de acrilamida. En el revelado se procedió igual que con cualquier otra proteína fosforilada. Como se puede observar en la Figura 41 el CBA Flex Set es eficaz en la detección de la fosforilación proteica, por lo que puede ser utilizada como alternativa al Western Blot.



**Figura 41. Comprobación de los resultados de fosforilación de ERK1/2 del CBA FlexSet mediante Western Blot.** Se emplearon las mismas muestras de la Figura 40, y el mismo anticuerpo fosfoespecífico de captura de ERK1/2 que el protocolo. También se realizó una comprobación de la carga proteica mediante el stripping y posterior revelado con β-Actina.

La activación de una MAPK p44/p42 en respuesta a la IL-12 fue, inicialmente, descrita por Pignata *et al.* en 1994 [537]. Desde entonces, varios autores han tratado de relacionar esta banda de 44/42kDa con la MAPK ERK1/2 sin éxito. Se ha llegado a afirmar que la banda descrita en Pignata *et al.* podría tratarse de la MAPK p38, dado que tienen un peso molecular similar, el sustrato MBP es utilizado por ambas y porque los anticuerpos utilizados no eran totalmente específicos [310]. Sin embargo, en nuestro caso, hemos encontrado que ERK1/2 se fosforila en una respuesta rápida a nuestra interleukina utilizando anticuerpos totalmente fosfoespecíficos. Diferencias en el método de activación empleado en cada caso pueden explicar las discrepancias obtenidas: así en el caso de Visconti *et al.* [310] se utilizó Concanavalina A y nosotros PHA para activar las células; en el caso de Athié *et al.* [325] se empleó IL-2 desde un primer momento en el cultivo. Ambos métodos son fuertes activadores *per se* de ERK1/2 lo que puede enmascarar su activación por IL-12 dado que ya hay un fuerte estímulo basal de partida (confirmado con datos propios en nuestros ensayos, datos no mostrados). Además, el análisis de activación de p38, JNK1/2 y ERK1/2 nos ha permitido diferenciar, sin lugar a dudas, a las dos MAPK, p38 y ERK1/2.

Por otro lado, nosotros hemos encontrado activación de la MAPK ERK1/2 en tiempos largos, de hasta 1h, lo que parece ser importante para promover la proliferación celular [322]. Sin embargo, algunos autores indican que fosforilaciones prolongadas (1.5h a 24h) de ERK1/2 activan procesos de muerte programada más que de división celular [550]. En el caso de IL-12, esta opción parece descartarse, ya que combinando el efecto de esta citokina con IL-4 e IL-7, muestran como, sin incrementarse el rescate de la apoptosis, hay mayor proliferación [551].

### **3.2.2 IL-12 provoca un incremento de la proliferación en linfoblastos humanos**

Como se ha comentado anteriormente, la interleukina 12 tiene un efecto proliferativo en células T o NK *resting*, pero sólo si éstas se hallan pre-activadas por la vía del TCR/CD3; es decir, necesita de la coestimulación mediante PHA, aloantígenos, anticuerpos anti-CD3, diésteres de forbol, o la IL-2 [163]. Posiblemente, esto es debido a que IL-12 sólo puede transmitir señales proliferativas a través de la cadena  $\beta 2$  pero no de  $\beta 1$  [501, 502], y para la expresión de esta cadena necesita de la activación vía TCR [503]. A pesar de que la proliferación inducida por IL-12 es un efecto muy conocido [152, 155, 219, 250], apenas está estudiado: se sabe que es reforzada por citocinas como la IL-2 [250] u otras aparentemente antagónicas como pueden ser la IL-4 o la IL-7, típicas de fenotipo Th2, vía un proceso mediado por STAT3 [551]; pero, sin embargo, no se conoce el mecanismo de transducción de señal asociado únicamente a la IL-12. Por ello, se diseñaron una serie de experimentos que nos permitieran relacionar el efecto proliferativo de la IL-12 con alguna de las JAK kinasas asociadas al receptor. Además, una vez confirmada la activación de ERK1/2 utilizando 3 métodos diferentes, y dado que una de sus principales funciones es la de inducir la proliferación celular [16], intentamos averiguar si éste es el papel que juega su activación en respuesta a la interleukina y cuál es el factor de transcripción implicado en la misma.

### 3.2.2.1 La concentración celular y la dosis de PHA influye en el grado de proliferación de los linfocitos T.

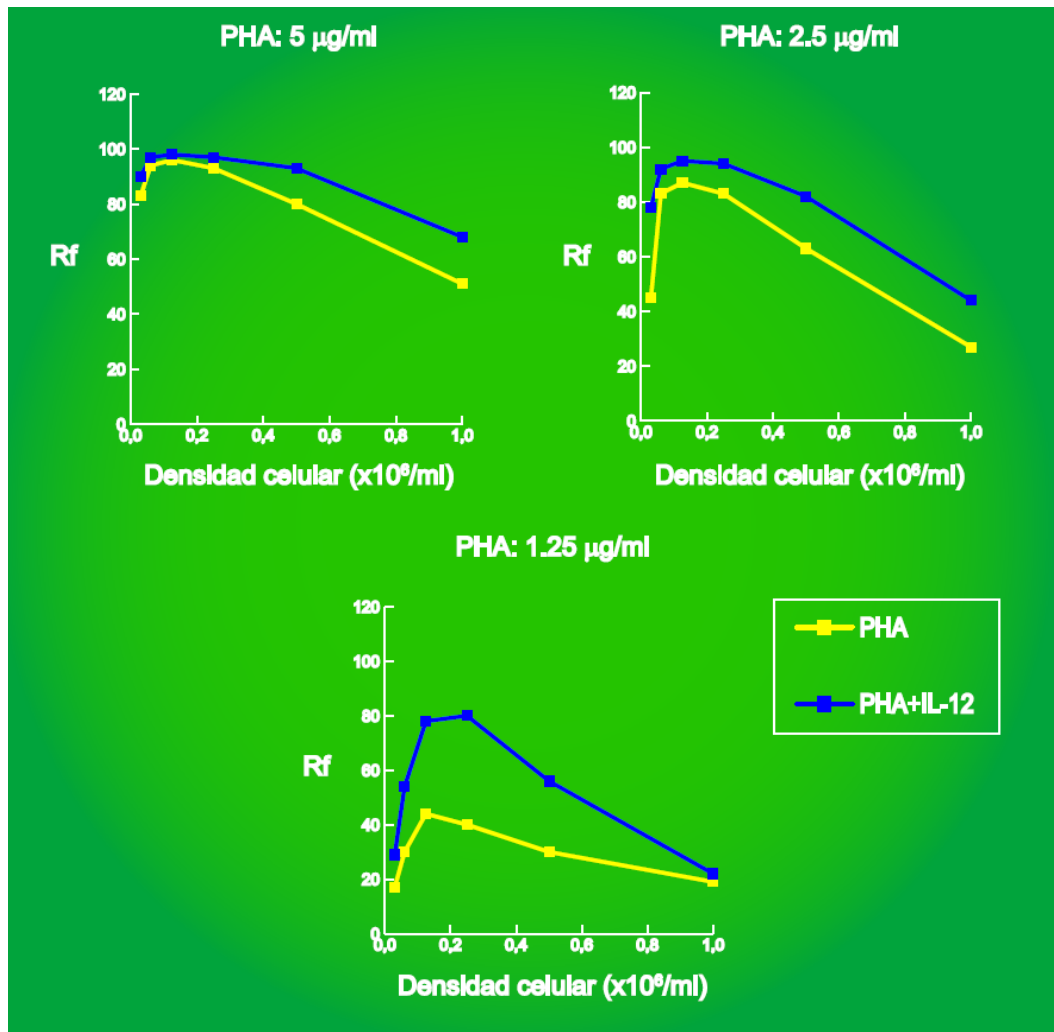
Se sabe desde hace tiempo que la inhibición por contacto entre células es un importante mecanismo de regulación de la proliferación [552], por ello, era necesario conocer cómo afectaba la concentración celular en nuestras condiciones de cultivo. Realizamos un experimento preeliminar, en el que pusimos en cultivo diferentes densidades celulares y de PHA durante 3 días. Al final de este período se procedió al conteo de las células recogidas comparando el nº final de células con el de partida. En la Tabla 3 podemos ver como la tasa de proliferación (nº final de células recogidas/ nº inicial de células) es mayor cuanto menos es la densidad celular inicial. Además, tal y como se recogía en la Figura 25, la elevada concentración de mitógeno entrañaba una gran mortalidad celular, lo que implica que el número de células recogidas era mucho menor de lo que se esperaba al aumentar la concentración de PHA.

<b>Tasa de proliferación</b>			
<b>Concentración inicial de células/ml</b>	<b>Concentración de PHA en el cultivo</b>		
	<b>10µg/ml</b>	<b>20µg/ml</b>	<b>40µg/ml</b>
<b>0.5x10<sup>6</sup></b>	<b>11.04</b>	<b>1.68</b>	<b>3.6</b>
<b>1x10<sup>6</sup></b>	<b>1.8</b>	<b>2.64</b>	<b>1.98</b>
<b>2x10<sup>6</sup></b>	<b>1.2</b>	<b>1.8</b>	<b>1.11</b>

**Tabla 3.** Tasa de proliferación de los cultivos según la concentración inicial de células y PHA (Tasa de proliferación= nº final/nº inicial de células)

### 3.2.2.2 Optimización de las condiciones de cultivo para maximizar el efecto proliferativo inducido por IL-12

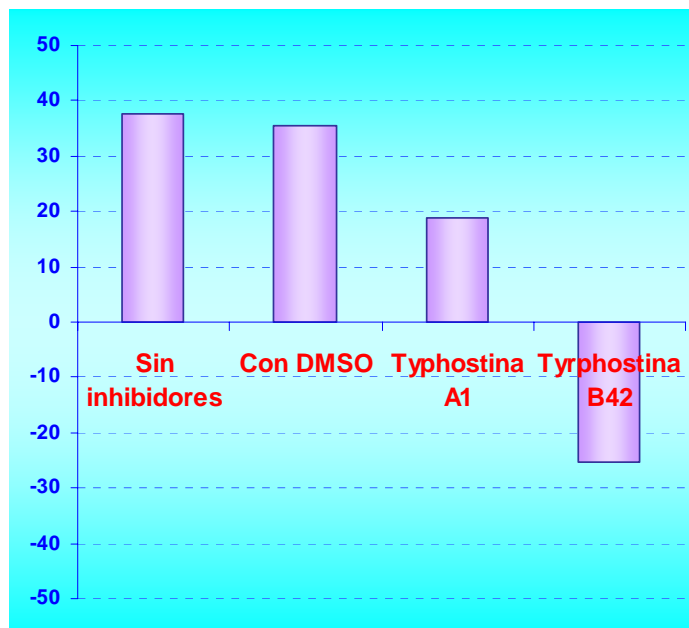
Para poder estudiar el efecto proliferativo de IL-12 fue necesario analizar si las condiciones de cultivo que maximizaban la expresión del IL-12R, eran óptimas también en proliferación. Con este fin estudiamos por citometría de flujo el efecto en la proliferación celular de diferentes concentraciones de PHA en combinación con IL-12. Los resultados pueden observarse en la Figura 42, donde las PBMCs fueron marcadas con CFSE, y cultivadas 5 días con diferentes concentraciones de PHA y distinta densidad celular inicial del cultivo, en presencia o no de IL-12. Observamos que la concentración de PHA elevada (5µg/ml) enmascaraba el efecto de la interleukina, por ello, hubo que reducir la cantidad de mitógeno. Además, teniendo en cuenta la inhibición por contacto entre células, se consideró la concentración celular como un factor adicional de interferencia en nuestras observaciones. Las mejores condiciones para observar el efecto de IL-12 son  $0.25 \times 10^6$  células/ml y 1.25µg/ml de PHA, aunque, al igual que ocurre con la expresión de la cadena IL-12Rβ2, existe variabilidad interindividual en la intensidad del efecto proliferativo.



**Figura 42. Efecto de la concentración celular inicial y de la cantidad de mitógeno en los cultivos.** Las células fueron marcadas con CFSE y cultivadas durante 5 días con diferentes concentraciones celulares y de PHA, en presencia o ausencia de IL-12 (2ng/ml). En el eje de abscisas se representa el porcentaje de células que se han dividido, al menos, una vez (Rf). Es un experimento representativo de n=4

### 3.2.2.3 JAK2 media la respuesta proliferativa activada por IL-12.

Una vez conocidas las mejores condiciones para observar la proliferación inducida por IL-12, nos propusimos averiguar cual de las dos kinasas asociadas al IL-12R (JAK2 o Tyk2) se halla ligada al efecto mitogénico de esta interleukina. En sistema murino, se ha logrado relacionar la producción de IFN $\gamma$  con Tyk2 y la cadena IL-12R $\beta$ 1, y la proliferación con JAK2 e IL-12R $\beta$ 2 [294, 553]. En humanos, se sabe que la expresión de  $\beta$ 2 está relacionada con una mayor inducción de proliferación, pero nunca ha habido datos concluyentes al respecto [280, 500, 554, 555]. Para poder confirmarlo, se cultivaron PBMCs marcadas con CFSE en presencia de inhibidores de JAK kinasas específicos, las tyrphostinas A1 (o AG9, inhibe Tyk2) y B42 (o AG490, inhibe JAK2). Estas moléculas presentan gran especificidad por su sustrato y además son utilizadas en ensayos con animales [553, 556, 557], lo que permite una aproximación a una futura aplicación en medicina de estos resultados. La concentración elegida en los ensayos de dosis-respuesta para trabajar con estos inhibidores fue 25mM, dado que se observa la inhibición de JAK2 pero no de Tyk2. Podemos ver en la Figura 43 que sólo el inhibidor de JAK2 (tyrphostina B42) es capaz de inhibir la proliferación inducida por IL-12.

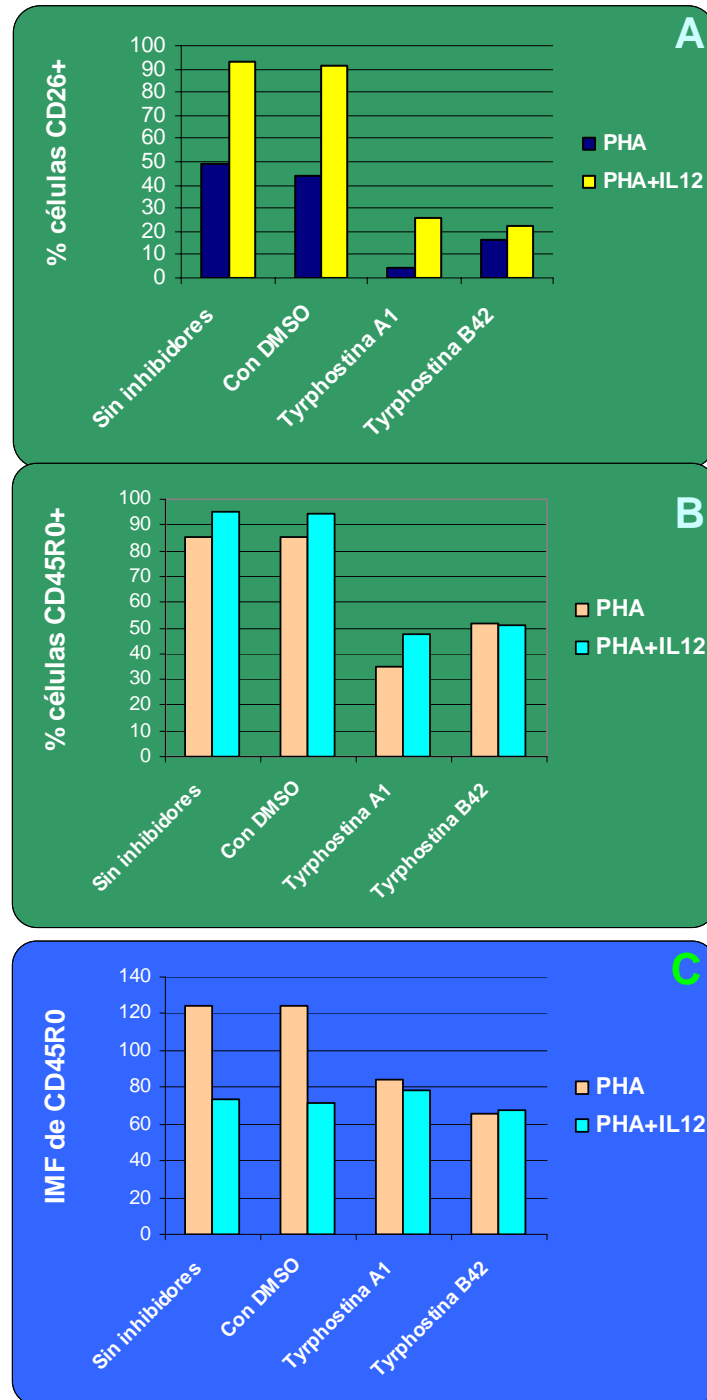


**Figura 43. La proliferación inducida por IL-12 es inhibida por typhostin B42** (inhibidor de JAK2). Las células fueron marcadas con CFSE y cultivadas ( $0.25 \times 10^6$  células/ml) con  $1.25 \mu\text{g/ml}$  de PHA, en presencia o no de IL-12 y con una concentración de inhibidores de 25mM. En el eje de abscisas se representa el incremento de proliferación observado en presencia de IL-12 respecto a PHA en tanto por cien:  $(((\text{IMF de PHA} - \text{IMF de IL-12}) / \text{IMF de PHA}) * 100)$ . Los datos pertenecen a la media de triplicados. Es un experimento representativo de  $n=3$ .

#### 3.2.2.4 CD26 es marcador de proliferación en respuesta a la IL-12.

CD26 es una dipeptidil peptidasa de membrana, que también puede encontrarse en forma soluble. Entre las funciones de esta proteína destaca su asociación con otras moléculas y vías de señalización [558-564]. En 1997 nuestro grupo de investigación describió un incremento de los niveles de CD26 en linfoblastos humanos inducida por IL-12, pero no por IFN $\gamma$  [433]. Este efecto es evidente sólo a partir del segundo o tercer día de preactivación de las células T con PHA, lo que la relaciona con los niveles de expresión de IL-12R $\beta$ 2 y su kinasa asociada, JAK2; e indicando, a su

vez, que ambos acontecimientos están relacionados. Este incremento de los niveles de CD26 desplaza a la fosfatasa CD45R0 desde zona raft hacia zona no-raft, un movimiento que se ha relacionado con la capacidad de regulación de la proliferación vía TCR [432]. Dado que JAK2 regula la respuesta proliferativa, es posible que CD26 esté relacionado con este efecto de la IL-12. Con el fin de estudiar la implicación de CD26 en la respuesta proliferativa a la IL-12 se compararon los niveles de CD26 y CD45R0, en células cultivadas 5 días con 1.25µg/ml de PHA, en presencia o ausencia de 2ng/ml de IL-12, y de los inhibidores de JAKs: tyrphostinas A1 y B42. Como se puede observar en la Figura 44A, el inhibidor B42 era capaz de eliminar el efecto regulador de IL-12 sobre CD26, lo que indica que CD26 es un marcador del grado de respuesta proliferativa más que de producción de IFN $\gamma$ . Además, este mismo inhibidor eliminó el efecto negativo de IL-12 sobre la intensidad media de fluorescencia de CD45R0, que se ha sido relacionado por nuestro grupo con la mayor interacción de esta fosfatasa de tirosina con CD26 y el desplazamiento del complejo CD26-CD45R0 hacia las zonas ricas en fosfolípidos de la membrana plasmática (no-rafts), Figura 44C [432].



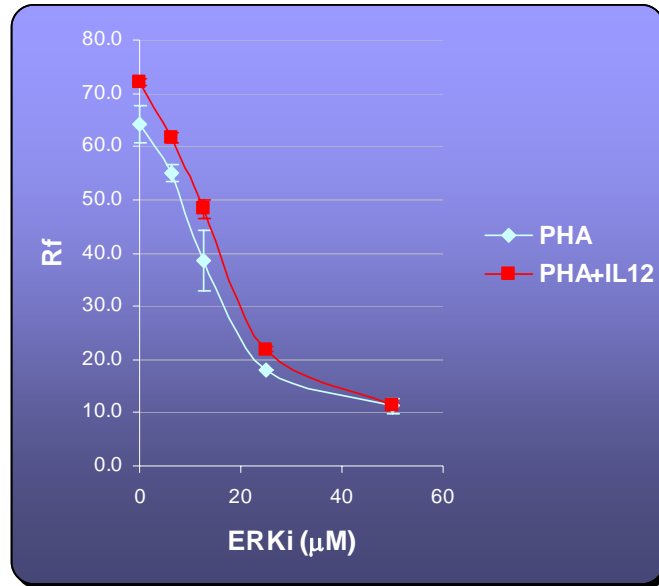
**Figura 45. Influencia de las JAK kinasas sobre la expresión de CD26 y CD45R0.** Linfoblastos cultivados 5 días con 1,25µg/ml PHA a  $1 \times 10^6$  células/ml en presencia de los inhibidores A1 y B42 (25mM). A) Porcentaje de células que expresan CD26 y B) CD45R0. C) IMF de CD45R0. Es un experimento representativo de n=3.

Dado que CD45R0 es una fosfatasa que ha sido implicada en la defosforilación de JAK kinasas [565], podría deducirse que su unión a CD26 y desplazamiento hacia zona no-raft está relacionado con la desactivación de la señal proliferativa dependiente de IL-12. Sin embargo, esto no es probable dado que el máximo de este efecto está a los 5 días de activación con PHA e IL-12 [433] y, sin embargo, la cadena IL-12R $\beta$ 2 sólo aparece hasta el 3<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> días. Sí es posible, en cambio, que sea necesaria su presencia en zona no-raft para desactivar a la otra JAK kinasa asociada a este proceso, Tyk2, que está asociada a IL-12R $\beta$ 1, que sí se encuentra en las células a los 5 días, en zona no-raft y que se ha relacionado con la producción de IFN $\gamma$  inducida por IL-12 [284, 294]. Así en un panorama general, podemos suponer que IL-12R $\beta$ 2 a través de JAK2, es responsable del proceso proliferativo y que aquellas células que más responden a la IL-12 también incrementan sus niveles de CD26. Esta proteína se une en superficie a CD45R0, que se desplaza paulatinamente hacia zona no-raft, en un proceso que concluirá a los 5 días con un enriquecimiento de estas regiones y la defosforilación de Tyk2 asociada a IL-12R $\beta$ 1. Esto redundaría en una disminución de la producción de IFN $\gamma$  inducida por IL-12. El desplazamiento de CD45R0 hacia zona no-raft también ha sido relacionado con la activación de la vía ERK1/2 en sistema murino [566], y con un incremento de la proliferación en respuesta a citocinas como la IL-6 [567]; por lo que además de regular negativamente la producción de IFN $\gamma$  podría ser un mecanismo de refuerzo de la actividad proliferativa de IL-12. Este mecanismo de control de la señal mediante compartimentalización de las diferentes moléculas implicadas, no es incompatible con la existencia de una regulación a nivel de expresión génica basado en SOCS, que impida la señalización de IL-12R [348-350].

### 3.2.2.5 ERK1/2 media el efecto proliferativo de la IL-12

La MAPK ERK1/2 está implicada en un gran número de procesos de señalización: traducción proteica, inducción de apoptosis y protección frente a la misma, migración, etc [324], pero su función más importante está ligada a la inducción de los procesos proliferativos [16, 568]. Por ello, utilizando un inhibidor específico de esta MAPK nos dispusimos a averiguar si en este caso también se la relaciona con este efecto de la IL-12. El inhibidor escogido en este caso fue el ERKi (3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione, HCl), que puede penetrar en las células e inhibe de forma específica la interacción de ERK1/2 con sus sustratos (principalmente se une a ERK2, p42) [569]. En este caso escogimos este inhibidor y no el clásico U0126, que bloquea la interacción de MEK1 con ERK1/2 impidiendo su fosforilación, porque U0126 tiene la capacidad de volverse fluorescente en cultivo, lo que interfiere con nuestra mediciones de proliferación con CFSE en el citómetro [570]. En la Figura 45 puede observarse como en células marcadas con CFSE y cultivadas en presencia del inhibidor de ERK (ERKi), la proliferación debida a IL-12 disminuye según se aumenta la concentración de inhibidor, lo que relaciona directamente a ERK1/2 con proliferación. También indica que la IL-12 potencia rutas de transducción de señales implicadas en proliferación comunes a las desencadenadas vía TCR.

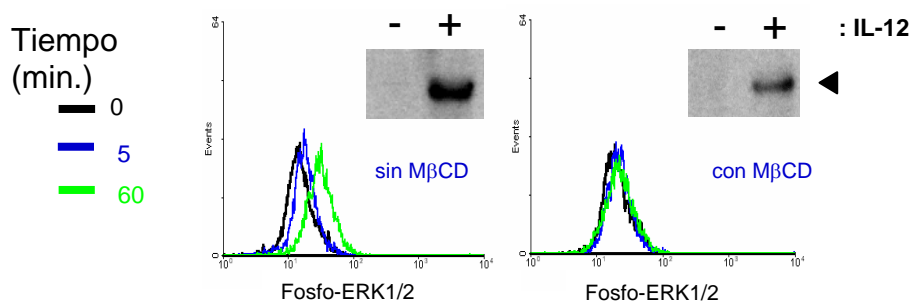
**Figura 45. Efecto de ERKi sobre la proliferación inducida por IL-12.** PBMCs marcados con CFSE previo a su cultivo con 1.25 $\mu$ g/ml de PHA (0.25 $\times 10^6$  células/ml) y cultivados en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor ERKi. Al cabo de 5 días, fueron lavadas y la lectura de fluorescencia medida en un citómetro. Rf: porcentaje de células que se han dividido, al menos, una vez. Se presenta media y desviación estándar de triplicados. Es un experimento representativo de n=3.



### 3.2.2.6 La fosforilación de ERK1/2 está ligada a la estabilidad de los rafts lipídicos y está mediada por IL-12R $\beta$ 2 y JAK2.

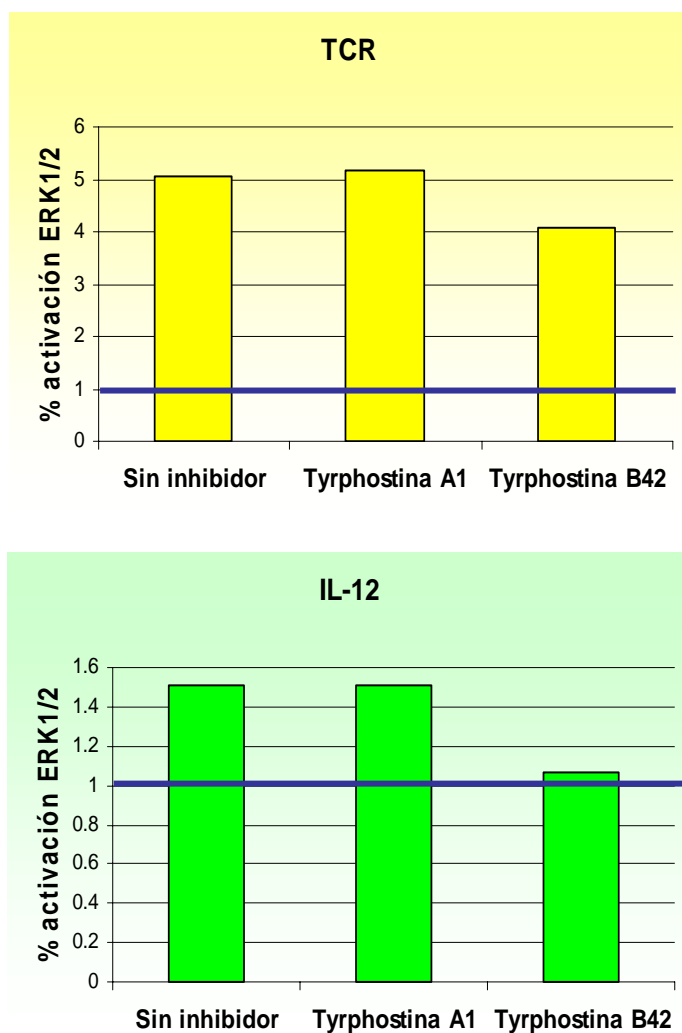
La pregunta que surgió en este momento de la investigación fue ¿cuál de las dos cadenas del receptor de IL-12, o sus kinasas asociadas, es responsable de la activación de la cascada de ERK1/2? Como ya hemos comentado anteriormente, la señalización celular está directamente relacionada con la posición respecto a los rafts lipídicos de los receptores. Dado que la cadena  $\beta$ 2 es la que sufre un proceso de translocación cuando se une a la IL-12, pasa de encontrarse en zona raft a desplazarse hacia zona no-raft; y, por tanto, el tratamiento con M $\beta$ CD alterará no sólo su presencia en la superficie, sino también el proceso de transducción de señal asociado.

Por ello, células activadas 3 días con PHA (10 $\mu$ g/ml), para maximizar la expresión de la cadena IL-12R $\beta$ 2, fueron tratadas o no con 2.5mM de M $\beta$ CD (15min a 37°C) antes de su estimulación, o no, con IL-12 durante 5 minutos. Posteriormente, cada muestra fue dividida en 2 alícuotas para realizar ambos ensayos: citometría y Western Blot. La detección intracelular de la fosforilación de ERK1/2 muestra (Figura 46) como la M $\beta$ CD es capaz de reducir de forma significativa la activación de ERK1/2, resultados que fueron confirmados mediante Western Blot. Estos datos, junto con los anteriores, ponen de manifiesto que los raft son importantes para la activación de ERK1/2. Como IL-12R $\beta$ 2 es una proteína residente en estos microdominios y, además, capaz de mediar los efectos de IL-12 incluso en ausencia de IL-12R $\beta$ 1 [296], no es difícil suponer que IL-12R $\beta$ 2 sea la proteína que activa, de forma indirecta, a ERK1/2 y la proliferación celular.



**Figura 46. El tratamiento con M $\beta$ CD altera el grado de fosforilación de ERK1/2.** Linfoblastos cultivados con 10 $\mu$ g/ml de PHA (1 $\times$ 10<sup>6</sup>cels/ml) durante 3 días fueron tratados o no con 2.5mM de M $\beta$ CD y después estimuladas, o no, con IL-12. El análisis de fosfo-ERK1/2 por Western Blot confirma lo observado en citometría de flujo. Es un experimento representativo de n=3.

Las kinasas JAK típicamente se encuentran asociadas a la vía JAK/STAT en respuesta a citocinas, de forma que activan a estos factores de transcripción, los STAT, por medio de fosforilaciones [8, 571]. Pero las kinasas JAK también pueden activar mecanismos alternativos de señalización, como puede ser la propia vía de la ERK1/2 [572]. Dado que IL-12R $\beta$ 2 es responsable de la activación de ERK1/2, algo normal si tenemos en cuenta que ambas median el efecto proliferativo, nos dimos cuenta de la paradoja que supone que IL-12R $\beta$ 2 sea necesaria para la producción de IFN $\gamma$  (porque tiene los residuos de tirosina fosforilables de anclaje para las STAT) por las células, y, sin embargo, es Tyk2, la kinasa asociada a IL-12R $\beta$ 1, la directamente relacionada con ello [284, 294]. Por ello, nos vimos obligados a comprobar cual de las dos JAKs estaba activando la MAPK. Las células, estimuladas 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, fueron tratadas con el inhibidor de JAK kinasa correspondiente (tyrphostina A1 o B42), estimuladas o no con IL-12 (5min a 37°C), y la fosforilación de ERK1/2 detectada mediante citometría de flujo. En la Figura 47, se observa como la activación de ERK1/2 por la interleukina 12 se reduce en presencia del inhibidor tyrphostina B42 y no se ven alterados sus niveles con tyrphostina A1 (inhibidor de Tyk2); esto que nos indica que es JAK2 la kinasa responsable del efecto de IL-12 sobre ERK1/2. La activación de ERK1/2 podría deberse tanto a una interacción directa de JAK2 con Raf [573] como a la activación de un mecanismo alternativo que desemboque en la activación de la ruta [572].



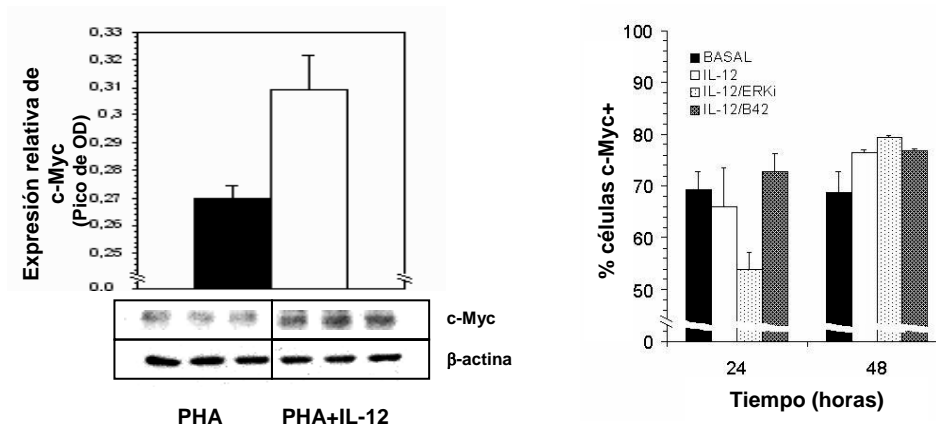
**Figura 47. La activación de ERK1/2 está mediada por JAK2.** Linfoblastos cultivados 3 días con 10 $\mu$ g/ml de PHA, fueron lavados y resuspendidos en medio completo con o sin inhibidores (ambos 25mM). Las células fueron activadas 5 minutos a 37°C con anti-CD3+GAM (control positivo, panel superior) o con IL-12 (panel inferior). Al nivel basal se le ha asignado un valor de 1 (barra azul), y el resto de valores se han relativizado respecto a éste. Se presenta media y desviación estándar de triplicados. Es un experimento representativo de n=3.

### 3.2.2.7 c-Myc no es diana de ERK1/2, pero está relacionado con la proliferación inducida por IL-12

Una vez conocido que el efecto proliferativo de IL-12 está mediado por IL-12R $\beta$ 2/JAK2, y que JAK2 activa a ERK1/2 de una forma directa nos preguntamos cuál podía ser la diana de esta kinasa. Su función principal es la de fosforilar, sobre todo, a factores de transcripción que inician la producción de proteínas previas al proceso de división celular. En 2001, Sugimoto *et al.*, describieron en sistema murino como IL-12 incrementaba los niveles de c-Myc [294]. Este factor de transcripción está implicado en gran número de procesos proliferativos, y su fosforilación en Ser62 (entre otras, por la ERK1/2) ha sido relacionada con ellos, aunque hay controversia a este respecto [574, 575]. En principio, c-Myc parecía un buen candidato como diana de ERK1/2 en respuesta a IL-12.

En la Figura 48, podemos ver como en humanos se confirman los resultados obtenidos en ratón [294] y existe un ligero aumento en los niveles de c-Myc, tal y como se observa al medir la densidad óptica media de la señal de c-Myc en Western Blot de lisados de células cultivadas para maximizar el efecto proliferativo de IL-12 (5 días, 1.25 $\mu$ g/ml de PHA, 2ng/ml de IL-12, 0.25x10<sup>6</sup>células/ml). Sin embargo, estudiando los niveles de esta proteína mediante citometría en linfoblastos preactivados con PHA (3 días, 1.5 $\mu$ g/ml de PHA) y estimulados diferentes tiempos con 2ng/ml de IL-12 (Figura 49B), observamos que es necesario un período de al menos 48h para que aumenten los niveles de c-Myc. De los resultados empleando inhibidores tanto de ERK1/2 como de JAK2, sólo el ERKi fue capaz de disminuir algo los niveles de c-Myc las primeras 24h, mientras que

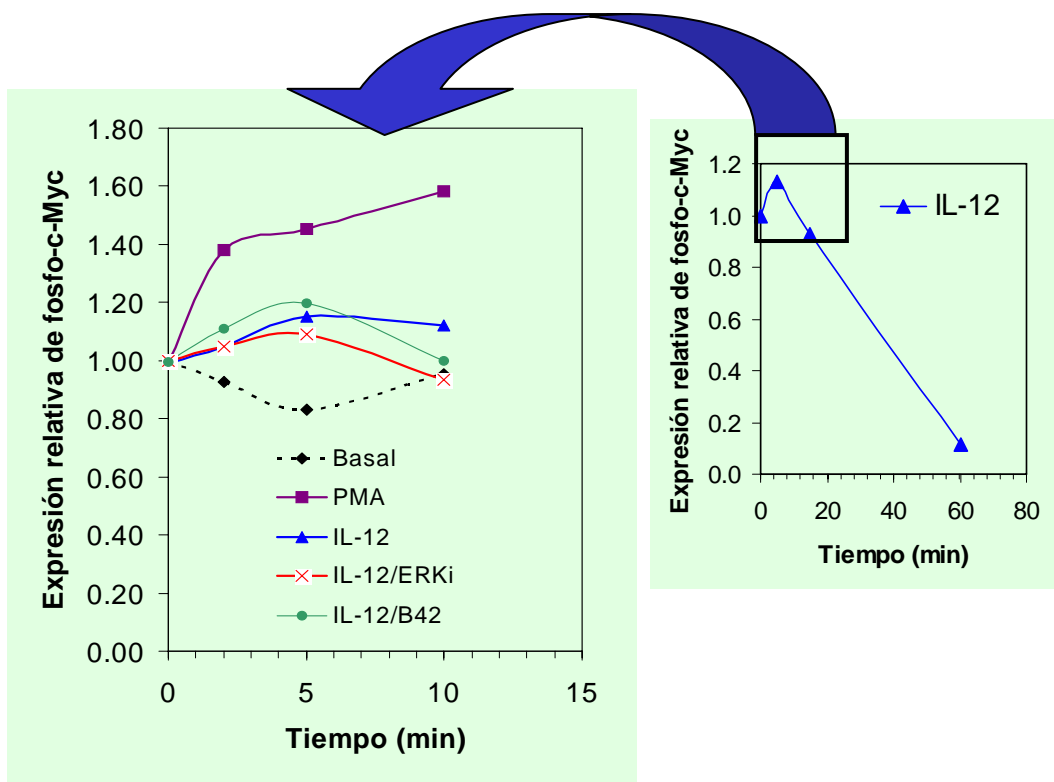
Tyrphostin B42 no mostró ninguna variación; esto nos indica que ni ERK1/2 ni JAK2 regulan los niveles de expresión de esta proteína.



**Figura 48. Interleukina 12 incrementa los niveles de c-Myc pero no a través de ERK1/2 o JAK2.** A) Western blot (n=3) de células activadas 5 días en presencia de PHA (1.5µg/ml) e IL-12 (2ng/ml), con una densidad de  $0.25 \times 10^6$  células/ml. Se representa la media de la intensidad de densidad óptica de los triplicados. B) Porcentaje de células que expresan c-myc tras ser estimuladas con IL-12, 24 ó 48h. Las células fueron activadas 3 días en presencia de PHA (10µg/ml) y se les añadió IL-12 (2ng/ml) por el tiempo indicado, después se marcaron con anti-c-Myc FITC, para su lectura en un citómetro de flujo. Se presenta media y desviación estándar de triplicados. Es un experimento representativo de n=3.

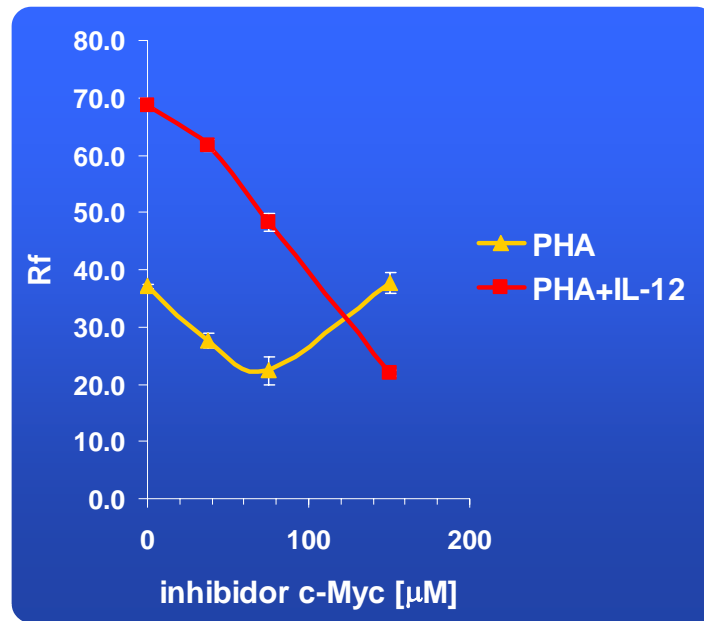
Se sabe que c-Myc tiene un ciclo de vida muy corto, y contiene varios residuos susceptibles de ser fosforilados; las MAPK y las CDK (quinasas dependientes de ciclinas) fosforilan la Ser62, mientras que la GSK3 (glycogen synthase kinase 3) lo hace posteriormente en la Thr58. La primera de estas fosforilaciones estabiliza la proteína, mientras que la segunda promueve su degradación [574]; también influyen en la formación del dímero Myc/Max, la activación de la transcripción y la proliferación celular [550, 576]. Descartado que JAK2 o ERK1/2 regulasen la expresión de c-Myc, nos propusimos comprobar si IL-12 influía sobre el grado de fosforilación de c-Myc, para lo cual empleamos un anticuerpo que reconoce la fosforilación de c-Myc sólo en Thr58 o en Ser62/Thr58. Mediante citometría de flujo, analizamos el grado de fosforilación de c-

Myc en linfoblastos activados 3 días con PHA (10 $\mu$ g/ml), y estimulados bien con IL-12, bien con PMA como control de activación (Figura 49). Podemos observar como la interleukina sólo produce un ligero aumento de la fosforilación de c-Myc con un pico a los 5 minutos, que decae rápidamente, incluso, por debajo de los niveles iniciales. Ninguno de los inhibidores específicos de ERK1/2 o de JAK2 fue capaz de disminuir este efecto, lo que nos está indicando que ninguna de estas kinasas influye de forma directa sobre la fosforilación de c-Myc.



**Figura 49. La fosforilación de c-Myc inducida por IL-12 no depende de JAK2 o ERK1/2.** Linfoblastos activados 3 días con PHA y estimulados con IL-12 en presencia o no de inhibidores fueron marcados con anti-fosfo-c-Myc. Como control de activación se empleó PMA. Es un experimento representativo de n=3.

Una vez comprobado que el efecto proliferativo mediado por ERK1/2 y JAK2 no está ligado directamente a c-Myc, nos preguntamos el porqué de ese ligero aumento de la expresión de c-Myc en respuesta a la IL-12 (Figura 48). Teniendo en cuenta su papel como proto-oncogen, pensamos que ese sutil incremento pudiera estar relacionado con la inducción de la proliferación. Nuevamente, combinamos el marcaje con CFSE y el uso de inhibidores de c-Myc, para comprobar si este factor de transcripción participa en la regulación de la proliferación inducida por IL-12. El inhibidor escogido fue (Z,E)-5-(4-Ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one, un compuesto que impide la formación del dímero Myc/Max, y por tanto, la activación de los genes diana de c-Myc [577]. Podemos comprobar en la Figura 50 como, cultivando las células 5 días (1.25µg/ml de PHA+2ng de IL-12, 0.25x10<sup>6</sup>células/ml) en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (0-150µM), se reduce de forma significativa el efecto proliferativo inducido por la IL-12, al igual que la proliferación dependiente del mitógeno PHA. Estos datos, por tanto, nos indican que debe existir un mecanismo (o mecanismos) común a TCR e IL-12 que controle la proliferación celular, dado que la inhibición de c-Myc es capaz de reducir los niveles de proliferación tanto de las células tratadas con PHA como PHA+IL-12. Puede observarse, además, como con una concentración muy elevada de inhibidor como es 150µM, en presencia de exclusivamente de PHA, el porcentaje de proliferación aumenta, posiblemente debido a la activación de mecanismos alternativos a c-Myc; este efecto no pudo ser observado en presencia de IL-12.



**Figura 50. c-Myc participa en el proceso proliferativo mediado por IL-12.** PBMCs marcadas con CFSE y cultivadas 5 días en presencia de PHA (1.25μg/ml) o PHA+IL-12 (2ng/ml) a  $0.25 \times 10^6$  células/ml, en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de c-Myc. Se representa a la derecha Rf: porcentaje de células divididas al menos una vez. Se presenta media y desviación estándar de triplicados. Es un experimento representativo de n=3.

Podemos pues afirmar que c-Myc participa en el proceso proliferativo inducido por la IL-12, dado que esta citokina es capaz de aumentar ligeramente sus niveles de expresión, y hemos podido inhibir la proliferación impidiendo la unión de c-Myc al DNA. Además, la expresión de c-Myc está en parte regulada por ERK1/2, dado que sólo ERKi fue capaz de disminuir durante las primeras 24h sus niveles de expresión. Sin embargo, c-Myc no es fosforilado ni por JAK2 ni por ERK1/2, lo que descarta que sea alguna de estas kinasas la responsable del ligero aumento de la fosforilación observado a los 5 minutos de la exposición a la interleukina. Estos resultados sobre la fosforilación de c-Myc concuerdan con Lutterbach *et al.*[578], que indicaban que a pesar de la posible interacción física de las MAPK y c-Myc en experimentos *in vitro*, éstas no

fosforilan *in vivo* en Ser62 a este factor de transcripción. Por lo tanto, aunque c-Myc participa en el proceso proliferativo inducido por IL-12, y ERK1/2 es, en parte, responsable de este efecto, no es mediante un mecanismo común a JAK2-ERK1/2.



---

*CONCLUSIONES Y MODELO FINAL*

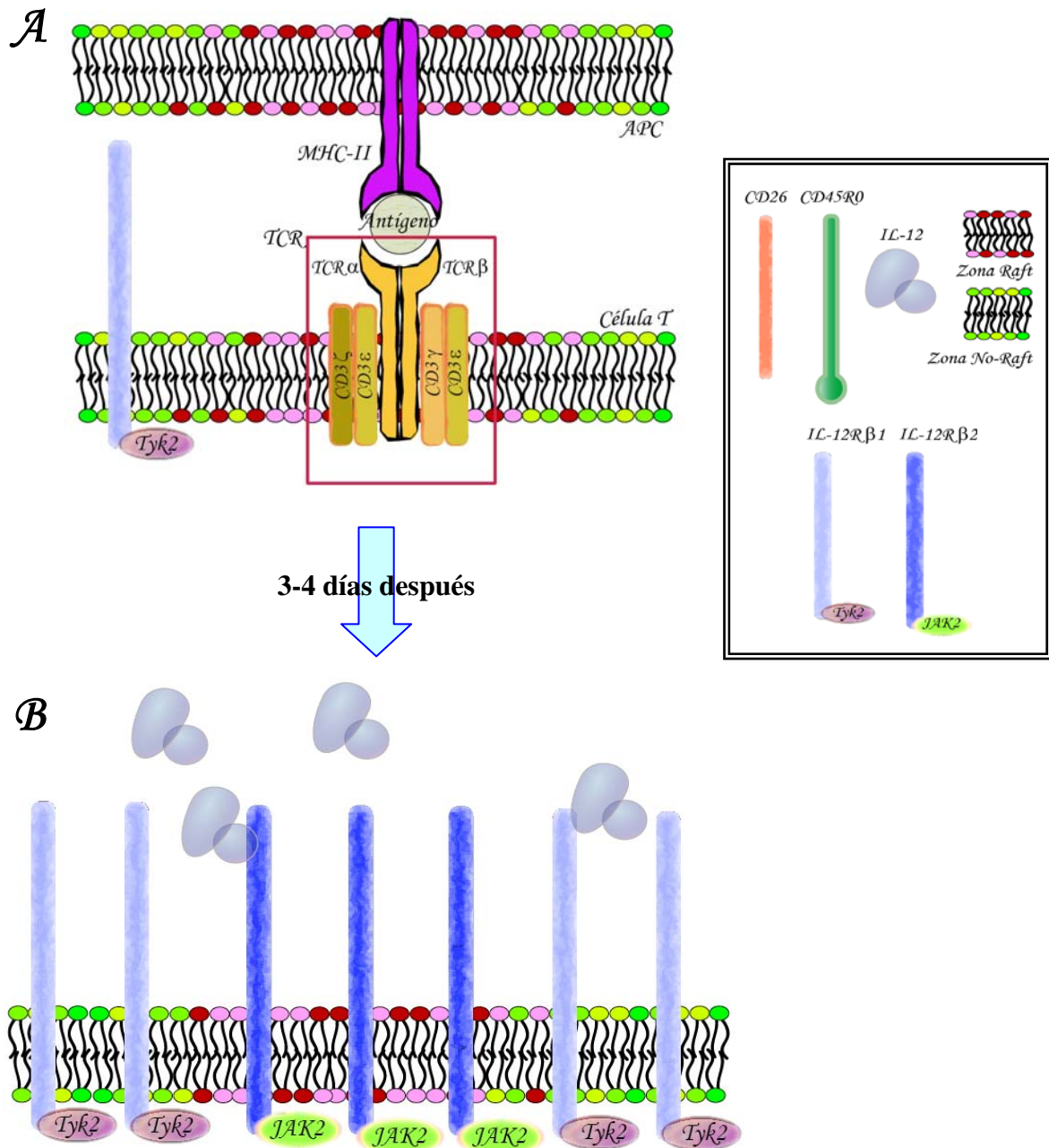


## 4 CONCLUSIONES Y MODELO FINAL

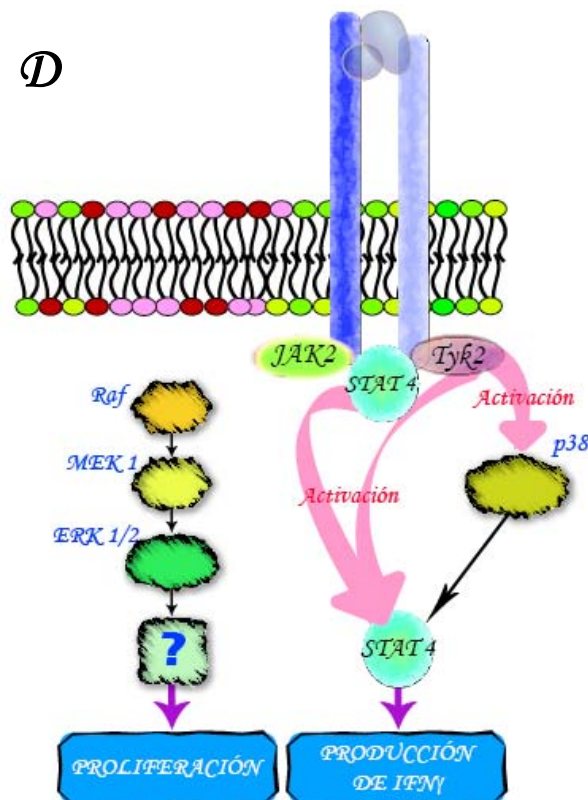
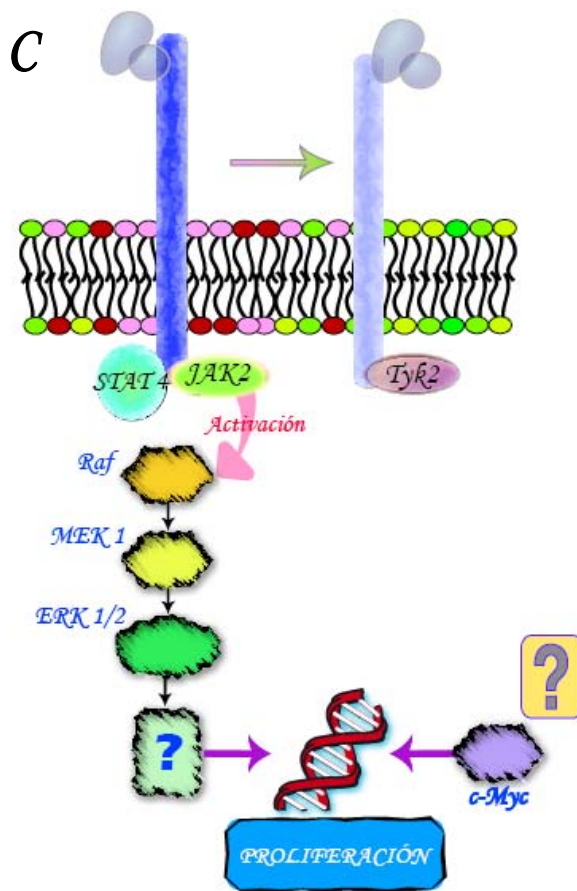
De los resultados obtenidos a lo largo de estos cinco años de investigación que presento y defendiendo con el fin de obtener el Grado de Doctora en Biología puedo concluir que:

- ❖ Con respecto al receptor de alta afinidad de Interleukina 12 podemos afirmar que mientras IL-12R $\beta$ 1 se halla en zona no raft y permanece en ella pese a la unión de la interleukina, IL-12R $\beta$ 2 se encuentra en microdominios ricos en colesterol/esfingolípidos, denominados raft, y se desplaza fuera de ellos en respuesta al ligando.
- ❖ La Interleukina 12 provoca la fosforilación y activación de las rutas de MAPKs: Raf-MEK1-ERK1/2 y de p38, pero no de JNK1/2.
- ❖ La proliferación inducida por IL-12 es un efecto dependiente de la densidad celular y la concentración del mitógeno, y está vinculada a la actividad de la kinasa JAK2.
- ❖ CD26 es un marcador de proliferación dependiente de IL-12, ya que su expresión está, también, ligada a la función de JAK2.
- ❖ La activación de ERK1/2 depende de IL-12R $\beta$ 2/JAK2, y necesita de la integridad de los rafts lipídicos. Esta MAPK participa en la proliferación de los linfocitos en respuesta a IL-12.
- ❖ c-Myc no es fosforilado directamente en respuesta a la IL-12 ni por JAK2 ni por ERK1/2, pero su incremento de expresión está relacionado con el efecto proliferativo de esta interleukina.

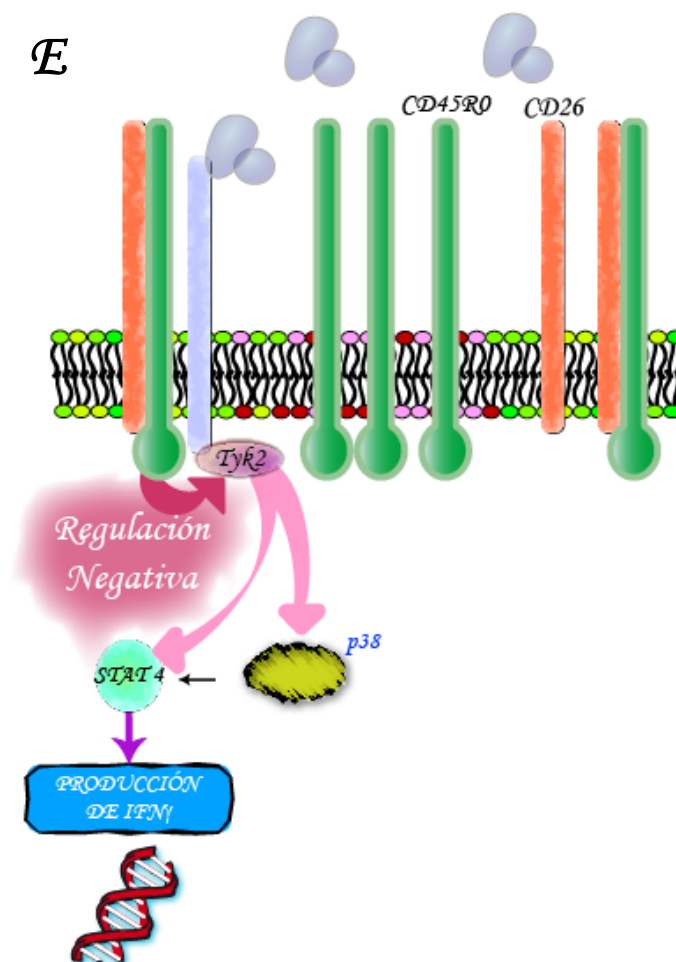
Con la idea de presentar todos estos resultados y conclusiones de una manera integrada y ordenada, que permita visualizar el mecanismo mediante el cual los rafts lipídicos participan en el control de la actividad proliferativa mediada por la Interleukina 12 proponemos el siguiente modelo de regulación. Éste está basado en las posibles interacciones entre las diversas proteínas estudiadas a lo largo de este trabajo, y no es incompatible con la existencia de una regulación mediada por proteínas SOCS:



La activación de los linfoblastos vía TCR (A) provoca un aumento de los niveles de constitutivos de IL-12Rβ1, y, sobre todo, de la cantidad de IL-12Rβ2 al 3<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> día post-activación vía TCR. La aparición de IL-12Rβ2 marca el inicio de la respuesta a la Interleukina 12. Como hemos visto, IL-12Rβ2 se hallaría inicialmente en microdominios raft e IL-12Rβ1 en regiones no-raft (B). Tras la unión de la interleukina ambos se unirían para formar el receptor de alta afinidad.



La afinidad levemente mayor de IL-12Rβ2 por IL-12 haría que se activase su kinasa asociada, JAK2, en zona raft (C). Esta kinasa sería la responsable de mediar el efecto proliferativo activando a la MAPK ERK1/2. De forma simultánea, se desplazaría hacia regiones no-raft (C). Con la activación vía TCR los niveles de STAT4 habrían aumentado, y el complejo IL12Rβ2/JAK2/STAT4 se uniría a IL-12Rβ1/Tyk2 en zona no-raft (D). Tyk2 podría, entonces, fosforilar a STAT4, que dimerizará y se translocará al núcleo (donde será fosforilada por p38, también activada por IL-12) para iniciar la producción de IFNγ. Es lógico pensar que, dentro del proceso proliferativo, aumenten los niveles de c-Myc, y que el dímero Myc/Max active genes relacionados con la división celular, además de los que sean diana directa de ERK1/2.



Por otro lado, IL-12 provocaría, en un proceso mediado por JAK2, un incremento de los niveles de CD26 y el desplazamiento de la fosfatasa CD45R0 hacia zona no-raft por CD26, dos efectos que son claramente observables a los 5 días de activación de los cultivos con IL-12. Dado que CD45R0 ha sido implicada en la defosforilación de JAK kinasas, y teniendo en cuenta que al quinto día los niveles de IL-12R $\beta$ 2 no son detectables, su función estaría relacionada con la desactivación de Tyk2 que, asociada a IL-12R $\beta$ 1, aún estaría promoviendo la producción de IFN $\gamma$ .



---

## *BIBLIOGRAFIA*



## 5 BIBLIOGRAFÍA

1. Helmreich, E.J.M., *The biochemistry of cell signalling*. 2001, Oxford ; New York: Oxford University Press. xxiii, 308 p.
2. Pawson, T. and P. Nash, *Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains*. *Science*, 2003. **300**(5618): p. 445-52.
3. Pawson, T., *Protein modules and signalling networks*. *Nature*, 1995. **373**(6515): p. 573-80.
4. Balkwill, F.R., *Cytokine cell biology : a practical approach*. 3rd ed. Practical approach series. 2000, New York: Oxford University Press. xxix, 254 p., [4] p. of plates.
5. Balkwill, F.R., *Cytokine molecular biology : a practical approach*. 3rd ed. Practical approach series. 2000, New York: Oxford University Press. xxii, 201 p.
6. Miyajima, A., et al., *Cytokine receptors and signal transduction*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 295-331.
7. Ihle, J.N., *Cytokine receptor signalling*. *Nature*, 1995. **377**(6550): p. 591-4.
8. Ihle, J.N., et al., *Jaks and Stats in cytokine signaling*. *Stem Cells*, 1997. **15 Suppl 1**: p. 105-11; discussion 112.
9. Taniguchi, T., *Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases*. *Science*, 1995. **268**(5208): p. 251-5.
10. Welham, M.J., V. Duronio, and J.W. Schrader, *Interleukin-4-dependent proliferation dissociates p44erk-1, p42erk-2, and p21ras activation from cell growth*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(8): p. 5865-73.
11. Welham, M.J., et al., *Multiple hemopoietic growth factors stimulate activation of mitogen-activated protein kinase family members*. *J Immunol*, 1992. **149**(5): p. 1683-93.
12. Marshall, C.J., *Ras effectors*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(2): p. 197-204.
13. Krauss, G., *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 3rd completely rev. ed. 2003, Weinheim: Wiley-VCH. xvi, 541 p.
14. Myung, P.S., N.J. Boerthe, and G.A. Koretzky, *Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(3): p. 256-66.
15. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 153-83.
16. Lee, J.T., Jr. and J.A. McCubrey, *The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia*. *Leukemia*, 2002. **16**(4): p. 486-507.
17. Velazquez, L., et al., *A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway*. *Cell*, 1992. **70**(2): p. 313-22.
18. Yan, R., et al., *Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development*. *Cell*, 1996. **84**(3): p. 421-30.

19. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. *Cell*, 1995. **82**(2): p. 241-50.
20. Endo, T.A., et al., *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. *Nature*, 1997. **387**(6636): p. 921-4.
21. Naka, T., et al., *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor*. *Nature*, 1997. **387**(6636): p. 924-9.
22. Naka, T., et al., *SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 535-45.
23. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. *Nature*, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
24. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. *Stem Cells*, 2001. **19**(5): p. 378-87.
25. Boussiotis, V.A., et al., *Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1*. *Science*, 1997. **278**(5335): p. 124-8.
26. Karnovsky, M.J., et al., *The concept of lipid domains in membranes*. *J Cell Biol*, 1982. **94**(1): p. 1-6.
27. Tron, L., et al., *Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis*. *Biophys J*, 1984. **45**(5): p. 939-46.
28. Szollosi, J., et al., *Fluorescence energy transfer measurements on cell surfaces: a critical comparison of steady-state fluorimetric and flow cytometric methods*. *Cytometry*, 1984. **5**(2): p. 210-6.
29. Matko, J. and M. Edidin, *Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces*. *Methods Enzymol*, 1997. **278**: p. 444-62.
30. Damjanovich, S., R. Gaspar, Jr., and C. Pieri, *Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane*. *Q Rev Biophys*, 1997. **30**(1): p. 67-106.
31. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, 1972. **175**(23): p. 720-31.
32. Mouritsen, O.G. and K. Jorgensen, *Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: a mesoscopic vehicle for membrane function?* *Bioessays*, 1992. **14**(2): p. 129-36.
33. Glebov, O.O. and B.J. Nichols, *Distribution of lipid raft markers in live cells*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 5): p. 673-5.
34. Magee, T., et al., *Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling*. *Biol Res*, 2002. **35**(2): p. 127-31.
35. Douglass, A.D. and R.D. Vale, *Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells*. *Cell*, 2005. **121**(6): p. 937-50.
36. Brown, D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. *Cell*, 1992. **68**(3): p. 533-44.

37. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
38. Parton, R.G., *Caveolae and caveolins*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 542-8.
39. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 257-83.
40. Edidin, M., *Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts*. Sci STKE, 2001. **2001**(67): p. PE1.
41. Helms, J.B. and C. Zurzolo, *Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 247-54.
42. Alonso, M.A. and J. Millan, *The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 22): p. 3957-65.
43. Binder, W.H., V. Barragan, and F.M. Menger, *Domains and rafts in lipid membranes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(47): p. 5802-27.
44. Dykstra, M., et al., *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 457-81.
45. Matko, J. and J. Szollosi, *Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated?* Immunol Lett, 2002. **82**(1-2): p. 3-15.
46. Hooper, N.M., *Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review)*. Mol Membr Biol, 1999. **16**(2): p. 145-56.
47. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
48. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
49. Langlet, C., et al., *Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 250-5.
50. Mukherjee, A., L. Arnaud, and J.A. Cooper, *Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40806-14.
51. van der Goot, F.G. and T. Harder, *Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack*. Semin Immunol, 2001. **13**(2): p. 89-97.
52. Rao, R., et al., *Lipid rafts in cytokine signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(2-3): p. 103-10.
53. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 375-96.
54. Gri, G., et al., *The inner side of T cell lipid rafts*. Immunol Lett, 2004. **94**(3): p. 247-52.
55. Thompson, T.E., et al., *Effects of domain structure on in-plane reactions and interactions*. Mol Membr Biol, 1995. **12**(1): p. 157-62.
56. Horejsi, V., et al., *GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors*. Immunol Today, 1999. **20**(8): p. 356-61.

57. Melkonian, K.A., et al., *Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3910-7.
58. van't Hof, W. and M.D. Resh, *Dual fatty acylation of p59(Fyn) is required for association with the T cell receptor zeta chain through phosphotyrosine-Src homology domain-2 interactions.* J Cell Biol, 1999. **145**(2): p. 377-89.
59. Rodgers, W., B. Crise, and J.K. Rose, *Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5384-91.
60. Shenoy-Scaria, A.M., et al., *Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6385-92.
61. Koegl, M., et al., *Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif.* Biochem J, 1994. **303** ( Pt 3): p. 749-53.
62. Prior, I.A., et al., *GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 368-75.
63. Webb, Y., L. Hermida-Matsumoto, and M.D. Resh, *Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids.* J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 261-70.
64. Liang, X., et al., *Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30987-94.
65. Zhang, W., R.P. Tribble, and L.E. Samelson, *LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation.* Immunity, 1998. **9**(2): p. 239-46.
66. Parolini, I., et al., *Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms.* J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14176-87.
67. Arcaro, A., et al., *Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function.* J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2068-76.
68. Field, K.A., D. Holowka, and B. Baird, *Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes.* J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1753-8.
69. Dykstra, M.L., R. Longnecker, and S.K. Pierce, *Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR.* Immunity, 2001. **14**(1): p. 57-67.
70. Scheiffele, P., M.G. Roth, and K. Simons, *Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain.* Embo J, 1997. **16**(18): p. 5501-8.
71. Qian, D. and A. Weiss, *T cell antigen receptor signal transduction.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 205-12.

72. Werlen, G. and E. Palmer, *The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 299-305.
73. Montixi, C., et al., *Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains*. *Embo J*, 1998. **17**(18): p. 5334-48.
74. Irlles, C., et al., *CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(2): p. 189-97.
75. Davidson, D., et al., *Phosphorylation-dependent regulation of T-cell activation by PAG/Cbp, a lipid raft-associated transmembrane adaptor*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(6): p. 2017-28.
76. Xavier, R., et al., *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. *Immunity*, 1998. **8**(6): p. 723-32.
77. Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee, *Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 447-61.
78. Valensin, S., et al., *F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(2): p. 435-46.
79. Hoessli, D.C., et al., *Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform*. *Glycoconj J*, 2000. **17**(3 -4): p. 191-7.
80. Harder, T. and K. Simons, *Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(2): p. 556-62.
81. Rodgers, W. and J. Zavzavadjian, *Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton*. *Exp Cell Res*, 2001. **267**(2): p. 173-83.
82. Villalba, M., et al., *Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells*. *J Cell Biol*, 2001. **155**(3): p. 331-8.
83. Wulfig, C. and M.M. Davis, *A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation*. *Science*, 1998. **282**(5397): p. 2266-9.
84. Moran, M. and M.C. Miceli, *Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation*. *Immunity*, 1998. **9**(6): p. 787-96.
85. Wang, T.Y. and J.R. Silvius, *Cholesterol does not induce segregation of liquid-ordered domains in bilayers modeling the inner leaflet of the plasma membrane*. *Biophys J*, 2001. **81**(5): p. 2762-73.
86. McIntosh, T.J., et al., *Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers*. *Biochemistry*, 1992. **31**(7): p. 2012-20.

87. Foster, L.J., C.L. De Hoog, and M. Mann, *Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5813-8.
88. Heerklotz, H., *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*. Biophys J, 2002. **83**(5): p. 2693-701.
89. Magee, A.I., J. Adler, and I. Parmryd, *Cold-induced coalescence of T-cell plasma membrane microdomains activates signalling pathways*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 14): p. 3141-51.
90. Drevot, P., et al., *TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts*. Embo J, 2002. **21**(8): p. 1899-908.
91. Mayor, S., K.G. Rothberg, and F.R. Maxfield, *Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1948-51.
92. Silvius, J.R., *Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 1034-45.
93. Kenworthy, A.K., N. Petranova, and M. Edidin, *High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1645-55.
94. Kenworthy, A.K., et al., *Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface*. J Cell Biol, 2004. **165**(5): p. 735-46.
95. Sharma, P., et al., *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes*. Cell, 2004. **116**(4): p. 577-89.
96. Pizzo, P., et al., *Lipid rafts and T cell receptor signaling: a critical re-evaluation*. Eur J Immunol, 2002. **32**(11): p. 3082-91.
97. Rouquette-Jazdanian, A.K., et al., *Reevaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signaling*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 105-22.
98. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Lipid Rafts & Co.: an integrated model of membrane organization in T cell activation*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(3): p. 187-202.
99. Fujiwara, T., et al., *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane*. J Cell Biol, 2002. **157**(6): p. 1071-81.
100. Kusumi, A., et al., *Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules*. Semin Immunol, 2005. **17**(1): p. 3-21.
101. Axelrod, D., et al., *Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4594-8.
102. Chang, C.H., et al., *Lateral mobility of erythrocyte membrane proteins studied by the fluorescence photobleaching recovery technique*. J Biochem (Tokyo), 1981. **90**(4): p. 997-1004.
103. Thomas, J.L., et al., *Large-scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 795-802.

104. Hegener, O., et al., *Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells*. *Biochemistry*, 2004. **43**(20): p. 6190-9.
105. Murase, K., et al., *Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques*. *Biophys J*, 2004. **86**(6): p. 4075-93.
106. Sako, Y. and A. Kusumi, *Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis*. *J Cell Biol*, 1994. **125**(6): p. 1251-64.
107. Sako, Y., et al., *Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton*. *J Cell Biol*, 1998. **140**(5): p. 1227-40.
108. Sako, Y. and A. Kusumi, *Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether*. *J Cell Biol*, 1995. **129**(6): p. 1559-74.
109. Schutz, G.J., et al., *Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy*. *Embo J*, 2000. **19**(5): p. 892-901.
110. Vrljic, M., et al., *Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells*. *Biophys J*, 2002. **83**(5): p. 2681-92.
111. Subczynski, W.K. and A. Kusumi, *Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1610**(2): p. 231-43.
112. Owicki, J.C. and H.M. McConnell, *Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol*. *Biophys J*, 1980. **30**(3): p. 383-97.
113. Smith, L.M., et al., *Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol*. *Biochemistry*, 1980. **19**(25): p. 5907-11.
114. Ike, H., et al., *Mechanism of Lck recruitment to the T-cell receptor cluster as studied by single-molecule-fluorescence video imaging*. *Chemphyschem*, 2003. **4**(6): p. 620-6.
115. Dustin, M.L. and J.A. Cooper, *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 23-9.
116. Sheets, E.D., et al., *Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane*. *Biochemistry*, 1997. **36**(41): p. 12449-58.
117. Dietrich, C., et al., *Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking*. *Biophys J*, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 274-84.
118. Schade, A.E. and A.D. Levine, *Lipid raft heterogeneity in human peripheral blood T lymphoblasts: a mechanism for regulating the initiation of TCR signal transduction*. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2233-9.

119. Kiyokawa, E., et al., *Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24072-84.
120. Kusumi, A., I. Koyama-Honda, and K. Suzuki, *Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 213-30.
121. Lai, E.C., *Lipid rafts make for slippery platforms*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 365-70.
122. Campbell, S.M., S.M. Crowe, and J. Mak, *Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions*. J Clin Virol, 2001. **22**(3): p. 217-27.
123. Sedwick, C.E. and A. Altman, *Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function*. Sci STKE, 2002. **2002**(122): p. RE2.
124. Schroeder, F., et al., *Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(10): p. 873-90.
125. Fantini, J., et al., *Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases*. Expert Rev Mol Med, 2002. **2002**: p. 1-22.
126. Marmor, M.D. and M. Julius, *Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1489-97.
127. Goebel, J., et al., *Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 199-206.
128. Vereb, G., et al., *Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6013-8.
129. Matko, J., et al., *GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines*. Eur J Biochem, 2002. **269**(4): p. 1199-208.
130. Vamosi, G., et al., *IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11082-7.
131. Leitinger, B. and N. Hogg, *The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 5): p. 963-72.
132. Manes, S., et al., *From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 320-6.
133. Manes, S., et al., *Membrane raft microdomains in chemokine receptor function*. Semin Immunol, 2001. **13**(2): p. 147-57.
134. Subramaniam, P.S. and H.M. Johnson, *Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1959-69.
135. Minami, Y., et al., *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 245-68.

136. Johnston, J.A., et al., *Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(4): p. 441-52.
137. Tilney, N.L., T.B. Strom, and L.C. Paul, *Transplantation biology : cellular and molecular aspects*. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven. xxiv, 740 p.
138. Hemar, A., et al., *Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 55-64.
139. Fra, A.M., et al., *Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae*. J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30745-8.
140. Subtil, A. and A. Dautry-Varsat, *Microtubule depolymerization inhibits clathrin coated-pit internalization in non-adherent cell lines while interleukin 2 endocytosis is not affected*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 19): p. 2441-7.
141. Hou, J., et al., *Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 321-9.
142. Goebel, J., et al., *STAT5 pathway: target of anti-CD4 antibody in attenuation of IL-2 receptor signaling*. Transplantation, 2001. **71**(6): p. 792-6.
143. Bacon, C.M., S.S. Cho, and J.J. O'Shea, *Signal transduction by interleukin-12 and interleukin-2. A comparison and contrast*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **795**: p. 41-59.
144. Harder, T. and K. Simons, *Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(4): p. 534-42.
145. Minami, Y., et al., *Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck*. Embo J, 1993. **12**(2): p. 759-68.
146. Li, Q., et al., *Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts*. Eur J Nutr, 2006. **45**(3): p. 144-51.
147. Li, Q., et al., *Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts*. J Lipid Res, 2005. **46**(9): p. 1904-13.
148. Takaoka, A., et al., *Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2357-60.
149. Triantafilou, M., et al., *Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2603-11.
150. Roepstorff, K., et al., *Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18954-60.

151. Wolf, S.F., et al., *Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells*. J Immunol, 1991. **146**(9): p. 3074-81.
152. Kobayashi, M., et al., *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
153. Stern, A.S., et al., *Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6808-12.
154. Schoenhaut, D.S., et al., *Cloning and expression of murine IL-12*. J Immunol, 1992. **148**(11): p. 3433-40.
155. Gately, M.K., et al., *Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)*. J Immunol, 1991. **147**(3): p. 874-82.
156. Gubler, U., et al., *Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4143-7.
157. Podlaski, F.J., et al., *Molecular characterization of interleukin 12*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(1): p. 230-7.
158. Sieburth, D., et al., *Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5*. Genomics, 1992. **14**(1): p. 59-62.
159. Huising, M.O., et al., *The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family*. Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1519-33.
160. Kaiser, P., et al., *Evolution of the interleukins*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 375-94.
161. Merberg, D.M., S.F. Wolf, and S.C. Clark, *Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family*. Immunol Today, 1992. **13**(2): p. 77-8.
162. Gearing, D.P. and D. Cosman, *Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor*. Cell, 1991. **66**(1): p. 9-10.
163. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
164. Alber, G., et al., *Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006(56): p. 107-27.
165. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
166. Pflanz, S., et al., *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 779-90.

167. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
168. Schulz, O., et al., *CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 453-62.
169. D'Andrea, A., et al., *Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1387-98.
170. Wysocka, M., et al., *Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 672-6.
171. Carra, G., F. Gerosa, and G. Trinchieri, *Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4752-61.
172. Heinzl, F.P., et al., *In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4381-8.
173. Gillessen, S., et al., *Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist*. Eur J Immunol, 1995. **25**(1): p. 200-6.
174. Watford, W.T., et al., *The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 361-8.
175. Grohmann, U., et al., *IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 315-23.
176. Belladonna, M.L., et al., *IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5448-54.
177. Grohmann, U., et al., *Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 221-7.
178. Pflanz, S., et al., *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2225-31.
179. Villarino, A.V., E. Huang, and C.A. Hunter, *Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 715-20.
180. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
181. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
182. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
183. Reis e Sousa, C., et al., *In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas*. J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1819-29.

184. Gazzinelli, R.T., et al., *Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1994. **153**(6): p. 2533-43.
185. Scharton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4045-54.
186. Dalod, M., et al., *Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 517-28.
187. Ma, X., et al., *Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10389-95.
188. Aliberti, J., et al., *CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 83-7.
189. Grumont, R., et al., *c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1021-32.
190. Ma, X. and G. Trinchieri, *Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells*. Adv Immunol, 2001. **79**: p. 55-92.
191. Snijders, A., et al., *Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit*. J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1207-12.
192. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
193. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
194. Hayes, M.P., F.J. Murphy, and P.R. Burd, *Interferon-gamma-dependent inducible expression of the human interleukin-12 p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4645-51.
195. Ma, X., et al., *The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 147-57.
196. D'Andrea, A., et al., *Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 537-46.
197. Marshall, J.D., et al., *Priming with IL-4 and IL-13 during HIV-1 infection restores in vitro IL-12 production by mononuclear cells of HIV-infected patients*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5705-14.
198. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.

199. Kalinski, P., et al., *IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1877-81.
200. Kato, T., et al., *Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3932-8.
201. Vaidyanathan, H., et al., *Differential response of the murine IL-12 p35 gene to lipopolysaccharide compared with interferon-gamma and CD40 ligation*. Cytokine, 2001. **16**(1): p. 1-9.
202. Aste-Amezaga, M., et al., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5936-44.
203. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1041-8.
204. Jankovic, D., et al., *In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 429-39.
205. Gazzinelli, R.T., et al., *In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 798-805.
206. Belkaid, Y., et al., *The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1497-506.
207. Du, C. and S. Sriram, *Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 92-7.
208. Cousens, L.P., et al., *Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1315-28.
209. Braun, M.C. and B.L. Kelsall, *Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors*. Microbes Infect, 2001. **3**(2): p. 99-107.
210. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 775-9.
211. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Regulation of IL-12 production by human monocytes and the influence of prostaglandin E2*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **795**: p. 147-57.
212. Jacobsen, S.E., O.P. Veiby, and E.B. Smeland, *Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 413-8.
213. Ploemacher, R.E., et al., *Interleukin-12 synergizes with interleukin-3 and steel factor to enhance recovery of murine hemopoietic stem cells in liquid culture*. Leukemia, 1993. **7**(9): p. 1381-8.

214. Hirayama, F., et al., *Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture*. *Blood*, 1994. **83**(1): p. 92-8.
215. Bellone, G. and G. Trinchieri, *Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis*. *J Immunol*, 1994. **153**(3): p. 930-7.
216. Bonnema, J.D., et al., *Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis*. *J Immunol*, 1994. **152**(5): p. 2098-104.
217. Gately, M.K., et al., *Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo*. *Int Immunol*, 1994. **6**(1): p. 157-67.
218. Chan, S.H., et al., *Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers*. *J Exp Med*, 1991. **173**(4): p. 869-79.
219. Perussia, B., et al., *Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells*. *J Immunol*, 1992. **149**(11): p. 3495-502.
220. Aste-Amezaga, M., et al., *Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells*. *Cell Immunol*, 1994. **156**(2): p. 480-92.
221. Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri, *Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells*. *J Exp Med*, 1994. **180**(1): p. 211-22.
222. Naume, B., et al., *Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(8): p. 1831-8.
223. Gazzinelli, R.T., et al., *Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(13): p. 6115-9.
224. Murphy, E.E., et al., *B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation*. *J Exp Med*, 1994. **180**(1): p. 223-31.
225. Goodman, R.E., et al., *Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN-gamma*. *J Immunol*, 1994. **152**(11): p. 5189-98.
226. Chan, S.H., et al., *Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2*. *J Immunol*, 1992. **148**(1): p. 92-8.

227. Walker, W., et al., *IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5894-901.
228. Hodge, D.L., et al., *Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(6): p. 1742-53.
229. Okamura, H., et al., *Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity*. Adv Immunol, 1998. **70**: p. 281-312.
230. Bazan, J.F., J.C. Timans, and R.A. Kastelein, *A newly defined interleukin-1? Nature*, 1996. **379**(6566): p. 591.
231. Barbulescu, K., et al., *IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3642-7.
232. Nakahira, M., et al., *Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1146-53.
233. Chang, J.T., et al., *The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1113-9.
234. Ohteki, T., et al., *Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1981-6.
235. Airoidi, I., et al., *Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6880-8.
236. Yang, J., et al., *Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 548-55.
237. Wu, C.Y., et al., *Cytokine regulation of IL-12 receptor beta2 expression: differential effects on human T and NK cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1364-74.
238. Sareneva, T., I. Julkunen, and S. Matikainen, *IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1933-8.
239. Park, W.R., et al., *CD28 costimulation is required not only to induce IL-12 receptor but also to render janus kinases/STAT4 responsive to IL-12 stimulation in TCR-triggered T cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1456-64.
240. Elloso, M.M. and P. Scott, *Differential requirement of CD28 for IL-12 receptor expression and function in CD4(+) and CD8(+) T cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(2): p. 384-95.
241. Carter, L.L. and K.M. Murphy, *Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1355-60.

242. Robertson, M.J., et al., *Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 779-88.
243. Chehimi, J., et al., *Natural killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus-infected patients*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 789-96.
244. Chehimi, J., et al., *Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells*. Eur J Immunol, 1993. **23**(8): p. 1826-30.
245. Gately, M.K., et al., *Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12*. Cell Immunol, 1992. **143**(1): p. 127-42.
246. Bloom, E.T. and J.A. Horvath, *Cellular and molecular mechanisms of the IL-12-induced increase in allospecific murine cytolytic T cell activity. Implications for the age-related decline in CTL*. J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4242-54.
247. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity*. Adv Immunol, 1998. **70**: p. 83-243.
248. Bontkes, H.J., et al., *Interleukin-12 increases proliferation and interferon-gamma production but not cytolytic activity of human antigen-specific effector memory cytotoxic T lymphocytes: power of the effect depends on the functional avidity of the T cell and the antigen concentration*. Hum Immunol, 2005. **66**(11): p. 1137-45.
249. Chizzonite, R., et al., *IL-12 receptor. I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3117-24.
250. Desai, B.B., et al., *IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3125-32.
251. Naume, B., et al., *Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation*. Cytokine, 1993. **5**(1): p. 38-46.
252. Naume, B., M. Gately, and T. Espevik, *A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2429-36.
253. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
254. Manetti, R., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
255. Afonso, L.C., et al., *The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against Leishmania major*. Science, 1994. **263**(5144): p. 235-7.
256. Seder, R.A., et al., *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes*

- interleukin 4 inhibition of such priming.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10188-92.
257. Manetti, R., et al., *Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones.* J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1273-83.
258. Gerosa, F., et al., *Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2559-69.
259. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent.* Int Immunol, 1993. **5**(9): p. 1119-28.
260. Noble, A., M.J. Thomas, and D.M. Kemeny, *Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells.* Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2227-35.
261. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.* Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
262. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.* Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
263. Heath, V.L., et al., *Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma.* J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2861-5.
264. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.
265. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.* Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
266. Szabo, S.J., et al., *Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells.* Science, 2002. **295**(5553): p. 338-42.
267. Metzger, D.W., et al., *Enhancement of humoral immunity by interleukin-12.* Ann N Y Acad Sci, 1996. **795**: p. 100-15.
268. Jelinek, D.F. and J.K. Braaten, *Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation.* J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1606-13.
269. Li, L., et al., *Interleukin-12 stimulates B cell growth by inducing IFN-gamma.* Cell Immunol, 1996. **168**(2): p. 133-40.
270. Dubois, B., et al., *Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes.* J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2223-31.
271. Metzger, D.W., et al., *The effects of IL12 on B-cell subset function.* Res Immunol, 1995. **146**(7-8): p. 499-505.

272. Gagro, A. and J. Gordon, *The interplay between T helper subset cytokines and IL-12 in directing human B lymphocyte differentiation*. Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3369-79.
273. Kuniwa, M., et al., *Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 262-6.
274. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 475-82.
275. Yoshimoto, T., et al., *Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3948-53.
276. Durali, D., et al., *In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4084-9.
277. Airoidi, I., et al., *The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1651-9.
278. Airoidi, I., et al., *Methylation of the IL-12Rbeta2 gene as novel tumor escape mechanism for pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cells*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3978-80.
279. Bacon, C.M., et al., *Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 399-404.
280. Zou, J., et al., *Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 6073-7.
281. Karaghiosoff, M., et al., *Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 549-60.
282. Neubauer, H., et al., *Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis*. Cell, 1998. **93**(3): p. 397-409.
283. Gollob, J.A., et al., *Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4120-6.
284. Ahn, H.J., et al., *Requirement for distinct Janus kinases and STAT proteins in T cell proliferation versus IFN-gamma production following IL-12 stimulation*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5893-900.
285. Morinobu, A., et al., *STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12281-6.
286. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
287. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
288. Bacon, C.M., et al., *Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7307-11.

289. Jacobson, N.G., et al., *Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1755-62.
290. Cho, S.S., et al., *Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4781-9.
291. Yu, C.R., et al., *Differential utilization of Janus kinase-signal transducer activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN-alpha*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 126-37.
292. Jacobson, N.G., et al., *Regulation of interleukin-12 signalling during T helper phenotype development*. Adv Exp Med Biol, 1996. **409**: p. 61-73.
293. Gollob, J.A., et al., *Altered interleukin-12 responsiveness in Th1 and Th2 cells is associated with the differential activation of STAT5 and STAT1*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1341-54.
294. Sugimoto, N., et al., *Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 243-51.
295. Naeger, L.K., et al., *Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 1875-8.
296. Wu, C., et al., *IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6221-8.
297. Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr., *Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4806-10.
298. Szabo, S.J., et al., *Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 665-75.
299. Nishikomori, R., et al., *Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4388-98.
300. Usui, T., et al., *GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet*. Immunity, 2003. **18**(3): p. 415-28.
301. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
302. Ota, N., et al., *N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 208-15.
303. Murphy, T.L., et al., *Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7121-31.
304. Chang, H.C., et al., *STAT4 requires the N-terminal domain for efficient phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32471-7.

305. Maritano, D., et al., *The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 401-9.
306. Hoey, T., et al., *Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4alpha and Stat4beta in IL-12 responses*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4237-48.
307. Decker, T. and P. Kovarik, *Serine phosphorylation of STATs*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2628-37.
308. Varinou, L., et al., *Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 793-802.
309. Shen, Y., et al., *Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 407-19.
310. Visconti, R., et al., *Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1844-52.
311. Gollob, J.A., et al., *The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4472-81.
312. Moriggl, R., et al., *Activation of STAT proteins and cytokine genes in human Th1 and Th2 cells generated in the absence of IL-12 and IL-4*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3385-92.
313. Lucas, S., et al., *IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15047-52.
314. Wang, K.S., J. Ritz, and D.A. Frank, *IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 299-304.
315. Strengell, M., et al., *IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5464-9.
316. Nguyen, K.B., et al., *Critical role for STAT4 activation by type I interferons in the interferon-gamma response to viral infection*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2063-6.
317. Rogge, L., et al., *The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6567-74.
318. Sinigaglia, F., D. D'Ambrosio, and L. Rogge, *Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm*. Dev Comp Immunol, 1999. **23**(7-8): p. 657-63.
319. Freudenberg, M.A., et al., *Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1665-8.
320. Wang, J., et al., *Dysregulated Sonic hedgehog signaling and medulloblastoma consequent to IFN-alpha-stimulated STAT2-independent*

- production of IFN-gamma in the brain. *J Clin Invest*, 2003. **112**(4): p. 535-43.
321. Pignata, C., et al., *Phosphorylation of src family lck tyrosine kinase following interleukin-12 activation of human natural killer cells*. *Cell Immunol*, 1995. **165**(2): p. 211-6.
322. Murphy, L.O. and J. Blenis, *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(5): p. 268-75.
323. Berenson, L.S., N. Ota, and K.M. Murphy, *Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved*. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 157-74.
324. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 55-72.
325. Athie, M.V., et al., *IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(5): p. 1425-34.
326. Zhang, S. and M.H. Kaplan, *The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression*. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1374-80.
327. Rincon, M., et al., *Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway*. *Embo J*, 1998. **17**(10): p. 2817-29.
328. Lu, H.T., et al., *Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice*. *Embo J*, 1999. **18**(7): p. 1845-57.
329. Yang, J., et al., *IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 157-64.
330. Lu, B., et al., *GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 583-90.
331. Li, B., et al., *Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation*. *Science*, 2000. **288**(5474): p. 2219-22.
332. Dong, C., et al., *Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2092-5.
333. Dong, Z., et al., *Activation of cytokine production, tumoricidal properties, and tyrosine phosphorylation of MAPKs in human monocytes by a new synthetic lipopeptide, JBT3002*. *J Leukoc Biol*, 1998. **63**(6): p. 766-74.
334. Yang, D.D., et al., *Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2*. *Immunity*, 1998. **9**(4): p. 575-85.
335. Brennan, P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F*. *Immunity*, 1997. **7**(5): p. 679-89.
336. Yoo, J.K., et al., *IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4+ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway*. *J Immunol*, 2002. **169**(7): p. 3637-43.
337. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 25851-4.

338. Yoshimoto, T., et al., *Positive modulation of IL-12 signaling by sphingosine kinase 2 associating with the IL-12 receptor beta 1 cytoplasmic region*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1352-9.
339. Liu, F., et al., *Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(ialpha2)-linked Rho kinase activity*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(6): p. 711-9.
340. Osawa, Y., et al., *TNF-alpha-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 173-80.
341. Igarashi, J. and T. Michel, *Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36281-8.
342. Watford, W.T., et al., *Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 139-56.
343. Diefenbach, A., et al., *Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity*. Science, 1999. **284**(5416): p. 951-5.
344. Chin, A.I., et al., *Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 190-4.
345. Al-Mohanna, F., et al., *IL-12-dependent nuclear factor-kappaB activation leads to de novo synthesis and release of IL-8 and TNF-alpha in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 995-1002.
346. Tato, C.M., et al., *Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to Toxoplasma gondii*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3139-46.
347. Alexander, W.S., et al., *SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine*. Cell, 1999. **98**(5): p. 597-608.
348. Eyles, J.L., et al., *Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43735-40.
349. Takatori, H., et al., *Stat5a inhibits IL-12-induced Th1 cell differentiation through the induction of suppressor of cytokine signaling 3 expression*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4105-12.
350. Yamamoto, K., et al., *SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(4): p. 1188-93.
351. Seki, Y., et al., *SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1047-54.
352. Matsumoto, A., et al., *A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 425-36.

353. Yu, C.R., et al., *Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29752-9.
354. Anderson, P., et al., *Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 and induction of suppressors of cytokine signalling in T(h)1 and T(h)2 cells*. Int Immunol, 2003. **15**(11): p. 1309-17.
355. Lovato, P., et al., *Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16777-81.
356. Lang, R., et al., *SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 546-50.
357. Croker, B.A., et al., *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 540-5.
358. Yasukawa, H., et al., *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 551-6.
359. Schmidt, D. and S. Muller, *PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2561-74.
360. Wormald, S. and D.J. Hilton, *Inhibitors of cytokine signal transduction*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 821-4.
361. Arora, T., et al., *PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21327-30.
362. Wang, K.S., E. Zorn, and J. Ritz, *Specific down-regulation of interleukin-12 signaling through induction of phospho-STAT4 protein degradation*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3860-6.
363. McIntyre, K.W., et al., *Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 2933-8.
364. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
365. Leonard, J.P., K.E. Waldburger, and S.J. Goldman, *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 381-6.
366. Malfait, A.M., et al., *Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(2): p. 377-83.
367. Ferber, I.A., et al., *Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 5-7.
368. Willenborg, D.O., et al., *IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3223-7.
369. Chu, C.Q., S. Wittmer, and D.K. Dalton, *Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 123-8.

370. Hunter, C.A., *New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 521-31.
371. Becher, B., B.G. Durell, and R.J. Noelle, *Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12*. J Clin Invest, 2002. **110**(4): p. 493-7.
372. Gran, B., et al., *IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 7104-10.
373. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
374. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
375. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
376. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
377. Nakae, S., et al., *IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5986-90.
378. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
379. Langrish, C.L., et al., *IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 96-105.
380. Taylor, G.A., C.G. Feng, and A. Sher, *p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 100-9.
381. Elkins, K.L., et al., *In vivo clearance of an intracellular bacterium, Francisella tularensis LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70*. Infect Immun, 2002. **70**(4): p. 1936-48.
382. Decken, K., et al., *Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4994-5000.
383. Lehmann, J., et al., *IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against Salmonella enteritidis*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5304-15.
384. Holscher, C., et al., *A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6957-66.
385. Carr, J.A., et al., *The role of endogenous interleukin-12 in resistance to murine cytomegalovirus (MCMV) infection and a novel action for endogenous IL-12 p40*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(10): p. 1145-52.

386. Lieberman, L.A., et al., *IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1887-93.
387. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
388. Happel, K.I., et al., *Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4432-6.
389. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 617-21.
390. Hunter, C.A., et al., *Cytokine mRNA in the central nervous system of SCID mice infected with Toxoplasma gondii: importance of T-cell-independent regulation of resistance to T. gondii*. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4038-44.
391. Suzuki, Y., et al., *Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2339-45.
392. Deckert-Schluter, M., et al., *Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3427-36.
393. Yap, G.S., et al., *Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1340-5.
394. Chen, Q., et al., *Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 916-20.
395. Yoshida, H., et al., *WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection*. Immunity, 2001. **15**(4): p. 569-78.
396. Takeda, A., et al., *Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 4886-90.
397. Hibbert, L., et al., *IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells*. J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(9): p. 513-22.
398. Kamiya, S., et al., *An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3871-7.
399. Robinson, D.S. and A. O'Garra, *Further checkpoints in Th1 development*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 755-8.
400. Casanova, J.L. and L. Abel, *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 581-620.

401. Artis, D., et al., *Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following Leishmania major infection*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4672-5.
402. Zahn, S., et al., *Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of Leishmania major*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1106-12.
403. Chiyo, M., et al., *Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals*. Int J Cancer, 2005. **115**(3): p. 437-42.
404. Matsui, M., et al., *Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9093-104.
405. Salcedo, R., et al., *IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7170-82.
406. Hisada, M., et al., *Potent antitumor activity of interleukin-27*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1152-6.
407. Larousserie, F., et al., *Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas: heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells*. Am J Pathol, 2005. **166**(4): p. 1217-28.
408. Villarino, A., et al., *The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 645-55.
409. Hamano, S., et al., *WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 657-67.
410. Holscher, C., et al., *The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3534-44.
411. Pearl, J.E., et al., *IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7490-6.
412. Villarino, A.V., et al., *Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7684-91.
413. Bancroft, A.J., et al., *WSX-1: a key role in induction of chronic intestinal nematode infection*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7635-41.
414. Smits, H.H., et al., *Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development*. Eur J Immunol, 2004. **34**(5): p. 1371-80.
415. Villarino, A.V., et al., *IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 237-47.
416. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.

417. Torimoto, Y., et al., *Biochemical characterization of CD26 (dipeptidyl peptidase IV): functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies*. Mol Immunol, 1992. **29**(2): p. 183-92.
418. Fleischer, B., *Dipeptidyl peptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response*. Molecular biology intelligence unit. 1995, Austin: R.G. Landes Co. 202p.
419. Goossens, F., et al., *The purification, characterization and analysis of primary and secondary-structure of prolyl oligopeptidase from human lymphocytes. Evidence that the enzyme belongs to the alpha/beta hydrolase fold family*. Eur J Biochem, 1995. **233**(2): p. 432-41.
420. Morimoto, C. and S.F. Schlossman, *The structure and function of CD26 in the T-cell immune response*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 55-70.
421. Fleischer, B., *CD26: a surface protease involved in T-cell activation*. Immunol Today, 1994. **15**(4): p. 180-4.
422. Hartel, S., et al., *Characterization of different forms of dipeptidyl peptidase IV from rat liver and hepatoma by monoclonal antibodies*. Adv Exp Med Biol, 1988. **240**: p. 207-14.
423. McCaughan, G.W., et al., *Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence*. Hepatology, 1990. **11**(4): p. 534-44.
424. Heike, M., et al., *Tissue distribution of the T cell activation antigen Ta1. Serological, immunohistochemical and biochemical investigations*. Clin Exp Immunol, 1988. **74**(3): p. 431-4.
425. Dinjens, W.N., et al., *Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(12): p. 1869-75.
426. McCaughan, G.W., et al., *Molecular pathogenesis of liver disease: an approach to hepatic inflammation, cirrhosis and liver transplant tolerance*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 172-91.
427. Dang, N.H., et al., *Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 3963-71.
428. Gerli, R., et al., *CD26 surface molecule involvement in T cell activation and lymphokine synthesis in rheumatoid and other inflammatory synovitis*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(1): p. 31-7.
429. Uematsu, T., et al., *Reduced expression of dipeptidyl peptidase (DPP) IV in peripheral blood T lymphocytes of oral cancer patients*. J Oral Pathol Med, 1996. **25**(9): p. 507-12.
430. Herrera, C., et al., *Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19532-9.
431. Cordero, O.J., et al., *Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 920-30.

432. Salgado, F.J., et al., *A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24849-57.
433. Cordero, O.J., et al., *Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes*. Immunobiology, 1997. **197**(5): p. 522-33.
434. Kahne, T., et al., *Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation*. Cell Immunol, 1996. **170**(1): p. 63-70.
435. Smith, R.E., et al., *The significance of hypersialylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in the inhibition of its activity by Tat and other cationic peptides. CD26: a subverted adhesion molecule for HIV peptide binding*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(10): p. 851-68.
436. Bauvois, B., et al., *Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Cancer, 1999. **79**(7-8): p. 1042-8.
437. Vanham, G., et al., *Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of HIV-infected subjects*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. **6**(7): p. 749-57.
438. Willheim, M., et al., *Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(3): p. 348-55.
439. Tanaka, S., et al., *Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV*. Int J Immunopharmacol, 1997. **19**(1): p. 15-24.
440. Rogge, L., et al., *Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 96-101.
441. Mizokami, A., et al., *Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1996. **23**(12): p. 2022-6.
442. Brezinschek, R.I., et al., *Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3062-77.
443. Gorrell, M.D., V. Gysbers, and G.W. McCaughan, *CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes*. Scand J Immunol, 2001. **54**(3): p. 249-64.
444. Kubota, T., et al., *Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an in vivo immune response*. Clin Exp Immunol, 1992. **89**(2): p. 192-7.
445. Ruiz, P., et al., *Dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity in human alloreactive T cell subsets varies with the stage of differentiation and activation status*. Transpl Immunol, 1997. **5**(2): p. 152-61.
446. Reinhold, D., et al., *Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes*. Immunol Lett, 1997. **58**(1): p. 29-35.

447. Blazquez, M.V., et al., *Selective decrease of CD26 expression in T cells from HIV-1-infected individuals*. J Immunol, 1992. **149**(9): p. 3073-7.
448. De Paoli, P., et al., *Effects of subcutaneous interleukin-2 therapy on CD4 subsets and in vitro cytokine production in HIV+ subjects*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2737-43.
449. Dang, N.H., et al., *Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways*. J Immunol, 1990. **144**(11): p. 4092-100.
450. De Meester, I.A., et al., *Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 325-30.
451. Mittrucker, H.W., et al., *The cytoplasmic tail of the T cell receptor zeta chain is required for signaling via CD26*. Eur J Immunol, 1995. **25**(1): p. 295-7.
452. von Bonin, A., J. Huhn, and B. Fleischer, *Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 43-53.
453. Kameoka, J., et al., *Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26*. Science, 1993. **261**(5120): p. 466-9.
454. Dong, R.P., et al., *Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6070-6.
455. Franco, R., et al., *Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme*. Prog Neurobiol, 1997. **52**(4): p. 283-94.
456. Cordero, O.J., F.J. Salgado, and M. Nogueira, *Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2 in biological fluids*. Eur Respir J, 1997. **10**(9): p. 2186-7.
457. Salgado, F.J., et al., *Mechanisms of CD26/dipeptidyl peptidase IV cytokine-dependent regulation on human activated lymphocytes*. Cytokine, 2000. **12**(7): p. 1136-41.
458. Torimoto, Y., et al., *Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2514-7.
459. Huntington, N.D. and D.M. Tarlinton, *CD45: direct and indirect government of immune regulation*. Immunol Lett, 2004. **94**(3): p. 167-74.
460. Holmes, N., *CD45: all is not yet crystal clear*. Immunology, 2006. **117**(2): p. 145-55.
461. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 107-37.
462. Hall, L.R., et al., *Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene*. J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2781-7.
463. Saga, Y., et al., *Regulation of alternative splicing in the generation of isoforms of the mouse Ly-5 (CD45) glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 3728-32.

464. Saga, Y., et al., *Alternative use of 5' exons in the specification of Ly-5 isoforms distinguishing hematopoietic cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5364-8.
465. Itoh, M., et al., *Purification and characterization of the catalytic domains of the human receptor-linked protein tyrosine phosphatases HPTP beta, leukocyte common antigen (LCA), and leukocyte common antigen-related molecule (LAR)*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 12356-63.
466. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 339-69.
467. Streuli, M., et al., *Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1548-66.
468. Desai, D.M., et al., *The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation*. Embo J, 1994. **13**(17): p. 4002-10.
469. Felberg, J. and P. Johnson, *Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17839-45.
470. McKeown, M., *Alternative mRNA splicing*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 133-55.
471. Schaapveld, R., B. Wieringa, and W. Hendriks, *Receptor-like protein tyrosine phosphatases: alike and yet so different*. Mol Biol Rep, 1997. **24**(4): p. 247-62.
472. Trowbridge, I.S., et al., *Structure and function of CD45: a leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase*. Adv Exp Med Biol, 1992. **323**: p. 29-37.
473. Ledbetter, J.A., et al., *CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(3): p. 334-40.
474. Matozaki, T. and M. Kasuga, *Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signalling*. Cell Signal, 1996. **8**(1): p. 13-9.
475. Donovan, J.A. and G.A. Koretzky, *CD45 and the immune response*. J Am Soc Nephrol, 1993. **4**(4): p. 976-85.
476. Tchilian, E.Z. and P.C. Beverley, *CD45 in memory and disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2002. **50**(2): p. 85-93.
477. Trowbridge, I.S. and M.L. Thomas, *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 85-116.
478. Rudd, C.E., et al., *The subdivision of the T4 (CD4) subset on the basis of the differential expression of L-C/T200 antigens*. J Exp Med, 1987. **166**(6): p. 1758-73.
479. Birkeland, M.L., et al., *Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6734-8.
480. Pilarski, L.M. and J.P. Deans, *Selective expression of CD45 isoforms and of maturation antigens during human thymocyte differentiation: observations and hypothesis*. Immunol Lett, 1989. **21**(3): p. 187-98.

481. Bell, C.G., *CD45 isoforms on T cells during ontogeny*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **636**: p. 363-8.
482. Caldwell, C.W., et al., *Surface and cytoplasmic expression of CD45 antigen isoforms in normal and malignant myeloid cell differentiation*. Am J Clin Pathol, 1991. **95**(2): p. 180-7.
483. Master, P.S., et al., *Patterns of membrane CD45 isoform expression by leukaemic blasts and normal mature myeloid cells*. Int J Hematol, 1992. **55**(3): p. 235-42.
484. Craig, W., et al., *CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development*. Br J Haematol, 1994. **88**(1): p. 24-30.
485. Zola, H., *Markers of cell lineage, differentiation and activation*. J Biol Regul Homeost Agents, 2000. **14**(3): p. 218-9.
486. Yakura, H., *The role of protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and differentiation*. Crit Rev Immunol, 1994. **14**(3-4): p. 311-36.
487. Okumura, M. and M.L. Thomas, *Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 312-9.
488. Kung, C. and M.L. Thomas, *Recent advances in lymphocyte signaling and regulation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d207-21.
489. Bilwes, A.M., et al., *Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 555-9.
490. Majeti, R., et al., *Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge*. Science, 1998. **279**(5347): p. 88-91.
491. Farber, D.L., O. Acuto, and K. Bottomly, *Differential T cell receptor-mediated signaling in naive and memory CD4 T cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2094-101.
492. Hall, S.R., et al., *CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RO+ T cells differ in their TCR-associated signaling responses*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2098-106.
493. Janes, P.W., et al., *The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 23-34.
494. Mustelin, T., et al., *Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 139-47.
495. Mustelin, T. and K. Tasken, *Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 15-27.
496. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7990-8000.
497. Hodgkin, P.D., J.H. Lee, and A.B. Lyons, *B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 277-81.
498. Bacia, K., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes*. Biophys J, 2004. **87**(2): p. 1034-43.

499. Ilangumaran, S., et al., *Evaluation by dot-immunoassay of the differential distribution of cell surface and intracellular proteins in glycosylphosphatidylinositol-rich plasma membrane domains*. Anal Biochem, 1996. **235**(1): p. 49-56.
500. Presky, D.H., et al., *A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 14002-7.
501. Rogge, L., et al., *Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 825-31.
502. Szabo, S.J., et al., *Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 817-24.
503. Ahlers, J.D., et al., *Signals delivered through TCR instruct IL-12 receptor (IL-12R) expression: IL-12 and tumor necrosis factor-alpha synergize for IL-12R expression at low antigen dose*. Int Immunol, 2001. **13**(11): p. 1433-42.
504. Wu, C.Y., et al., *Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 345-50.
505. Presky, D.H., et al., *IL12 receptors and receptor antagonists*. Res Immunol, 1995. **146**(7-8): p. 439-45.
506. Reddy, M., et al., *Cutaneous lymphocyte antigen expression on activated lymphocytes and its association with IL-12R (beta1 and beta2), IL-2Ralpha, and CXCR3*. Cell Immunol, 2005. **236**(1-2): p. 131-9.
507. Reddy, M., et al., *Co-expression of IL-12 receptors along with CXCR3 and CD25 on activated peripheral blood T lymphocytes*. Cell Immunol, 2005. **236**(1-2): p. 123-30.
508. Wu, C., et al., *Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(1): p. 147-54.
509. Brown, D.A. and E. London, *Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes*. J Membr Biol, 1998. **164**(2): p. 103-14.
510. Lim, K.I. and J. Yin, *Localization of receptors in lipid rafts can inhibit signal transduction*. Biotechnol Bioeng, 2005. **90**(6): p. 694-702.
511. Ariel, O., et al., *Distinct membrane localization and kinase association of the two isoforms of CD58*. Cell Signal, 2004. **16**(6): p. 667-73.
512. Chang, J.T., E.M. Shevach, and B.M. Segal, *Regulation of interleukin (IL)-12 receptor beta2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 969-78.
513. Ilangumaran, S. and D.C. Hoessli, *Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane*. Biochem J, 1998. **335** ( Pt 2): p. 433-40.
514. Magee, A.I. and I. Parmryd, *Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts*. Genome Biol, 2003. **4**(11): p. 234.

515. Chin, B.Y., et al., *Transforming growth factor beta1 rescues serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11362-8.
516. Inokuchi, J., *Insulin resistance as a membrane microdomain disorder*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(8): p. 1532-7.
517. Taylor, D.R. and N.M. Hooper, *The prion protein and lipid rafts*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 89-99.
518. Pinheiro, T.J., *The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions*. Chem Phys Lipids, 2006. **141**(1-2): p. 66-71.
519. Allsup, D.J., et al., *B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7328-37.
520. Cordy, J.M., N.M. Hooper, and A.J. Turner, *The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 111-22.
521. Jury, E.C. and P.S. Kabouridis, *T-lymphocyte signalling in systemic lupus erythematosus: a lipid raft perspective*. Lupus, 2004. **13**(6): p. 413-22.
522. Krishnan, S., et al., *Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7821-31.
523. Flores-Borja, F., et al., *Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(12): p. 3955-65.
524. Pavon, E.J., et al., *Increased association of CD38 with lipid rafts in T cells from patients with systemic lupus erythematosus and in activated normal T cells*. Mol Immunol, 2006. **43**(7): p. 1029-39.
525. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
526. Sehgal, P.B., et al., *Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 12067-74.
527. Sehgal, P.B., *Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(3): p. 583-94.
528. Lincoln, J.E., et al., *Fas Signaling Induces Raft Coalescence That Is Blocked by Cholesterol Depletion in Human RPE Cells Undergoing Apoptosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(5): p. 2172-8.
529. Furne, C., et al., *The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4128-33.
530. Cho, N.H., et al., *Association of herpesvirus saimiri tip with lipid raft is essential for downregulation of T-cell receptor and CD4 coreceptor*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 108-18.
531. Cahuzac, N., et al., *Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2384-91.

532. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12088-94.
533. Thierfelder, W.E., et al., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
534. Lawless, V.A., et al., *Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6803-8.
535. Yamamoto, K., et al., *Binding sequence of STAT4: STAT4 complex recognizes the IFN-gamma activation site (GAS)-like sequence (T/A)TTCC(C/G)GGAA(T/A)*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **233**(1): p. 126-32.
536. Holscher, C., *The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases*. Med Microbiol Immunol (Berl), 2004. **193**(1): p. 1-17.
537. Pignata, C., et al., *Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation and activation of 44-kD mitogen-activated protein kinase in human T cells*. Blood, 1994. **83**(1): p. 184-90.
538. Feng, G.J., et al., *Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6403-12.
539. Reinders, J. and A. Sickmann, *State-of-the-art in phosphoproteomics*. Proteomics, 2005. **5**(16): p. 4052-61.
540. Mumby, M. and D. Brekken, *Phosphoproteomics: new insights into cellular signaling*. Genome Biol, 2005. **6**(9): p. 230.
541. Mukherji, M., *Phosphoproteomics in analyzing signaling pathways*. Expert Rev Proteomics, 2005. **2**(1): p. 117-28.
542. Chen, W.G. and F.M. White, *Proteomic analysis of cellular signaling*. Expert Rev Proteomics, 2004. **1**(3): p. 343-54.
543. Johnson, S.A. and T. Hunter, *Phosphoproteomics finds its timing*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(9): p. 1093-4.
544. Stern, D.F., *Phosphoproteomics for oncology discovery and treatment*. Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(4): p. 851-60.
545. Lim, Y.P., *Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3163-9.
546. Lim, Y.P., et al., *Phosphoproteomic fingerprinting of epidermal growth factor signaling and anticancer drug action in human tumor cells*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(12): p. 1369-77.
547. Stern, D.F., *Phosphoproteomics*. Exp Mol Pathol, 2001. **70**(3): p. 327-31.
548. Chow, S., H. Patel, and D.W. Hedley, *Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors*. Cytometry, 2001. **46**(2): p. 72-8.

549. Roovers, K. and R.K. Assoian, *Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 818-26.
550. Wang, Z., et al., *Phosphorylation regulates Myc expression via prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway*. J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 133-40.
551. Kriegel, M.A., et al., *Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon-gamma secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells*. Immunology, 2006. **119**(1): p. 43-53.
552. Nelson, P.J. and T.O. Daniel, *Emerging targets: Molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control*. Kidney Int, 2002. **61**(1 Suppl): p. 99-105.
553. Bright, J.J., C. Du, and S. Sriram, *Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6255-62.
554. Verhagen, C.E., et al., *Residual type 1 immunity in patients genetically deficient for interleukin 12 receptor beta1 (IL-12Rbeta1): evidence for an IL-12Rbeta1-independent pathway of IL-12 responsiveness in human T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 517-28.
555. Chua, A.O., et al., *Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130*. J Immunol, 1994. **153**(1): p. 128-36.
556. Burdelya, L., et al., *Combination therapy with AG-490 and interleukin 12 achieves greater antitumor effects than either agent alone*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(11): p. 893-9.
557. Fan, H., et al., *IL-12 plays a significant role in the apoptosis of human T cells in the absence of antigenic stimulation*. Cytokine, 2002. **19**(3): p. 126-37.
558. Howard, C.J., et al., *Co-stimulation and modulation of the ensuing immune response*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(3-4): p. 123-30.
559. Lojo, J., et al., *CD26 is involved in the regulation of T-cell plasma membrane compartmentation*. Adv Exp Med Biol, 2003. **524**: p. 145-53.
560. Pro, B. and N.H. Dang, *CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer*. Histol Histopathol, 2004. **19**(4): p. 1345-51.
561. Mentlein, R., *Cell-surface peptidases*. Int Rev Cytol, 2004. **235**: p. 165-213.
562. Aytac, U. and N.H. Dang, *CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. **4**(1): p. 11-8.
563. Sedo, A., et al., *Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(6): p. 253-69.
564. Gorrell, M.D., et al., *Structure and function in dipeptidyl peptidase IV and related proteins*. Adv Exp Med Biol, 2006. **575**: p. 45-54.

565. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 349-54.
566. Zhang, M., et al., *CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1479-90.
567. Li, F.J., et al., *A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in myeloma*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3295-302.
568. Fischer, A.M., et al., *The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 431-43.
569. Hancock, C.N., et al., *Identification of novel extracellular signal-regulated kinase docking domain inhibitors*. J Med Chem, 2005. **48**(14): p. 4586-95.
570. Blank, N., et al., *MEK inhibitor U0126 interferes with immunofluorescence analysis of apoptotic cell death*. Cytometry, 2002. **48**(4): p. 179-84.
571. Valentino, L. and J. Pierre, *JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(6): p. 713-21.
572. Winston, L.A. and T. Hunter, *Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP*. Curr Biol, 1996. **6**(6): p. 668-71.
573. Luo, H., et al., *The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in Drosophila*. Mol Genet Genomics, 2002. **267**(1): p. 57-63.
574. Sears, R.C., *The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation*. Cell Cycle, 2004. **3**(9): p. 1133-7.
575. Hann, S.R., *Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(4): p. 288-302.
576. Gupta, S., A. Seth, and R.J. Davis, *Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3216-20.
577. Yin, X., et al., *Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function*. Oncogene, 2003. **22**(40): p. 6151-9.
578. Lutterbach, B. and S.R. Hann, *c-Myc transactivation domain-associated kinases: questionable role for map kinases in c-Myc phosphorylation*. J Cell Biochem, 1999. **72**(4): p. 483-91.



---

*APÉNDICE*



A lo largo de esta investigación se han presentado los siguientes trabajos:

### **Artículos:**

- “Lipid rafts, how to regulate signalling via IL-12R through protein positioning on cell membrane”.  
The Biochemical Journal (enviado).  
**Canda-Sánchez A**, Salgado FJ, Nogueira M
- “Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes”  
Mol Membr Biol. 2005 May-Jun;22(3):163-76.  
Salgado FJ, Pineiro A, **Canda-Sánchez A**, Lojo J, Nogueira M.

### **Congresos:**

#### **Presentaciones orales:**

- Papel de la ERK1/2 en la proliferación inducida por Interleukina 12 en linfoblastos humanos.  
**Canda-Sánchez A**; Salgado Castro FJ; Pérez-Díaz A; Varela-González C; Nogueira Álvarez M.  
XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Elche, 2006)
- Interacciones y asociaciones de proteínas de membrana.  
**Canda-Sánchez A**; Salgado Castro FJ; Nogueira Álvarez M.  
XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Zaragoza, 2005)
- Receptores de citoquinas y dinámica de los rafts  
Salgado Castro FJ; **Canda-Sánchez A**; Lojo Rodríguez J; Nogueira Álvarez M.  
XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. (Lleida, 2004)

## **Pósters:**

- CD26 expression reduction affects CD45R0 detected on lymphocyte surface.  
Lojo Rodríguez J; **Canda-Sánchez A**; Cordero Santamaría OJ; Nogueira Álvarez M.  
I Luso-Spanish Workshop on the structure and function of proteins (A Coruña, 2003).
- Búsqueda de biomarcadores de artritis reumatoide.  
Varela-González C; **Canda-Sánchez A**; Pérez-Díaz A; Arias Crespo MP; Nogueira Álvarez M; Salgado Castro FJ  
XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Elche, 2006).
- Aplicación de técnicas proteómicas al estudio de sitios de unión para protimosina alfa en linfoblastos humanos.  
Pérez-Díaz A; **Canda-Sánchez A**; Varela-González C; Arias Crespo MP; Nogueira Álvarez M; Salgado Castro FJ.  
XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Elche, 2006).
- La IL12 induce la asociación de IL12Rb1 e IL12Rb2 en zona no raft en la membrana plasmática de linfocitos T.  
Salgado Castro FJ; **Canda-Sánchez A**; Varela-González C; Pérez-Díaz A; Arias Crespo MP; Nogueira Álvarez M.  
XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Zaragoza, 2005)
- El receptor de IL12 y los microdominios de membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos-colesterol.  
**Canda-Sánchez A**; Lojo Rodríguez J; Salgado Castro FJ; Nogueira Álvarez, M.  
XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Lleida, 2004).

- Fosforilaciones en tirosinas en respuesta a Protimosina alpha.  
**Canda-Sánchez A;** Salgado Castro FJ; Lojo Rodríguez J; Arias Crespo MP; Nogueira Álvarez, M.  
XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Lleida, 2004).
  
- ERK1/2 en la transducción de la señal de la IL12 en linfoblastos humanos.  
**Canda-Sánchez A;** Lojo Rodríguez J; Bugía MB; Nogueira Álvarez M.  
XXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (A Coruña, 2003)



**LIPID RAFTS AND HOW TO REGULATE SIGNALLING VIA IL-12R THROUGH  
PROTEIN POSITIONING ON CELL MEMBRANE.**

**Ana CANDIA-SÁNCHEZ, Francisco J. SALGADO and Montserrat NOGUEIRA**  
**Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of**  
**Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain.**

Correspondence to: Montserrat Nogueira, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Facultad de Biología, Universidad de Santiago.

C/ Lope Gómez de Marzoa s/n, Santiago de Compostela, 15782, España

Tel. +34 981 563100 ext 13301 or 13244

Fax. +34 981 596904 E-mail: [bnlmna@usc.es](mailto:bnlmna@usc.es)

Short (page heading) title: IL-12-dependent proliferation, rafts, MAPK, membrane segregation  
and CD26

<sup>1</sup>Abbreviations footnote: IL-12R, IL-12 receptor; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; TX-100,  
Triton -X100; PHA, phytohemagglutinin; MAPK, mitogen activated protein kinase; ERK1/2,  
extracellular signal-regulated kinase 1/2; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase; JAK, Janus kinase;  
STAT, signal transduction and activation of transcription ;CTB, cholerae toxin B subunit;  
CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester.

## **SYNOPSIS**

As previously reported, IL-12 not only stimulates the expression of CD26, a raft-associated protein present on human T cells, but enhances the CD26-CD45R0 interaction. CD45R0 is a phosphatase also found in lipid rafts. As a result of a CD26-dependent mechanism CD45R0 is pushed away from these microdomains, which could be necessary to downmodulate the signalling activity of certain interleukin receptors, like ; accordingly, both IL-12R and CD45R0 proteins should colocalize. Now, new data from experiments, focused on the topology both IL-12R chains, give support to our hypothesis. We show that IL-12R $\beta$ 1 is permanently associated to phospholipid-rich areas of the membrane on human PHA-blasts where, later on, CD45R0 will be also enriched due to IL-12. Moreover, although IL-12R $\beta$ 2 was initially in lipid rafts, IL-12 induces this protein to move toward phospholipid-rich areas. IL-12R $\beta$ 2 association with lipid rafts is not accidental; IL-12 is a mitogenic cytokine for human primary T cells, although IL-12 brings about T cell proliferation through a lipid rafts and cascade (Raf/MEK-1/ERK1/2) dependent event. JAK2, the IL-12R $\beta$ 2-associated Janus kinase, but not TYK2, is necessary for both ERK1/2 activation and IL-12-mediated T cell growth/CD26 expression. Finally, we close by analysing one likely ERK1/2 target, c-Myc, a transcription factor slightly upregulated upon IL-12 incubation and important for cell proliferation. However, neither c-Myc phosphorylation or c-Myc expression seem to depend on JAK2 or ERK1/2, so other transcription factors (e.g. STAT3, STAT5) must be involved as downstream mediators of the mitogenic activity of IL-12 through IL-12R $\beta$ 2-JAK2-ERK1/2.

## INTRODUCTION

Lipid rafts are membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids which have gained attention as important sites for signal transduction in a wide variety of cells. Quite a few transmembrane receptors are constitutively or inducibly associated to rafts and some of them work as cytokine receptors [1]. As a means of concentrating and/or sequestering plasma membrane-linked macromolecules we are starting to know how these microdomains affect signal transduction through cytokine receptors, like IL-2R or IL-15R [1-4], or receptors for biological response modifiers like Prothymosin- $\alpha$  [5].

works have shown that CD4<sup>+</sup> T cells are a heterogeneous population made of various lymphocyte subsets, each one with a profile of secreted cytokines. Amongst them, T<sub>H1</sub> cells produce TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , and are involved in cell-mediated immunological responses, while T<sub>H2</sub> lymphocytes secrete IL-4 and IL-5, being more connected to the humoral branch of the Immune System [6]. Regulatory T cells (T<sub>reg</sub>), instead, release a different set of cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ ) and are connected to the *in vitro* or *in vivo* suppression of both T<sub>H1</sub> and T<sub>H2</sub> immune responses [7].

Regulatory T cell function is abrogated by IL-12 [8], a key cytokine produced by APCs. IL-12 is not important for the development of T or B cells *in vivo*, but is relevant on T cell activation-proliferation, IFN $\gamma$  production and T<sub>H1</sub> cell differentiation [9,10]. This cytokine also upregulates certain surface molecules like CD26 [11] and control the segregation of different proteins (CD26, CD45R0) in different membrane compartments from human T cells [12]. functional receptor for this cytokine (IL-12R) is made of two subunits, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2. In murine system, IL-12R $\beta$ 1 is responsible for the low and high affinity binding places, while IL-12R $\beta$ 2 shows low affinity for IL-12 [13]. In humans, however, both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins bind IL-12 with low affinity when separated while, as a whole, form the high affinity receptor [14]. IL-12R $\beta$ 1 is constitutively expressed by T-cells [15], but is also upregulated upon T cell activation. However, resting T cells lack of IL-12R $\beta$ 2 and require TCR stimulation in order to express this protein [16], which allows IL-12 to fully exercise all its biological functions.

IL-12R does not have intrinsic kinase activity and requires the classical JAK/STAT pathway. Two *Janus* tyrosine kinases (JAKs), TYK2 and JAK2, are found associated with IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2, respectively. As well, they phosphorylate some residues on IL-12R $\beta$ 2 and, at least in murine system [17], are linked to specific IL-12 functions: TYK2 seems important for IFN $\gamma$  production, while JAK2 is relevant for T cell proliferation. However, this last issue remains to be clarified for human primary T cells because of the differences between both murine and human systems, as above commented. IL-12R $\beta$ 2-phosphorylation provides docking sites for the SH2 domains of STATs proteins (signal transducers and activators of transcription), mainly STAT4 but also STAT1, STAT3 and STAT5 [9,10]. Upon IL-12 binding, STAT4 is recruited to the IL-12R $\beta$ 2 cytoplasmic region, tyrosine-phosphorylated by TYK2 [17] and translocated into the nucleus, where a mitogen activated protein kinase (MAPK-p38) phosphorylates this transcription factor on serine. It has been reported that both STAT4 and the above commented double tyrosine/serine-phosphorylation of STAT4 [18-20] as well as STAT3 [17] are important for the IL-12 effect on IFN $\gamma$  production and T<sub>H1</sub>-differentiation. However, STAT4 contribution to cell proliferation is controversial and, in spite of the fact that T-cells from STAT4 knockout mice show defective proliferative responses to IL-12 [21,22], nowadays authors speculate that this IL-12 function is mainly under the control of JAK2 and PI3K/Akt kinase systems as well as STAT5 and c-Myc transcription factors [17,23].

MAPK comprises several families of protein kinases (extracellular signal-regulated kinases/ERKs, c-Jun N-terminal kinases/JNKs and p38 kinase) regulated by different stimuli. In 1994, Pignata *et al* described, in human PHA-lymphoblasts, that IL-12 induces the tyrosine phosphorylation of a 44 kDa MAPK [24]. Some authors have rejected those results and excluded the role of ERKs and JNKs in the signal transduction machinery triggered by IL-12 [18,25]. However, all those experiments have been performed under different experimental conditions [18,24,25], which together with the fact that ERKs are activated rapidly by growth factors and a wide variety of mitogenic stimuli leaves an open question: are ERKs involved in the mechanism through which IL-12 promotes T cell proliferation?

We previously found that CD45R0, a low molecular weight isoform of CD45, segregates from lipid rafts microdomains to phospholipids-enriched areas of the plasma membrane when human T cells are costimulated with IL-12 [12]. CD45 is a phosphatase for the Janus family of kinases, and therefore involved in downmodulation of cytokine receptors signalling [26]. Since this activity requires from CD45R0 to be next to its substrates, like for example the IL-12R-associated TYK2 and JAK2 Janus kinases, we speculated that the IL-12-dependent movement of a CD26-CD45R0 complex out of lipid rafts would allow CD45R0 to turn off this receptor [12]. However, in spite of several studies regarding the membrane location of some cytokine receptors [1-4], there are not data available about the membrane location of IL-12R, or the role of lipid microdomains on cell signalling through this receptor. The goal of the study is to start filling that gap, as well as to shed some light about how IL-12 is able to deliver proliferative signals to human T cells.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

The following reagents were purchased: recombinant human (rh)IL-12 and rhIL-2 (Peprotech); PHA, CFSE (carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester), PMA, DMSO (Hybri-Max®), penicillin/streptomycin solution, RPMI 1640, methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), PMSF, leupeptin, aprotinin, human IgG, goat anti-rabbit-FITC (GAR-FITC), isotype clone MOPC21 and anti-mouse IgG (whole molecule), both either R-phycoerythrin or FITC-conjugated, and mouse anti- $\beta$ -actin mAb (Sigma); Janus kinase family inhibitors tyrphostin A1 (AG9) and B42 (AG490), as well as inhibitors for ERK (ERKi) and cMyc ((Z,E)-5-(4-Ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one) (Calbiochem); Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus, ECL<sup>Plus</sup> and Western Blotting detection kit (GE Healthcare); BCA (Pierce); Super RX film (Fujifilm); PVDF membrane (Millipore); AP Conjugate substrate kit (Biorad); Immunofluore mounting medium (ICN Biomedicals); goat anti-mouse H+L (Caltag); Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit, containing antibodies against phospho-Raf (Ser-259), phospho-MEK1/2 (Ser-217/Ser-221), phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204), phospho-Elk-1 (Ser-383) and phospho-p90RSK (Ser-380), as well as anti phospho-c-Myc (Thr-58/Ser-62) (Cell signalling Technologies); anti-

phospho-Tyr mAb (clone PY20), biotinylated polyclonal goat anti-rat Ig, PE-labeled anti-CD71 (clone M-A712), anti-CD59-FITC (clone p282), Phospho-Flow Alexa Fluor® 488 conjugated anti-phospho-ERK1/2, anti-IFN $\gamma$  neutralizing mAb (clone B27), biotinylated rat anti-human IL-12R $\beta$ 1 (clone 2B10) and biotinylated rat anti-human IL-12R $\beta$ 2 (clone 2B6) and their corresponding isotypes (BD Biosciences); Streptavidin-PE and anti-c-Myc (clone 9E10; pure or FITC-conjugated) (Serotec); CTB-Alexa488, Streptavidin-Alexa 633 and DiI (Vybrant® CM-DiI/C18) (Molecular Probes); for Western blot experiments, goat anti human IL-12R $\beta$ 2 extracellular domain (R&D Systems) and anti-IL-12R $\beta$ 1 carboxi terminus (C-20; Santa Cruz Biotechnology); for CBA/Flex Set experiments, capture beads and detection reagents (PE-labelled) for phospho-p38 (Thr-180/Tyr-182), phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) and phospho-JNK1/2 (Thr-183/Tyr-185)(BD Biosciences); Mouse anti-human CD3 (clone OKT3) mAb and anti-CD26 TP1/16 mAb were used as previously described [12].

### **Cell isolation and culture**

Blood, donated by healthy volunteers and processed by Centro de Transfusiones de Galicia (Santiago, Spain), was provided as buffy coats. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and cultured as previously [12]. Unless otherwise stated, cells were activated with 10-20  $\mu$ g/ml PHA. In confocal microscopy experiments, 2-3 days PHA activated lymphocytes were restimulated for an additional 14-16 hours period with 1 ng/ml IL-2 to enhance IL-12R expression.

### **Extracellular protein labelling for flow cytometry and confocal microscopy**

To detect IL-12R by flow cytometry cells were washed, fixed with ice-cold 1 % (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS pH 7.4 at RT for 5 min and placed in PBS-1 % (w/v) BSA-0.05 % (w/v) sodium azide. Fc receptors were blocked (30 min, 4 °C) with human IgG, and cells incubated (1 h, 4 °C) with the primary antibody (anti-IL-12R $\beta$ 1, anti-IL-12R $\beta$ 2 or the corresponding isotype). After washing (PBS-BSA) for two times, cells were incubated with a biotinylated goat anti-rat Ig (1 h, 4 °C), washed, labelled using streptavidin R-phycoerythrin (1 h, 4 °C), and carefully washed before reading the samples in a FACScalibur flow cytometer

(BD Biosciences). Direct staining was also performed, when necessary, with anti-CD26-FITC, anti-CD71-PE, anti-CD59-FITC or proper isotypes. Membrane cholesterol depletion was carried out with 2.5 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) for 15 min at 37 °C, while non ionic detergent sensitive areas were removed with 0.25 % (v/v) Triton X-100 (5 min on ice), before fixation. Analysis was carried out with WinMDI software.

For confocal microscopy experiments, IL-12R expression was previously evaluated by flow cytometry before going on. Alexa 633-conjugated streptavidin was used to reveal IL-12R $\beta$ 1 or IL-12R $\beta$ 2, and all the incubations performed at 37 °C (1 h). In order to see rafts location (GM1 enriched domains), Alexa 488 cholerae toxin B subunit (CTB-Alexa488) was used. Cells were also labeled, before fixation, with the PFA-resistant and unsaturated lipid probe DiI (Vybrant<sup>®</sup> CM-DiI/C18), specific for non-rafts areas [27]. After the final wash, cells were placed on a microscope slide and mounted with Immunofluore medium. Observations were made with a spectral confocal microscope Leica TCS-SP2, and colocalization analysis performed by means of Leica confocal software (Leica Microsystems, Spain).

### **CFSE-based proliferation assays**

20 x 10<sup>6</sup> PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium at 10 x 10<sup>6</sup> cell/ml. 5  $\mu$ M CFSE was added and incubation performed for 8 min at RT in the dark. To stop the reaction an equal volume of FBS was included and, after washing with complete medium. Unless otherwise indicated, cultures were set up at 0.25 x 10<sup>6</sup> cells/ml and 1.25  $\mu$ g/ml PHA. Fluorescence fall was measured by flow cytometry after 5 days. Unlabeled cells served as negative controls.

### **Intracellular staining**

To detect phospho-ERK, phospho-c-Myc or c-Myc by flow cytometry, 20 x 10<sup>6</sup> PHA-blasts were resuspended in RPMI (with or without inhibitors) and anti-mouse H+L added when indicated. After 10 min at 37 °C, an aliquot of 6 x 10<sup>6</sup> cells (T<sup>o</sup>) was collected and fixed in 3 ml of 4 % (w/v) PFA in PBS (10 min, 37 °C). Either OKT3 mAb, PMA (200 ng/ml) or IL-12 (2 ng/ml) were added for the indicated times at 37 °C to the remaining cells. As before, 6 x 10<sup>6</sup> PHA-blasts were collected and fixed, 1 x 10<sup>6</sup> cells placed in each test tube, washed (PBS pH

7.4) and permeabilized with 90 % (v/v) methanol (-20 °C) for 30 min on ice. Cells were then washed twice with PBS-2 % (v/v) FBS-0.05 % (w/v) azide, their FcR blocked with human IgG and stained with the corresponding antibody (1 h, RT) in the dark. After several washes cells were resuspended in 1 ml PBS-BSA.

### **Cytometric Bead Array Flex Set System**

PBMCs were expanded for 3 days with PHA and placed in 4 tubes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) for 5 min at 37 °C. Then, either RPMI 1640, DMSO, PMA (200 ng/ml) or IL-12 (2 ng/ml) were added for a further 5 min period at 37 °C. Cells were then washed (PBS pH 7.4, 4 °C), supplemented with 1  $\mu$ M orthovanadate, pelleted, lysated with the buffer provided with the kit, and their DNA disrupted with a syringe. Protein concentration in every sample was quantified (BCA) and equal amounts analysed following the manufacturer indications. Sample acquisition was made with a BD FACSCanto™ flow cytometer and analysis performed with FCAP Array™, both from BD Biosciences.

### **Triton X-100 resistant microdomains (rafts) isolation by equilibrium density gradient centrifugation**

Unless otherwise commented, all the steps were performed at 4 °C and according to Ilangumaran *et al* [28]. PHA-blasts ( $50 \times 10^6$ ) were sequentially washed with PBS pH 7.4 and TKM buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EDTA) to eliminate residual serum proteins. Cell lysis was induced upon incubation (20 min, on ice) with TKM buffer containing 0.5 % (w/v) Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin and 5  $\mu$ g/ml aprotinin). Cell extracts were adjusted to 40 % (w/v) sucrose, placed into SW55Ti (Beckman L8-M) tubes and overlaid with two sucrose solutions, 36 % (w/v) and 5 % (w/v) respectively in TKM buffer. After ultracentrifugation (200 000 g, 18 h, 4 °C) 11 fractions (numbered 1-11; 450  $\mu$ l/each) were harvested from top to bottom and stored afterwards at -20 °C. Quality of raft membranes preparation was assayed by alkaline phosphatase activity determination.

### **SDS-PAGE and Western blotting**

Three days (or five days for c-Myc) PHA-blasts were treated as described in Results Section. To detect IL-12R $\beta$ 1 or IL-12R $\beta$ 2, PHA-blasts were lysated in RIPA buffer (PBS pH 7.4, 1 % (v/v) NP-40, 0.5 % (w/v) sodium deoxycholate, 0.1 % (w/v) SDS), supplemented with protease inhibitors, for 60 min on ice. Samples were then centrifugated at 13 000 g (4 °C) and postnuclear supernatant collected. Regarding raft and non-raft proteins samples from sucrose gradients (IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 experiments), fractions 3-6 and 10-11 were pooled. In both cases, the amount of protein was calculated (BCA) and 5x SDS sample buffer added (final concentration: 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 10 % w/v glycerol, 3 % w/v  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 % (w/v) bromophenol blue and 0.1 % (w/v) pyronine). To detect c-Myc and tyrosine phosphorylated proteins aliquots of  $1.5 \times 10^6$  cells were lysed in an equal volume of 2x SDS sample buffer. All samples were boiled for 5 min and their DNA broken. Proteins (10-15  $\mu$ g/lane) were separated on a SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane and blocked with either 10 % (w/v) semi-fat dry milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20) or, to detect tyrosine phosphorylated proteins, 1 % (w/v) BSA-TBS-T. Blots were incubated with primary antibodies (anti-c-Myc or anti-pTyr PY20) in blocking buffer, washed with TBS-T and the corresponding HRP-conjugated secondary antibody used. Visualization was performed by the ECL<sup>Plus</sup> method. When necessary (e.g.  $\beta$ -actin measurements), membranes were stripped in 0.2 N NaOH (15 min, RT), washed, and blocked before reprobing. Densitometric values were obtained using ScanMaker 9800XL calibrated scanner (Microteck) and Quantity One software (BioRad).

## RESULTS

### **IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 are differentially associated with distinct areas of the plasma membrane on human T lymphoblasts.**

carry out their biological activities cytokines through plasma membrane receptors, like the IL-12 receptor (IL-12R). IL-12R is made up of two proteins, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2, which separately recognize IL-12 with low affinity ( $K_d$ s of 10 and 10 nM, respectively) [14] on PHA-activated PBMCs. Only upon ligand-induced dimerization of IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 a high affinity and fully functional heterodimeric receptor ( $K_d$  of 55 pM) [14]. The plasma membrane where these receptors are located is not at equilibrium. Indeed, it maintains an asymmetry in lipid and protein composition between the inner and the outer leaflets but also through the lateral segregation of its constituents (microdomains). Specialized cholesterol-rich plasma membrane microdomains (rafts) in the outer leaflet seem to play a role in signalling through cytokine receptors [2-4], but there are not data available regarding the IL-12 receptor (IL-12R). One normal criterion which helps to identify a raft-associated protein is to evaluate its surface expression after cholesterol or phospholipid extraction with M $\beta$ CD or Triton X-100, respectively. In order to carry out these studies resting PBMCs were first stimulated to become IL-12R $\beta$ 2<sup>+</sup> lymphoblasts [15,16]. Thus, as increasing amounts of PHA were added to the culture medium the basal IL-12R $\beta$ 1 expression was upregulated, and being 20  $\mu$ g/l the optimal amount of mitogen (Figure 1A). IL-12R $\beta$ 2 only started to be detectable upon cell activation but, despite of that, at usually very low levels. Therefore, the most important hindrance in our experiments was IL-12R $\beta$ 2, due to its low expression as well as the high variable and individual response to the mitogen. Besides, high PHA levels (20  $\mu$ g/ml) highly decreased cell viability, so we were forced to work with lower and suboptimal amounts of mitogen: 10  $\mu$ g/ml PHA. For some experiments, like the confocal microscopy assays that we will show later on, that was a problem. We knew that IL-12 upregulated the amount of IL-12R $\beta$ 2 on T cells [16]. However, in order to increase IL-12R $\beta$ 2 levels without affecting the spatial distribution of this protein (something that likely IL-12 would do) 2 days PHA-blasts were harvested, washed and incubated for 14-16 additional hours with either fresh PHA (not shown) or IL-2 (Figure 1B).

We found that IL-2 (optimal amount: 1 ng/l) was more efficient enhance IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 expression.

It can be disrupted when cholesterol is sequestered by methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), what can affect the expression of certain rafts-resident proteins [29]. Proliferation assays with M $\beta$ CD were carried out with 3 days PHA-lymphoblasts. The expression of three surface molecules was evaluated by flow cytometry: the raft markers CD59 (Figure 2A) and GM1 (detected with cholerae toxin B subunit/CTB) [30,31], and the non-raft protein CD71 [32]. As expected, we found that 2.5 mM M $\beta$ CD downmodulated both GM1 (not shown) and CD59 antigens, but kept, at the same time, CD71 levels intact (Figure 2A). The effect of cholesterol depletion on IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 expression was also tested. Figure 2B shows how M $\beta$ CD limited the amount of IL-12R $\beta$ 2 in human T lymphoblasts, in much the same way as it did with GM1 or CD59, while IL-12R $\beta$ 1 levels remained unaffected. Therefore, those results were underlining a differential recruitment of both IL-12R proteins in lipid rafts, with a  $\beta$ 1-chain closer to CD71-enriched/M $\beta$ CD-insensitive areas of the membrane (non-rafts) and a  $\beta$ 2-chain associated to CD59/GM1-enriched/M $\beta$ CD-sensitive domains (rafts). Since ligand interaction could modify the membrane positioning of both proteins, we carried out the experiments with PHA-blasts incubated for 5 min with IL-12, and found that receptor ligation makes IL-12R $\beta$ 2 less sensitive to cholesterol extraction without affecting the expression of IL-12R $\beta$ 1 (Figure 2B). Similar results were obtained when postnuclear lysates from blasts, treated or not with M $\beta$ CD, by Western blotting. As shown (Figure 2C) IL-12R $\beta$ 2 (122 kDa) was downmodulated, but no modification was observed for IL-12R $\beta$ 1 (94 kDa). Besides, IL-12R $\beta$ 2 levels after IL-12 preincubation were significantly reduced as compared with the initial amount of IL-12R $\beta$ 2, but also more resistant to the M $\beta$ CD treatment as IL-12R $\beta$ 1 was (Figure 2C). Therefore, if we put all together, these findings support the idea that IL-12R $\beta$ 2 could be translocated, after ligand engagement, from lipid rafts to non-raft areas of the membrane, while location is likely to be linked to regions

Lipid rafts are also highly resistant at low temperature to non-ionic detergents, Triton X-100 [33], and therefore the non-raft resident protein CD71 and the raft-associated ganglioside

GM1, respectively, Triton X-100-sensitive and Triton X-100-resistant markers [5,12]. Consequently, flow cytometry experiments with Triton X-100-treated lymphoblasts (Figure 3A) showed that a low detergent concentration (0.25 % v/v, 5 min) at low temperature (4 °C) fully remove CD71 from cells, but not GM1 (Figure 3A). When we checked out the amount of both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 after this Triton X-100 treatment (Figure 3B), we found that IL-12R $\beta$ 1 is a CD71-like molecule concerning the Triton X-100 sensitivity. This sensitivity is even substantially increased when PHA-blasts are previously exposed to IL-12, which can be explained considering an IL-12-dependent enrichment of IL-12R $\beta$ 1 in non-rafts. However, IL-12R $\beta$ 2, in a similar way to GM1, was not down modulated by Triton X-100 (Figures 3A and B), probably this last result indicating an association of IL-12R $\beta$ 2 with lipid rafts. Because of the difficulties we ran up against related to the expression of this protein we can not clearly draw conclusions about the influence of IL-12 on the location of IL-12R $\beta$ 2 with these Triton X-100 experiments. However, considering the M $\beta$ CD and Triton X-100-experiments as a whole, our data may indicate that IL-12R $\beta$ 2 is probably located in lipid rafts but, soon after ligand-engagement, associates to IL-12R $\beta$ 1 to form the high affinity heterodimeric receptor in phospholipids rich areas (non-rafts).

Lipid rafts have been traditionally evaluated through biochemical techniques based on the insolubility of these microdomains in non-ionic detergents at low temperatures and their density when submitted to a discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation [5,12,28]. Western blotting experiments were carried out to detect IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 in raft (pooled 3-6 fractions) and non-raft (pooled 10-11 fractions) microdomains from PHA-blasts. As expected from previous experiments, IL-12 $\beta$ 1 (94 kDa band) was present in high density fractions (non-rafts), while IL-12R $\beta$ 2 (122 kDa band) was in low density fractions (rafts) (Figure 3C).

It has been described that the use of detergents could present some limitations and associations between surface proteins and microdomains [33,34]. To discard any interference of detergents within our studies we carried out confocal microscopy experiments. Two surface markers were used this time, the cholera toxin B subunit (CTB-Alexa488) and the lipid probe

DiI (Molecular Probes Vybrant® CM-DiI/C18)[27], to respectively identify rafts (GM1<sup>+</sup>) and non-rafts (CM-DiI<sup>+</sup>) regions. As Figure 4 indicates on focal laser-scanning microscopy analysis did not show, as expected, any colocalization between both markers. What is more, a substantial overlap between the IL-12Rβ1 and DiI fluorescences was always evident, no matter whether or not cells were exposed to IL-12 (Figure 4). Regarding IL-12Rβ2, the persistently low expression of this receptor (despite the use of IL-2 to overstimulate cells), specially when blasts were preincubated with IL-12, made very difficult again to draw conclusions about this . However, it could be deduced that, in the absence of IL-12, IL-12Rβ2 behaved, mainly, as a raft-resident protein, and as a non-raft located protein in IL-12-stimulated lymphoblasts (Figure 4).

### **JAK2 mediates the upregulation of CD26 and the proliferative activities of IL-12 on human T-cells.**

Resting T lymphocytes (i.e. IL-12Rβ1<sup>+</sup>, but IL-12Rβ2<sup>-</sup> cells) produce IFNγ in response to IL-12 [9]. However, they do not proliferate when IL-12 is added to the medium, because this function of IL-12 seems to relay on the expression of IL-12Rβ2 (only detectable 2-3 days after TCR stimulation) [14,35]. It is also known that IL-12Rβ2 interacts with JAK2, while IL-12Rβ1 is associated to TYK2 [36]. Since IL-12Rβ2 is a raft resident protein and rafts microdomains are important for T cell proliferation [37,38] this prompted us to study the role of the IL-12Rβ2-associated kinase JAK2 in IL-12-induced cell proliferation. For these experiments we used two inhibitors, tyrphostins A1 (AG9; TYK2-specific) and B42 (AG490; JAK-2-specific), as well as carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-stained cells. Firstly, we set up the optimal conditions for these experiments; PBMCs were CFSE labeled, activated with different concentrations of PHA and cultured for 5 days, IL-12, at various initial cell densities. Our results (Figure 5A) indicated that IL-12 enhances T-cell proliferation, in a donor, PHA-doses and cell-concentration dependent way (optimum: 1.25 μg/l PHA and 0.25 x 10<sup>6</sup> cells/l). Then, different amounts of both A1 (TYK2) and B42 (JAK2) inhibitors were tested (data not shown), and a single amount of A1 and B42 molecules selected for later experiments. Our

findings, adding these inhibitors when PBMCs cultures were set up (day 0; Figure 5B), proved that JAK2 is used by IL-12 to deliver proliferative signals to T cells through a signalling pathway probably shared with TCR, since B42, but not A1, significantly reduced the IL-12-dependent but also the proliferation triggered by the lectin (Figure 5B). This is in agreement, at least on this matter, with experiments carried out using the murine 2D6 T cell clone or [17,39].

Activated T cells produce IFN $\gamma$  in response to IL-12 stimulation [9], so IFN $\gamma$  might be mediating the proliferative effects seen for IL-12 [40]. To investigate this possibility, saturating amounts of neutralizing anti-IFN $\gamma$  was incorporated to the culture medium, but not reduction of the mitogenic effect of IL-12 was observed (data not shown). In the G1 phase of the cell cycle. In much the same way, CD26, a surface and inducible protein in T-cells associated with signal transduction is significantly upregulated with IL-12, but not IFN $\gamma$  [11]. The IL-12 effect on CD26 is evident only after the second-third day of polyclonal T-cell activation, which correlates with the highest IL-12R $\beta$ 2 expression. As Figure 5C shows the JAK2 inhibitor B42, but not the TYK2 inhibitor A1, abrogated this IL-12-mediated CD26 upregulation. Since another mitogenic cytokine, IL-2, also boosts the expression of CD26 [11] this indicates that CD26 behaves more as a cell proliferation than an IFN $\gamma$ -production marker.

### **IL-12 activates the MAP kinase signal transduction cascade Raf/Mek1/ERK1/2 in human T lymphocytes through a raft and JAK2-dependent mechanism.**

Tyrosine phosphorylation is an important mechanism of signal transduction involved in cell cycle or cellular differentiation. When human PBMCs were activated with PHA for 3 days and then stimulated with IL-12 for different times a change in the tyrosine phosphorylation pattern, measured by Western blotting with anti-phospho-Tyr mAb PY20, was evident (Figure 6A). Relative mobility analysis showed phosphorylation of proteins of 25, 31, 34, 38, 43, 56, 133 and 276 kDa, as previously indicated [24]. The presence of a 38 kDa phosphorylated protein (Figure 6A), and the detection of p38, but not JNK, MAPK phosphorylation using a BD<sup>TM</sup> CBA Flex Set assay data (Table I), was in agreement with previous results [18].

However, we were curious, however, about the 43 kDa band, because of its similar molecular weight to ERK1/2 MAPK. Thus, we also examined by flow cytometry the Thr-

202/Tyr-204 ERK1/2 phosphorylation on three days PHA-blasts in response to IL-12 (Table I, BD<sup>TM</sup> CBA Flex Set data from cell lysates; Figure 6B, intracellular staining). As positive controls, we determined the amount of phospho ERK1/2 triggered by either phorbol myristate acetate/PMA (Table I) or TCR signalling (anti-CD3/OKT3 +anti-mouse H+L; Figure 6B)[41]. No basal ERK1/2 activation was observed in unstimulated cells, but ERK1/2 was Thr-202/Tyr-204-phosphorylated after 1 min of IL-12 stimulation, reaching a peak after 5 min. Of note, the ERK1/2 phosphorylation kinetic with IL-12 was very similar to the one found in anti-CD3-treated lymphoblasts, although the percentage and mean values were not so high.

To confirm these results linking with ERK1/2 took advantage of a Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit. Three days PHA-blasts were exposed to IL-12 for different times (30 sec-60 min) and proteins detected by Western blotting with specific antibodies. As it can be seen (Figure 6B), the Raf-MEK1-ERK1/2 route was activated after IL-12 binding to its receptor. Besides, Western blotting experiments yielded a stronger and more sustained ERK signalling, still detected 60 min (Figure 6B), than inflow cytometry experiments (Figure 6B), which indicates either significant differences between both technical approaches regarding sensitivity or a fast nuclear translocation of phospho-ERK which makes this protein rapidly undetectable by flow cytometry. In any case, this ERK1/2 activation is under the control of JAK2, because B42, A1, was able to abolish the IL-12-dependent Thr-202/Tyr-204 phosphorylation of ERK1/2 (Figure 6C)

Since the Janus kinase JAK2 interacts with IL-12R $\beta$ 2, and we have shown that IL-12R $\beta$ 2 is a raft-associated protein, we also examined the role of these microdomains in the IL-12-dependent activation of ERK1/2. PHA-blasts were treated or not with 1 mM M $\beta$ CD, a concentration which eliminates cholesterol without damaging membrane integrity, and IL-12-stimulated. Cells were harvested at different times and phosphorylated ERK1/2 levels measured by flow cytometry. In parallel, lysates from the same cells were analysed by Western blotting (Figure 9A). Up-regulation of ERK1/2 phosphorylation by IL-12 was noticeably influenced by M $\beta$ CD (Figure 7A), which implies that signal transduction through IL-12R/ERK1/2 requires raft microdomains integrity.

To determine whether the proliferative response to IL-12 is dependent on the ERK pathway, a cell-permeable ERK inhibitor, which preferentially binds to ERK2 and prevents its interaction with protein substrates, was used. Treatment of PHA-blasts with different doses of this inhibitor not only suppressed cell proliferation but also blocked the enhancing effect of IL-12 (Figure 7B), supporting the idea that ERK activation is important for both TCR- and IL-12-mediated T-cell mitogenesis.

### **c-Myc partially supports the proliferative effect of IL-12 in human T lymphocytes through an JAK2/ERK1/2-independent mechanism.**

One likely candidate to mediate the ERK1/2-dependent cell proliferation induced by IL-12 was transcription factor c-Myc [17]. To test this theory we first examined by Western blotting the c-Myc protein levels on PBMCs cultured for 5 days with either PHA or PHA+IL-12, but we found only slightly increased in PHA+IL-12-treated PBMCs (Figure 8A). Then, we checked up on the role of JAK2 and ERK1/2 kinases as likely mediators of this IL-12's effect. PBMCs were activated for 3 days with PHA, harvested and restimulated for 24 or 48 h with IL-12, in the presence of either the ERK inhibitor or B42. The amount of c-Myc protein was detected by flow cytometry (Figure 8B) and, once again, we observed an upward trend in c-Myc levels from IL-12 stimulated lymphoblasts, although a period of at least 48 h was required. Strikingly, neither ERK1/2 or JAK2 were significantly important for this IL-12-dependent rise in c-Myc protein within cells (Figure 8B).

c-Myc shows a short half-life and contains multiple phosphorylation sites: Ser-62 is *in vitro* phosphorylated by MAPK and cyclin/CDKs, and Thr-58 is subsequently phosphorylated by GSK-3. Ser-62 phosphorylation stabilizes the protein while Thr-58 promotes its degradation [42]; they also influence Myc/Max dimerization, transcription activation and cell-proliferation [43,44]. To evaluate the influence of IL-12 on c-Myc phosphorylation an antibody, which recognises (Ser-62)-(Thr-58) modified c-Myc molecules was used in flow cytometry experiments. Three days PHA-blasts were stimulated for different times with IL-12 or PMA but, unlike the phorbol ester, IL-12 only induced a weak phosphorylation, which peaked after 5 min and dropped afterwards (Figure 8C).

Amongst MAPK c-Jun N-terminal kinase/JNK has been described to phosphorylate c-Myc at Ser-62 and Ser-71 [45]. However, IL-12 is not able to induce any JNK activation (Table I), so we focused exclusively on ERK1/2. As Figure 8C shows, neither the ERK1/2- or the JAK2-inhibitor significantly suppressed the c-Myc phosphorylation triggered by IL-12, which means that, spite this cytokine delivers mitogenic signals through JAK2 or ERK1/2, these kinases are not upstream c-Myc. However, inhibition of c-Myc-Max interaction abrogates both the PHA-dependent proliferation of lymphoblasts as well as the enhancing effect of IL-12 (Figure 8D), which points out that (i) c-Myc is certainly involved in this IL-12 effect and (ii) some transduction pathways, transmitting mitogenic signals, must be shared by TCR and IL-12R.

## DISCUSSION

This paper shows, for the first time, data about how both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins differentially segregate between different membrane microdomains. These findings picture an IL-12R $\beta$ 1 receptor constantly associated to glycerophospholipids-rich areas (non-rafts) of the cell membrane, but also a partially raft-resident IL-12R $\beta$ 2 protein, this last one more and more located in cholesterol-impoverished zones as ligand-receptor interaction takes place. It can be easily inferred that this initial segregation of both  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 chains may serve as a negative mechanism to control untimely signalling through IL-12R, something that other authors have also pointed out for other cytokine receptors [46]. However, another plausible explanation has to do with the fact that IL-12 makes human T lymphoblasts progress through the G1 phase of the cell cycle [39] via an IL-12R $\beta$ 2-dependent event [14,35,36] and the finding that this protein can be found in lipid rafts. Cholesterol-enriched microdomains are membrane platforms where signalling molecules like G proteins or PTKs accumulate [46], so these lipid rafts, and therefore the presence of IL-12R $\beta$ 2 in them, could be important for the mitogenic effect of IL-12.

On the other hand, despite some differences between the murine and the human system regarding the IL-12 receptor [13,14], this cytokine enhances the T-cell division rate of primary human T lymphoblasts by means of a JAK2-dependent but TYK2/IFN $\gamma$ -independent mechanism, in agreement with previous works with the murine T cell clone 2D6 [17] or Con-A activated primary murine T-cells [39]. Our experiments also show that IL-12 activates MAPK p38, but not JNK, which is in line with findings from several groups reporting that IL-12R $\beta$ 2, TYK2, MKK6/p38 and STAT4 are important for IFN $\gamma$  production and TH1 differentiation in IL-12-stimulated T cells [14,18,19,35]. However, there is little consensus about the mitogenic effect of IL-12 and the signalling pathway downstream IL-12R $\beta$ 2/JAK2.

Several works [18,24,25] shed contradictory results about the IL-12-dependent activation of mitogen activated protein kinases others than p38, like for example ERK1/2. Thus, both Athié *et al.* and Visconti *et al.* pointed out that IL-12 does not induce ERK1/2 activation in T cells [24,25]. However, an initial paper from Pignata *et al.*, [18], and now our more extensive studies using similar culture conditions (human PBMCs, PHA stimulation), intracellular

staining, Western blotting and a Cytometric Bead Array Flex Set System, refute those data and show that, at a lesser extent than with anti-CD3 or PMA, the JAK2-Raf-MEK1-ERK1/2 route is really triggered by IL-12. The reason for these contradictory results is unclear, but could come from different kind of cells (primary and cell lines), polyclonal stimuli or culture conditions in general. In addition, the idea of a fast and long-lasting ERK1/2 activation mediating the proliferative effect of IL-12 on T-cells is not surprising, since it is known that the ERK1/2 pathway is turned on by some growth factors and cytokines, like for example EGF, GM-CSF or IL-2 [47]. Moreover, this argue against the role of this kind of prolonged (1.5-24 h) ERK1/2 activation on starting the cell death-instead of the cell division program [43].

It is known that STAT4-deficient lymphocytes have a reduced ability to proliferate in response to IL-12 [21], which suggests a role for STAT4 in cell cycle progression [19,20]. However, STAT4 serine phosphorylation is neither regulated by ERK1/2 nor necessary to promote cell proliferation during IL-12 responses [18,19], so maybe other transcription factors like certain members of the STAT family (e.g. STAT3 or STAT5 [17]), are downstream ERK1/2. In this context, it has been described that ERK1/2criptional activation of sometranscription , like the Ets protein Elk-1 or p90-RSK [47]. However, we did not see any upregulation of Elk-1 or p90-RSK phosphorylation, although IL-12 seems to lead to an ERK1/2-mediated Ser-727 phosphorylation of STAT3 (our unpublished observations). Besides, according to our results with the ERK inhibitor (Figure 7B), both TCR and IL-12R may share some signalling pathways involved in cell proliferation.

As commented above, segregation of IL-12R $\beta$ 2 within lipid rafts probably facilitates the activation of JAK2-ERK1/2 [48], through a still unknown mechanism, and certain downstream transcription factors to control cell proliferation and/or survival. The identity of these transcription factors remains obscure, but Sugimoto *et al.* found increased levels of c-Myc in cell extracts from IL-12-treated murine 2D6 T lymphocytes [17]. Our data in human primary T cells confirm Sugimoto's finding, although it is worth to mention that differences between IL-12-treated *vs* non-treated T-cells regarding c-Myc levels are rather subtle and maybe not enough by themselves to explain the proliferative effect of IL-12, so other transcription factors may participate. As with ERK inhibitor, blockade of c-Myc-Max interaction abrogates the IL-

IL-12-dependent proliferation of T cells. However, the c-Myc inhibitor affects as well the mitogenic effect of the lectin, which once again points out to signalling pathways linked to cell-cycle control shared by TCR and IL-12R and reinforced by IL-12.

It is known that the amount of c-Myc is carefully regulated at different levels (transcription, RNA/protein stability, translation), being high in cycling cells and low during differentiation. Proper control of c-Myc requires a transient induction during the early G1 phase, and c-Myc phosphorylation on Ser-62 or Thr-58 plays a role on this short-lasting expression, increasing or decreasing the stability of c-Myc, respectively [42]. An ERK1/2-dependent Ser-62 phosphorylation of c-Myc was an obvious candidate to explain the slightly increased levels of this transcription factor in IL-12-treated blasts, but neither IL-12 strongly modulates the Ser-62- of c-Myc nor ERK-1/2 seems to affect the level of this covalent modification. Therefore, in spite of MAPK physically interacting with c-Myc, this group of kinases does not perform the *in vivo* phosphorylation of c-Myc at Ser-62, in agreement with Lutherbach *et al.* [49] and, as a whole, all these observations suggest that the effect of ERK1/2 on cell proliferation must be mediated by another transcription factor.

Finally, according to our model IL-12 up regulates CD26 expression as part of a shuttling mechanism to exclude the low molecular weight isoform of CD45, CD45R0, from rafts and to control by this mechanism its tyrosine-phosphatase activity [12]. Janus kinases, like the IL-12R $\beta$ 1-associated TYK2 or the IL-12R $\beta$ 2-linked JAK2, are dephosphorylated by CD45 [26], which downmodulates signalling through the IL-12 receptor. Since after IL-12 ligation both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 are basically found in non-rafts microdomains, this gives more support to a model in which that the slower IL-12-dependent movement of a CD26-CD45R0 complex out of lipid rafts would allow CD45R0 to turn off the non-raft resident IL-12R at later stages. However, there is still another possibility that we also favour; it has been shown that raft-excluded CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK1/2 activation through a pathway involving Lck, Grb2, Sos, and K-Ras [50], so it is not unlikely that this membrane relocation of CD26-CD45R0 caused by IL-12 could contribute to the above commented IL-12-dependent ERK1/2 activation. Indeed, it has been demonstrated in this paper that microdomain integrity appears relevant for this process and that a 56 kDa tyrosine-phosphorylated protein, maybe the

Src kinase p56lck, is induced by IL-12. However, the Src kinase inhibitor Damnacanthal is not able to suppress the upregulation on T-cell proliferation observed with IL-12 (data not shown), so this question remains unclear and new experiments are necessary to shed light on the signalling cascade triggered by IL-12.

In conclusion, we propose that IL-12R $\beta$ 2 is a raft resident protein which moves out of these microdomains upon IL-12 interaction to form the high affinity receptor with IL-12R $\beta$ 1. Besides, IL-12 enhances T cell proliferation through an IL-12R $\beta$ 2-JAK2-ERK1/2-dependent mechanism, which is connected to rafts microdomains and, at least partially, to an independent and more delayed c-Myc-linked pathway. Nevertheless, which are the ERK1/2 most immediate targets associated to cell proliferation upon IL-12R triggering remains to be elucidated.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Dr. J. Trotter (Scripps Institute, La Jolla, CA), for the WinMDI software, and to the Centro de Transfusiones de Galicia, for all the buffy coats provided. This paper was supported by the grant PGIDIT05PXIB20001PR, from Xunta de Galicia.

## REFERENCES

1. Matkó, J. and Szöllösi, J. (2002) Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol. Lett.* **82**, 3-15
2. Marmor M. D. and Julius, M. (2001) Role of lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signalling. *Blood* **98**, 1489-1497
3. Goebel, J., Forrest, K., Morford, L. and Roszman, T. L. (2002) Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 199-206
4. Vamosi, G., Bodnar, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C. K., Langowski, J., Toth, K., Matyus, L., Szöllösi, J., Waldman, T. A. and Damjanovich, S. (2004) IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 11082-11087
5. Salgado, F. J., Piñeiro, A., Canda-Sánchez, A., Lojo, J. and Nogueira, M. (2005) Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 163-176
6. Kriegel, M. A., Tretter, T., Blank, N., Schiller, M., Gabler, C., Winkler, S., Kalden, J. R. and Lorenz, H. M. (2006) Interleukin-4 supports interleukin-12 induced proliferation and interferon-gamma secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunology* **119**, 43-53.
7. Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. (2004) CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J. Clin. Invest.* **114**, 1209-1217.
8. King, I. L. and Segal, B. M. (2005) Cutting edge: IL-12 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**, 641-645
9. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133-146
10. Watford, W. T., Hissong, B. D., Bream, J. H., Kanno, Y., Muul, L. and O'Shea, J. J. (2004) Signalling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* **202**, 139-156

11. Cordero, O. J., Salgado, F. J., Viñuela, J. E. and Nogueira, M. (1997) Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology* **197**, 522-533
12. Salgado, F. J., Lojo, J., Alonso-Lebrero, J. L., Lluís, C., Franco, R., Cordero, O. J. and Nogueira, M. (2003) A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation. *J. Biol. Chem.* **278**, 24849-24857
13. Wu, C.-Y., Wang, X., Gadina, M., O'Shea, J. J., Presky, D. H. and Magrath J. (2000) IL-12 receptor  $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ )-deficient mice are deficient in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J. Immunol.* **165**, 6221-6228.
14. Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K. and Gubler, U. (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor units. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14002-14007
15. Wu, C., Warriar, R. R., Wang, X., Presky, D. H. and Gately, M. K. (1997) Regulation of interleukin-12 receptor beta 1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 147-154
16. Rogge, L., Papi, A., Presky, D. H., Biffi, M., Minetti, L. J., Miotto, D., Agostini, C., Semenzato, G., Fabbri, L. M. and Sinigaglia, F. (1999) Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **162**, 3926-3932
17. Sugimoto, N., Nakahira, M., Ahn, H. J., Micallef, M., Hamaoka, T., Kurimoto, M. and Fujiwara, J. (2003) Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur. J. Immunol.* **33**, 243-251
18. Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E. H., Stancato, L. F., Gutkind, J. S. and O'Shea, J. J. (2000) Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* **96**, 1844-1852.
19. Morinobu, A., Gadina, M., Strober, W., Visconti, R., Fornace, A., Montagna, C., Feldman, G. M., Nishikomori, R. and O'Shea, J. J. (2002) STAT4 serine phosphorylation

- is critical for IL-12-induced IFN- $\gamma$  production but not for cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12281-12286
20. Nishikomori, R., Usui, T., Wu, C-Y, Morinobu, A., O'Shea J. J. and Strober, W. (2002) Activated STAT4 has an essential role on Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R $\beta$ 2 chain expression and signalling. *J. Immunol.* **169**, 4388-4398
  21. Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T. and Grusby, M. J. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**, 174-177
  22. Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. and Ihle J. N. (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**, 171-174
  23. Yoo, J. K., Cho, J. H., Lee, S. W. and Sung, Y. C. (2002) IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4<sup>+</sup> T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Immunol.* **169**, 3637-3643
  24. Pignata, C., Sanghera, J. S., Cossette, L., Pelech, S. L. and Ritz, J. (1994) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation and activation of 44 kD mitogen-activated protein kinase in human T cells. *Blood* **83**, 184-190
  25. Athié-M, V., Flotow, H., Hilyard, K. L. and Cantrell, D. A. (2000) IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1425-1434
  26. Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson C. D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D. M. and Penninger, J. M. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* **409**, 349-354
  27. Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N. and Schwille, P. (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys. J.* **87**, 1034-1043
  28. Ilangumaran, S., Arni, S., Chicheportiche, Y., Briol, A. and Hoessli, D. C. (1996) Evaluation by dot-immunoassay of the differential distribution of cell surface and

- intracellular proteins in glycosylphosphatidylinositol-rich plasma membrane domains. *Anal. Biochem.* **235**, 49–56
29. Ilangumaran, S. and Hoessli, D. C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* **335**, 433-440
  30. Thomas, S., Kumar, R. S., Casares, S. and Brumeanu, T. D. (2003) Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane. *J. Immunol. Methods* **275**, 161-168
  31. Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Raederstorff, D., Stockinger, H. and Waldhausl, W. (1998) Polyunsaturated fatty acids inhibit T-cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J. Cell Biol.* **143**, 637-644
  32. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell. Biol.* **141**, 929-942
  33. Magee, A. I. and Parmyrd, I. (2003) Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol.* **4**, 234
  34. Babiychuk, E. B. and Draeger, A. (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem. J.* **397**, 407-416
  35. Chua, A. O., Chizzonite, R., Desai, B. B., Truitt, T. P., Nunes, P., Minetti, L. J., Warriar, R. R., Presky, D. H., Levine, J. F., Gately, M. K. and Gubler, U. (1994) Expression cloning of a human IL-2 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J. Immunol.* **153**, 128-136
  36. Zou, J., Presky, D.H., Wu, C.-Y. and Gubler, U. (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits  $\beta 1$  and  $\beta 2$  and JAK kinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 6073-6077
  37. Rouquette-Jazdanian, A.K., Foussat, A., Lamy, L., Pelassy, C., Lagadec, P., Breittmayer, J.-P. and Aussel C. (2005) Cholera toxin B-subunit prevents activation and proliferation of human CD4<sup>+</sup> T cells by activation of a neutral sphingomyelinase in lipid rafts. *J. Immunol.* **175**, 5637-5648

38. Martin, M., Schneider, H., Azouz, A. and Rudd, C.E. (2001) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* **194**, 1675-1682
39. Bright, J. J., Du, C. and Sriram, S. (1999) Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **162**, 6255-6262
40. Asao, H. and Fu, X. Y. (2000) Interferon- $\gamma$  has dual potentials in inhibiting or promoting cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **275**, 867-874
41. Chow, S., Patel, H., and Hedley, D. W. (2001) Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. *Cytometry* **46**, 72-78
42. Sears, R. C. (2004) The life cycle of c-Myc. From synthesis to degradation. *Cell Cycle* **3**, 1133-1137
43. Wang, Z., Ge, L., Wang, M. and Carr, B.I. (2006) Phosphorylation regulates Myc expression via prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Cell Physiol.* **208**, 133-140
44. Gupta, S., Seth, A. and Davis, R. J. (1993) Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3216-3220
45. Noguchi, K., Kitanaka, C., Yamana, H., Kobubu, A., Mochizuki, T. and Kuchino, Y. (1999) Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 32580-32587
46. Rao, R., Logan, B., Forrest, K., Roszman, T. L. and Goebel, J. (2004) Lipid rafts in cytokine signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **15**, 103-100
47. McCubrey, J. A, Stratford May, W., Duronio, V. and Mufson, A. (2000) Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* **14**, 9-21
48. Anderson, D. H. (2006) Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog. lipid Res.* **45**, 102-119

49. Lutterbach, B. and Hann, S.R. (1999) c-Myc transactivation domain kinases: questionable role for MAP kinases in c-Myc phosphorylation. *J. Cell Biochem.* **71**, 483-491
50. Zhang, M., Moran, M., Round, J., Low, T. A., Patel, V. P., Tomassian, T., Hernandez, J. D. and Carrie Miceli, M. (2005) CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J. Immunol.* **174**, 1479-1490.

## TABLES AND FIGURES

**Table I. p38 and ERK1/2, but no JNK, MAP kinases are activated by IL-12.** Phospho-p38, JNK and ERK1/2 levels were measured on the same denatured cell lysate from human PHA-lymphoblasts, stimulated (T=5') or not (T=0') for 5 min with IL-12 (2 ng/ml). Calculated values, shown in pg/ml, were obtained using MAP kinase CBA standard curves. Data were acquired on a BD FACSCanto™ flow cytometer and analysis performed with FCAP Array™. The same samples were analyzed by Western blot using identical antibodies in Figure 6D.

	IL-12			PMA
	T=0'	T=5'	%*	%*
<b>p38</b>	135.23 pg/ml	575.96 pg/ml	4.3	2.7
<b>JNK</b>	11.53 pg/ml	12.71 pg/ml	1.1	1.7
<b>ERK</b>	19.24 pg/ml	251.85 pg/ml	13.1	72.7 <sup>†</sup>

\* Data in those columns are expressed in per one percentage units (%). † Above lineal range.

**Figure 1 Human PBMCs increase the amount of IL-12Rβ2 in response to PHA in a dose-dependent manner.** (A) Effect of different concentrations of PHA on the expression of IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 on PBMCs after three days of culture. IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 protein levels were measured by flow cytometry using a FACScalibur® flow cytometer; (n=3). (B) Human PBMCs were stimulated for two-three days with PHA (10 μg/ml) to generate PHA-lymphoblasts. The culture medium was supplemented with different concentrations of human recombinant IL-2 for an additional period of 14-16 hours to get higher IL-12R levels, specially IL-12Rβ2; (n=3).

**Figure 2 IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 show a differential sensitivity to cholesterol extraction with MβCD.** (A) PHA-lymphoblasts (10 μg/ml PHA; 3 days) were treated with different concentrations of MβCD in order to reduce the amount of cholesterol within the plasma membrane. Cells were evaluated for CD59 (raft resident protein) and CD71 (non-raft

protein) expression by flow cytometry. All the data were relativized considering the highest value (w/o M $\beta$ CD) as 100 %. In **B** and **C**, PHA-lymphoblasts were incubated (or not) with 2 ng/ml IL-12 for 5 min and plasma membrane cholesterol subsequently depleted with M $\beta$ CD (2,5 mM, 15 min, 37 °C). Sensitivity of both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins to M $\beta$ CD was measured by flow cytometry (**B**; samples were labeled in triplicate; SD, standard deviation) or Western blotting (**C**; duplicated samples). In **C**, constitutive  $\beta$ -actin expression was measured as a protein loading control. Data shown in **A**, **B** and **C** are representative of three independent experiments..

**Figure 3 IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 differential sensitivity to non-ionic detergent Triton X-100.** In flow cytometry experiments (**A** and **B**), PHA-lymphoblasts (10  $\mu$ g/mL PHA; 3 days), incubated in the absence or the presence of IL-12 (2 ng/ml, 5 min, 37 °C), were exposed to PBS pH 7.4 containing (or not) 0.1 % (v/v) Triton X-100 for 5 min on ice. (**A**) Both ganglioside GM1 (a raft and Triton X-100-resistant marker) and CD71 (a non-raft and Triton X-100 sensitive marker) were subsequently analysed. (**B**) Effect of Triton X-100 on IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 protein levels. Mean values come from triplicated samples; SD, standard deviation. (**C**) Cell extracts from PHA-lymphoblasts (10  $\mu$ g/mL PHA; 3 days) were subjected to discontinuous sucrose density gradient ultracentrifugation, and eleven fractions, numbered from top to bottom, collected. Rafts (3-6) and non-raft (10-11) fractions were pooled, separated by SDS-PAGE and both IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2 proteins detected, in duplicated samples, with specific antibodies. Constitutive  $\beta$ -actin expression was used as protein loading control.

**Figure 4 IL-12R $\beta$ 2, but not IL-12R $\beta$ 1, colocalizes with sphingolipids/cholesterol-enriched regions (rafts) of the plasma membrane.** Human lymphoblasts (10  $\mu$ g/mL PHA for 3 days +1 ng/ml IL-2 for 14-16 hours) were incubated (**A** and **B**) or not (**A**) with 2 ng/ml IL-12 for 5 min, washed, fixed and stained. (**A**) GM1<sup>+</sup> areas of the membrane (rafts) were revealed using Alexa488-cholerae toxin B-subunit (green; CTB), while DiI is a unsaturated lipid probe selective for phospholipid rich areas of the membrane (red; non-rafts). The absence of yellow

color (merged), as well as the cytofluorogram, prove the expected lack of colocalization between both markers. **(B)** Location of IL-12R $\beta$ 1 or IL-12R $\beta$ 2 proteins in comparison with GM1 (CTB) and DiI markers. Only overlaid images, with their respective cytofluorograms, are shown. White dots, pointing up the presence of colocalizing molecules on the cell surface, correspond with those circled in the cytofluorogram on the right. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

**Figure 5 JAK2 mediates, in human T lymphoblasts, the effect of IL-12 on cell proliferation and CD26-expression.** **(A)** CFSE-stained PBMCs were incubated, at the indicated cell densities, in the presence of different amounts of mitogen (1.25, 2.5 and 5  $\mu$ g/l PHA). Culture medium was supplemented, or not, with 2 ng/l IL-12 and cell proliferation analysed by flow cytometry after 5 days; Rf (y-axis) is the calculated responder frequency (i.e., the percentage of responder T cells that divided at least once). **(B)** PBMCs were stained with CFSE, seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml, activated with 1.25  $\mu$ g/ml PHA  $\pm$  2 ng/ml IL-12) and cultured for 5 days with DMSO (negative control) or 25  $\mu$ M of the corresponding inhibitor (either A1 or B42). Flow cytometry results in A and B are representative of independent experiments (n=3). **(C)** In parallel, CD26 expression was measured by flow cytometry using the anti-CD26 TP1/16-FITC mAb (n=2).

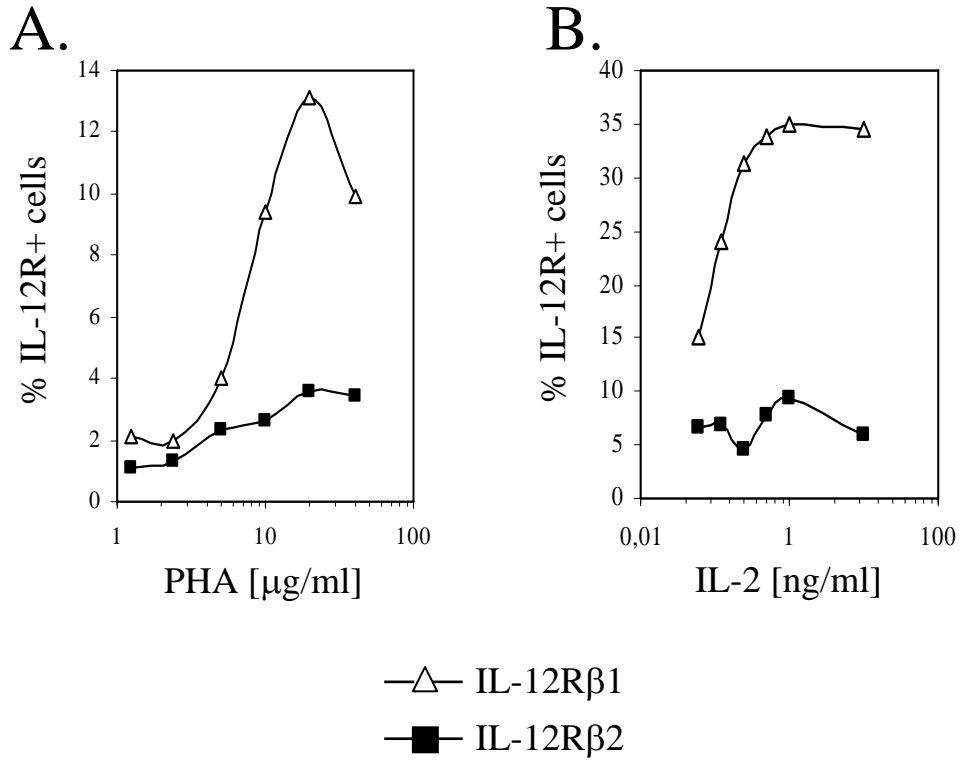
**Figure 6 IL-12 activates MAPK ERK1/2 through a JAK2-dependent mechanism.** PBMCs were cultured for 3 days with 1.5  $\mu$ g/ml PHA, washed and stimulated for the indicated times with 2 ng/ml IL-12. Samples were lysated with SDS sample buffer and proteins resolved by electrophoresis, transferred to PVDF and probed with anti-phospho-Tyr (clone PY20; **A**) or Phospho-ERK1/2 Pathway Sampler Kit (Cell signalling Technologies; **B**), containing antibodies against phospho-Raf (Ser-259), phospho-MEK1/2 (Ser-217/Ser-221), phospho-ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204); Bands were visualized using a chemiluminescence detection system (ECL<sup>plus</sup>). **(C)** Flow cytometry experiment showing the time-course phosphorylation of ERK1/2 upon stimulation with either anti-CD3+GAM or 2 ng/ml IL-12. **(D and E)** PHA-blasts were treated for 5 minutes with PMA (positive control; **D**), anti-CD3+GAM (TCR; positive

control; **E**) or 2 ng/ml IL-12 (**D** and **E**). Phospho-ERK1/2 levels were measured by Western blot (**D**; same lysates as in CBA Flex Set experiment in Table I) or flow cytometry (**E**). In **E**, Culture medium was supplemented with 25  $\mu$ M of either A1 (TYK2) or B42 (JAK2) Janus kinase inhibitors. ERK1/2 phosphorylation enhancement was expressed as fold over T=0.

**Figure 7 ERK1/2 pathway activation is a raft dependent event important for the mitogenic effect of IL-12.** (**A**) PHA-blasts (1.5  $\mu$ g/ml PHA, 3 days), treated or not with 1 mM M $\beta$ CD, were incubated for 5 min with 2 ng/ml IL-12. ERK1/2 phosphorylation was evaluated by flow cytometry and Western blotting. (**B**) CFSE labeled PBMCs were polyclonally stimulated with 1.25  $\mu$ g/ml PHA in the presence or absence of 2 ng/ml IL-12 and different amounts of ERK inhibitor (ERKi). Triplicated samples were analysed by flow cytometry and the responder frequency (Rf) calculated as in Figure 5. Results (mean $\pm$ SD) are representative of three experiments.

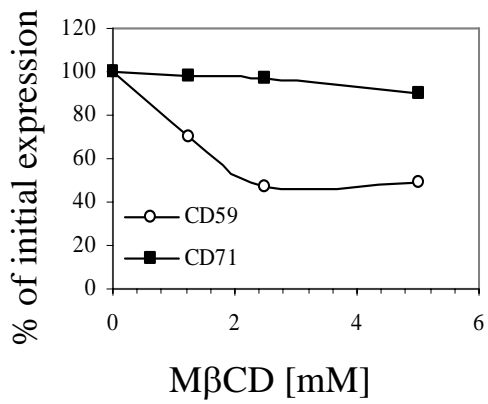
**Figure 8 c-Myc upregulation takes place through a JAK2- and ERK1/2-independent signal transduction pathway, but contributes to the mitogenic effect of IL-12 on human T-cells.** (**A**) Western blots showing higher c-Myc levels in IL-12-treated (0.25 x 10<sup>6</sup> cells/ml, 1.25  $\mu$ g/ml PHA  $\pm$  2 ng/ml IL-12, five days).  $\beta$ -actin levels were measured in order to obtain relative data for c-Myc expression. (**B**) The amount of c-Myc was measured by flow cytometry in three days PHA lymphoblasts cultured for additional 24 or 48 hours with either conditioned medium (basal) or IL-12 (2 ng/ml). IL-12 cultures were supplemented, with - (ERKi) or JAK2- (B42) inhibitors. (**C**) c-Myc phosphorylation up-regulation by PMA or IL-12. Three days PHA-lymphoblasts were incubated for the indicated times with PMA or IL-12 (in the absence or the presence of ERKi or B42). c-Myc phosphorylation kinetic was monitored by flow cytometry with a specific anti-phospho-Thr-58/Ser-62 antibody. (**D**) c-Myc/Max interaction inhibition down-modulates cell proliferation of PBMCs activated for 5 days with either PHA or PHA+IL-12. CFSE-fluorescence was analysed by flow cytometry and the responder frequency (Rf) calculated as previously. Error bars represent the SD of triplicated samples (n=3).

Figure 1

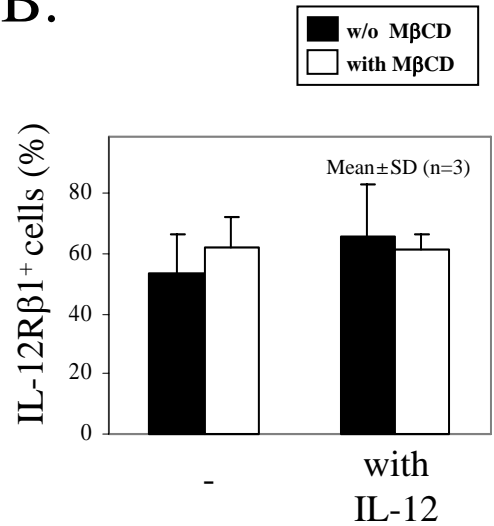


# Figure 2

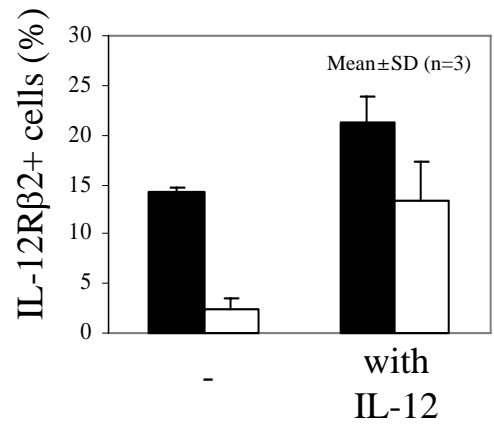
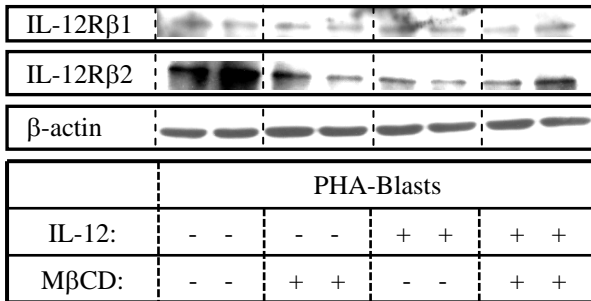
A.



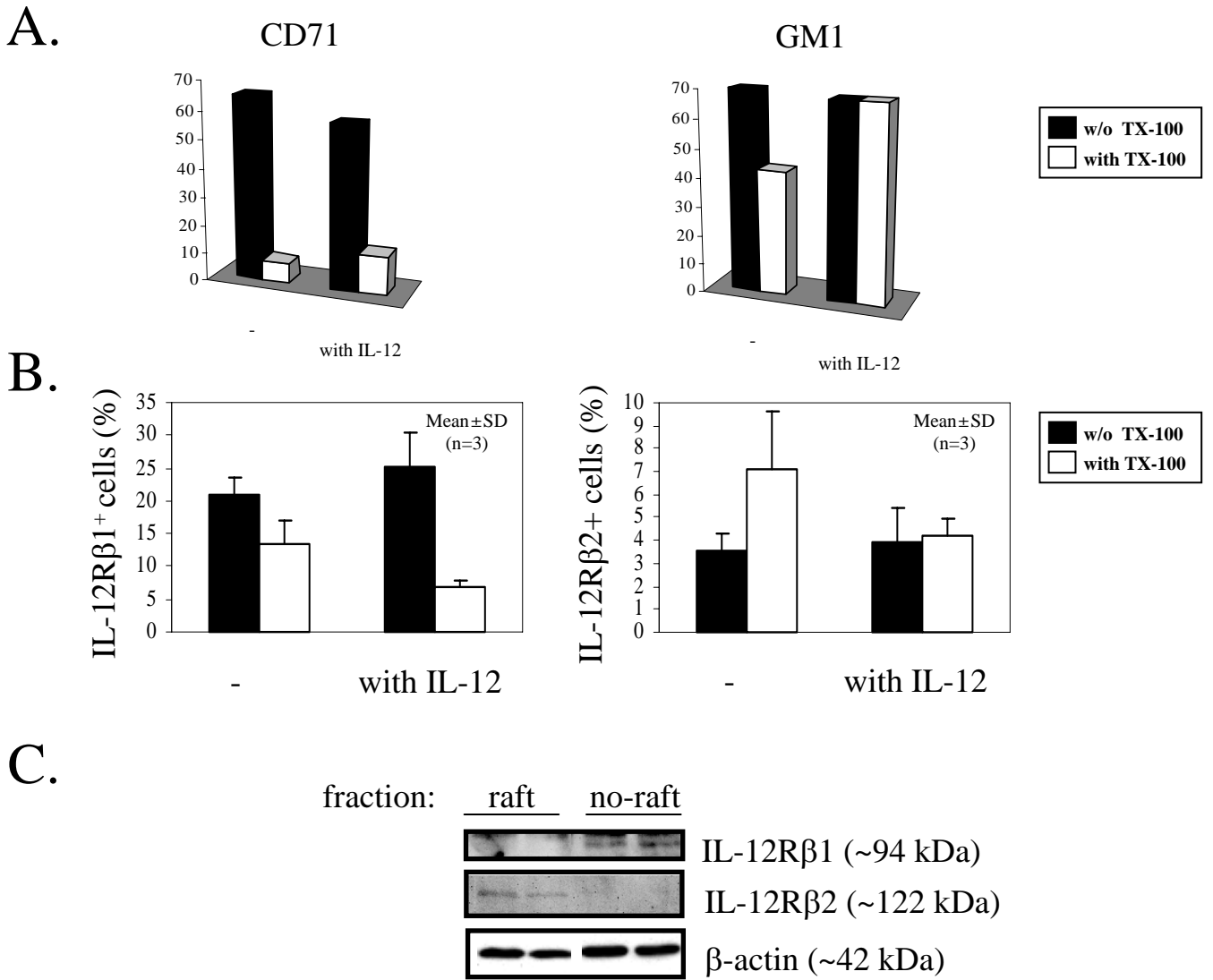
B.

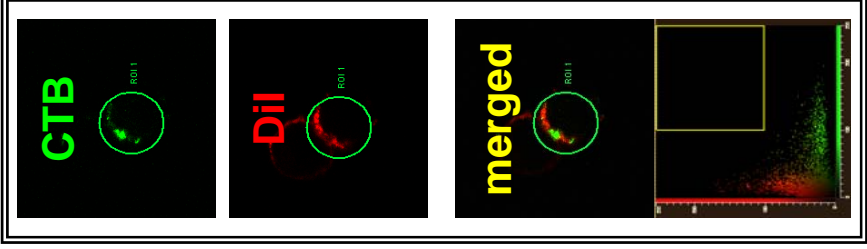
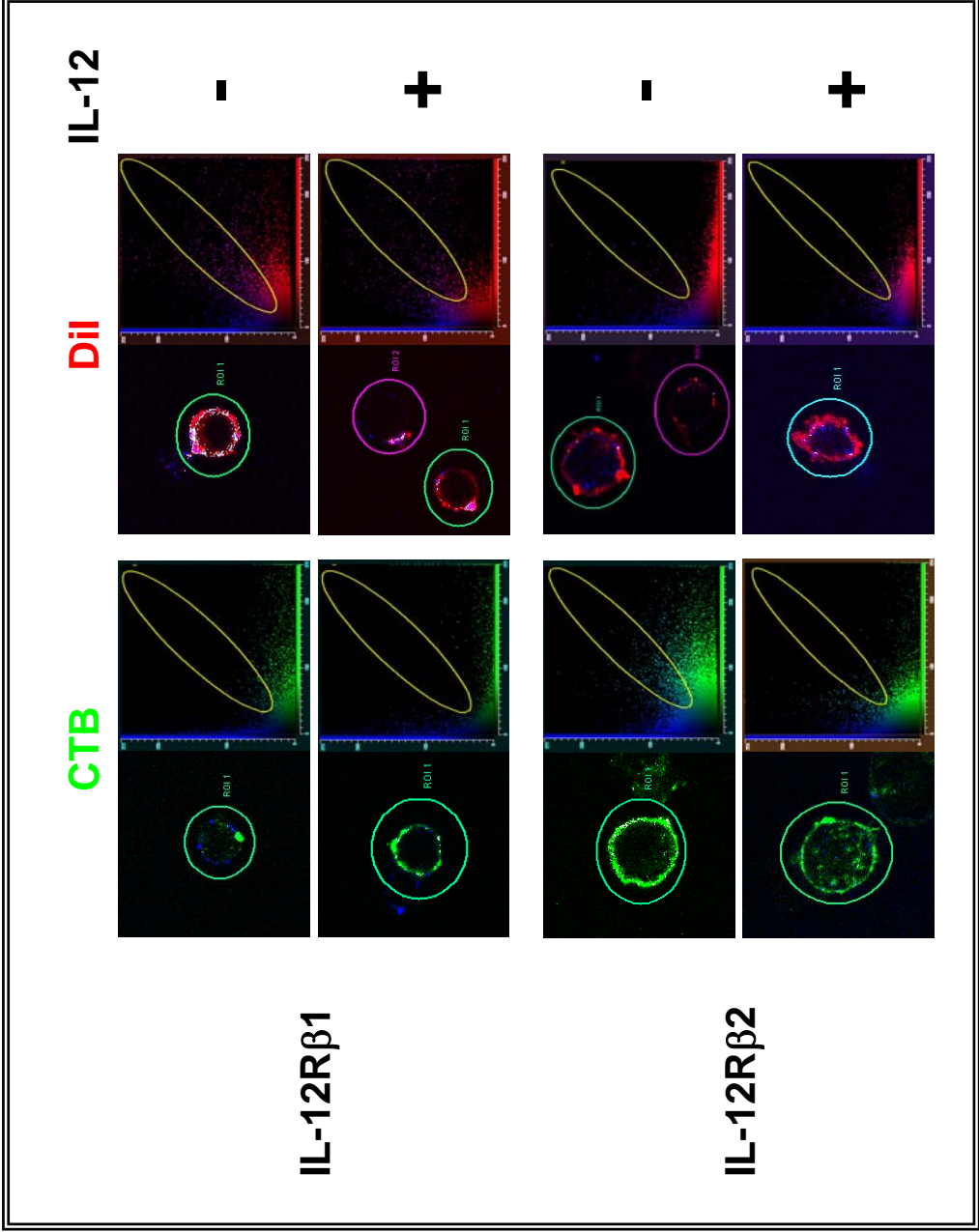


C.



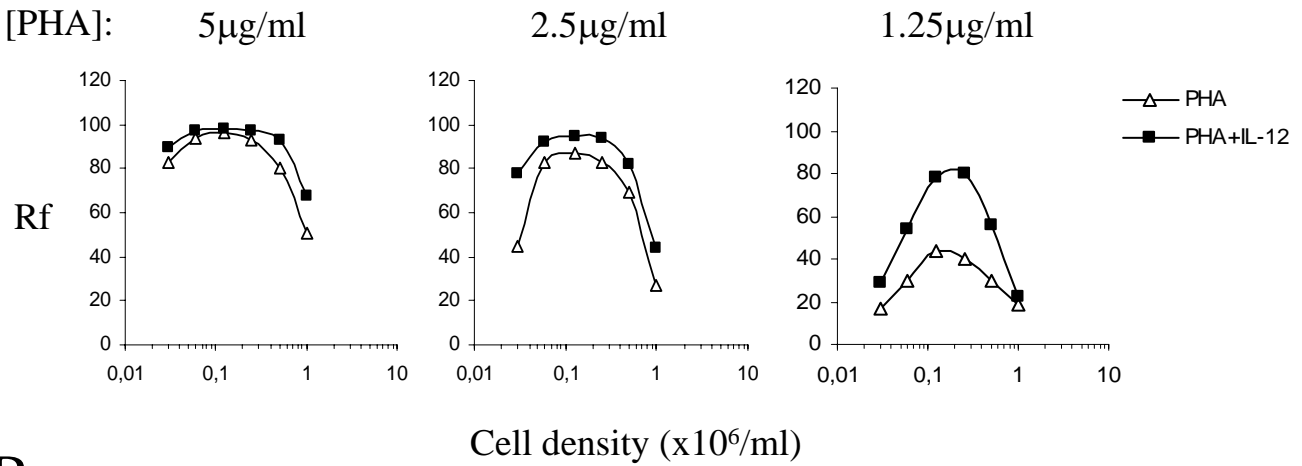
# Figure 3



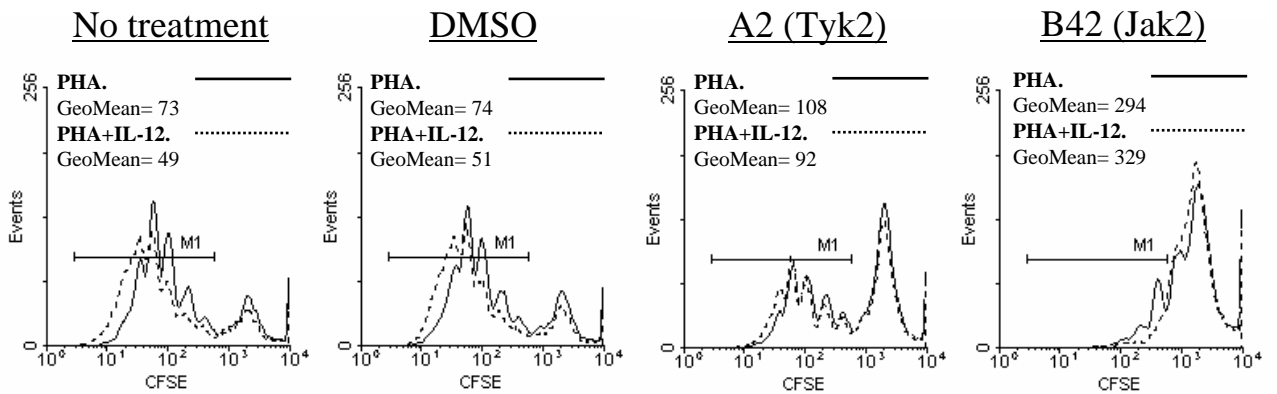


# Figure 5

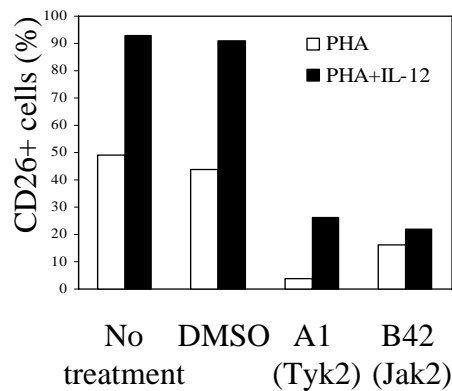
**A.**



**B.**

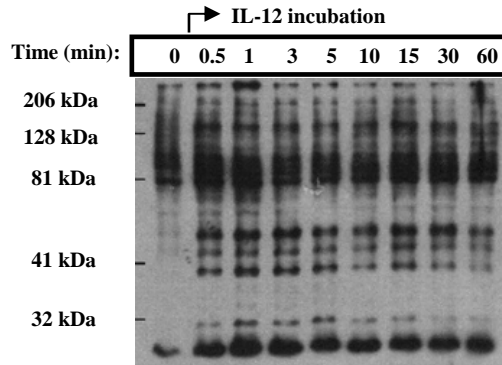


**C.**

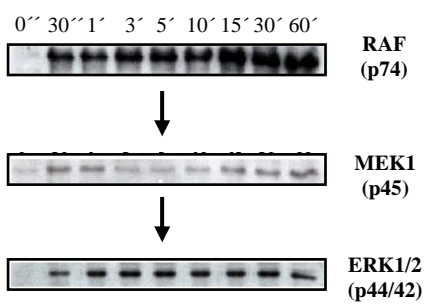


# Figure 6

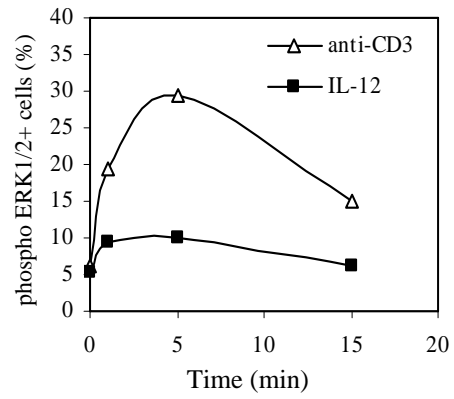
A.



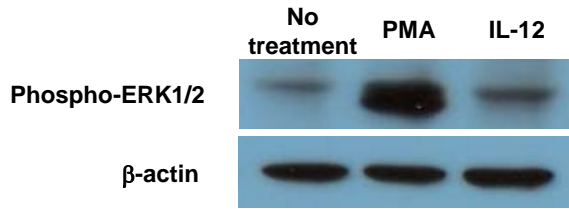
B.



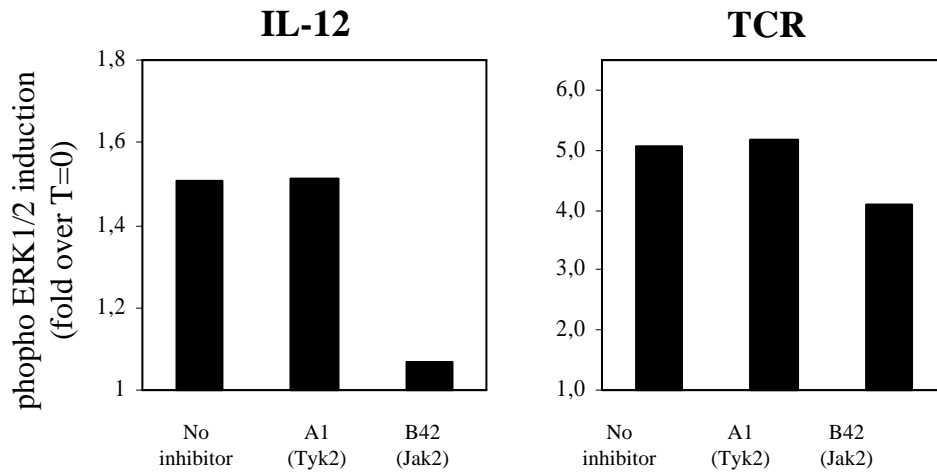
C.



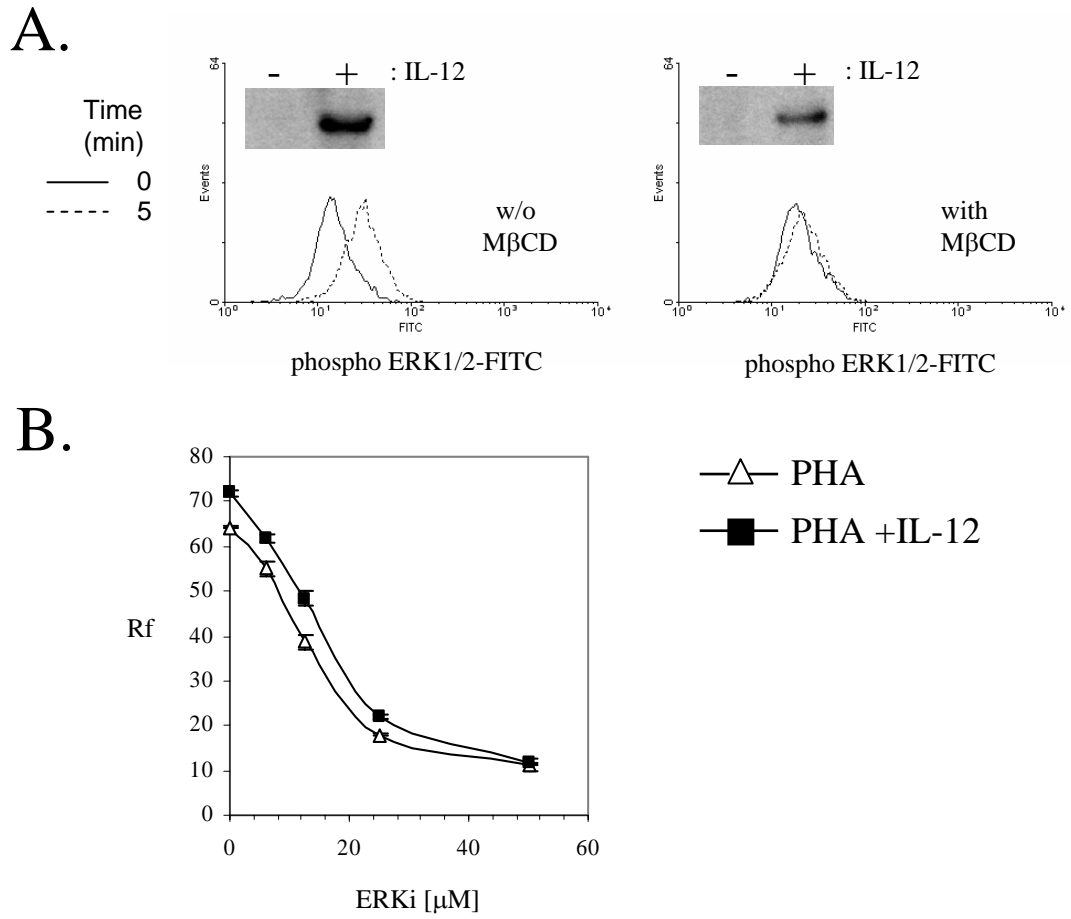
D.



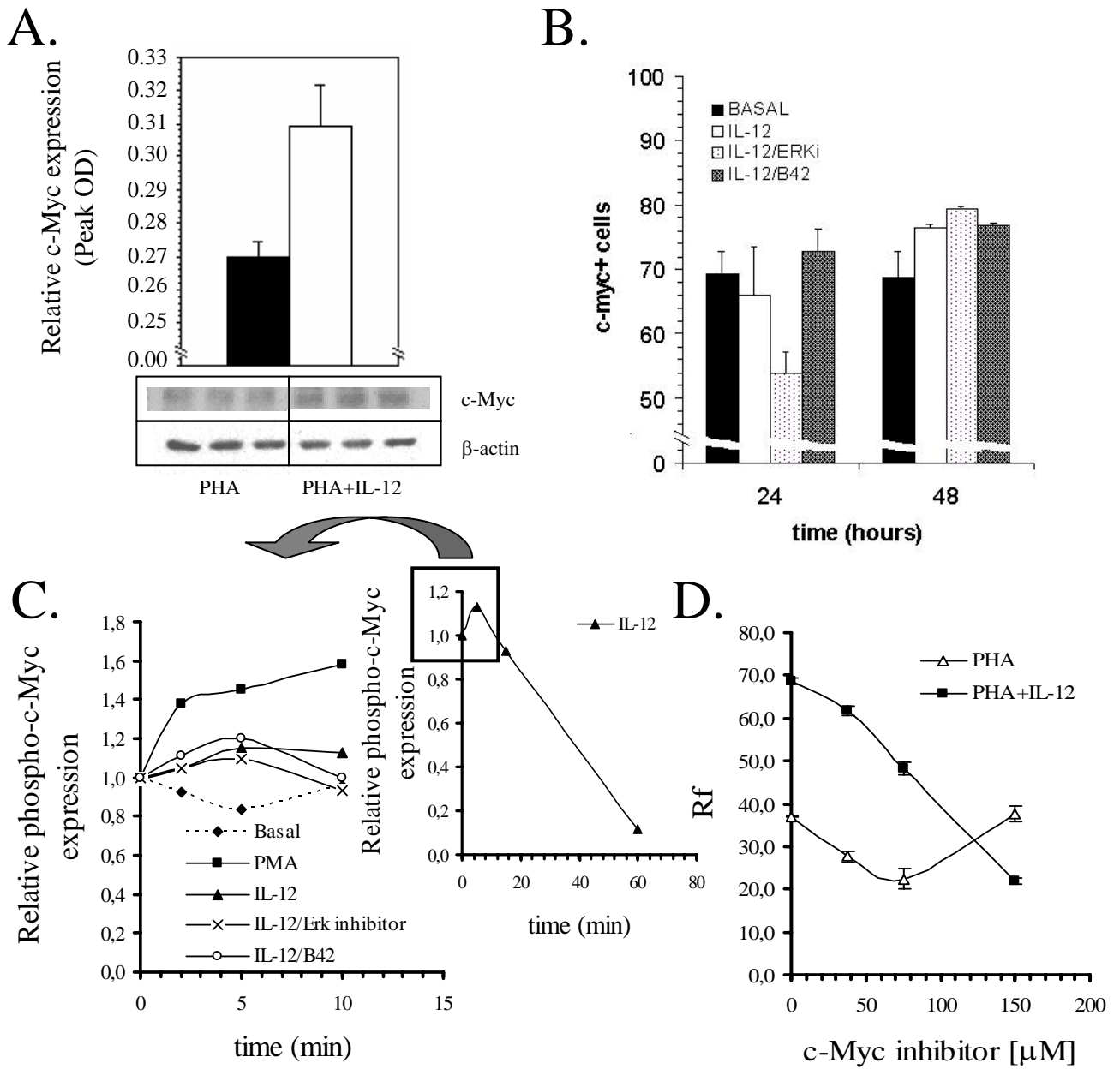
E.



# Figure 7



# Figure 8





## Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes

FRANCISCO J. SALGADO, ALICIA PIÑEIRO, ANA CANDIA-SÁNCHEZ, JUAN LOJO & MONTSERRAT NOGUEIRA

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Spain*

*(Received 11 November 2004, and in revised form 4 January 2005)*

### Abstract

Lipid rafts are specialized plasma membrane microdomains in which glycosphingolipids and cholesterol are major structural components. Their relative insolubility to nonionic detergents is the most widely used method to purify these structures. Several signalling proteins are associated with these microdomains in T lymphocytes, including receptors for growth factors and cytokines. ProT $\alpha$  is a highly conserved and widely distributed protein whose physiological functions remain elusive. In previous works we identified, by means of affinity cross-linking, affinity chromatography and fluorescence microscopy, a set of binding proteins for ProT $\alpha$  in human lymphoblasts. Now, this work goes deeply in that ProT $\alpha$  receptor description revealing, by different experimental approaches, its presence in lipid rafts. Moreover, our results fit a model in which a tyrosine phosphorylation signalling cascade confined to rafts is initiated upon ProT $\alpha$  receptor recognition, which represents an important and promising finding in the research for elucidating the molecular mechanisms underlying the immunomodulatory functions of ProT $\alpha$ .

**Keywords:** *Prothymosin  $\alpha$ , rafts microdomains, confocal microscopy, phosphotyrosine pathway*

**Abbreviations:** M $\beta$ CD, methyl beta cyclodextrin; ProT $\alpha$ , Prothymosin  $\alpha$ ; GPI, glycosylphosphatidylinositol; TX-100, Triton X-100; CTB, cholerae toxin B subunit; HRP, horseradish peroxidase; PE, phycoerythrin; FITC, fluorescein isothiocyanate; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; GM1, ganglioside M1; mAb, monoclonal antibody; PHA, phytohemagglutinin; AP, alkaline phosphatase.

### Introduction

The current view of the three-dimensional plasma membrane organization includes specific interactions between membrane lipids and proteins, producing a physical and functional compartmentation in dynamic microdomains also called rafts [1,2]. Rafts are enriched in extracellular GPI-anchored as well as cytoplasmic acylated proteins. However, transmembrane receptors or cytoskeletal proteins have been also detected by different means [3]. These microdomains deeply affect membrane functionality since the clustering of all these proteins (and associated molecules) in a very small area renders supramolecular complexes with new functions related with vesicular trafficking, signal transduction, viral gemation and cell motility [4–6]. However, despite the major advances made, the presence of rafts *in vivo*,

their dynamics and stability as well as their actual dimensions are still under discussion [7–10].

The raft model has received much attention after the discovery of their role in the functionality of the lymphocyte, the central cell of the Immune System. This is because a crucial event in its biology, the signalling through the TCR/BCR receptors, is closely related with these membrane structures. According to a recent model both TCR and BCR are weakly associated with or even excluded from rafts during the resting state, and only upon triggering of these receptors (for example, after antibody-crosslinking) they move inside these microdomains [11–15], where Src kinases accumulate. The number of signalling processes related with proliferation and differentiation where it was found a link to rafts is increasing daily. Many cytokine and growth factor

---

Correspondence: Montserrat Nogueira, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Sur s/n, 15782, Santiago de Compostela, A Coruña, España (Spain). Tel: +34 981 563100 ext 13301 or 13244. Fax: +34 981 596904. E-mail: bnlmna@usc.es

receptors are located in this region, including IL-2 $\alpha$  [16], EGFR [17], PDGF [18], FGF [19] and insulin [20]. The current goal is not only to find out the signalling mechanisms triggered by these structures, but also the functional consequences that a membrane compartmentation could have on these transduction pathways.

Prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) is a highly acidic and small protein of only 109 amino acids with an unusual primary structure. Based on its wide distribution or high conservation degree amongst mammals one would expect ProT $\alpha$  to play an essential role in the organism [21]. However, despite the number of effects described for this protein (e.g., intracellular modulator of nuclear processes [22], inhibitor of apoptosome formation [23] or extracellular functions; reviewed in Piñeiro et al. [21]) none of them have been really accepted as its actual physiological role.

The immunoregulatory properties of ProT $\alpha$  have been described both *in vivo* and *in vitro*. Perhaps, the most outstanding *in vivo* assays are the ones showing an anticancer activity for ProT $\alpha$  in an experimental tumour model, prolonging the survival of DBA/2 mice inoculated intraperitoneally with syngenic L1210 leukemic cells [24,25]. *In vitro*, ProT $\alpha$  has been shown to increase allo- and auto-mixed lymphocyte responses in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus patients [26,27]. Likewise, ProT $\alpha$  regulates IL-2 and PGE<sub>2</sub> secretion in bulk mononuclear cell-mediated lympholytic activities in cancer patients [28]. These effects are also observed in normal donors, where there is an enhancement of the PHA-induced proliferation of PBMC and an increased NK activity [29–33]. Finally, Eckert et al. opened the way for clinical applications of ProT $\alpha$  in melanoma and colorectal tumour patients [34,35].

Taking into account all the above mentioned biological responses to ProT $\alpha$  and after detecting a number of binding sites on the plasma membrane of lymphoid cells [36–38] our group started a study to broach the ProT $\alpha$  receptor characterization. As a result, affinity crosslinking and affinity chromatography experiments uncovered the existence of three binding proteins for ProT $\alpha$  of 31, 29 and 19 kDa on the cell surface of human lymphoblasts [39].

On the other hand, a basic criterion that a putative receptor for a specific ligand should meet is that it must be present not only in all tissues and cell types showing pharmacological activity, but also located in a membrane region where adequately carry out its activity. In this report we demonstrate that different ProT $\alpha$  binding proteins (ProT $\alpha$  receptor) are detected on rafts from human lymphocytes and also that, upon ProT $\alpha$  receptor recognition by its ligand, there is a change in the tyrosine phosphorylation

pattern of proteins exclusively located in rafts. Thus, our data point toward a ProT $\alpha$  receptor being responsible for the activities described for its ligand on the Immune System and reinforce the information gathered during the last years suggesting that the main part of the signalling processes related with cell proliferation and differentiation arise in these lipid rafts microdomains.

## Material and methods

### Cell isolation and culture

Buffy coats were kindly provided by the Centro de Transfusiones de Galicia, Santiago de Compostela, Spain. Human PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) were isolated by Ficoll Paque PLUS (Amersham Biosciences) density gradient centrifugation as described [39]. Cells were cultured at  $1 \times 10^6$  PBMCs/ml in RPMI 1640 (Sigma, Spain) supplemented with 10% inactivated FBS (Invitrogen, Spain), 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin (Sigma), in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and activated with 2.5  $\mu$ g/ml PHA-P (Sigma) [39]. After three days of culture, lymphoblasts (more than 90% CD3<sup>+</sup> T cells) were collected. Cell viability, assessed by trypan blue exclusion and flow cytometry analysis, was always higher than 90%.

### Biotinylation

ProT $\alpha$  isolated from calf thymus and tested for purity by amino acid analysis and high voltage electrophoresis was kindly provided by Thymoorgan GmbH (Vieneenburg, Germany). ProT $\alpha$  (1 mg) was dissolved in 1 ml 0.1 M bicarbonate buffer pH 8.3 and subsequently conjugated with biotin-succinimidyl ester as previously described by Piñeiro et al. [39].

### Isolation of TX-100 resistant membranes/rafts by equilibrium density gradient centrifugation

All the following steps were carried out at 4°C unless indicated and basically as described in Ilangumaran et al. [40–42]. PHA-lymphoblasts ( $50 \times 10^6$ ) were washed twice in PBS pH 7.4 and once in TKM buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EDTA). Detergent lysates were prepared in TKM containing 0.5% Triton X-100 (TX-100) and the protease inhibitors Pefabloc SC (Roche Diagnostics, Barcelona; 2 mM), leupeptin (Sigma; 10  $\mu$ g/ml) and aprotinin (Sigma; 5  $\mu$ g/ml) for 20 min on ice. For equilibrium gradient centrifugation, cell extracts were adjusted to 40% sucrose and loaded into SW55Ti (Beckman L8-M) tubes.

Next, 2.7 ml of 36% sucrose and finally 1.575 ml of 5% sucrose, both solutions prepared in TKM buffer, were successively added. After centrifugation at  $200,000 \times g$  for 18 h, 450  $\mu$ l fractions were collected from top to bottom, numbered (1–11) and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Proteins of discontinuous gradient density fractions were evaluated by dot-blot immunoassay.

#### *Affinity chromatography*

The affinity matrix was prepared by coupling ProT $\alpha$  to a 1 ml NHS-activated HiTrap column (Amersham-Biosciences Europe GmbH, Barcelona, Spain). To this end, 1 ml of 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl pH 8.3 (coupling buffer) containing 6 mg of ProT $\alpha$  was injected into the column and the incubation was carried out for 4 h at  $4^\circ\text{C}$ . According to the manufacturer's instructions after the incubation the amount of protein bound to the column was determined by a BCA test. Several wash steps with buffers A (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl pH 8.3) and B (0.1 M acetate, 0.5 M NaCl pH 4) were performed in order to block any remaining active groups and remove the ligand excess. Column was equilibrated with TNE buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) and coupled to an ÄKTA Purifier 10 (Amersham-Biosciences Europe GmbH, Barcelona, Spain) under the control of UNICORN 3.00 software. TX-100 resistant membranes (rafts) from PHA-activated lymphocytes were purified by equilibrium density gradient ultracentrifugation as described before, pooled and dialysed against TNE buffer. Samples (10–12 ml) was injected stepwise (2 ml each) into the column with a 0.5 ml/min flux. Non specific proteins were washed away with 30 ml of TNE buffer and elution was carried out with 0.1 M glycine pH 2.5 (0.5 ml/min flux). 1 ml fractions were collected, neutralised with 1 M Tris pH 9, concentrated (centricon-10, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) and analysed by SDS-PAGE and silver staining.

#### *Affinity cross-linking*

Aliquots of  $2 \times 10^6$  lymphoblasts were incubated with 40  $\mu$ g biotin-ProT $\alpha$  at room temperature for 30 min. Chemical cross-linking was carried out in a 20  $\mu$ l volume containing 1 mM BS<sup>3</sup> (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, USA) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Reaction was stopped by the addition of 1 ml TES buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose) and cells extensively washed in ice-cold PBS pH 7.4.

#### *Immunostaining and immunofluorescence*

Cells were cross-linked with biotin-ProT $\alpha$  and stained with streptavidin-PE and/or anti CD59-FITC (clon p282; BD-Biosciences, Madrid) and anti CD71-FITC (clon M-A712; BD-Biosciences). The percentage of cells positive for the Ag was evaluated by setting proper negative controls. For studies of detergent resistant proteins associated with rafts we have adapted the work of Janes et al. [43] to flow cytometry. Briefly, cells were treated with 1% TX-100 for 5 min on ice, 10 mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) (Sigma) for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ , or M $\beta$ CD followed by TX-100 extraction, before fixation (3% paraformaldehyde-60 mM sucrose in PBS pH 7.4 for 30 min at RT). Subsequently, cells were washed with PBS-20 mM glycine, blocked with PBS 5% BSA and stained as described above. Samples were processed on a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer and WinMDI software (a kind gift of J. Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) was used to analyse the data.

#### *Protein-depletion from rafts with CTB-HRP/DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Depletion of microdomain-linked proteins was carried out, with modifications, according to Cheng et al. [44,45]. After a 3-day culture period with 2.5  $\mu$ g/ml PHA human lymphoblasts were washed twice in ice-cold modified HBSS<sup>+</sup> (13 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.38 M NaCl, 56 mM glucose and 200 mM Hepes, pH 7.4). Aliquots of  $2 \times 10^6$  cells were incubated with cholera toxin B subunit (CTB; 0.01, 0.05, 0.1 or 0.1  $\mu$ g/ml; Sigma) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  and washed with ice-cold HBSS<sup>+</sup>. Samples were then resuspended at  $4^\circ\text{C}$  in 1 ml HBSS<sup>+</sup> containing diaminobenzidine (DAB, Sigma; 0.5 mg/ml or 0.1 mg/ml), in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01, 0.05, or 0.1%), for 45 min. After two washes with cold HBSS<sup>+</sup>, cell lysis was performed for 30 min on ice with TKM/0.5%TX-100/protease inhibitors and nuclei, debris and DBA cross-linked proteins eliminated after centrifugation at 13,000 rpm for 15 min ( $4^\circ\text{C}$ ). Once all the conditions for this protocol were set up aliquots of  $2 \times 10^6$  lymphoblasts, with or without biotin-ProT $\alpha$  (15  $\mu$ M) bound to the cell surface receptors with BS<sup>3</sup>, were treated with CTB (0.05  $\mu$ g/ml) and incubated in the absence or presence of DAB (0.5 mg/ml) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%) as indicated.

#### *Dot blot analysis*

For these experiments two kinds of serially diluted samples were handled: (a) postnuclear lysates, nor-

malized for total protein or for an even number of cells, from biotin-ProT $\alpha$  (15  $\mu$ M) labelled lymphoblasts, where rafts microdomains were depleted with the CTB-HRP based method described above; (b) equal volumes of samples from discontinuous density gradient fractions. Proteins were applied to the wells of a dot-blot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA) to be transferred to nitrocellulose filters (Hybond<sup>ECL</sup>, Amersham) for analysis with appropriate antibodies: anti CD59 (clon p282; BD-Biosciences), anti CD71 (clon M-A712; BD-Biosciences) or anti biotin-HRP (Sigma). Goat anti mouse (GAM)-HRP (Sigma) was used as a secondary Ab to reveal anti CD59 or anti CD71 binding to the membranes. Detection was carried out by using a nonisotopic chemiluminescent system (ECL<sup>+</sup>, Amersham Biosciences) in all cases. When measuring alkaline phosphatase (AP) levels bromochloroindolyl phosphate/nitro blue tetrazolium was used as a substrate (BCIP/NBT; BioRad Laboratories). Spots were quantified by scanning the filters and densitometry (ImageMaster ID, Amersham Biosciences Europe GmbH).

#### *Confocal microscopy*

For confocal microscopy, aliquots of  $2 \times 10^6$  PHA activated lymphoblasts were cross-linked with 1 mM BS<sup>3</sup> in the presence or absence of 15  $\mu$ M biotin-ProT $\alpha$ . Cells were incubated with streptavidin-PE to detect ProT $\alpha$  receptor expression and stained with anti CD59 or anti CD71 mAbs at 4°C. In order to induce either rafts (with anti-CD59) or non-raft (with anti-CD71) protein clustering and detect both CD59 and CD71 antigens, a further incubation step at RT (i.e., allowing free lateral movements) with a FITC-labelled anti-IgG Ab was performed. After washing with PBS pH 7.4 and SlowFade equilibrium buffer, cells were finally resuspended in a antifading Slowfade solution (Molecular Probes, Inc., OR, USA). Observations were made with a Leica TCS 4D confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany). Colocalization analysis was performed by means of the MultiColour software (version 2.0; Leica Lasertechnik GmbH).

#### *Western blotting*

To detect tyrosine phosphorylation of proteins in total cell lysates, human lymphoblasts ( $5 \times 10^6$ ) were placed in 100  $\mu$ l of RPMI-1640 and incubated at 37°C for 10 min. Then, two 5  $\mu$ l aliquots (controls) were collected and the rest was divided in two identical ( $2 \times 10^6$  cells) samples that were treated

with 45  $\mu$ l of RPMI-1640 containing or not ProT $\alpha$  (5  $\mu$ g/ml final concentration). 10  $\mu$ l samples were removed at different times and cellular lysis was carried out immediately by the addition of an equal volume of  $2 \times$  SDS-PAGE Laemmli sample buffer. In another set of experiments, lymphoblasts ( $50 \times 10^6$ ) obtained as above and treated or not for 1 min at 37°C with 5  $\mu$ g/ml of ProT $\alpha$  were subjected to equilibrium density gradient centrifugation as previously indicated. Insoluble (3–6) and soluble (10–11) fractions were pooled, protein concentration of every sample determined and either the same volume or the same amount of protein loaded in a 7.5% SDS-PAGE. After transferring to PVDF (Hybond<sup>P</sup>) or nitrocellulose (Hybond<sup>ECL</sup>) membranes (Amersham Biosciences Europe GmbH) blots were blocked with 1% BSA in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 1 h at RT, hybridized with anti phosphotyrosine (clon PY20, BD-Biosciences) in blocking buffer 30 min at RT, washed extensively with TBS-T and incubated with GAM-HRP under the same conditions. Bands were detected using ECL<sup>+</sup> and revealed with X-OMAT XAR 5 (Eastman-Kodak, Sigma).

## **Results**

### *ProT $\alpha$ receptor isolated from detergent-resistant membrane fractions*

We recently demonstrated by fluorescence microscopy and biotin-ProT $\alpha$  cross-linking to human lymphoblasts that there is a set of ProT $\alpha$  binding proteins heterogeneously distributed on the cell surface to form a cap at one of the poles [39]. Taking into account that the same capping phenomenon has been described for many important receptors we came to the conclusion that a study on the membrane distribution of this receptor would be interesting. Therefore, PHA-activated lymphocytes were cultured and lipid rafts isolated based on their nonionic detergent insolubility at low temperature and their density when submitted to a discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation step. Eleven fractions, collected and numbered from the top to the bottom of the tube, were analysed for protein concentration and AP activity (Figure 1A) in order to be confident about the conditions used in our raft purification protocol [46,47].

Next, we carried out the same kind of experiments but using human lymphoblasts cross-linked with biotin-ProT $\alpha$  accordingly with the protocol we had previously described [39]. Analysis of those cells by flow cytometry showed activated lymphoblasts exhibiting the correct cell morphology and being, in

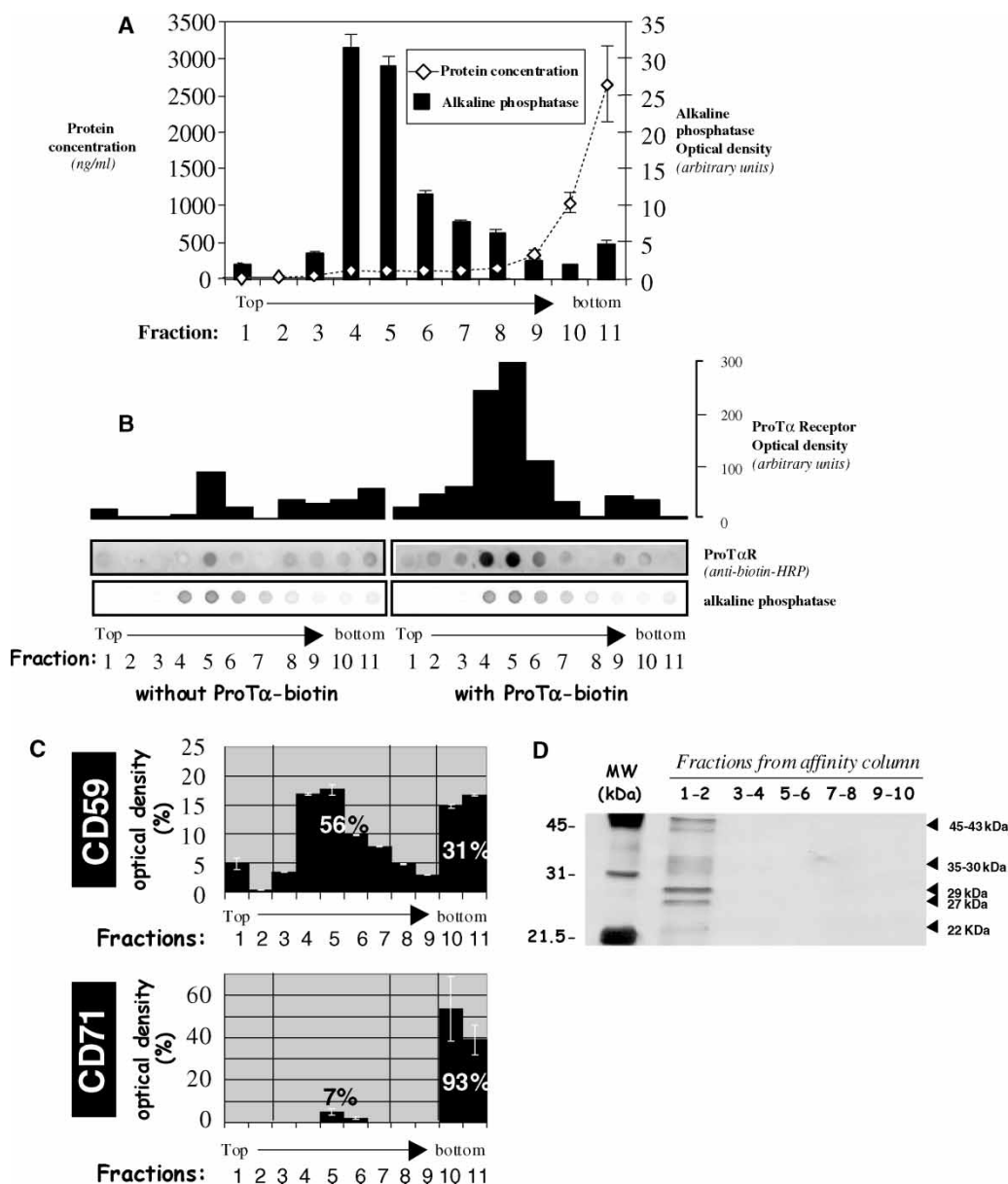


Figure 1. ProT $\alpha$  receptor is located in rafts microdomains. After BS<sup>3</sup>-mediated crosslinking of biotin-ProT $\alpha$  to surface receptors on human lymphoblasts ( $50 \times 10^6$ ) cell lysis was carried out in TKM buffer containing 0.5% TX-100. The cell lysate was then adjusted to 40% sucrose and subjected to equilibrium density gradient centrifugation in a SW55Ti rotor. After an overnight centrifugation at  $200,000 \times g$ , 11 fractions (0.45 ml/each) were collected from top to bottom. Serial dilutions of the fractions were dotted on and analysed for total protein (BCA assay; a), alkaline phosphatase activity (BCIP/NBT-based assay; a and b), and the presence of ProT $\alpha$  receptor (b), CD59 (c) and CD71 (c). Films were scanned, subjected to densitometry, and data shown as raw arbitrary units (b) or expressed as a percentage of the total amount for the respective antigen (a, c). (d) Analysis by SDS-PAGE of pooled fractions obtained after running a raft membrane extract from human lymphoblasts through a ProT $\alpha$  affinity column.

a vast majority (>90%), positive for the ProT $\alpha$  receptor (data not shown). To study the presence of the receptor in membrane fractions isolated by discontinuous sucrose density gradient ultracentrifugation, dot-blot analyses were performed. We used in this set of experiments peroxidase-conjugated monoclonal antibody against biotin. As observed in Figure 1B, most of the labelling from anti biotin-antibody was detectable on fractions 4–6, the ones with the highest levels of AP activity. We also

analysed (Figure 1C) the presence of both CD59 (as raft marker) and CD71 (a protein normally excluded from rafts) in order to attain the highest stringent conditions when purifying the different membrane fractions. These controls also pointed out to the 4–6 fractions as the ones containing exclusively raft resident proteins. On the other hand, experiments designed to characterize and purify the Prothymosin  $\alpha$  receptor (manuscript in preparation) allowed us to detect in rafts, by affinity

chromatography, several protein species of about 35–30, 29–27 and 22–19 kDa (Figure 1D), providing strong evidences about a ProT $\alpha$  interaction with proteins located within lipid rafts.

*ProT $\alpha$  receptor is present on lipid rafts from living cells*

It has been described that the method based on the insolubility in nonionic detergents for the analysis of raft domains suffers from some technical limitations [48]. Taking that into account, we employed other techniques that could reflect, in a more reliable way, the actual situation of the ProT $\alpha$  receptor in living cells.

Cholera toxin B subunit (CTB) exhibits a great affinity for ganglioside GM1, a glycosphingolipid present almost exclusively in raft regions [10]. Cell surface labelling with CTB linked to peroxidase (CTB-HRP) allows a specific cross-linking of surrounding proteins in the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Any protein at close proximity to CTB-HRP will be polymerized into insoluble aggregates when DAB and  $H_2O_2$  are both present, but not in the absence of  $H_2O_2$ . Hence, only proteins displayed within the area where GM1 is present *in vivo* will precipitate after cell lysis and centrifugation. This technique has been designed to work with closed cellular micro-environments, such as organelles or vesicles [49]. The adaptation to our experimental system was carried out using two well-established raft- and soluble- markers (CD59 and CD71, respectively) and different concentrations of CTB-HRP, DAB and  $H_2O_2$  to induce chemical cross-linking. As observed in Figure 2, the different concentrations of reagents generate a differential drag of the components analysed, being some conditions so aggressive that eliminate even the transferrin receptor (CD71). On the contrary, other conditions were observed to be totally ineffective in eliminating CD59. Hence, the amounts of reagents considered to be optimal were 0.05  $\mu$ g/ml CTB-HRP, 0.01%  $H_2O_2$  and 0.5 mg/ml DAB (Figure 2, arrow).

The next step was to evaluate the capacity of the chemical cross-linking of proteins residing at the same microenvironment as GM1 to eliminate the ProT $\alpha$  receptor. Figure 3 clearly shows how after the chemical cross-linking and elimination of raft proteins induced by CTB-HRP,  $H_2O_2$  and DAB both ProT $\alpha$  receptor (Figure 3A) and CD59 (Figure 3B) were no longer detectable in the sample. Besides, it is also observed how the signal of the samples treated with DAB in the absence of  $H_2O_2$  is the same as the one of cells incubated exclusively with CTB-HRP. Taking into account all these results we can state that the ProT $\alpha$  receptor is associated to raft micro-

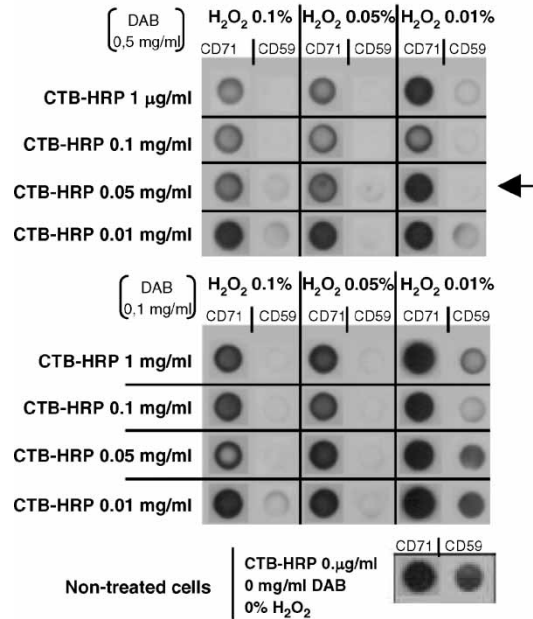


Figure 2. Improvement of a CTB-HRP-based method for the specific depletion of raft proteins. Lymphoblasts were separated in different samples, incubated with various amounts of cholera toxin (CTB; 0.01, 0.05, 0.1 or 1  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C and then washed several times with HBSS<sup>+</sup>. Next, cells were placed in 1 ml HBSS<sup>+</sup> and the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) crosslinker, either at 0.5 or 0.1 mg/ml, added in the presence of different concentrations of  $H_2O_2$  (0.01, 0.05 or 0.1%) for 45 min at 4°C. After this incubation step, lymphoblasts were washed twice with cold HBSS<sup>+</sup> and cell lysis performed with TKM/0.5% TX-100 for 30 min on ice. A postnuclear supernatant was obtained after centrifugation at 13,000 rpm for 15 min (4°C) to eliminate, amongst others, nuclei and rafts proteins. Soluble proteins (non raft proteins) were dotted on a nitrocellulose membrane (Hybond<sup>ECL</sup>, Amersham-Biosciences Europe, GmbH) and the presence of CD59 (raft marker) and CD71 (non raft marker) analysed as in Figure 1 by Immunoblotting combined with ECL<sup>Plus</sup> (Amersham-Biosciences Europe, GmbH). Initial expression of both CD59 and CD71 was evaluated in non-treated cells.

domains *in vivo* and not as a consequence of experimental manipulations or artefacts.

*ProT $\alpha$  receptor location corresponds to membrane areas highly resistant to M $\beta$ CD and TX-100*

The effect of cholesterol removal on rafts integrity was assessed by treating biotin-ProT $\alpha$  cross-linked lymphoblasts with either TX-100, a non ionic detergent which eliminates non-raft proteins, or M $\beta$ CD (methyl  $\beta$ -cyclodextrin), which efficiently extracted cholesterol from cells. Figure 4 shows the results from a typical experiment obtained after biotin-ProT $\alpha$  cross-linking, detergent treatment and immunofluorescent detection with streptavidin-PE. It can be observed that none of the conditions eliminate the ProT $\alpha$  receptor labelling. To test the efficiency of the treatment a well-known TX-100 sensitive and M $\beta$ CD-resistant cell surface marker, CD71, was also used (Figure 4), which allowed us to

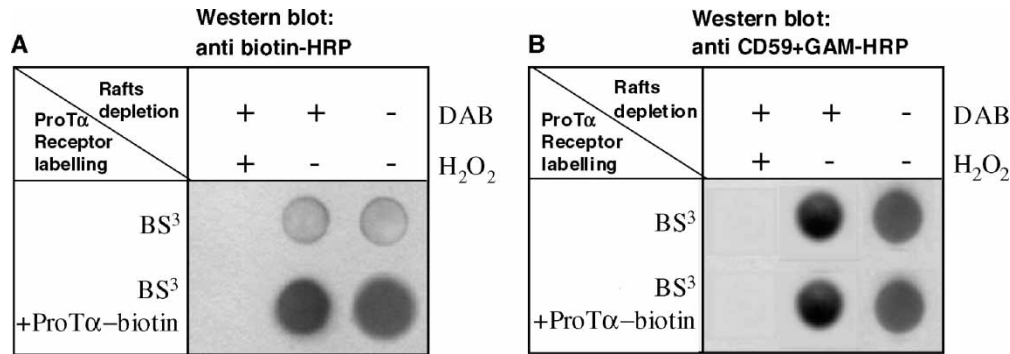


Figure 3. Raft protein crosslinking and depletion from lymphoblasts leads also to a ProT $\alpha$  receptor removal. Aliquots of  $2 \times 10^6$  PHA-activated cells were cross-linked with 20  $\mu$ M 1 BS<sup>3</sup>, in the absence or presence of 15  $\mu$ M biotin-ProT $\alpha$ . To eliminate raft proteins all samples were treated with CTB-HRP (0.05  $\mu$ g/ml) and incubated (+) or not (-) with DAB (0.5  $\mu$ g/ml) in the absence (-) or presence (+) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%) as indicated. After lysis and centrifugation, samples were dotted on a nitrocellulose membrane and the presence of ProT $\alpha$  receptor (a) and CD59 (b) detected with anti biotin-HRP and anti CD59+GAM-HRP, respectively.

be sure about the experimental conditions. Once again we can conclude that our results are consistent with an *in vivo* ProT $\alpha$  receptor location within rafts.

If we observe the histogram profiles (Figure 5A) where TX-100 has been used to extract part of the lipid fraction of the membrane it easily follows that ProT $\alpha$  receptor signal is not reduced but increased. The effect of these treatments on cell size and microstructure of the plasma membrane was also analysed. Thus, cells treated with TX-100 showed a decrease in size due to the loss of a great part of their lipid content in plasma membrane (Figure 5B). But, at the same time, its structure likely presents a relaxation that could allow somehow the entrance of streptavidin-PE inside cells. Further controls, subjected to the same cross-linking treatment but in the absence of biotin-ProT $\alpha$ , allowed us to rule out a non-specific binding of streptavidin-PE to intracellular components as responsible for that enhanced receptor fluorescence (Figure 5A). Therefore, the most plausible explanation was that streptavidin-PE is detecting an internalized ProT $\alpha$ -receptor complex. In fact, the same kind of observation can be made with the GM1 ganglioside, a raft marker with important intracellular stores, detected by CTB-Alexa 488 immunofluorescent staining, and whose expression is enhanced upon TX-100 treatment (Figure 5C). Thus, these results gave more support to our hypothesis of internalization for the ProT $\alpha$  receptor [36–38], a phenomenon normally associated with signalling through growth factors receptors [50].

#### *ProT $\alpha$ receptor is colocalized with aggregated rafts microdomains generated by surface cross-linking of CD59*

To obtain confocal images showing the above mentioned ProT $\alpha$  receptor inclusion in raft regions from

biotin-ProT $\alpha$  cross-linked lymphoblasts, we compared the ProT $\alpha$  receptor surface location with CD59 or CD71 distribution. In order to carry out these experiments either CD59 or CD71 antigens from biotin-ProT $\alpha$  cross-linked lymphoblasts were labelled with anti CD59-FITC or anti CD71-FITC and patching induced with a FITC-labelled anti IgG. To allow free lateral movements the last incubation was performed at room temperature.

As observed in Figure 6, both CD71 and CD59 markers present a distribution with a dotted appearance, which indicates that the antibody cross-linking was effective in generating aggregates. To determine the correspondence between the physical locations of these molecules on biotin-ProT $\alpha$  cross-linked lymphoblasts, double-immunofluorescence analyses were carried out with either anti CD59-FITC/Streptavidin-PE or anti CD71/Streptavidin-PE combinations. In the double labelled anti CD71-FITC/Streptavidin-PE samples the signal detected by confocal microscopy corresponded with separate areas of the membrane (Figure 6). However, anti CD59-FITC/Streptavidin-PE labelled PHA-stimulated lymphocytes showed that both CD59 and ProT $\alpha$  receptor molecules were colocalized in rafts (Figure 6). Furthermore, since these images have been taken using a 63  $\times$  objective, with a resolution limit for the z-axis of 0.23  $\mu$ m, it is likely that both proteins, ProT $\alpha$  receptor and CD59, are confined in an area with a diameter  $\leq 230$  nm.

#### *Increased tyrosine phosphorylation in response to ProT $\alpha$ takes place in raft microdomains from T lymphoblasts*

Next we investigated the possible transduction mechanisms promoted by the interaction between ProT $\alpha$  and its receptor on PHA-lymphoblasts. As a first approach, whole lysates from cells treated with 5  $\mu$ g/ml ProT $\alpha$  for various times were analysed,

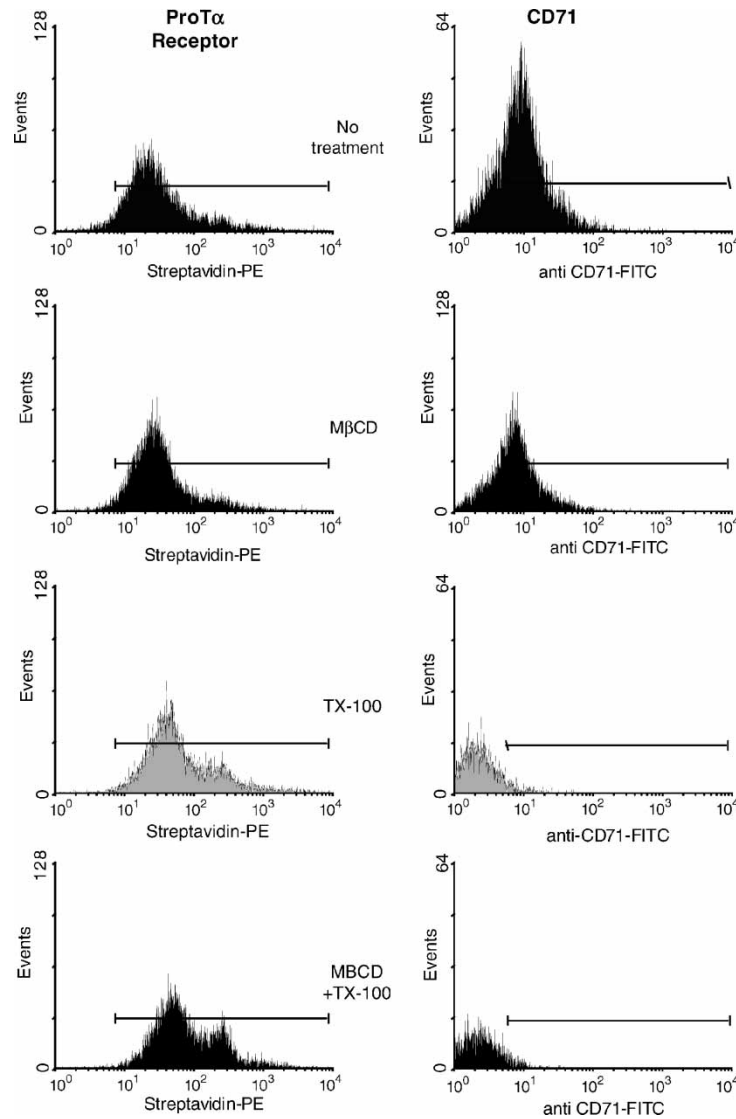


Figure 4. Flow cytometry analysis of the ProT $\alpha$  receptor association with raft regions on human lymphoblasts. Cells ( $2 \times 10^6$ ) were cross-linked with BS<sup>3</sup> in the absence (to check for background fluorescence; see also Figure 5a, right) or the presence of 15  $\mu$ M of biotin-ProT $\alpha$ , and then treated with 1% TX-100, 10 mM M $\beta$ CD or both as indicated in Material and Methods. After paraformaldehyde fixation, ProT $\alpha$  receptor and CD71 expression was revealed by staining with streptavidin-PE and anti CD71-FITC, respectively. In order to know the percentage of CD71<sup>+</sup> cells and to place the histogram marker as shown, a FITC-labelled IgG<sub>2a</sub> $\kappa$  isotype antibody was used as a negative control. Data acquisition was done on a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer, while WinMDI software was used to analyse the data. This experiment is representative of several with similar results.

showing that ProT $\alpha$  strongly induced a transitory tyrosine phosphorylation of multiple proteins after 30 s incubation, with a maximum at 15 min (Figure 7A).

An additional support for the ProT $\alpha$  receptor presence in rafts microdomains was obtained when we evaluated the distribution of these tyrosine phosphorylated proteins among different membrane fractions. Cells were incubated or not for 1 min with 5  $\mu$ g/ml ProT $\alpha$  and fractions from discontinuous sucrose density gradients, corresponding to either TX-100 insoluble (fractions 3–6; lipid rafts) or soluble membranes (fractions 10–11), pooled. Pro-

tein quantification of all the samples was carried out because of the substantial differences between raft and non-raft fractions and the very fast protein distribution we have observed upon one minute incubation with ProT $\alpha$  (Figure 7B), which could alter our perception about the magnitude of the tyrosine phosphorylation taking place. Based on that, we decided to carry out several experiments loading SDS-PAGE gels with either the same amount of membrane protein (Figure 7C) or identical fractions volumes (Figure 7D). In both cases, it was apparent an induced tyrosine phosphorylation in several rafts resident proteins from ProT $\alpha$ -treated

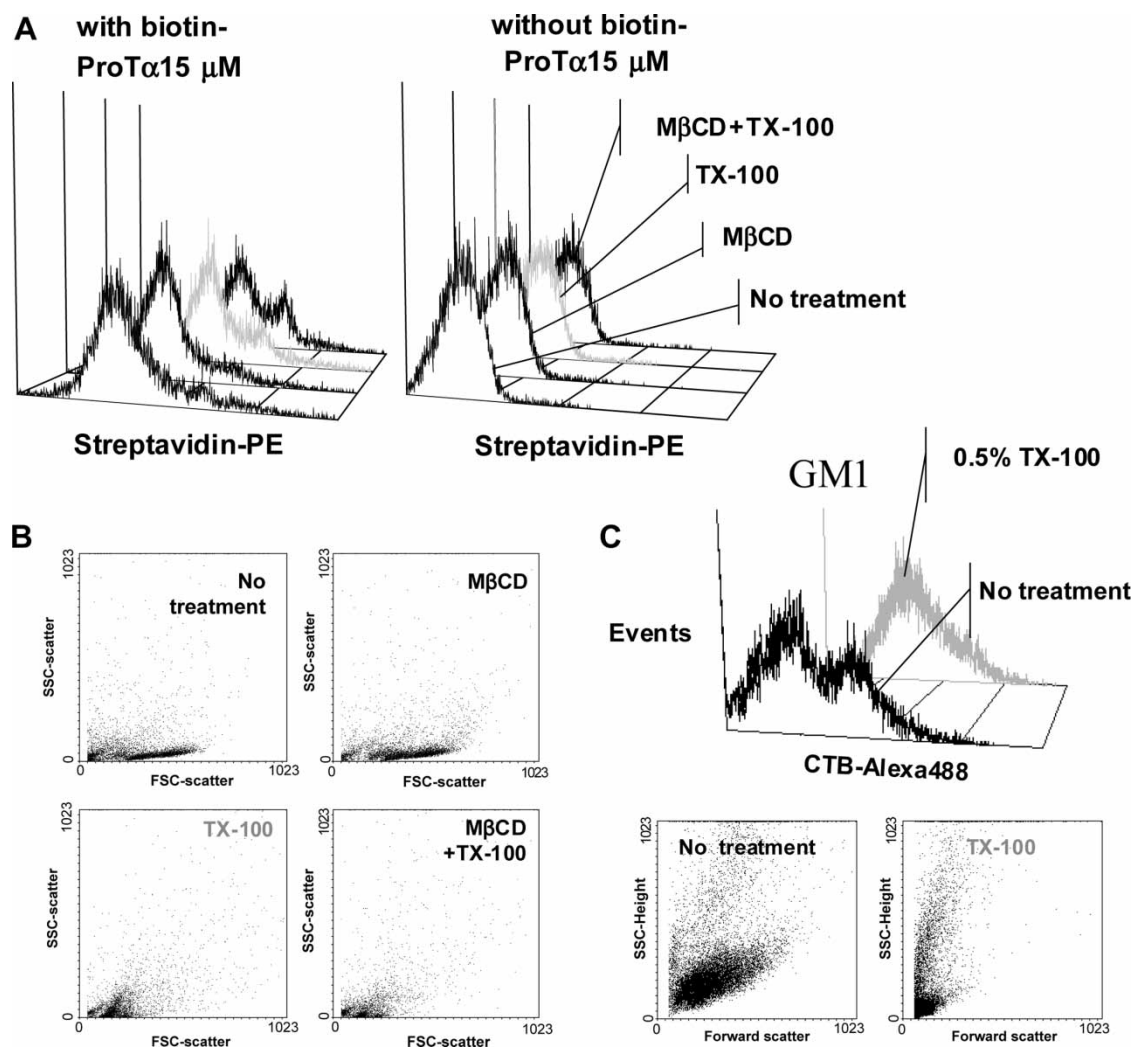


Figure 5. High resistance to non ionic detergent extraction is consistent with an *in vivo* location of ProT $\alpha$  receptor within rafts. Cells from samples described in Figure 4 were analysed by flow cytometry for streptavidin-PE (ProT $\alpha$  receptor) immunofluorescence (a) and for forward and right-angle light scattering (b). In (a), negative control cells (right) were not incubated with biotin-ProT $\alpha$  in order to show the non specific binding of streptavidin-PE. Dot plot (forward versus right-angle scattering) and histograms (CTB-Alexa 488 versus events) shown in figure (c) represent human PHA-lymphoblasts from a different donor treated with or without 1% TX-100 and stained with CTB-Alexa 488 to reveal GM1 ganglioside expression.

versus untreated cells, being even more evident when equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE (Figure 7C). On the contrary, tyrosine phosphorylated species were hardly detected in TX-100-soluble membrane fractions, and only when the same sample volume was loaded (Figure 7D). We should mention that all these phosphorylated proteins (asterisks in Western blot of Figures 7C and D) were consistently present in raft fractions from ProT $\alpha$ -treated cells and were similar in size to some of the phosphorylated proteins detected in the whole cell lysates (Figure 7A). Therefore, our results definitively involve a tyrosine phosphorylation cascade taking place in a raft microdomain environment as a response to the interaction of ProT $\alpha$  with its receptor, which agree with our previous results showing a proliferative effect of ProT $\alpha$  [29].

## Discussion

Due to all the *in vitro* and *in vivo* immunoregulatory properties previously shown by ProT $\alpha$  is of fundamental importance to elucidate the molecular mechanisms underlying these functions and, therefore, to understand the nature of the ProT $\alpha$  interaction with the cell surface. Recently, we demonstrated by affinity cross-linking and affinity chromatography the existence of binding sites for ProT $\alpha$  in human lymphoblasts, detecting also by fluorescence microscopy a heterogeneous distribution of this ProT $\alpha$  receptor in a cap-like structure at one of the cell poles [39]. To test whether this particular receptor polarization had also some type of relationship with a specific location in differentiated plasma membrane compartments we started

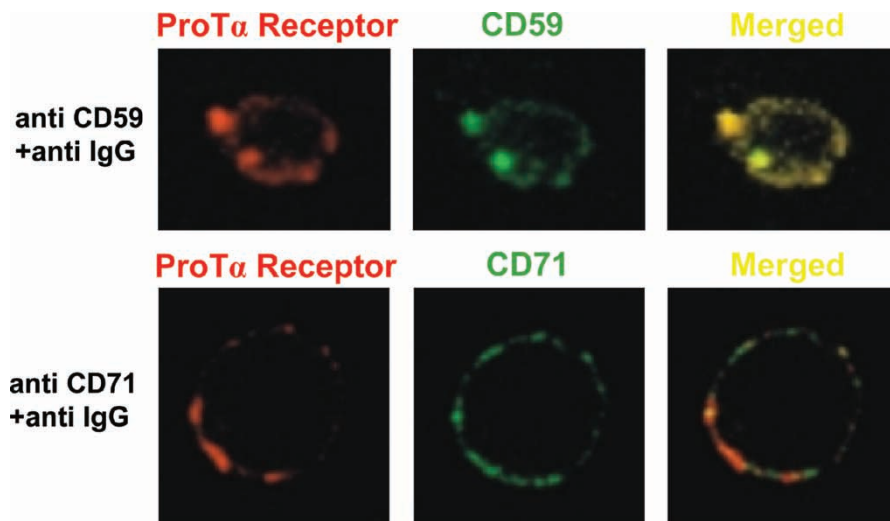


Figure 6. ProT $\alpha$  receptor and CD59 show a similar distribution pattern on plasma membrane from human lymphoblasts. Aliquots of  $2 \times 10^6$  cells were cross-linked with 1 mM BS<sup>3</sup> in the presence (figure) or absence (not shown) of 15  $\mu$ M biotin-ProT $\alpha$ . Lymphoblasts were incubated with streptavidin-PE to reveal ProT $\alpha$  receptor expression (red) and also, in order to induce either raft or non-raft proteins clustering, stained with anti CD59 or anti CD71 mAbs respectively at 4°C and incubated at RT (to allow free lateral movements of proteins) with a FITC-labelled anti-IgG Ab to cross-link any antibody on the cell surface. Both CD59 and CD71 expression are shown in green, while colocalization level (merged) of any of these markers with ProT $\alpha$  receptor is presented in yellow.

purifying, by discontinuous sucrose density gradients, both raft (TX-100 insoluble) and non-raft (TX-100 soluble) membrane fractions. In agreement with other authors [47] rafts proteins (7%) were detected in detergent insoluble fractions (3–6), while most of the protein (85%) appeared in the soluble area (10–11). ProT $\alpha$  receptor was found in strong association with raft microdomains, as well as several well-known raft proteins (alkaline phosphatase, CD59). Thus, both ProT $\alpha$  receptor and alkaline phosphatase (AP) showed a normal distribution between fractions 3–6 [46], while CD59, a GPI-anchored protein whose presence in rafts is prominent, revealed also a percentage of CD59 (31%) still present in non-raft fractions. This last finding could result from its weak association with these microdomains, the extraction procedure or the maturity degree of the protein (presence or not of the GPI-anchorage) [40]. On the contrary CD71, a transmembrane protein accessible for nonionic detergents, proved to be a good marker for non-raft membrane areas and showed a different membrane distribution when compared with ProT $\alpha$  receptor.

However, in spite of nonionic detergents insolubility and discontinuous density gradient ultracentrifugation have been shown to be a good starting point to detect raft proteins and several studies prove its validity [51–53], it has been also published that this technique presents some limitations [48]. Thus, it is currently under debate if data obtained with this purification method really reflects the actual *in vivo* situation or it is merely an artefact. As well, there are some reasonable doubts whether this technique is

adequate for detecting raft proteins whose association to rafts is weak [40,43]. To sort all these problems out, we decided to use a different experimental approach. Cholera toxin B subunit (CTB) colocalization is equivalent to the association of the protein under study with rafts in intact cells [43]. Therefore, we wondered if, under very controlled conditions, the capacity of the peroxidase (HRP) linked to CTB to catalyze a massive protein cross-linking in the presence of DAB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would delete ProT $\alpha$  receptor from cells. Once again, our results probed, in agreement with our data obtained from sucrose gradients, that both CD59 and ProT $\alpha$  receptor were located at the same raft microenvironment.

Cyclodextrins are non invasive tools of extracting cholesterol in cell membranes. Because cholesterol is essential for raft integrity [52] many proteins associated with these microdomains are extracted with M $\beta$ CD or acquire sensitivity to solubilization with nonionic detergents after treatment with M $\beta$ CD [40]. Thus, by using nonionic detergents and cyclodextrins prior to flow cytometry analysis, we wanted to test the exact position of ProT $\alpha$  receptor within the plasma membrane. The ProT $\alpha$  receptor labelling persistence upon TX-100 and/or M $\beta$ CD treatment was consistent with its presence in rafts microdomains of human lymphoblasts.

Studies carried out by chemical cross-linking of markers [54] and FRET [55,56] have demonstrated that raft domains are dynamic structures whose mean diameter is around 70 nm in living cells. For such a reason they are outside the limits of resolution

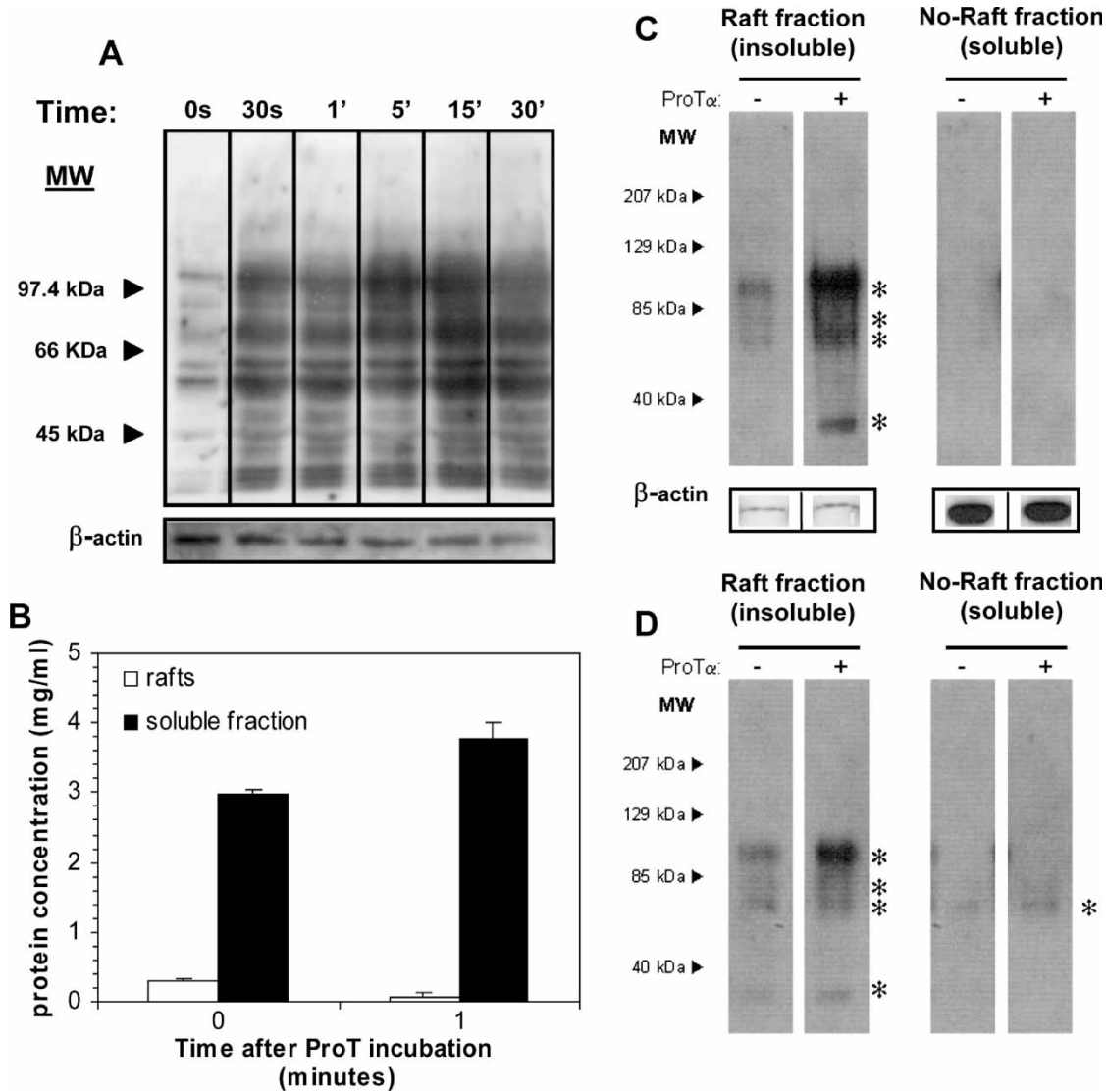


Figure 7. ProT $\alpha$  induces a tyrosine phosphorylation event confined to rafts in lymphoblasts. (a) Cells were incubated or not with 5  $\mu$ g/ml of ProT $\alpha$  for different times and their lysates run on a 7.5% SDS-PAGE electrophoresis gel, transferred to a PVDF membrane and the presence of phosphotyrosines revealed with an anti-phosphotyrosine mAb (clone PY20, BD-Biosciences) in combination with GAM-HRP and ECL<sup>Plus</sup> (Amersham Biosciences Europe, GmbH). (b) Proteins from cells incubated or not with 5  $\mu$ g/ml of ProT $\alpha$  for 1 min at 37°C were extracted as indicated in Figure 1. Raft fractions (3–6) and soluble fractions (10–11) were pooled and protein concentration determined (BCA, Pierce Biotechnology, Inc). Identical amounts of protein (2  $\mu$ g; c) and volume (10  $\mu$ l; d) from both pooled insoluble and soluble fractions were run on a 7.5% SDS-PAGE gel and detection of phosphotyrosines performed as before. In a and c protein loading controls were established after membrane stripping and incubation with an anti  $\beta$ -actin mAb.

of conventional optical microscopy techniques. However, lipids and proteins exposed extracellularly can be laterally cross-linked by means of antibodies or multivalent bacterial toxins (e.g., CTB), which causes its aggregation on the cell surface [57]. Therefore, cross-linking of known raft components has allowed us to sort out the above mentioned problem and determine the suspected association of some proteins with rafts [43,58]. By using this approach ProT $\alpha$  receptor was also found to be close to CD59 in cholesterol/espingolipids enriched membrane microdomains. However, it has been also described that many receptors migrate to a raft

region only after binding to its specific ligand, and vice versa. Due to the fact that in our experiments the detection of the receptor by means of either confocal microscopy or flow cytometry can only be achieved after binding ProT $\alpha$ , its location should correspond to rafts when the receptor has been engaged. Therefore, purification and identification of all the acceptor molecules for ProT $\alpha$  with different techniques and strategies will allow us to clarify their location before or after the binding of a specific ligand. In this sense, affinity chromatography experiments carried out to characterize and purify the ProT $\alpha$  receptor led to the detection in rafts

preparations of several protein species of about 35–30, 29–27 and 22–19 kDa (the present data and manuscript in preparation). However, since it is known that not all the rafts proteins come from the lymphocyte plasma membrane [48 and our data] and ProT $\alpha$  seems to have both intracellular and extracellular functions [21], it is likely that not all these binding proteins are linked to the actual surface receptor. Studies are currently being carried out to gain insights on this regard.

As mentioned above, confocal microscopy provided us with data supporting the fact that both ProT $\alpha$  receptor and CD59 were close to each other when the former is aggregated by its ligand and probably located in an area (clustered rafts) with a diameter no bigger than 230 nm (the maximum distance to see colocalization between two proteins). Therefore, we have a receptor not only situated in cells which the immunoregulatory properties of ProT $\alpha$  have been described for, but also a receptor placed in a plasma membrane area (rafts) where many receptors known to have similar biological activities reside and where the signalling processes for differentiation and proliferation seem to be more active. In agreement with that we provided experimental evidence supporting the fact that a phosphotyrosine pathway is initiated upon ProT $\alpha$  receptor recognition and that such a signalling cascade is confined to rafts. It has been previously reported by other authors as well as ourselves that ProT $\alpha$  may act as a co-stimulator in the proliferation process [28–30]. Our data are relevant because they show a ProT $\alpha$  receptor and a ligand induced tyrosine phosphorylation located in rafts from human lymphoblasts. This allows us to feel more confident about the idea that this receptor possesses the necessary requirements to form part of the mechanism of action of ProT $\alpha$  as a biological response modifier in the Immune System. Therefore, an aspect that should be studied, as soon as the sequence become available, is the possible secondary modification responsible for its association to raft regions. The search for that modification on the receptor and the identification of all the participants in the signalling cascade triggered by ProT $\alpha$  will lead us to a better understanding at a molecular level of this peculiar protein.

### Acknowledgements

We are grateful to Thymoorgan GmbH Pharmazie and Co KG (Vienenburg, Germany) for kindly supply us with ProT $\alpha$ . We also wish to thank Dr Begoña Bujía and Dr Pilar Arias for their invaluable help, the Centro de Transfusiones de Galicia for the buffy coats provided and Dr. J. Trotter (Scripps

Institute, La Jolla, CA) for the WindMDI software. This work was supported by grant PGDIT99-BIO201 (Xunta de Galicia). Alicia Piñeiro, Juan Lojo, and Ana Canda-Sánchez are all recipients of a Xunta de Galicia predoctoral fellowship.

### References

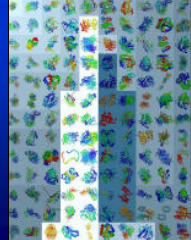
- [1] Brown DA, London E. Structure of detergent-resistant membrane microdomains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:1–7.
- [2] Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:199–225.
- [3] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569–572.
- [4] Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CGM, Parolini I, Loti F, Sette G, Peschle C, De Maria R. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1930–1940.
- [5] Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: Secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004;21:461–465.
- [6] Panchal RG, Ruthel G, Kenny TA, Kallstrom GH, Lane D, Li L, Bavari S, Aman MJ. In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15936–15941.
- [7] Harder T, Simmons K. Caveolae, DIGs and the dynamic of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:534–542.
- [8] Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000;275:17221–17224.
- [9] Pralle A, Keller P, Florin EL, Simmons K, Horber JK. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 2000;148:997–1008.
- [10] Laude AJ, Prior IA. Plasma membrane microdomains: Organization, function and trafficking. *Mol Memb Biol* 2004;21:193–205.
- [11] Janes PW, Ley SC, Magee AI, Kabouridis PS. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 2000;12:23–24.
- [12] Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R, He HT. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* 2002;15:1899–1908.
- [13] Viola A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol* 2001;22:322–327.
- [14] Gupta N, DeFranco AL. Visualizing lipid rafts dynamics and early signalling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell* 2003;14:432444.
- [15] Cheng PC, Brown BK, Song W, Pierce SK. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol* 2001;166:3693–3701.
- [16] Marmor MD, Julius M. Role for lipid rafts in regulating IL-2R signalling. *Blood* 2001;98:1489–497.
- [17] Roepstorff K, Thomsem P, Sandvig K, van Deurs B. Secuestation of EGF receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem* 2000;277:18960–18960.

- [18] Liu P, Ying Y, Anderson RGW. Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13666–13670.
- [19] Davy A, Feuerstein C, Robbins SM. Signalling within a caveolae-like microdomain in human neuroblastoma cells in response to fibroblast growth factor. *J Neurochem* 2000;74:676–683.
- [20] Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Holmgren PK, Magnusson KE, Stralfors P. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J* 1999;13:1961–1971.
- [21] Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000;9:1433–1446.
- [22] Trumbore MW, Berger SL. Prothymosin a is a nonspecific facilitator of nuclear processes: Studies of Run-on transcription. *Protein Expr Purif* 2000;20:414–420.
- [23] Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003;299:223–226.
- [24] Papanastasiou M, Baxevasis CN, Papamichail M. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I Introduction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor. *Cancer Immunol Immunother* 1992;35:145–150.
- [25] Baxevasis CN, Gritzapis AD, Spanakos G, Tsitsilonis OE, Papamichail M. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1995;40:410–418.
- [26] Baxevasis CN, Frilingos S, Reclus GJ, Arsenis P, Katsiyianis A, Anastasopoulos E, Seferiadis K, Tsolas D, Papamichail M. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: increased production of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors on normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1990;12:595–617.
- [27] Baxevasis CN, Reclus GJ, Papamichail M, Tsokos GC. Prothymosin alpha restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte responses in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1987;9:429–440.
- [28] Baxevasis CN, Spanakos G, Voutsas IF, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Mamalaki A, Papamichail M. Increased generation of autologous tumor-reactive lymphocytes by anti-CD3 monoclonal antibody and prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:71–84.
- [29] Cordero OJ, Sarandeses CS, Lopez JL, Cancio E, Regueiro BJ, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances interleukin-2 receptor expression in normal human T-lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1991;13:1059–1065.
- [30] Cordero OJ, Sarandeses CS, Lopez JL, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: Role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992;11:277–285.
- [31] Cordero OJ, Sarandeses CS, Lopez-Rodriguez JL, Nogueira M. The presence and cytotoxicity of CD16<sup>+</sup> CD2<sup>-</sup> subset from PBL and NK cells in long-term IL-2 cultures enhanced by Prothymosin alpha. *Immunopharmacology* 1995;29:215–223.
- [32] Lopez-Rodriguez JL, Cordero OJ, Sarandeses CS, Viñuela J, Nogueira M. Interleukin-2 killer cells: In vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994;13:175–182.
- [33] Lopez JL, Czarnecki J, Cordero OJ, Nogueira M. Enhancement of cytoskeletal polarisation of NK cells upon conjugation with target cells by prothymosin alpha. *Int J Thymol* 1995;3:296–303.
- [34] Eckert K, Grunberg E, Garbin F, Maurer HR. Preclinical studies with prothymosin alpha 1 on mononuclear cells from tumour patients. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:493–500.
- [35] Eckert K, Grunberg E, Immenschuh P, Garbin F, Kreuser ED, Maurer HR. Interleukin-2 activated killer cell activity in colorectal tumor patients: Evaluation of in vitro effects by prothymosin alpha 1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123:420–428.
- [36] Cordero OJ, Sarandeses CS, Nogueira M. Prothymosin alpha receptors on peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Letters* 1994;341:23–27.
- [37] Cordero OJ, Sarandeses CS, Nogueira M. Prothymosin a receptors on lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:731–737.
- [38] Cordero OJ, Sarandeses CS, Nogueira M. Binding of 125I-prothymosin alpha to lymphoblasts through the non-thymosin alpha-1 sequence. *Life Science* 1996;58:1757–1770.
- [39] Piñeiro A, Bugía B, Arias MP, Cordero OJ, Nogueira M. Identification of receptors for Prothymosin a on human lymphocytes. *Biol Chem* 2001;382:1473–1482.
- [40] Ilangumaran S, Hoessli DC. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 1998;335:433–440.
- [41] Ilangumaran S, Briol A, Hoessli DC. Distinct interactions among GPI-anchored, transmembrane and membrane associated intracellular proteins, and sphingolipids in lymphocyte and endothelial cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1997;1328:27–36.
- [42] Ilangumaran S, Arni S, van Echten-Deckert G, Borish B, Hoessli DC. Microdomain-dependent regulation of lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T-lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell* 1999;10:891–905.
- [43] Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signalling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 1999;147:447–461.
- [44] Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, Pierce SK. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Medicine* 1999;190:1549–1560.
- [45] Salgado FJ, Lojo J, Alonso-Lebrero JL, Lluís C, Franco R, Cordero OJ, Nogueira M. A role for interleukin-12 in the regulation of T cell plasma membrane compartmentation. *J Biol Chem* 2003;278:24849–24857.
- [46] Hanada KM, Nishijima Y, Akamasatu Y, Pagano RE. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. *J Biol Chem* 1995;270:6254–6260.
- [47] Ostermeyer AG, Beckrich BT, Ivarson KA, Grove KE, Brown DA. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells M $\beta$ CD does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J Biol Chem* 1999;274:34459–34466.
- [48] Magee AI, Parmryd I. Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol* 2003;4:234–237.
- [49] Cuortoy PJ, Quintart J, Baudhuin P. Shift of equilibrium density induced by 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry: a new procedure for the analysis and purification of peroxidase-containing organelles. *J Cell Biol* 1984;98:870–878.
- [50] Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell* 1993;73:5–8.
- [51] Cerneus DP, Ueffing E, Posthuma G, Strous GJ, van der Ende A. Detergent insolubility of alkaline phosphatase

- during biosynthetic transport and endocytosis Role of cholesterol. *J Biol Chem* 1993;268:3150–3155.
- [52] Schroeder R, London E, Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance to lipids and glycosphosphatidylinositol-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12310–12334.
- [53] Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent insoluble, liquid ordered phase in model membranes. *Biochemistry* 1997;36:10944–10953.
- [54] Friedrichson T, Kurzchalia T. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by cross-linking. *Nature* 1998;394:802–805.
- [55] Varma R, Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 1998;394:798–801.
- [56] Hooper NM. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol Memb Biol* 1999;16:145–156.
- [57] Spiegel S, Kassis M, Wilchek M, Fishman PH. Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J Cell Biol* 1984;99:1575–1581.
- [58] Harder T, Scheifelle P, Verkade P, Simmons K. Lipid domain structure revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 1998;141:929–942.

This paper was first published online on prEview on 21 April 2005.

# CD26 Expression Reduction Affects CD45R0 Detected on Lymphocyte Surface



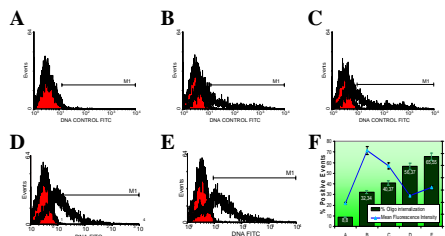
Lojo J., Canda-Sánchez A., Cordero O., Nogueira M.†

## INTRODUCTION

Major progress has recently been achieved in understanding the process involved in signal transduction after antigen presentation, but most of the roles of proteins involved in the regulation of this immunological synapse remain unclear. CD45 PTPase activity is crucial in TCR signal transduction initial activation step, and this is reflected in CD45-null mice and CD45 deficient cell lines, unable to develop TCR mediated T cell activation. CD45 seems to be also important in the limitation or downregulation of this TCR activation cascade, and this balance might result in changes in some kind of threshold for TCR signal triggering and regulation of the activation signal length or strength. The different splicing isoforms of CD45 only affect CD45 extracellular domain, keeping intracellular PTPase activity unaffected. These splicing isoforms probably play a role in CD45 ability of binding other membrane proteins or targeting different membrane domains, and this could explain the different response of diverse T lymphocyte populations, expressing different amounts of CD45 isoforms.

CD26, an enzyme with DDPIV activity whose interaction with CD45 has been widely described, was pointed out as a possible target molecule for rheumatoid arthritis therapy. We have recently illustrated different behavior in CD26 and CD45 expression and their molecular association in presence or absence of IL-12 in the culture media, specially relevant with regard to CD45R0 isoform. In order to connect some of these changes in CD45R0 behavior with its interaction with CD26, we have optimized a protocol to inhibit *de novo* synthesis of CD26 preincubating Ficolin-purified human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) with Anti-CD26 mRNA Morpholino Antisense Oligonucleotides and then performing 5-day primary cultures, in presence of PHA, with or without IL-12.

### Optimization of CD26 antisense oligo internalization in PBMCs.

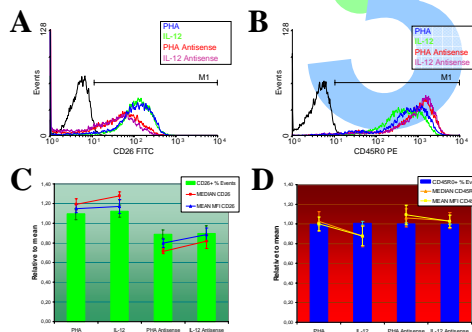


Incubation conditions were tested increasing recommended concentrations of both components. Only conditions resulting in a >95% viability were analyzed. Starting with (A) 1.4 nM morpholino oligo control-FITC and 0.56 nM EPEI, (B) 1.4 nM control-FITC oligo and 0.61 nM EPEI, (C) 1.5 nM control-FITC oligo and 0.61 nM EPEI, (D) 1.5 nM control-FITC oligo and 0.64 nM EPEI, (E) 1.6 nM control-FITC oligo and 0.64 nM EPEI, (F) In the histogram, percent of lymphocytes containing control-FITC DNA is represented, and the line represents MFI.

The original conditions provided by the manufacturer showed a low success in delivering oligonucleotides in PBMCs, but increments in EPEI and oligo concentration generated a great increase in the percent of cells internalizing the complex and also in the amount of oligo control-FITC into the cells. Anyway, lymphocytes seem to heterogeneously and difficultly internalize these complexes, probably because of the low ability of this cell type to carry out endocytosis. Actually, cells with a higher forward and side scatter, corresponding with the most activated lymphocytes, showed a higher internalization capability (data not shown). The percent of positive cells increased almost linearly as EPEI and oligo concentration is increased, but the highest MFI is achieved with just a small increase in EPEI concentration (B) probably because there is a small population more sensitive to the treatment internalizing oligos more easily, but when a higher percent of cells become positive, the efficiency incorporating the complex becomes lower.

### CD26 and CD45R0 expression in 5-day cultures under *de novo* CD26 synthesis inhibition.

Representative histograms showing CD26 (A) and CD45R0 (B) expression in non-treated lymphoblasts cultured with PHA (blue line) or with PHA and IL-12 (green line) and lymphoblasts previously treated with CD26 antisense oligo with PHA (red line) or with PHA and IL-12 (violet line). CD26 (C) and CD45R0 (D) positive percent (green and blue bars), median (red and orange lines) and mean fluorescence intensity (blue and yellow lines) statistics from 4 different experiments are represented.



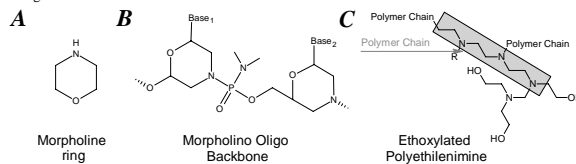
CD26 expression is substantially downregulated both with and without IL-12 and CD26 MFI in IL-12 cultures is enhanced, as we had previously described. This increase is also detected in cells preincubated with CD26 antisense oligos. On the other hand, CD45R0 behaviour in cells incubated with IL-12 is altered. CD45R0 is downregulated in cells if cultured with that interleukin. This is just reflected in a short decrease in MFI but constant in every experiment done, and CD26 expression inhibition abolishes that effect, showing no significant differences between that MFI between both conditions in cells pretreated with antisense oligos. Also, CD26 antisense oligos produced in every experiment an increase in CD45R0 MFI compared to non treated cells. These results do not necessarily mean a real decrease in that expression, which should not be affected by CD26 antisense oligonucleotides, but a better binding capability with anti-CD45R0 (UCHL-1) antibodies used for this detection. We have noticed this fact because CD45R0 quantification by western blot and his enzymatic activity seems not to be affected by IL-12 (or even increases), but cytometry results did not match these findings. Also, immunoprecipitation experiments have shown an increase in CD26-CD45R0 interaction in cells cultured with that interleukin. This could be explained through a competence between CD26 and anti-CD45R0 UCHL-1 antibody, and the increase of CD45R0 staining observed in cells with a lower CD26 expression observed here seems to support this theory.

### Inhibition of CD26 Expression with Antisense Morpholino Oligos.

Antisense Morpholino oligos and EPEI were provided by Gene Tools, LLC. Antisense oligonucleotides bind complementary mRNA sequences and specifically prevent its translation. High effectivity for translation blocking of target mRNAs is generally achieved by selecting a target sequence in the post-spliced mRNA in the region comprised between the 5' cap and about 25 bases 3' beyond the AUG translational start site. CD26 Antisense 5'-GAACCTCCACGGTGTCTTCATCGT-3' were designed according to these characteristics.

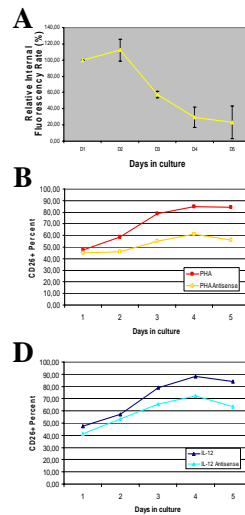
EPEI is used as a weakly basic delivery reagent which electrostatically binds the anionic Morpholino/DNA duplex generating a cationic complex which tends to approach to the anionic cell surfaces leading to endocytosis. Acidification within the endosome increases EPEI ionization inducing permeabilization of the endosomal membrane, releasing the Morpholino oligo into the cytosol.

The ratio EPEI/Morpholino/PBMCs was optimized for the internalization of the oligo to obtain the highest decrease of CD26 expression and the highest (>95% in every displayed case) cell viability, and was set in 1.6 nM Morpholino/DNA, 0.64 nM EPEI and 4-10<sup>6</sup> cells/ml in serum-free RPMI 1640. In a first step, EPEI and Morpholino/DNA duplex were mixed and incubated for 20 min. RT. Cells were then incubated at 37°C in a wet atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 3 hours and then washed with RPMI 1640 and cultured with RPMI 1640 + 10% FCS and 1.5 mg/ml PHA with or without 1 ng/ml IL-12 for 5 days at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Control cultures performed with Fluoresceinated Standard Control and with just RPMI 1640 were done simultaneously to test Morpholino oligo internalization and normal cell characteristics of each donor.



Morpholino oligos are assembled from four different (A) Morpholino modified subunits containing each one of the genetic bases (A, C, G, T) to obtain an oligo with a (B) non ionic nuclease-resistant backbone. A non ionic morpholino oligo is paired to a complementary DNA "carrier", which electrostatically binds to (C) Ethoxylated polyethylenimine (EPEI).

### Morpholino oligonucleotide permanence and CD26-CD45R0 expression dynamics under *de novo* CD26 synthesis inhibition.



(A) Morpholino Oligo Control-FITC fluorescence dynamics relative to initial fluorescence rate was set at 100% after 1 day of culture. (B, D) Percent of positive events with anti-CD26 (TP1/16) antibody 5-day dynamics in cells cultured with PHA (B) or PHA + IL-12 (D) after 3 hours of incubation with or without CD26 antisense oligos. (C, E) Percent of positive events with anti-CD45R0 (UCHL-1) antibody 5-day dynamics in cells cultured with PHA (C) or PHA + IL-12 (E) after 3 hours of incubation with or without CD26 antisense oligos.

The amount of FITC labelled oligonucleotides present in PBMCs decreases during the 5 days of culture. The first two days, fluorescence is maintained in high levels, decreasing the next two days almost a 70% and showing no significant changes on the last day. This decrease hardly has a substantial effect over CD26 inhibition, as we can see in figures 2.B an 2.D. They show that synthesis inhibition is working even on the last days, when the amount of oligo is severally low, and also that CD26 upregulation is not totally blocked but severally reduced mainly in PHA lymphocytes. IL-12 blasts are less affected by translation blockage, possibly due to the higher expression of CD26 in those conditions.

This CD26 antisense preincubation seems to slightly affect also CD45R0 detected in blasts surface. Actually, CD45R0 expression after CD26 inhibition is always higher than without inhibition after 5 days of culture, but the significance of this finding will be discussed in Figure 3 legend.

## CONCLUSIONS

In this work we clearly show that inhibition expression with antisense morpholino oligos can be carried out successfully in primary cultures of PBMCs. This has been done previously in lymphoid lines, and in the same way, it has been noticed a lower capability for lymphocytes to carry out that internalization, because severally stronger conditions were needed compared to the conditions recommended by the supplier. This is probably caused by their lower endocytic abilities. We can also affirm that CD26 expression reduction is affecting CD45R0 staining in lymphoblasts, suggesting that UCHL-1 is competing with CD26 molecules able to interact with CD45R0, and that the pool of molecules interacting is increased under IL-12 treatment, and this fact probably depends on CD26 *de novo* synthesis and post-translational modifications.



La proteómica es una estrategia particularmente adecuada para la investigación en fluidos biológicos con el fin de identificar alteraciones moleculares relacionadas con enfermedades. Este tipo de muestras ofrecen un enorme potencial para la investigación de biomarcadores, lo que permitirá, en un futuro cercano, el desarrollo de test de detección temprana de muchas enfermedades.

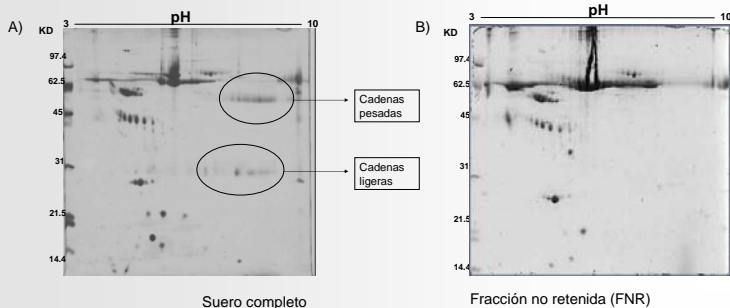
La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y de etiología desconocida, con una mayor prevalencia en mujeres, gran repercusión socioeconómica, incapacitante y de difícil diagnóstico. Nuestro grupo de investigación está desarrollando nuevas metodologías para el estudio de sueros en individuos sanos con el fin de construir mapas proteómicos de referencia que permitan realizar estudios comparativos de gran fiabilidad, lo que nos dará la posibilidad de detectar biomarcadores de artritis reumatoide.

Con el fin de visualizar proteínas poco abundantes se ha diseñado un protocolo de cromatografía de afinidad que permite eliminar prácticamente todos los isotipos de inmunoglobulinas (~20% de la proteína total) y además nos da la posibilidad de trabajar con mayores volúmenes de suero que las técnicas habituales. Las muestras, así tratadas, fueron analizadas mediante isoelectrofoque (1ª dimensión) y SDS-PAGE (2ª dimensión) optimizando carga proteica, concentración de sales, utilización de tiourea, voltaje y tinción. El análisis informático se realizó con el programa PDQuest sobre muestras de suero procedentes de 5 individuos sanos (por triplicado). El método ha mostrado una elevada eficacia en la eliminación de las inmunoglobulinas así como bajos valores de variabilidad intra- e intermuestral.

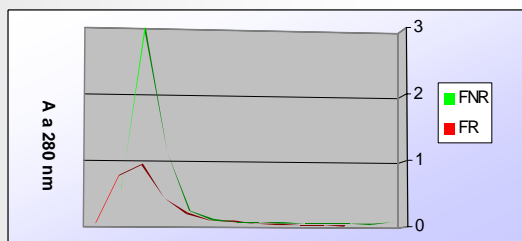
## 1 Eliminación de Igs mediante cromatografía de afinidad

La detección de biomarcadores, generalmente proteínas que se encuentran a baja concentración, requiere un fraccionamiento de la muestra para enriquecerla de proteínas poco abundantes.

Nosotros hemos eliminado las Igs de nuestras muestras mediante una columna de afinidad, denominada T-Gel (Pierce). El análisis comparativo de suero completo y fracción no retenida (FNR) mediante electroforesis bidimensional muestra el buen funcionamiento de la columna, ya que se puede comprobar la eliminación total de las Igs, sin pérdida apreciable de otras proteínas.

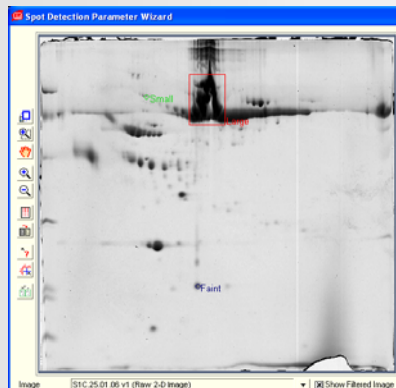


Cromatograma de elución de las fracciones no retenidas (FNR) y las fracciones retenidas (FR). Los datos mostrados son una media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos diferentes. Cada fracción fue recogida en alícuotas de 3 ml y su absorbancia fue medida a 280 nm. La carga total fue de 1 ml de suero.



## 2 Electroforesis bidimensional

Para estandarizar el protocolo de electroforesis bidimensional con el fin de analizar sueros procedentes de individuos sanos, tuvimos que optimizar carga proteica, concentración de sales, utilización de tiourea para la solubilización de proteínas, voltaje y tinción.

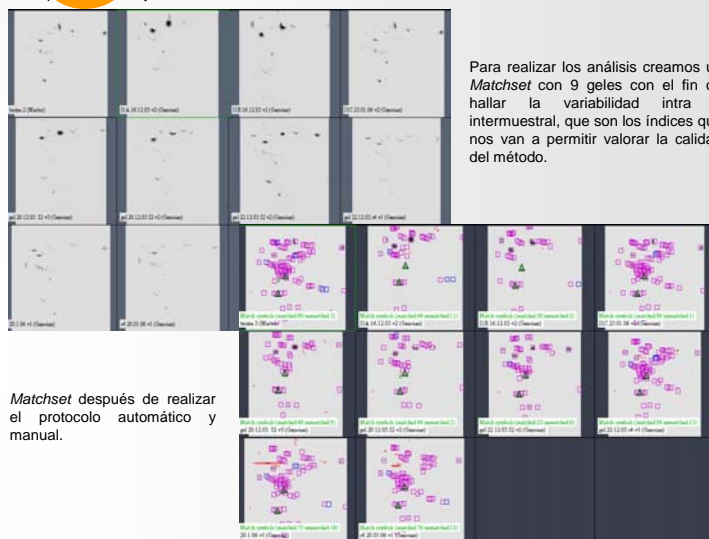


Condiciones óptimas:

- Carga : 1mg de proteína
- Diálisis de las muestras frente a agua destilada y utilización de wicks.
- El uso de tiourea mejora la focalización de proteínas.
- Amperaje: 18 mA/24 h.
- Coomassie Coloidal G-250, Bio-safe.

## 3 Análisis bioinformático

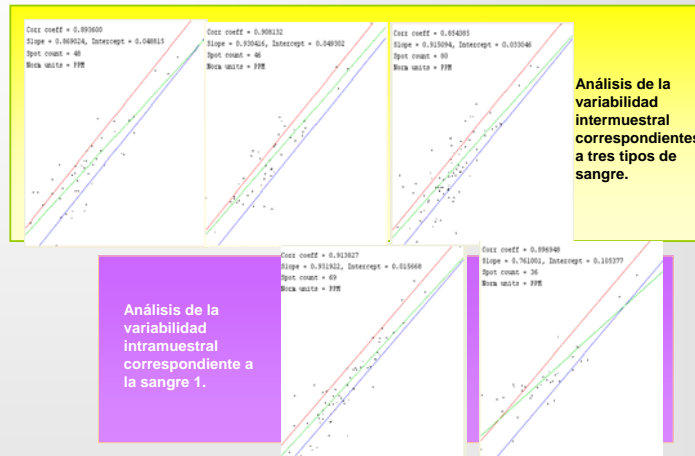
Una vez optimizamos el protocolo de electroforesis bidimensional, analizamos 5 sueros diferentes por triplicado, con el fin de comprobar, mediante el programa PDQuest (Biorad), la reproducibilidad y fiabilidad del método.



Para realizar los análisis creamos un Matchset con 9 gels con el fin de hallar la variabilidad intra e intermuestral, que son los índices que nos van a permitir valorar la calidad del método.

Matchset después de realizar el protocolo automático y manual.

Análisis de la variabilidad intra e intermuestral mediante scatter plot.



Análisis de la variabilidad intermuestral correspondientes a tres tipos de sangre.

Análisis de la variabilidad intramuestral correspondiente a la sangre 1.

## Conclusiones

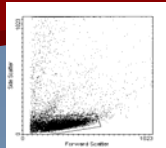
- Hemos conseguido optimizar un protocolo de eliminación de prácticamente todas las Igs del suero mediante una columna de afinidad
- Hemos puesto a punto la técnica de electroforesis bidimensional que nos permite analizar muestras de suero de modo fiable y reproducible.



Protomiosina alfa (ProT $\alpha$ ) es una proteína inusual por sus características bioquímicas y estructurales (pI 3.5, carece de aas aromáticos y azufrados, no tiene estructura secundaria en condiciones fisiológicas, etc.) que está implicada en numerosas funciones, tanto a nivel intracelular (relacionada con la proliferación celular, activador de la transcripción, antiapoptótico, marcador tumoral...) como extracelular (es un importante inmunomodulador). Nuestro grupo de investigación estableció un método de purificación de moléculas de unión a ProT $\alpha$  en membrana plasmática de linfoblastos humanos con el objetivo de conocer el mecanismo molecular implicado en la transducción de señal de ProT $\alpha$ . En este protocolo fueron solubilizadas las membranas de los linfocitos extraídos de sangre humana cultivados 4 días para aislar microdominios raft. A continuación se aplicaron técnicas de cromatografía de afinidad (HPLC) e inmunoprecipitación del complejo ProT $\alpha$ -receptor. Todas las muestras fueron estudiadas por electroforesis uni y bidimensional y los resultados se estudiaron mediante espectrometría de masas. Las búsquedas en bases de datos revelaron la existencia de proteínas de unión a ProT $\alpha$  en membrana plasmática de linfoblastos humanos, tal y como se describe a continuación.

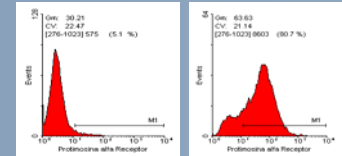
## 1 Cultivo celular

Los linfoblastos purificados a partir de concentrados leucocitarios fueron cultivados durante 4 días en presencia del mitógeno PHA. Se optimizó la concentración de este mitógeno a 10  $\mu$ g/ml, buscando el equilibrio entre el grado de proliferación y el grado de viabilidad de las células. La activación de las células fue comprobada mediante citometría de flujo



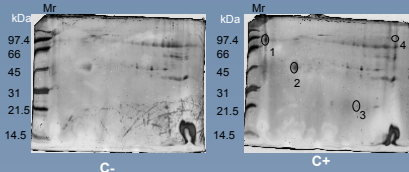
Análisis por citometría de flujo de la viabilidad y el nivel de activación de la población de linfoblastos.

A continuación se comprobó el nivel de expresión del receptor de ProT $\alpha$  en la membrana de linfocitos. Los blastos fueron incubados con ProT $\alpha$  y fijados con paraformaldehído (PFA). El control positivo fue incubado con un anticuerpo anti-ProT $\alpha$  y con otro secundario marcado con un fluorocromo para posibilitar su detección mediante citometría de flujo.



## 2 Inmunoprecipitación del receptor de ProT $\alpha$

Los linfoblastos fueron tratados en presencia/ausencia de ProT $\alpha$  para que ésta se uniese a su posible receptor en membrana, siendo fijada esta unión con PFA. A continuación fueron lisados e inmunoprecipitados con una matriz de proteína A Sepharosa que llevaba unido el anticuerpo anti-ProT $\alpha$ . Seuyó para revertir los enlaces formados y las muestras se resolvieron en un gel de electroforesis bidimensional.



Los spots marcados se analizaron por espectrometría de masas. Los espectros m/z fueron introducidos en la herramienta MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) para su estudio. La probabilidad de identificación o MOWSE Score sólo fue significativa para el spot 3

Spot	Proteína	Peso molecular	MOWSE Score
1	KRAS	55 kDa	
2	Ig cadena pesada	31 kDa	
3	Proteína de anclaje relacionada con la nebulina	21 kDa	66
4	Proteína de unión al péptido $\beta$ -amiloides asociado a RE	75 kDa	

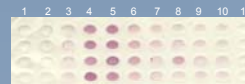
## 3 Aislamiento de zona raft

Nuestro grupo de investigación ha demostrado una mayor presencia de receptores para ProT $\alpha$  en microdominios raft de linfoblastos humanos.

### Características RAFTS

- Zonas ricas en colesterol y esfingolípidos
- Presentan mayor empaquetamiento que el resto de la membrana
- Son insolubles en detergentes no iónicos a 4°C
- Su alta ratio lípidos-proteínas permite su aislamiento en gradientes de densidad de sacarosa

Los blastos fueron lisados y ultracentrifugados en gradientes de sacarosa, obteniendo microdominios raft en la interfase 5-36%. La detección de actividad fosfatasa alcalina (marcador de zona raft) nos sirvió para comprobar la efectividad del método.

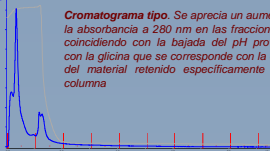


Ensayo de actividad enzimática fosfatasa alcalina. (Los dot-blot coloreados son los resultados positivos)

## 4 Cromatografía de afinidad (HPLC)

Las fracciones raft purificadas se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna HiTrap NHS-activated que contenía ProT $\alpha$  unida. Se estableció una carga óptima de fracción raft en torno a 2 mg que se realizó en ciclos sucesivos de 2 ml. La elución se realizó con glicina 0.1M pH 2.5.

**Cromatograma tipo.** Se aprecia un aumento de la absorbancia a 280 nm en las fracciones 1-2, coincidiendo con la bajada del pH provocada con la glicina que se corresponde con la elución del material retenido específicamente por la columna



Las fracciones 1 y 2 fueron concentradas por centrifugación en centricon y analizadas por electroforesis uni y bidimensional. Los datos fueron estudiados por espectrometría de masas.

KDa	Mr	Banda (kDa)	Proteína	MOWSE Score
97.4		66	Fosfatasa A2	83
66		80	Queratina 10	122
45		48	Zinc-finger protein 26	63
31		31 sup	ORF cromosoma 14	38
21.5		31 inf	Proteína de anclaje relacionada con la nebulina	67
14.5				

Spot	Proteína	Peso molecular	MOWSE Score
1	Proteína quinasa C	33 kDa	67
3	Proteína hipot.	60 kDa	46

Spot	Proteína	Peso molecular	MOWSE Score
1	ASE-B	32 kDa	36

## CONCLUSIONES

Hemos visto que ProT $\alpha$  presenta una elevada afección por proteínas de citoesqueleto como demuestran los experimentos de inmunoprecipitación y cromatografía de afinidad. Además, nuestra hipótesis propone que ProT $\alpha$ , una vez internalizada, es capaz de unirse a motivos de repetición de anquirina, lo que explicaría tanto sus efectos inmunomoduladores como la dificultad en la identificación del receptor, debido a su escasez en relación con la alta concentración de anquirina.

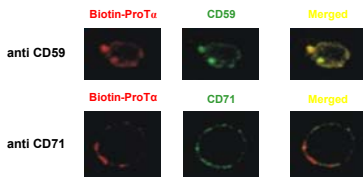


## INTRODUCCIÓN

A pesar del alto número de efectos descritos para la proteína Protimosina alfa (ProT alfa), tanto intracelular como extracelularmente, su función biológica exacta no está definida en la actualidad. Trabajos recientes la sitúan como facilitador de procesos nucleares y como inhibidor de la formación del apoptosoma. Sin embargo, desde 1990 nuestro grupo ha publicado diferentes trabajos de ProT alfa como modulador de respuesta biológica. Una búsqueda del posible receptor (ProT alfa R) implicado en estos procesos nos ha permitido descubrir sitios de unión específicos e inducibles para esta proteína en linfocitos T humanos. Recientemente, mediante microscopía confocal y FRET, hemos localizado ProT alfa R en microdominios rafts, a una distancia entre 60 nm y 230 nm del marcador de región GPI CD59. Investigado el posible mecanismo de transducción promovido por la interacción de ProT alfa con el receptor hemos encontrado, en lisados totales de linfocitos activados con PHA, una inducción transitoria de fosforilación en tirosinas, con un máximo a los 15 minutos. Los Western de membranas fraccionadas mediante gradientes de sacarosa han puesto en evidencia además, diferencias cualitativas y cuantitativas en la fosforilación en tirosina de proteínas en fracciones rafts de células tratadas versus células no tratadas con ProT alfa.

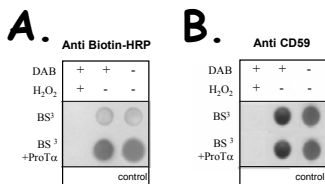
Para obtener una idea de la localización del receptor de ProT alfa en la superficie celular hemos realizado la agregación de los marcadores de zona raft (CD59) y regiones ricas en glicerosfolípidos (CD71) con anticuerpos específicos, y analizado el grado de localización del receptor de Protimosina alfa con ambos marcadores. La determinación de la ubicación física del receptor con respecto a CD59 y CD71 se realizó mediante un doble marcaje con antiCD59-FITC/ProT alfa-PE y antiCD71-FITC/ProT alfa-PE, tal y como se observa en la figura. Se aprecia como CD71 y CD59 presentan una distribución heterogénea, lo que indica que los agregados se han formado correctamente. Por otro lado, las fluorescencias correspondientes a CD71 y ProT alfa se ubican en distintas áreas de la membrana, mientras que en el marcaje CD59/ProT alfa el pseudocolor amarillo, resultado de la superposición de ambas fluorescencias, es indicativo de una localización del receptor de ProT alfa preferentemente en los rafts lipídicos. Dadas las características del microscopio utilizado podemos afirmar que la distancia entre CD59 y ProT alfa es menor de 230 nm.

Paralelamente se realizaron estudios de FRET mediante citometría de flujo que no arrojaron un resultado positivo. Sabemos que el FRET tiene un límite máximo de resolución en torno a 60 nm. Ya que por encima de este límite la molécula aceptora de la energía de resonancia no emite señal alguna podemos concluir de ambos resultados que la distancia que separa al receptor de ProT alfa de CD59 en rafts es de 60-230 nm.



**Figura 1.** Linfoblastos humanos muestran una distribución similar del receptor de ProT alfa y CD59. Alícuotas de  $2 \times 10^6$  células fueron crosslinkadas con BS<sup>3</sup> y ProT alfa biotinilada y teñidas con anti-CD59-FITC (verde)/estreptavidina-PE (rojo) o con anti-CD71-FITC (verde)/estreptavidina-PE (rojo). Los análisis de colocalización (pseudocolor amarillo) se realizaron con un LeicaTCS software.

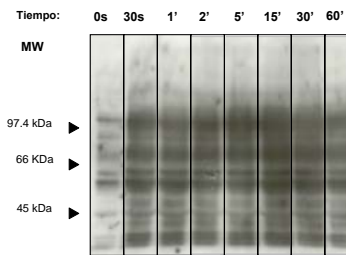
La subunidad B de la toxina colérica (CTB) muestra una gran afinidad por el gangliósido GM1, un glicosíngolípido presente casi exclusivamente en las regiones raft. El marcaje celular con CTB ligada a peroxidasa (CTB-HRP) permite realizar un cross-linking de las proteínas circundantes, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3,3'-diaminobencidina (DAB). De esta forma, las proteínas situadas en el área en la que GM1 está presente in vivo serán precipitadas en la centrifugación de los lisados celulares. Cuando aplicamos este método para localizar el receptor de ProT alfa en el mismo microambiente que GM1 vimos como, claramente, tras precipitar con CTB-HRP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DAB, tanto el marcador de zona raft (CD59) como ProT alfa ya no eran detectables en la muestra. Los controles realizados con CTB-HRP y DAB en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, muestran el mismo comportamiento que el control, lo que demuestra que no estamos ante un artefacto. De esta forma podemos afirmar que el receptor de ProT alfa se halla asociado a microdominios raft in vivo.



**Figura 2.** El receptor de ProT alfa coprecipita con los dominios de membrana marcados con CTB. Alícuotas de  $2 \times 10^6$  de linfoblastos fueron crosslinkados con BS<sup>3</sup> 10 mM, en la presencia o ausencia de 15 mM ProT alfa biotinilada y después tratados con CTB-HRP (0.05 mg/ml) e incubados o no con DAB (0.5 mg/ml) y/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%). Tras la lisis y la centrifugación, las muestras fueron analizadas por Dot-Blot buscando la presencia de ProT alfa biotinilada (A) y CD59 (B) usando anti biotina-HRP y GAM-HRP respectivamente.

## 3

Así pues, se ha localizado una proteína cuyo ligando es Protimosina alfa y que se encuentra en microdominios de membrana implicados por muchos investigadores en procesos de señalización celular. Por lo tanto, un siguiente paso fue investigar el mecanismo de transducción de señal de este posible receptor en linfoblastos humanos. Uno de los sucesos que generalmente acompaña a la unión de un ligando a su receptor consiste en la inducción de una cascada de fosforilación de proteínas en el interior celular. Basándonos en este hecho, linfoblastos activados con ProT alfa a diferentes tiempos fueron lisados y las proteínas fosforiladas en tirosina detectadas por Western Blot mediante un anticuerpo específico. Como se aprecia en la figura la respuesta al estímulo de ProT alfa es inmediata (30 segundos), y tiene un pico máximo a los 15 minutos. Por lo tanto, la aparición de una respuesta intracelular temprana y sostenida tras la unión de ProT alfa a esta proteína de superficie es indicativo de que nos encontramos frente al receptor de Protimosina alfa.

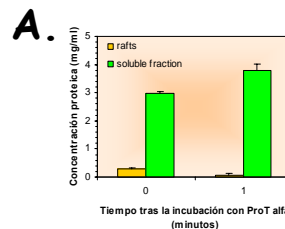


**Figura 3.** Protimosina alfa induce la fosforilación en tirosina de numerosas proteínas celulares. Las células fueron incubadas o no con 5 mg/ml de ProT alfa a los tiempos indicados y sus lisados analizados en un 7.5% SDS-PAGE, transferidos a una membrana de PVDF y revelada la presencia de fosfotirosinas con el anticuerpo monoclonal PY20 (BD) y GAM-HRP (Sigma).

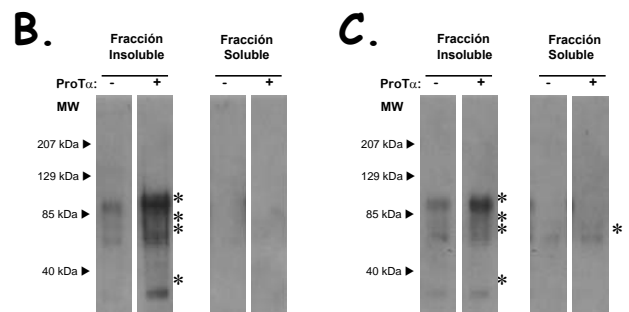
## 4

Para reforzar nuestra hipótesis sobre una localización del receptor de ProT alfa en rafts lipídicos, analizamos la fosforilación en tirosina de proteínas presentes en rafts inducidas por ProT alfa en linfoblastos.

Podemos observar como el aumento de la fosforilación en tirosina aparece en las fracciones correspondientes a los rafts, tras la incubación de 1 minuto con ProT alfa. Esto nos indica, claramente, una localización del receptor, así como del inicio de su cascada de transducción de señal, en rafts, lo que refuerza nuestros anteriores resultados. Además, este proceso está acompañado de un fenómeno de redistribución de proteínas en la superficie de la membrana muy rápido, tal y como se puede observar en los resultados de cuantificación de proteína. Esto es importante porque altera nuestra percepción de la magnitud de la fosforilación cuando cargamos un mismo volumen de muestra versus la misma cantidad de proteína.



**Figura 4.** La cascada de transducción de señal Protimosina alfa se inicia en los rafts. Las proteínas de células incubadas o no con 5 mg/ml de ProT alfa durante 1 min, fueron extraídas mediante lisis en tampón de lisis con 1% Triton X-100 y ultracentrifugadas durante 18 h a 200,000g. Las fracciones raft (3-6) y las fracciones solubles fueron almacenadas juntas y determinada su concentración proteica. Una vez establecida, se analizaron por SDS-PAGE bien muestras de igual cantidad de proteína (B) bien igual volumen (C) tanto de fracciones solubles como insolubles y se detectaron las fosfotirosinas como en la figura anterior.





# La IL-12 induce la asociación de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 en la zona no raft de la membrana plasmática de linfocitos T



F.J. Salgado, A. Canda-Sánchez, C. Varela, A. Pérez-Díaz, P. Arias, M. Nogueira<sup>§</sup>.

## Resumen

El concepto de raft lipídico comprende la existencia de unos dominios de membrana enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas específicas, cuya función es servir de plataformas de señalización dinámicas en procesos tan importantes como la transducción de la vía TCR. Nuestro grupo ha publicado recientemente la implicación de la IL-12 en la regulación de la compartimentación de la membrana plasmática de células T. Ahora, tratamos de esclarecer el mecanismo molecular involucrado en este proceso. Hemos llevado a cabo estudios en linfoblastos humanos y analizamos el comportamiento de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2, las dos cadenas que, juntas, generan el receptor de alta afinidad responsable de las funciones de IL-12. Análisis por citometría de flujo de la ubicación de ambas cadenas en células estimuladas o no con IL-12 y tratadas con TX100 y/o M $\beta$ CD, situaron a  $\beta$ 1 siempre en dominios no raft. Sin embargo,  $\beta$ 2 presentó un cambio de localización de raft a no raft en presencia de IL-12. Los experimentos de microscopía confocal realizados con CTB-Alexa 488 (une a GM1, marcador de zona raft) y DiI (lípidio marcador de zona no-raft) mostraron idéntica dinámica de  $\beta$ 2 en presencia de IL-12. Dada la importancia y trascendencia que tienen estas asociaciones proteicas en la transducción de señales, se confirmaron los resultados analizando por Western-blot y electroforesis bidimensional fracciones raft y no raft aisladas en gradientes de sacarosa.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (PGIDT9981O20001). El Centro de Transfusiones de Galicia ha cedido los "buffy coats" a partir de los cuales se purificaron los linfocitos T humanos empleados en este estudio. A. Canda-Sánchez, C. Varela y A. Pérez-Díaz son becarios de la Xunta de Galicia. <sup>§</sup> E-mail: [mlnma@usc.es](mailto:mlnma@usc.es)

## Introducción

Los rafts o balsas lipídicas son microdominios de membrana enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas específicas, plataformas dinámicas que han sido implicados en funciones tan dispares como el control de la señalización a través de proteínas transmembrana (TCR, BCR, FcR, etc), receptores de citoquinas (IL-2R, IL-6R o IFN $\gamma$ , etc), comunicación célula-célula a través de exosomas, infectividad de priones y VIH, etc. Pero a pesar de la gran cantidad de estudios existentes sobre ellos permanecen muchas cuestiones abiertas; una de ellas es el papel de estos microdominios en el control de la señalización a través de receptores de citoquinas. En este póster presentamos nuestros últimos datos obtenidos que ilustran el papel de los microdominios en la función del receptor de IL-12.

## Resultados

1) La extracción del colesterol presente en rafts empleando metil beta ciclodextrina (M $\beta$ CD) se utiliza habitualmente para probar la asociación de una proteína de membrana con microdominios de membrana ricos en esfingolípidos/colesterol. M $\beta$ CD reduce la expresión (citometría de flujo) en linfocitos T humanos preactivados 3 días con PHA, de CD59 (un marcador de zona raft), pero no así de CD71/TfR (un marcador de regiones no-raft) (Figura 1). Hemos comprobado que IL-12R $\beta$ 1 se comporta análogamente a CD71, mientras que IL-12R $\beta$ 2 lo hace a CD59, lo que indica una clara asociación de IL-12R $\beta$ 2 con rafts (Figura 1). Sin embargo, una breve exposición (5') de los linfoblastos T a IL-12 provoca una reducción del efecto de M $\beta$ CD sobre IL-12R $\beta$ 2 (Figura 1), lo que indica la reubicación de  $\beta$ 2 en zonas menos enriquecidas en colesterol: zona no raft.

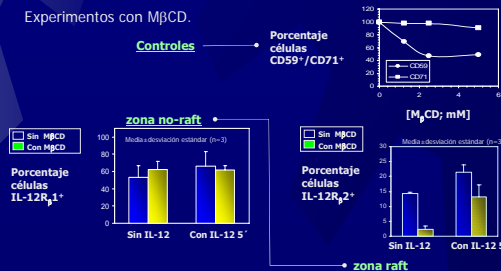


Figura 1.

2) Proteínas transmembrana como CD71, presentes en regiones no rafts -enriquecidas en fosfolípidos y más pobres en esfingolípidos y colesterol- son más sensibles a la extracción con detergentes no iónicos (como TX-100, NP-40, etc) que aquellas residentes en rafts (como CD59). Nuestros experimentos de pretratamiento de linfoblastos humanos con TX-100 indican que IL-12R $\beta$ 1 se localiza en un área de membrana fácilmente accesible para este detergente, por lo que su expresión es drásticamente reducida, junto con la de CD71. Este efecto es potenciado cuando los linfoblastos son preincubados 5' con IL-12 (Figura 2). IL-12R $\beta$ 2, en cambio, muestra gran resistencia a la acción de TX-100 (menor tras la unión a IL-12), de forma similar al comportamiento del gangliósido GM1 (un glicoesfingolípido predominante en rafts y detectado mediante la subunidad B de la toxina cólera/CTB-Alexa-488) (Figura 2). Estos datos apuntan a una localización de las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 de IL-12R en zonas no raft y raft, respectivamente, y a una mayor asociación de  $\beta$ 2 con regiones ricas en fosfolípidos tras unir su ligando.

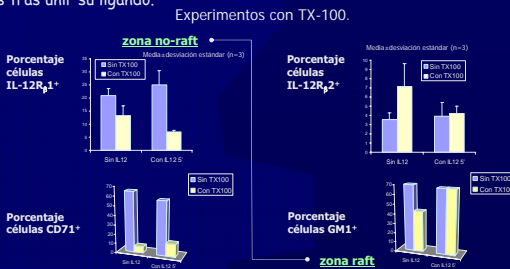


Figura 2.

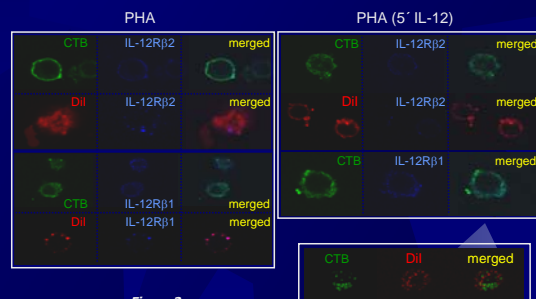
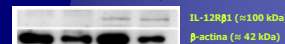


Figura 3.

3) Dado que el empleo de detergentes podría desvirtuar, de algún modo, los datos obtenidos por citometría, se empleó la técnica de microscopía confocal para confirmar dichos resultados. En este caso se emplearon los marcadores CTB-Alexa488 (GM1) y DiI (Molecular Probes Vybrant<sup>®</sup> GM-DiI/G18) para el marcaje de regiones raft y no-raft respectivamente de la membrana plasmática de linfoblastos humanos. En ausencia de exposición a IL-12 es fácilmente observable (Figura 3, izquierda) una colocalización de IL-12R $\beta$ 1 con DiI, mientras que la cadena  $\beta$ 2 de IL-12R presenta una distribución en superficie diferente, que se corresponde más con la de CTB/GM1. Tras una incubación de cinco minutos con IL-12 (Figura 3, derecha) el grado de colocalización entre IL-12R $\beta$ 2 y CTB/GM1 se reduce, probablemente como consecuencia de su desplazamiento hacia zonas más ricas en fosfolípidos saturados de la membrana plasmática (no-raft). En cambio, IL-12R $\beta$ 1 persiste en una ubicación fuera de zona raft independientemente de la presencia o no de IL-12 en el medio de cultivo, algo que también es mostrado en el Western blot de la figura 4.

Figura 4. Western IL-12R $\beta$ 1



Fracción: raft no-raft raft no-raft

## Microdominios rafts: análisis 2D

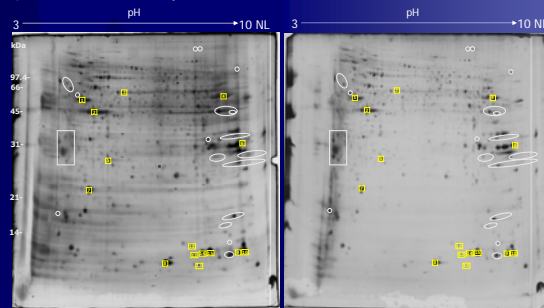
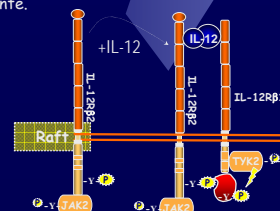


Figura 5.

4) Finalmente, resultados preliminares obtenidos tras analizar mediante técnicas proteómicas (2D/tinción de plata/MS) muestras de rafts lipídicos de linfoblastos humanos, tratados o no durante 5 minutos con IL-12, indican la existencia de modificaciones postraduccionales, cambios de composición proteica y movimientos de proteínas (círculos) inducidos por esta citoquina heterodimérica que están siendo investigados actualmente.

## Modelo conclusiones:





Canda-Sánchez, A.; Lojo Rodríguez, J.; Salgado castro, F.J.; Nogueira Álvarez, M.  
Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular Facultade de Bioloxía

## INTRODUCCIÓN

Los rafts son microdominios de la membrana ricos en glicosfingolípidos y colesterol, lo que les confiere una menor fluidez e insolubilidad en detergentes iónicos. La presencia de moléculas implicadas en la señalización celular los convierte en clave en el control de la transducción de señales vía TCR, BCR o FcγRI. Se ha visto que algunas cadenas de receptores de citoquinas (IL2R e IL15R) están presentes en dominios raft, lo que pudiera indicar su importancia en el control de la señalización mediada por citoquinas.

IL12 es una citoquina producida por APCs, con efectos sobre la proliferación, producción de IFNγ y diferenciación del linfocito T activado. Su receptor está formado por IL12Rβ1 e IL12Rβ2. Ambas unen con baja afinidad IL12 por separado, pero generan en conjunción un receptor de alta afinidad responsable de muchas de las funciones de IL12. Se desconoce cómo los rafts pueden influir en la señalización mediada por IL12R, así como la ubicación de las cadenas de este receptor en la membrana. Nuestros estudios en linfocitos T humanos preactivados muestran una IL12Rβ2 asociada a rafts, dado su similar comportamiento a moléculas como el gangliósido GM1 o CD59 con respecto al tratamiento de las células con detergentes no iónicos (TX100) o moléculas que extraen colesterol (MβCD). Una preincubación de las células con IL2 fue suficiente para provocar un efecto radicalmente opuesto en IL12Rβ2, idéntico al observado con TfR (CD71), proteína típica de regiones no raft. Nuestros datos indican, que si bien en un inicio IL12Rβ2 se encuentra en rafts, tras la interacción con su ligando se produce un movimiento de la proteína fuera de éstos, un proceso también descrito para CD25. Las implicaciones de este fenómeno serán discutidas.

## ANTECEDENTES

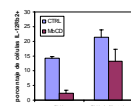
Las citoquinas son proteínas que producen ciertos tipos celulares en respuesta a múltiples estímulos y que se unen a receptores transmembrana que carecen de actividad quinasa. De este modo, para que se produzca la transducción de señales hacia el interior celular, deben reclutarse tirosin quinasas citosólicas, en su mayoría de la familia Janus (JAKs). Estas JAK quinasas se asocian a las colas citoplasmáticas del receptor y, tras un proceso de autofosforilación cruzada, producen la activación, dimerización y translocación nuclear de los factores de transcripción STAT ("signal-transducing transcriptional activators"). Un ejemplo lo tenemos con IL-12, en cuya ruta de señalización están implicadas las quinasas Janus Tyk2 y JAK2 así como la proteína de unión a DNA STAT4. No obstante, vías de transducción de señales adicionales contribuyen a la ruta JAK/STAT. Así, IL-12 estimula la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38, una serín quinasa que fosforila adicionalmente a STAT4, un paso importante para desencadenar la producción de IFNγ inducida por IL-12 pero no suficiente para generar proliferación celular.

Nuestro grupo de investigación está estudiando la cascada de transducción de IL12 en linfoblastos humanos. El uso de mAc PY20 permitió detectar una serie de proteínas fosforiladas en tirosina en respuesta a IL-12. Así, junto con las bandas de 120-130 kDa, probablemente las JAK quinasas Tyk2 y JAK2, de 82-85 kDa, que encajaban con STAT4, y de 38 kDa, posiblemente la MAPK p38, se pusieron otras de manifiesto en torno a 44 kDa que sugerían la activación de otras MAP quinasas (datos no mostrados). El uso de anticuerpos específicos de las formas fosforiladas de estas proteínas nos ha permitido demostrar la activación de la ruta de MAPKs Raf-MEK1-ERK1/2 mediante citometría de flujo (Figura 1, A) y Western blot (Figura 1C).

Los rafts parecen jugar un papel importante en la señalización vía receptores de citoquinas. Su estructura, y por tanto función, puede ser modificada mediante el sequestrado del colesterol utilizando metil-β-ciclodextrina (MβCD). Se realizaron ensayos de dosis-respuesta en donde se evaluaba la eficacia de la MβCD en relación a la expresión en superficie de los marcadores de zona raft CD59 (Figura 1) y GM1 (no mostrados) así como de zona no-raft CD71 (Figura 2), encontrándose una concentración óptima de 1-2.5 mM. El siguiente paso fue preincubar los linfoblastos con MβCD, observando un marcado descenso de la fosforilación de ERK1/2 (Figura 1C). Ello sugiere que bien el receptor de alta afinidad o bien alguna de sus subunidades podrían estar localizadas en rafts.

1

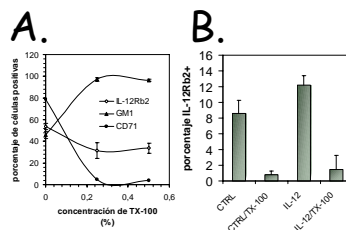
Para averiguarlo linfoblastos activados y tratados con concentraciones óptimas de MβCD fueron marcados con un anticuerpo monoclonal específico frente a cadena β2 del receptor de IL12 (IL12Rβ2). El resultado es mostrado en la figura 2, en donde se aprecia como MβCD está arrastrando parte del receptor. Sin embargo, cuando preincubamos las células con IL12 durante 5 minutos este efecto de la dextrina se ve reducido (figura 2). Este resultado nos sugiere que la cadena β2 del receptor de la IL12 se halla localizado en los microdominios ricos en GPI/colesterol, pero que tras la unión a su ligando se desplazaría hacia zonas periféricas de los mismos, donde ya no es accesible para la MβCD.



**Figura 2.** Linfoblastos activados con PHA fueron estimulados o no con 2 ng/ml de IL12 en RPMI suplementado con un 10% FCS (Medio Completo) a 37°C durante 5 minutos. Las células fueron inmediate y abundantemente lavadas con RPMI, tras lo cual se procedió (MβCD) o no (CTRL) a la eliminación del colesterol de la membrana (2.5 mM en RPMI, 20 min, 37°C). Las células se marcaron inmunofluorescentemente con anti-IL12Rβ2, GARat-Biotin (BD) y Streptavidin-PE (Serotec) y fueron fijadas con 1% PFA. Se utilizó un citómetro FACSscan (Becton) para la lectura. Cada dato es resultado de la media de triplicados, mientras que las barras representan la desviación estándar. Se muestra un experimento representativo (n=3).

2

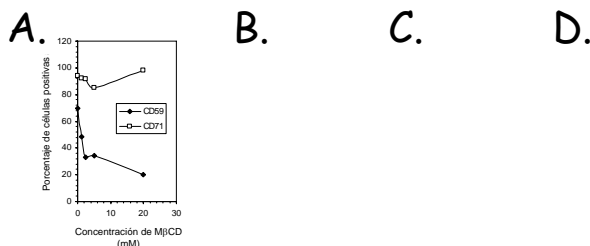
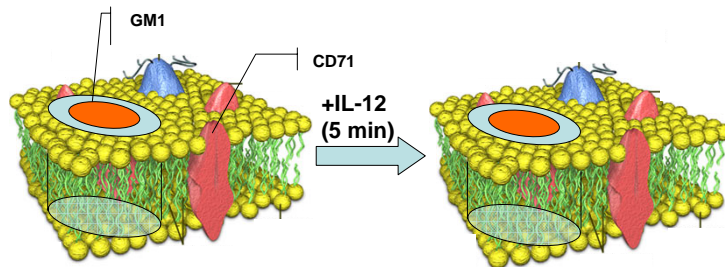
Por otro lado los rafts son microdominios de membrana resistentes, a baja temperatura, a la acción de detergentes no iónicos como el TX100. Basándonos en esta propiedad se comprobó si la expresión de la cadena β2 de IL12R se reducía como consecuencia del tratamiento con TX100. Como controles se evaluaron una serie de marcadores de zona no raft (CD71) y raft (GM1) (Figura 3). Como se esperaba el detergente no iónico eliminaba gran parte del CD71, mientras que la expresión de GM1 no se veía reducida sino que incluso aumentaba. En cuanto a los resultados con IL-12Rβ2 la reducción observada, menos acusada que la de CD71, apunta hacia una localización en la periferia de rafts debido a la sensibilidad parcial de esta región de los rafts al tratamiento con TX-100. Por otro lado, este efecto es menos acusado cuando los linfoblastos son preincubados con IL12 durante 5 min, lo que indica una mayor accesibilidad de IL12Rβ2 al detergente. Este último resultado es indicativo de un cierto desplazamiento de IL12Rβ2 hacia regiones de la membrana con mayor abundancia de glicerosfingolípidos (en donde se encontraría CD71), sin abandonar del todo la zona raft.



**Figura 3.** A) Linfoblastos activados con PHA fueron lavados con PBS pH 7.4 y sometidos a un tratamiento para eliminar la fracción no raft de la membrana con concentraciones crecientes de TX100 en PBS durante 5 minutos en hielo. Tras un lavado exhaustivo y un paso de fijación (1% de PFA en PBS) se procedió al marcaje utilizando los mismos anticuerpos que en experimentos. La presencia del gangliósido GM1 fue revelada con CTB-Alexa488 (Molecular Probes). En B) linfoblastos activados con PHA fueron estimulados o no con IL-12 (2 ng/ml) a 37°C durante 5 minutos. Tras un lavado con RPMI1640 las células fueron tratadas con 0,25% TX-100 5 min en hielo, fijadas y la expresión de IL-12Rβ2 medida como en la figura 2. Cada dato experimental se corresponde a la media de triplicados, mientras que las barras representan la variabilidad valorada como desviación típica. Tanto en A como en B los experimentos son representativos de varios realizados (n=3).

## Conclusiones

En el presente estudio mostramos datos que apoyan: a) una participación de la vía Raf-MEK1/2-ERK1/2 en la cascada de transducción de señales generada por IL-12; b) una ubicación de la cadena β2 del receptor de IL12 en la periferia de microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol, también denominados rafts, que explicaría la alteración de la fosforilación de ERK1/2 por el tratamiento con MβCD, un agente que sequestra colesterol de la membrana. Además se apunta, como en el caso del receptor de IL-2, a una rápida reorganización en el raft en respuesta a IL-12. Esta reorganización se ve reflejada en un desplazamiento de IL12Rβ2 desde la periferia hacia el exterior de los microdominios (ver esquema inferior), un fenómeno posiblemente relacionado con la generación del receptor de alta afinidad, la cascada de transducción de señales o la internalización del complejo receptor-ligando. Estudios en progreso nos permitirán profundizar más en este proceso así como conocer la ubicación de IL-12Rβ1 y el heterodímero IL-12Rβ1/IL-12Rβ2.



**Figura 1.** A) Análisis del efecto de distintas concentraciones de metil-β-ciclodextrina (MβCD) sobre la expresión del marcador de zona raft CD59 y del marcador de zona no-raft CD71 mediante citometría de flujo en linfoblastos humanos activados con fitohemaglutinina (PHA). Se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-CD71-PE y anti-CD59-FITC (BD) y el análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScan. B) Linfoblastos activados con PHA fueron estimulados con 2 ng/ml de IL-12 en RPMI 1640 a 37°C a los tiempos indicados. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) y permeabilizadas con saponina, tras lo cual se realizó un marcaje inmunofluorescente con un anticuerpo primario anti-Phospho-ERK1/2 (CellSignaling Technologies) y el secundario GAR-FITC (Sigma Aldrich Química). C) Igual que en B pero los linfoblastos fueron tratados con 1mM MβCD en RPMI a 37°C durante 15 min, para extraer el colesterol de la membrana antes de la estimulación con IL-12 durante los diferentes tiempos. D) Linfoblastos procedentes de las muestras analizadas por citometría en B y C (tiempos cero y 5 minutos) fueron lisados en tampón de muestra 1X SDS-PAGE y cargadas en un gel de electroforesis desnaturalizante. Tras la transferencia a PVDF se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo primario anti-Phospho-ERK1/2 y un secundario GAR-HRP (CellSignaling Technologies).



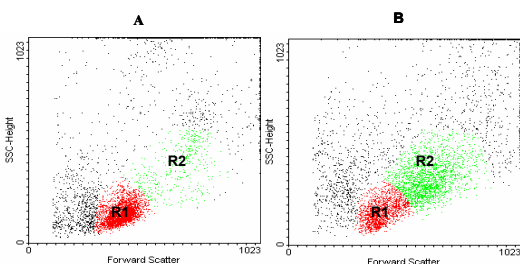
Canda-Sánchez A., Lojo J., Bugía B., Nogueira M.†

## INTRODUCCIÓN

La IL-12 es una citoquina pro-inflamatoria que induce la producción de IFN $\gamma$ , promueve la diferenciación de las células T CD4+ en células Th1, y es un vínculo entre la resistencia innata y la inmunidad adaptativa. Nuestro grupo estudia el papel de IL-12 en la activación de linfoblastos humanos y su implicación en la compartimentalización de la membrana plasmática, en particular, la regulación de la expresión e interacción de dos marcadores de activación: CD26 y CD45R0. En un intento de profundizar en el papel regulador de la IL-12, hemos estudiado su mecanismo de transducción de señal. Se sabe que su unión al receptor provoca la fosforilación de éste y de dos quinasas asociadas, JAK2 y TYK2, lo que, a su vez, produce la fosforilación en tirosina de STAT4, cuya activación es necesaria para la producción de IFN $\gamma$  pero no para el efecto proliferativo también observado. De las tres MAPKs (p38, JNK/SAPK y ERK1/2), se ha descrito que la p38 fosforila a STAT4 una vez que ha entrado al núcleo, y, hasta donde sabemos, no se ha encontrado activación de JNK/SAPK ni ERK1/2 mediada por la IL-12. En este trabajo hemos investigado el efecto de la IL-12 en la activación de linfocitos humanos utilizando cultivos de PBMCs activadas con PHA. Mediante Citometría y Western blot, hemos puesto de manifiesto en estas células la activación de ERK1/2 en respuesta a la presencia de IL-12, lo que implica a la ERK1/2 en la vía de transducción de señal de la IL-12 en linfoblastos humanos.

## Activación de los linfocitos con PHA

Nuestro grupo de investigación estableció hace tiempo las condiciones óptimas de activación con PHA e IL-12 para aumentar el nivel de expresión de CD26, una proteína de la superficie celular con actividad dipeptidil-peptidasa, en la cual se enmarcan estos experimentos. Estudios previos demostraban que el porcentaje de células T activadas en estos cultivos es del orden de 90%. Todas las células empleadas han sido analizadas para controlar el grado de activación antes y después del cultivo, dado que el receptor de alta afinidad de IL-12 sólo se expresa en la células con un elevado grado de activación. Se puede observar como la activación provoca un aumento del Forward-Side Scatter en la región R2.

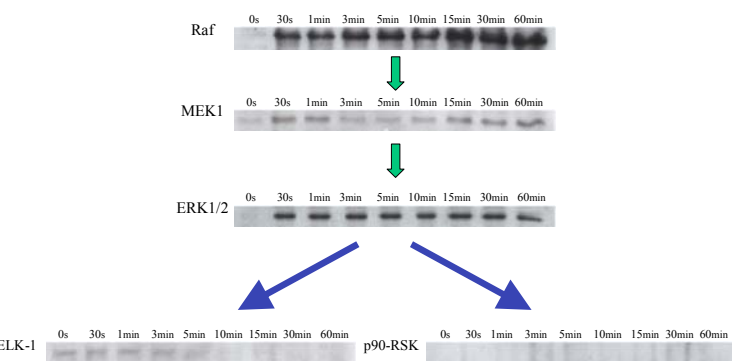


Utilizando sangre procedente de donantes voluntarios sanos, se purificaron las PBMCs en un gradiente de Ficoll. 1 millón de células fueron fijadas con 1% PFA en PBS, antes (A) y después (B) del cultivo de 3 días con PHA a 1.5 µg/ml. Sólo se emplearon para estos experimentos aquellos cultivos con viabilidad superior al 95% y cuyo análisis del FSC-SSC presentaba un elevado nivel de activación de los PBMCs.

## Activación de la vía de transducción de señal Raf-MEK-ERK en linfoblastos

En los Western blot revelados con anticuerpos fosfoespecíficos de las proteínas de la ruta de la MAPK ERK1/2 vemos como, en presencia de IL-12, hay un aumento en el grado de fosforilación de las proteínas clave de esta ruta: Raf, MEK1 y ERK1/2. Esto indica claramente que se está activando esta cascada de MAPK en respuesta a la IL-12. La respuesta se mantiene a lo largo de los diferentes tiempos analizados.

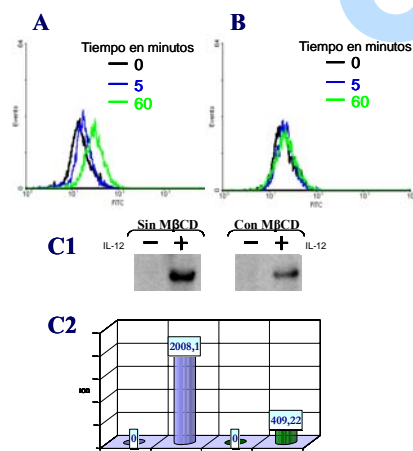
No se ha encontrado un aumento en el grado de fosforilación de p90-RSK ni de ELK1, aunque en el caso de esta última podría decirse que incluso sufre cierto descenso en el mismo. Ambas proteínas son dianas específicas de ERK1/2, pero no las únicas. Que no se hallen activadas no sorprende porque es probable que estas dos proteínas en concreto, no se activen en respuesta a la IL-12 y si lo hagan otros factores de transcripción no abarcados en este estudio.



Los linfoblastos activados con PHA fueron estimulados con 2ng/ml de IL-12 a 37°C. Las muestras de células fueron tomadas a los diferentes tiempos indicados en la figura, y lisadas en un tampón de muestra para electroforesis (312.5mM Tris-HCl pH6.8, 0.5% peso/volumen Glicerol, 10% peso/volumen SDS, 0.125% peso/volumen Azul de Bromofenol, con pirronina como marcador adicional). Tras el Western blot, el revelado de las membranas de PVDF se realizó con los anticuerpos primarios específicos de cada forma fosforilada y después con su secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (CellSignaling Technologies).

## Detección de ERK1/2 mediante citometría de flujo

La ERK1/2 fosforilada puede detectarse mediante citometría de flujo si las células son permeabilizadas para permitir el paso del anticuerpo al citosol. Podemos ver como claramente hay un aumento de la IMF a lo largo de los diferentes tiempos analizados debido a la ERK1/2 cuando las células son estimuladas con IL-12. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante Western blot.



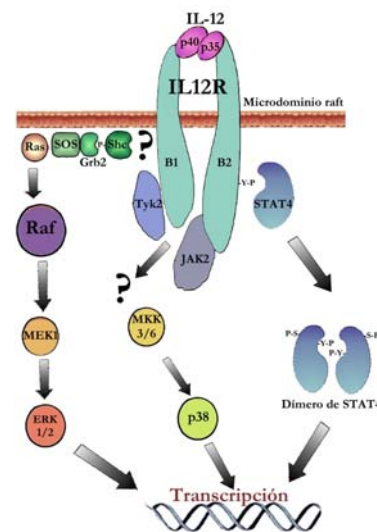
A) Linfoblastos activados con PHA fueron estimulados con 2ng/ml de IL-12 en RPMI a 37°C. Las reacciones se pararon a los diferentes tiempos indicados en un tampón de fijación con PFA y un detergente (saponina) para su permeabilización. El marcaje de las células se realizó con un anticuerpo anti-Phospho-ERK1/2 (CellSignaling Technologies) y como secundario GAR-FITC (Sigma Aldrich Química). B) Linfoblastos activados con PHA fueron tratados con 1mM MβCD en RPMI a 37°C durante 15min, para extraer el colesterol de la membrana. Una vez lavadas las células fueron estimuladas y marcadas al igual que en A). C1) Western blot de linfoblastos procedentes del mismo cultivo que las citometrías. El tratamiento con MβCD se realiza 'previamente a la estimulación con IL-12 y en las mismas condiciones que B). La obtención y tratamiento de muestras se corresponde al de la fig.2. C2) Densitometría de los Western blot revelados con el anticuerpo fosfoespecífico. La electroforesis y transferencia se realizó en un mismo gel y membrana de PVDF para garantizar la homogeneización en el tratamiento, la cantidad de proteína es la misma en ambos casos.

El tratamiento con MβCD, previo a la estimulación con IL-12, altera la organización del raft lipídico. Como puede verse en la figura aunque hay un aumento en la IMF del grado de fosforilación de la ERK1/2, este aumento es muy inferior al observado en los linfoblastos no tratados con MβCD. Dado que el proceso de transducción de señal de la IL-12 es poco conocido, este experimento sitúa al receptor y/o su mecanismo de transducción de señal en el entorno de los microdominios raft.

Como control interno de las citometrías se realizó un Western blot que fue revelado con el mismo anticuerpo contra la forma fosforilada de ERK1/2 en presencia y ausencia de IL-12. Vemos claramente como las células tratadas con MβCD disminuye el nivel de fosforilación de la ERK1/2. Este descenso fue ratificado a través del análisis de la densidad óptica.

## IPÓTESIS

A partir de los datos mostrados en esta presentación, y de la bibliografía existente hasta la fecha, establecemos la siguiente hipótesis de transducción de señal de la IL-12. Por un lado estaría la activación de la ruta de las JAK-STAT (STAT4 como diana principal) y, por otro, la activación a través de moléculas desconocidas de la MAPK p38. Por último debería existir una conexión entre el receptor de IL-12 a través de moléculas adaptadoras (Ej.: Shc, Grb2, SOS) con una GTPasa (como puede ser Ras) o con una proteína quinasa, necesaria para iniciar la cascada ERK1/2 que hemos detectado en este trabajo. La integridad del raft sería un factor clave en la actividad de esta ruta. Como se ha demostrado, ni p38 ni STAT4 están implicadas en la proliferación observada en respuesta a la IL-12. ERK1/2 está implicada en la regulación del ciclo celular, por lo que creemos lógico pensar que esta es la molécula responsable de este efecto.



## CONCLUSIONES

En el presente trabajo mostramos como se produce la activación de la MAPK ERK1/2 así como de su cascada específica de activación: Raf-MEK1-ERK1/2. No se ha encontrado activación de ninguna de las dianas estudiadas de esta MAPK, probablemente porque ni p90-RSK ni ELK1 se activen en respuesta a la IL-12.

También mostramos como es posible medir la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la IL-12 a diferentes tiempos y usando la citometría de flujo. Usando esta misma técnica en células tratadas con MβCD antes de la estimulación con IL-12, vemos una disminución en el grado de activación de la ERK1/2 respecto a las células no-tratadas, lo que nos permite situar al receptor de IL-12 y/o su mecanismo de transducción de señal en el entorno de los microdominios rafts.

