

Tesi doctoral presentada per En/Na

Elisabet CANTÓ I NAVÉS

amb el títol

**"Diferències fenotípiques i funcionals del
limfócits CD4⁺ de sang de cordó umbilical i sang
perifèrica d'adult"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

FARMÀCIA

Barcelona, 23 de setembre de 2003

Facultat de Medicina
Departament de Fisiologia



UNIVERSITAT DE BARCELONA



1. INTRODUCCIÓ	
1.1. Limfòcits T	1
1.2. Activació limfòcits T via TCR/CD3	2
1.2.1. Complexe TCR/CD3	4
1.2.2. Molècules accessòries i coestimuladores	7
1.2.3. Cascada de senyalització via TCR/CD3	13
1.2.4. Resposta dels limfòcits T a l'antigen i a la coestimulació	32
1.3. Apoptosi en els limfòcits T	35
1.3.1. Característiques generals	36
1.3.2. Mecanismes de mort en limfòcits T activats	38
1.3.3. Regulació de l'apoptosi	44
1.3.4. Control de la supervivència de les cèl·lules T	45
1.4. Sang de cordó umbilical	46
1.4.1. Trasplantament de sang de cordó umbilical	46
1.4.2. Composició de la sang de cordó umbilical	48
1.4.3. Resposta dels limfòcits de sang de cordó	52
2. OBJECTIUS	61
3. MATERIALS I MÈTODES	
3.1. Mostres cel·lulars	63
3.2. Cultius cel·lulars	67
3.3. Citometria de fluxe	70
3.4. Quantificació d'interleuquina 2	76
3.5. Immunodetecció de proteïnes	78
3.6. Seguiment de la fosforilació de proteïnes en tirosina	86
3.7. Obtenció de RNA total	91
3.8. Assaig de protecció de Ribonucleasa	92
3.9. Manteniment d'hibridomes en cultiu cel·lular	95

3.10. Anàlisi estadístic	97
4. RESULTATS	
4.1. Immunofenotip de les cèl·lules de cordó umbilical	99
4.2. Estat funcional de les cèl·lules CD4 ⁺ CD45RA ⁺	103
4.3. Activació via el receptor del limfòcit T	111
4.4. Transducció de senyals després de l'activació via TCR/CD3	137
5. DISCUSSIÓ	145
5.1. Immunofenotip de SCU i SPA	146
5.2. Estat funcional dels limfòcits CD4 ⁺ CD45RA ⁺ de SCU	148
5.3. Activació dels limfòcits de SCU	152
5.4. Cinètica de fosforilació en tirosina	161
6. CONCLUSIONS	167
7. BIBLIOGRAFIA	169

1.1. LIMFÒCITS T

Tots els elements que formen la sang provenen dels mateixos precursors o progenitors hematopoiètics: les cèl·lules sota hematopoiètiques del moll d'òs. El progenitor mieloide és el precursor dels granulòcits, macròfags, de les cèl·lules dendrítiques i dels mastòcits. El progenitor comú limfoide donarà lloc a limfòcits B i T.

Els limfòcits T es diferencien en el timus i d'allà, un cop han estat seleccionats per poder reaccionar enfront antígens estranys presentats per molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) pròpies, passen a la perifèria. Els limfòcits T es poden subdividir en dos tipus depenent del receptor (TCR) que expressen en la seva superfície. La majoria dels limfòcits T expressen un TCR constituït per la cadena α i β i una petita proporció expressen les cadenes γ i δ .

Dins dels limfòcits que expressen les cadenes α i β existeixen dos poblacions, els que coexpressen la molècula CD4 i els que coexpressen la molècula CD8. Aquests dos tipus cel·lulars es diferencien principalment en com reconeixen l'antigen i com medien les funcions reguladores i efectores després de la seva activació.

Els limfòcits CD4⁺ són les principals cèl·lules reguladores en el sistema immune. La seva funció depèn de molècules que s'expressen en la seva superfície, així com de diferents citocines que secreten quan són activats.

Dins dels limfòcits T es poden diferenciar aquells que no han estat en contacte amb l'antigen, limfòcits T *naïve*, i aquells que ja han desenvolupat una resposta immune enfront de l'antigen i mantenen la capacitat de respondre de manera més ràpida i eficaç a un segon encontre amb el mateix antigen, limfòcits memòria. Ambdós tipus cel·lulars presenten diferències tant fenotípiques com funcionals que permeten la seva diferenciació.

1.1.1. FENOTIP DE LES CÈL·LULES T MEMÒRIA I *NAÏVE*

Una de les principals diferències fenotípiques entre les cèl·lules memòria i les *naïve* és l'expressió de marcadors d'adhesió. Així els nivells d'expressió de les integrines $\beta 1$ (CD29, CD49d, CD49e) i $\beta 2$ (CD11a, CD11b i CD18), CD2, CD44, CD54 i CD58 són superiors en les cèl·lules de memòria que en les *naïve* (Berard and Tough, 2002). L'expressió de molècules relacionades amb la migració limfocitària

INTRODUCCIÓ

també s'ha vist que difereixen entre les cèl·lules *naive* i les memòria, així, les cèl·lules *naive* expressen nivells elevats i uniformes de CD62L i CCR7, en canvi algunes cèl·lules memòria formen una població heterogènia amb cèl·lules de fenotips CD62L⁺ CCR7⁺ i CD62L⁻ CCR7⁻ (Swain et al., 1991; Bradley et al., 1992; Hou and Doherty, 1993; Sallusto et al., 1999). Entre d'altres molècules que presenten diferències d'expressió entre els limfòcits memòria i *naive* trobem la cadena β del receptor de la IL2 (CD122) i Ly-6C que són expressats a majors nivells en els limfòcits memòria CD8 que en els *naive*. A la superfície de les cèl·lules *naive* s'expressa la isoforma CD45 d'alt pes molecular (CD45RA), mentre que en les cèl·lules memòria s'expressa la isoforma de baix pes molecular (CD45RO).

En general s'assumeix que les cèl·lules memòria no presenten una morfologia blàstica i no expressen marcadors transitoris d'activació com el CD69.

1. 2. ACTIVACIÓ LIMFÒCITS T VIA TCR/CD3

La resposta de la cèl·lula T depèn de la naturalesa de l'antigen, de la cèl·lula presentadora que el presenta (APC) i de l'estat de maduració i diferenciació.

Les cèl·lules *naive* necessiten d'uns requeriments més astringents per a la seva activació comparat amb les cèl·lules memòria. Això explica la major sensibilitat de les cèl·lules memòria a respondre en front de baixes concentracions d'antigen (Kearney et al., 1994; Curtsinger et al., 1998; Rogers et al., 2000) i que requereixen menys senyals de coestimulació per poder ser activades. L'activació de les cèl·lules *naive* és dependent de la presentació de l'antigen per les cèl·lules dendrítiques (Inaba et al., 1990), mentre que les cèl·lules memòria poden respondre a antígens presentats per altres APCs, com les cèl·lules B (Croft et al., 1994).

El reconeixement d'un antigen per les cèl·lules T *naive* comporta la proliferació de les cèl·lules específiques per l'antigen, expansió clonal i la diferenciació de la progènie a cèl·lules efectores i memòria. Les cèl·lules efectores respondran a una segona exposició a l'antigen, desenvolupant una resposta efectora, caracteritzada per la secreció de citokines (majoritàriament per limfòcits CD4⁺) o desenvolupant una resposta citolítica (principalment per limfòcits CD8⁺). D'aquesta manera el reconeixement de l'antigen per les cèl·lules efectores desencadenarà una resposta per eliminar a l'antigen. Malgrat diferències en quant a resposta funcional, la via de senyalització després de l'activació del TCR de les cèl·lules *naive* i efectores és fonamentalment la mateixa.

INTRODUCCIÓ

Les principals cèl·lules presentadores pels limfòcits T *naive* són les cèl·lules dendrítiques madures, donat que expressen elevats nivells de MHC amb pèptids i de molècules que donen lloc a la senyal coestimuladora pels limfòcits T. Altres APCs són els limfòcits B i els macròfags, que són més eficients com a presentadores pels limfòcits efectors i memòria. El fet que les cèl·lules *naive* necessitin d'unes APCs més professionals, ve determinat perquè presenten un llindar d'activació més alt comparat amb les memòria.

La resposta dels limfòcits a l'antigen presentat per les APCs es pot dividir en:

a) *Síntesi de noves proteïnes*. Després de l'activació, els limfòcits comencen a transcriure una sèrie de gens i sintetitzar noves proteïnes. Dins d'aquestes proteïnes s'inclouen citoquines, que estimulen el creixement i la diferenciació, receptors de citoquines, que permeten que els limfòcits responguin a les citoquines i altres proteïnes involucrades en la transcripció i la divisió cel·lular. La principal citoquina produïda per les cèl·lules *naive* és la interleuquina 2 (IL2), que és un factor de creixement i de diferenciació.

b) *Proliferació*. El fet que els limfòcits reconeixin a l'antigen pel qual són específics fa que entrin en cicle cel·lular, resultant en la proliferació i expansió clonal. Com que per la producció d'IL2 i l'expressió d'IL2R (receptor de la interleuquina 2) es requereix el reconeixement de l'antigen pel limfòcit T, les cèl·lules que reconeixen l'antigen proliferen en resposta a aquest d'una manera autocrina.

c) *Diferenciació a cèl·lules efectores*. La diferenciació del limfòcits T *naive* en cèl·lules efectores depèn de l'activació per l'antigen i de certes citoquines presents en el lloc de l'activació. Les cèl·lules CD4⁺ es diferenciarien en Th1 i Th2 que poden secretar diferents citoquines i desencadenar una sèrie de respostes, mentre que les cèl·lules CD8⁺ es diferenciarien a limfòcits T citotòxics funcionals amb capacitat de matar a cèl·lules diana. Moltes de les citoquines secretades per les cèl·lules CD4⁺ actuen sobre d'altres poblacions: TNF i limfotòxina actuen sobre els neutròfils i l'endoteli vascular, IL5 activa als eosinòfils, IFN γ activa als fagòcits mononuclears i la IL2 activa a les NK i als limfòcits T i B.

d) *Desaparició de la resposta immune i homeostasi*. Al final de la resposta, el sistema immune retorna al seu estat basal, doncs la majoria dels limfòcits que s'han expandit són eliminats per apoptosi. Encara que una part de la progènie sobreviurà, donant lloc a les cèl·lules memòria. Hi ha dos models per la generació de les cèl·lules

INTRODUCCIÓ

memòria: un propòsita que provenen de les cèl·lules *naive* i l'altre que provenen de les cèl·lules efectores (Farber, 1998).

1.2.1. COMPLEXE TCR/CD3

Els limfòcits T responen a fragments peptídics que són presentats per les cèl·lules presentadores. L'inici d'aquesta resposta requereix un reconeixement específic de l'antigen pel limfòcit T, una adhesió estable entre les cèl·lules T i les APCs i una transducció dels senyals d'activació.

El TCR presenta dues funcions en l'activació de les cèl·lules T induïda per l'antigen. La primera és la unió al pèptid específic presentat pel complex major d'histocompatibilitat. La segona, és que converteixi el reconeixement per l'antigen en una senyal de transmembrana en la qual la maquinària citoplasmàtica d'activació sigui activada i reguli la subsegüent resposta cel·lular. Els senyals bioquímics que es donen després del reconeixement de l'antigen són conduïts per unes proteïnes invariants CD3 (γ , δ , ϵ) i ζ que es troben unides no covalentment al TCR, formant el complex del TCR/CD3.

Diferències conformacionals al·lostèriques durant el reconeixement entre el TCR i pèptid-MHC, en la interacció del TCR amb les molècules accessòries o altres interaccions intermoleculares poden comportar variacions en la senyal de transducció (Lyons et al., 1996; Madrenas and Germain, 1996).

1.2.1.1. CARACTERÍSTIQUES DEL TCR $\alpha\beta$

El TCR $\alpha\beta$ està constituït per dues cadenes transmembrana unides per un pont disulfur. Cada una de les cadenes consisteix en un domini Ig (immunoglobulina) amb una regió variable en l'extrem N-terminal, un domini Ig constant que presenta una part transmembrana i una petita cua citoplasmàtica (5 aa i 12 aa en la cadena α i β respectivament). En el domini variable tant de la cadena α com de la β , es localitzen petites seqüències on es concentra la variabilitat entre diferents TCR i això forma les regions hipervariables o determinants de complementarietat (CDRs). En la cadena α es troben 3 CDRs i en la cadena β quatre, on el quart CDR s'anomena HV4, presenta hipervariabilitat i és lloc d'unió de superantígens (Choi et al., 1990; Fields et al., 1996).

INTRODUCCIÓ

Cada cadena del TCR és codificada per diferents gens que pateixen reordenaments somàtics durant la maduració dels limfòcits T. Evidències recents indiquen que hi hauria dos heterodímers de TCR per cada complexe TCR/CD3 (Fernandez-Miguel et al., 1999). En la figura 1.1. es mostra un esquema del complexe TCR/CD3.

En condicions bassals el complexe TCR de les cèl·lules CD4⁺ es troba expressat conjuntament amb les molècules CD45 i el CD4 associat al Lck. S'ha vist que aquesta interacció pot estar estabilitzada per proteïnes com CD45AP (*CD45-associated protein*) i per interaccions amb el citoesquelet. Això facilitaria la formació del complexe de senyalització i que la cèl·lula pogués respondre d'una manera efectiva. L'associació del Lck al TCR es donaria només en presència del CD4 (Diez-Orejas et al., 1994). A més, també la cua citoplasmàtica del CD4 és necessària per estabilitzar l'associació del CD45 amb el CD3/TCR després de l'activació del TCR (Leitenberg et al., 1999).

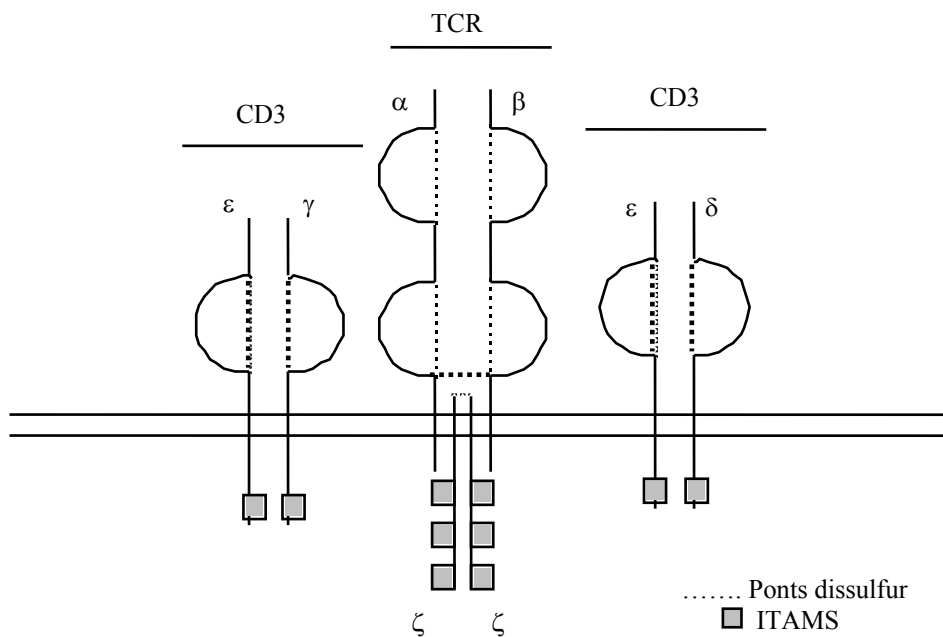


Figura1.1. Esquema del complexe TCR/CD3 on s'indiquen les cadenes que el constitueixen així com els dominis ITAMs.

1.2.1.2. ESTRUCTURA DEL CD3 i CADENA ζ

El CD3 està constituït per 3 proteïnes, γ , δ , ϵ . El complexe de TCR també conté un homodímer de cadena ζ . El CD3 i cadena ζ estan unides al TCR de forma no covalent i quan el TCR reconeix a l'antigen, aquestes proteïnes transdueixen el senyal que portarà a l'activació del limfòcit T. En les cues citoplasmàtiques de les cadenes γ , δ , ϵ , es localitza el domini ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que presenta una seqüència amb dues tirosines (YxxI/Lx₍₆₋₈₎YXXI/L) (Reth, 1989; Cambier, 1995). La cadena ζ presenta una llarga cua citoplasmàtica que conté tres ITAMs. S'ha establert que el CD3 estaria organitzat en dímers: CD3 $\gamma\epsilon$, CD $\delta\epsilon$ i $\zeta\zeta$ (Terhorst G. Et al. 1996). Per tant, en cada complexe de TCR existirien 10 motius ITAMs que són necessaris per l'activació mediada pel TCR (Irving and Weiss, 1991; Letourneur and Klausner, 1991).

1.2.1.3. PAPER DEL TCR EN EL RECONeixAMENT

Els limfòcits T tenen una doble especificitat, ja que reconeixen uns residus polimòrfics del MHC (restricció per MHC) i residus dels pèptids presentats per aquest MHC (responsable de la seva especificitat). L'orientació entre el TCR i el pèptid-MHC pot ser variable depenent del receptor de la cèl·lula T (Garcia et al., 1999a; Hennecke and Wiley, 2001). Dels models que s'han cristal·litzat del TCR-pep-MHC-I, s'ha determinat que la interacció es dóna diagonalment malgrat diferents especificitats de TCR. Recentment s'ha cristal·litzat el complexe entre el TCR (D10) i un pèptid presentat per classe II, demostrant una ortogonalitat en l'orientació del TCR vers el MHC-II-pèptid (Reinherz et al., 1999).

S'han proposat diferents models del desencadenament de la resposta del TCR:

a) Models de multimerització que proposen que la unió dels lligands atrau a complexos de TCR/CD3. Aquest model requeriria una unió simultània mínima de TCRs adjacents pel pèptid-MHC, però no explicaria el perquè es pot donar una molt bona eficient resposta amb baixes densitats de pèptid-MHC (Lanzavecchia et al., 1999).

b) Models de canvis conformacionals que proposen que després de la unió al pèptid-MHC, el TCR pateix uns canvis conformacionals que d'alguna manera ho transmeten al complexe CD3. Per fer-ho més compatible amb la informació estructural

INTRODUCCIÓ

del TCR que ara es coneix, caldria assumir que dos TCRs formarien un dímer i la unió de cada TCR per l'antigen alteraria l'orientació relativa dels dos TCRs (Ding et al., 1999).

c) Un altre model postula que l'activació resulta de l'heterodimerització del TCR amb el CD8 o CD4 després de la unió al lligand, fent que es produeixi una aproximació entre el TCR/CD3 i les molècules de senyalització associades als coreceptors.

d) El model d'associació a rafts. Els rafts constitueixen ensemblaments de colesterol i esfingolípidis presents en la cara externa de la bicapa lipídica que constitueix la membrana extracel·lular. Aquest model postula que la unió al TCR permet l'associació del TCR/CD3 als rafts (Lanzavecchia et al., 1999).

e) El model de cinètica de segregació proposa que la unió del pèptid-MHC porta al complexe TCR/CD3 dins de la zona de contacte amb la membrana en la qual la fosforilació en tirosina està afavorida per l'exclusió o segregació de les tirosin fosfatasas, com el CD45 (Davis and van der Merwe, 1996; Anton van der Merwe et al., 2000).

1.2.2. MOLÈCULES ACCESSÒRIES I COESTIMULADORES

Les cèl·lules T expressen altres proteïnes integrades en la membrana que tenen un paper important en les respostes funcionals que es donen pel reconeixement de l'antigen. Aquestes molècules s'uneixen específicament a lligands presents en les cèl·lules presentadores (APCs), cèl·lules diana o a molècules de la matriu extracel·lular. Són molècules no polimòrfiques i invariables. Com a resultat de la seva interacció augmenta la força d'adhesió entre la cèl·lula T i l'APC o bé amb la cèl·lula diana. Moltes d'elles poden conduir senyals bioquímiques a l'interior de la cèl·lula T que són importants en la resposta funcional.

Una òptima activació dels limfòcits per l'antigen específic requereix de dues senyals: un reconeixement de l'antigen pels limfòcits (senyal 1) i senyals addicionals (senyal 2). El senyal 1 ve donat per la interacció entre el TCR i el pèptid presentat en el context del MHC, i el segon senyal ve donat per les molècules coestimuladores expressades en la superfície de les APCs o factors solubles (IL1, IL2, IL4 i altres). La coestimulació és crítica per permetre una completa activació, una proliferació sostinguda, per prevenir l'anèrgia i/o apoptosi, per induir la diferenciació a cèl·lules efectores i memòria i per permetre la cooperació entre cèl·lules. Però, l'activació de la

INTRODUCCIÓ

cèl·lules T es pot donar en determinades condicions en absència de la coestimulació si la senyal via TCR és molt forta.

1.2.2.1. CD4, CD45 i CD2

El CD4 és una glicoproteïna de transmembrana que s'expressa en forma de monòmer en la superfície de limfòcits T i timòcits, però també és present en les cèl·lules mononuclears fagocítiques i en algunes cèl·lules dendrítiques. Presenta un domini extracel·lular amb quatre dominis d'Ig units en tàndem i un domini N-terminal que s'uneix al domini no polimòrfic $\beta 2$ de la molècula de MHC-II, sense modificar l'especificitat del reconeixement del TCR però augmentant la seva interacció (Hampl et al., 1997; Madrenas et al., 1997). També presenta una cua citoplasmàtica de 38 aa que interacciona de manera no covalent amb la regió N-terminal de Lck (Shaw et al., 1989; Turner et al., 1990). Això permet que el Lck s'apropi al TCR quan es dona l'activació via TCR permetent que Lck fosforili els ITAMs. D'aquesta manera el CD4 participa en la formació d'una interacció més estable entre el TCR i el pèptid-MHC, alhora que es comunica amb la senyal de transducció a través de la seva interacció amb Lck (Glaichenhaus et al., 1991). També una part de les molècules CD4 poden interaccionar amb LAT, fent que el Lck i LAT es pugui apropar al TCR (Bosselut et al., 1999).

La molècula CD45 s'anomena antigen leucocitari comú i s'expressa en totes les cèl·lules hematopoiètiques nucleades i la seva expressió és necessària per a una bona activació de les cèl·lules T. La família del CD45 consta de múltiples membres que són producte d'un únic gen. El gen es localitza en el cromosoma 1 en els humans. Conté múltiples exons que combinats i degut a les diferents glicosilacions que pot patir la molècula, resulta en l'expressió de diferents isoformes de CD45 expressades en diferents tipus cel·lulars. Es poden trobar 8 isoformes generades per un *splicing* alternatiu dels exons 4,5 i 6 (A, B i C) que afecta a la longitud del domini extracel·lular. En els primers moments del desenvolupament dels timòcits, TCR⁺CD4⁺CD8⁻, s'expressa la isoforma més llarga del CD45 (CD45R/B220) que inclou tots els exons. Després de l'estimulació, els timòcits immadurs passen a expressar la isoforma CD45RO. Si els timòcits segueixen en la seva maduració, migren a les zones de la medul·la tímica i la perifèria on apareixen les formes de CD45 més llargues (CD45RA, CD45RB i CD45RC). En els humans la isoforma CD45RA indica que les cèl·lules T són *naive*.

INTRODUCCIÓ

El CD45 és una glicoproteïna de membrana que presenta un domini citoplasmàtic amb activitat tirosin fosfatasa. Se l'ha relacionat amb el desenvolupament de les cèl·lules T, donat que s'ha vist que l'animal deficient en CD45 presenta una disminució de la transició dels timòcits doble negatius a doble positius i a positius simples, resultant en una reducció de les cèl·lules T madures existents en la perifèria (Kishihara et al., 1993; Frearson and Alexander, 1996).

La principal funció coneguda del CD45 en la cascada de senyalització via TCR és la defosforilació de la tirosina de l'extrem C-terminal de Lck que regula negativament la funció d'aquesta quinasa (Thomas, 1995), encara que també pot defosforilar la tirosina d'activació del Lck (Tyr 394) (D'Oro and Ashwell, 1999; Katagiri et al., 1999). Utilitzant cèl·lules CD4⁺ de sang perifèrica d'adult s'ha observat que l'entrecruament de CD45 amb anticossos pot induir la mort del limfòcits independent de la isoforma que presenten (CD45RA o CD45RO) (Klaus et al., 1996). Així com la utilització d'anticossos anti-CD45 ha resultat ser efectiva en el tractament de prevenció del rebuig en trasplantaments renals de diferents models murins (Lazarovits et al., 1996).

S'han descrit diferències en l'associació dels components del complex TCR/CD3 entre les cèl·lules memòria i les *naive* (Farber et al., 1997). Així en les cèl·lules *naive* l'organització entre CD45, TCR i CD4 és menys estable que en les cèl·lules memòria (Dianzani et al., 1990).

El CD2 és una glicoproteïna de la superfamília de les Igs present en el 90% del les cèl·lules T madures i en un 50% i un 70% dels timòcits i les cèl·lules NK respectivament. Presenta un domini extracel·lular d'Ig, una regió transmembrana i una llarga cua citoplasmàtica. El principal lligand de CD2 en els humans és LFA-3 (CD58). A més de la seva funció d'adhesió, el CD2 és també una molècula de transducció de senyals que media la coestimulació de les cèl·lules T *in vitro*. La seva funció *in vivo* és difícil de determinar.

Altres molècules que interaccionen amb els seus lligands i que incrementen l'avidesa de la interacció TCR-APC són: LFA-1 (CD11a i CD18) amb ICAM-1 (CD54) o ICAM-2 (CD102), CD2 amb LFA-3 (CD58) o CD59 (Dustin and Springer, 1991; Shaw and Dustin, 1997).

1.2.2.2. SUPERFAMÍLIA CD28/B7

La via de coestimulació de les cèl·lules T més ben estudiada és la de la família B7-1/B7-2 - CD28/CTLA-4 que és crucial per l'activació d'aquestes cèl·lules i per tant per la inducció de tolerància. En la figura 1.2. es mostren els principals membres d'aquesta família descrits fins ara.

Dins d'aquesta família es troben tant molècules implicades en una regulació positiva (CD28 i ICOS) de la resposta via TCR, com elements que actuarien regulant negativament (CTLA-4 i PD-1) aquesta resposta.

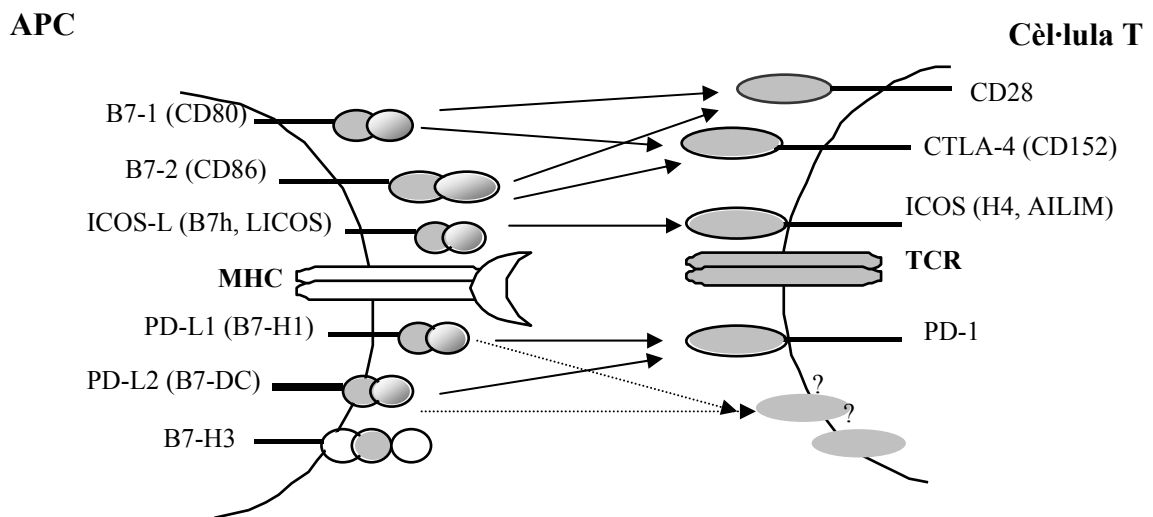


Figura 1.2. Membres de la superfamília de B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4, receptors presents en la cèl·lula T i els seus lligands presents en les cèl·lules APCs. (Figura basada de la revisió *The B7-CD28 superfamily*. (Sharpe and Freeman, 2002)).

El CD28 s'expressa constitutivament en més del 90% dels limfòcits CD4⁺. És un homodímer de dues cadenes amb dominis Ig. És considerat un receptor amb una funció estimuladora (Aruffo and Seed, 1987; Gross et al., 1990) i els seus lligands són el B7-1 (CD80) (Freedman et al., 1987) i B7-2 (CD86) (Freeman et al., 1993). El CD28 és la principal molècula coestimuladora per les cèl·lules T *naive* sent les CD4⁺ més dependents d'aquest senyal que les CD8⁺ (Whitmire and Ahmed, 2000).

INTRODUCCIÓ

En moltes APCs, el B7-2 s'expressa constitutivament a baixos nivells i es regula a l'alça ràpidament, mentre que l'expressió del B7-1 s'indueix més tard després de l'activació. B7-1 i B7-2 representen una senyal de coestimulació per augmentar i sostenir la resposta de les cèl·lules T mitjançant la seva interacció amb CD28 (Lenschow et al., 1996), promovent la supervivència de la les cèl·lules T i permetent que les citokines iniciïn l'expansió i diferenciació (Sharpe and Freeman, 2002). A més, el CD28 regula el llindar d'activació i disminueix significativament el nombre d'unions necessàries per una efectiva activació de la cèl·lula T (Viola and Lanzavecchia, 1996). Recentment s'ha vist que el CD28 presenta un lloc d'unió PYAP ric en prolines, (*consensus SH3-Kinase binding site*) que és crucial per la proliferació i la síntesi d'IL2 (Holdorf et al., 2000).

La coestimulació també fa que es fosforili la cua citoplasmàtica del CD28 i permeti la seva associació a diferents molècules com PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), Grb-2 i Itk (August et al., 1994; Schneider et al., 1995; Okkenhaug and Rottapel, 1998) i pot promoure l'apropament del citoesquelet i el rafts cap a la sinapsi immunològica (Viola and Lanzavecchia, 1996; Wulfig and Davis, 1998). Altres vies de senyalització, Cbl i PP2A, s'oposarien a la via de coestimulació del CD28. En la figura 1.3 es detallen les diferents vies que s'activen en la coestimulació per CD28.

La unió del CD28 amb el seu lligand incrementa la resposta de la cèl·lula T, així com l'activació de JNK necessària per la generació d'AP-1 (Su et al., 1994). A més a més el CD28 permet l'expressió transitòria de molècules antiapoptòtiques com Bcl-x_L (Boise et al., 1995b). Altres mecanismes que relacionen a CD28 amb la supervivència dels limfòcits T es detallen en l'apartat 1.3 de la introducció.

INTRODUCCIÓ

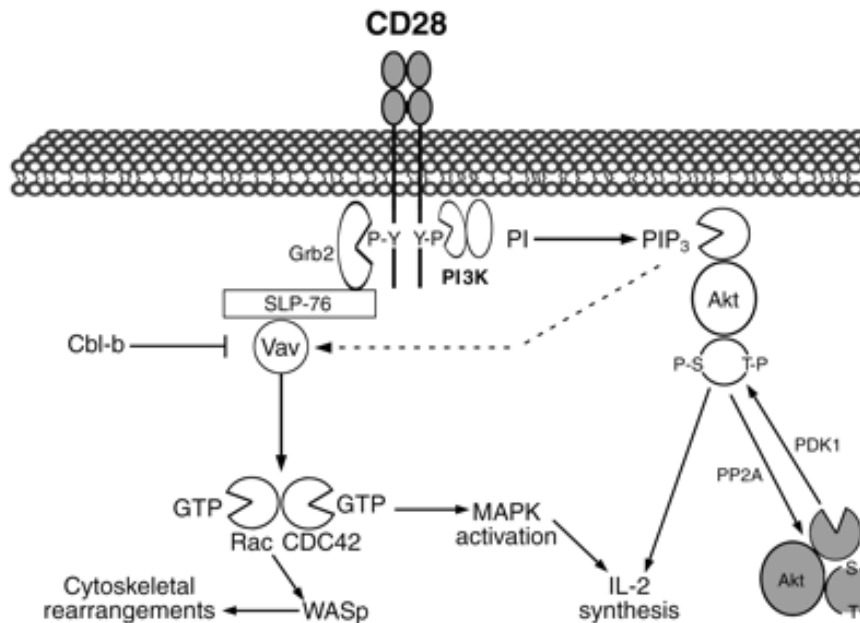


Figura 1.3. Vies implicades en la senyalització de CD28. L'activació del CD28 comporta la fosforilació en tirosina de la seva cua citoplasmàtica permetent la interacció amb Grb-2 i PI3K. El Grb-2 mitjançant SLP-76 activa la via de Vav, donant lloc a la reorganització del citoesquelet. El senyal de coestimulació via CD28 ve regulat negativament per Cbl-b que regula a Vav i per PP2A que regula a AKT. (Frauwirth and Thompson, 2002).

La molècula ICOS (*inducible T cell costimulator*) també es coneix amb el nom de H4 i AILIM, i fou primer descrit en cèl·lules T humanes activades (Hutloff et al., 1999). No s'expressa constitutivament en les cèl·lules T *naive* però és ràpidament induïble després de la unió del TCR. L'expressió d'ICOS està influenciada tant per la unió del TCR com per CD28. Interacciona amb el seu lligand (ICOS lligand o B7h, GL50, B7RP, LICOS i B7-H2) que s'expressa a nivells baixos en les cèl·lules B en repòs, en alguns macròfags i cèl·lules dendrítiques, així com en una sub població de cèl·lules T CD3⁺ (Ling et al., 2000). La coestimulació d'ICOS produeix baixos nivells d'IL2 que són necessaris per iniciar la proliferació però no suficients per mantenir la resposta proliferativa (Riley et al., 2001). ICOS pot incrementar l'expressió de CD40L encara que aquesta no és exclusivament dependent d'ICOS (McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). S'ha descrit que ICOS presenta un domini YMFM que s'uneix a la subunitat p85 de la PI3K. La coestimulació d'aquesta molècula també estimula la producció de certes citocines com IL4, IL5, IL10, TNF α i IFN γ .

1.2.3. CASCADA DE SENYALITZACIÓ VIA TCR/CD3

Les conseqüències bioquímiques intracel·lulars del reconeixement del TCR-pep-MHC depèn de vies de senyalització transduccionals que donen lloc a una resposta cel·lular per finalment iniciar la transcripció d'una sèrie de gens implicats en la resposta del limfòcit T.

Aquests processos es poden dividir en funció del moment post-activació en que es desencadenen.

- 1) Processos de membrana que es produeixen pocs segons després del reconeixement de l'antigen.
- 2) Vies de transducció de senyal citoplasmàtiques que són activades en minuts.
- 3) Transcripció de nou de gens que són detectats en hores.

Quan la cèl·lula T troba a una APC presentant un antigen específic pel seu TCR, para la seva migració i pateix una sèrie de canvis morfològics i de mobilitat que portaran a l'inici d'una cascada d'esdeveniments per concloure en l'activació dels mecanismes pels que les cèl·lules CD4⁺ realitzen les seves funcions efectores.

Una productiva activació del TCR requereix una senyal sostinguda entre el TCR i receptors d'adhesió (LFA-1) o bé amb molècules coestimuladores (CD28). El contacte entre la cèl·lula T específica per l'antigen i la cèl·lula presentadora indueix la formació d'una estructura ben ordenada que s'anomena SMAC (*supramolecular activation cluster*) (Monks et al., 1998) o sinapsi immunològica (Grakoui et al., 1999) en el lloc de contacte. Aquest procés implica la formació d'un complex constituït pel TCR, molècules coestimuladores i proteïnes intracel·lulars de senyalització, la reorganització del citoesquelet d'actina i l'agrupament dels rafts de membrana (Bi and Altman, 2001).

El citoesquelet d'actina regula la forma així com el moviment de les cèl·lules T i és essencial per a la formació de la sinapsi immunològica (Dustin and Cooper, 2000) actuant com una plataforma pel reclutament de molècules implicades en la senyalització (Penninger and Crabtree, 1999; Dustin and Cooper, 2000). L'activació de les cèl·lules T promou la polimerització de l'actina (DeBell et al., 1992; Donnadieu et al., 1992), reorientant el citoesquelet de la cèl·lula T cap al lloc de contacte amb les cèl·lules presentadores on es localitzarien els rafts (Wulfiging and Davis, 1998). S'ha considerat que existeixen dues poblacions de TCR que s'expressen en les cèl·lules T no activades: un 60-70 % són TCR solubles en detergents i un 30-40% dels TCR es troben units al citoesquelet per la cadena ζ (Caplan and Baniyash, 1996), anomenats CSKA- ζ

INTRODUCCIÓ

(*cytoskeleton-associated* ζ) (Caplan et al., 1995; Rozdzial et al., 1995). CSKA- ζ podria tenir un paper en les vies de senyalització del TCR primerenques i en el manteniment de la sinapsi immunològica.

El típic model de la bicapa lipídica descrit per la membrana cel·lular s'ha anat modificant en els últims anys fins concloure que la membrana cel·lular no és homogènia (Brown and London, 1997; Simons and Ikonen, 1997; London et al., 2000). L'agregació de glicoesfingolípid i colesterol dóna lloc a la formació de microdominis en la membrana cel·lular que es coneixen amb el nom de GEMs (*glycolipid enriched microdomains*), DIGs (*detergent insoluble glycolipid-enriched membranes*), DRMs (*detergent-resistant membranes*) o rafts.

La distribució dels rafts en la superfície cel·lular depèn del tipus de cèl·lula, així en els limfòcits estan distribuïts sense cap polaritat. Molts estudis indiquen que els rafts estan enriquits en molècules implicades en la senyalització per facilitar una eficient transducció de senyal via el TCR i actuant com plataformes per la concentració i juxtaposició de les molècules implicades en la senyal del TCR i en l'organització del complex de senyalització. L'activació de les cèl·lules T indueix una ràpida compartimentalització de la maquinària de senyalització dins dels rafts i les molècules coestimuladores participarien en aquest procés.

Encara que la localització del TCR en els rafts abans i després de l'activació és controvertida, s'ha demostrat que en estat de repòs la cadena ζ del TCR es localitza parcialment en els rafts (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998) i després de l'activació ja s'inclourien totes les cadenes ζ hiperfosforilades (Kosugi et al., 1999). En estat de repòs es trobarien en els rafts: el substracte lipídic de la PLC γ 1 i les proteïnes amb un anclatge de GPI (glicosilfosfatidilinositol), Ras, altres proteïnes G i membres de la família de les proteïn tirosin quinases Src (von Haller et al., 2001), així com certes proteïnes que han estat palmitolades post-traduccionament com el LAT, CD44, CD4 i CD8 β (Miceli et al., 2001). També s'han localitzat proteïnes que no pateixen modificacions com el CD2, CD5, CD9, algunes Tec com la Itk (Bunnell et al., 2000) i molècules implicades en la regulació negativa de la resposta dels limfòcits T com CBP/PAG. En la figura 1.4 es pot observar alguns dels esdeveniments que es desencadenen a nivell dels rafts després de l'activació del limfòcit T via TCR.

INTRODUCCIÓ

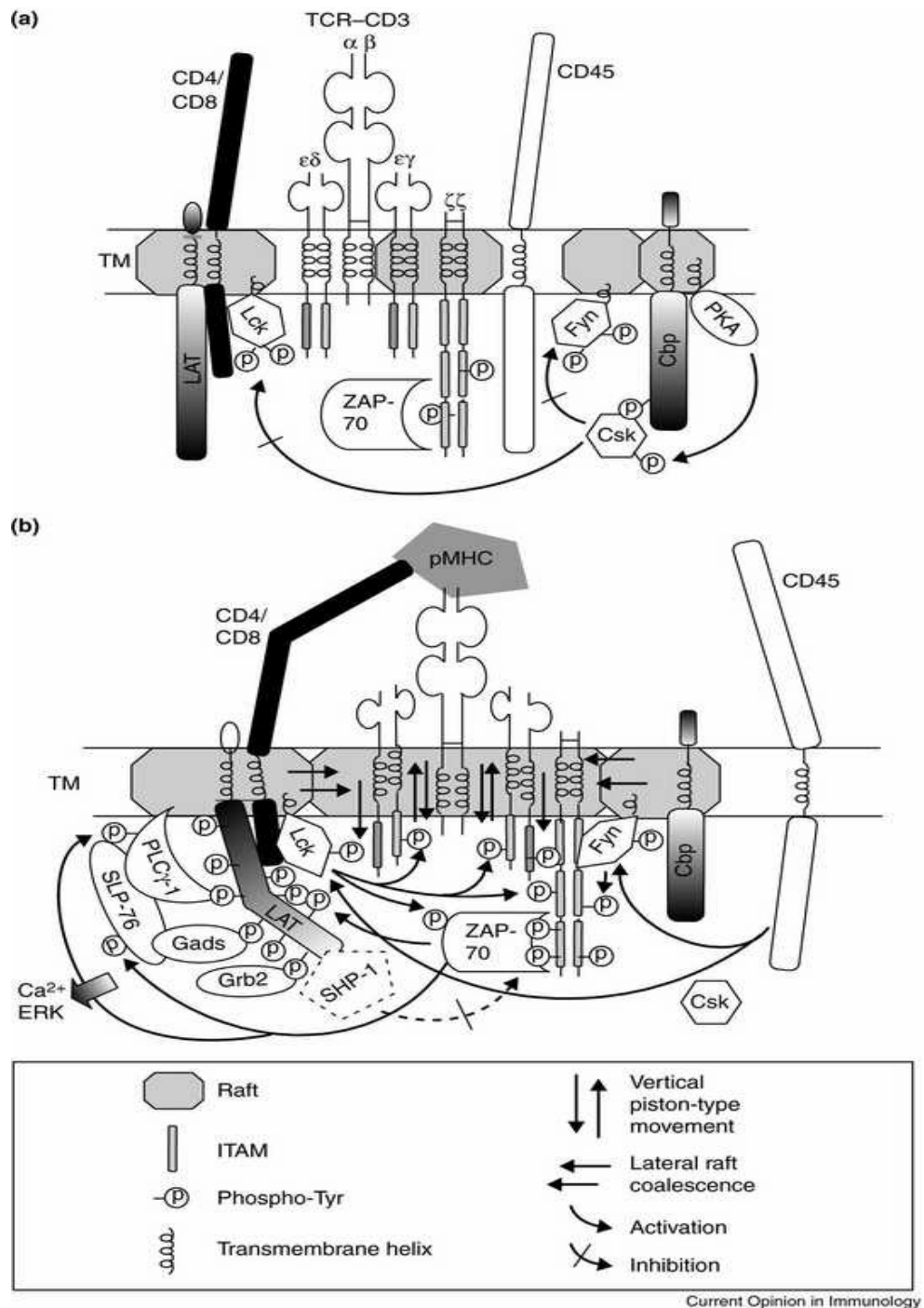


Figura 1.4. Esdeveniments a nivell de membrana cel·lular que es donen abans i després de la unió del lligand al TCR. A). En les cèl·lules en repòs diferents components com el CD4 o CD8, LAT, Lck i Csk i una part del complex TCR/CD3 es localitzen en els rafts. B). La unió del pep-MHC al TCR comporta una sèrie d'esdeveniments, produint-se una sèrie de moviments que permetran que certs components com Lck i LAT s'apropin al TCR. La mobilització del CD45 i l'alliberació de Csk permetran l'activació de Lck i posterior fosforilació del CD3. La modulació a la baixa de la resposta és controlada en part per l'activació i relocalització de SHP-1 i Csk dins del la sinapsi immunològica. (Werlen and Palmer, 2002).

INTRODUCCIÓ

Molècules com PKC θ , Vav, PLC γ 1 i Shc es troben als rafts després de l'activació amb anti-CD3+anti-CD28 (Plyte et al., 2000; Bi et al., 2001). En canvi hi ha altres molècules que estarien excloses dels rafts, com el CD45 i CD43 (Simons and Ikonen, 1997; Weintraub et al., 2000), encara que certs autors han demostrat que una petita quantitat de CD45 es trobaria associat als rafts en les cèl·lules T (Montixi et al., 1998; Ilangumaran et al., 1999). Fins el moment no es coneix si la reorganització del citoesquelet d'actina és necessària per un bon agrupament dels rafts (Sheets et al., 1999; Holdorf et al., 2000) o si l'agrupament dels rafts juga un paper important en la reorganització del citoesquelet d'actina (Simons and Toomre, 2000). La idea més extesa sobre la relació entre els rafts i la sinapsi és que els rafts podrien formar part de la zona central dels SMACs.

1.2.3.1. MODULACIÓ A LA BAIXA DEL TCR

En absència de lligands el nombre de complexos TCR/CD3 presents en la superfície cel·lular es manté en equilibri entre la síntesi i secreció de nous polipèptids, la seva internalització, reciclatge i degradació (Kraugel, 1987). Cèl·lules T activades per antigen o anticossos anti-TCR/CD3 incrementen la internalització, produint una modulació negativa dels nivells superficials de TCR/CD3.

Després de la internalització del complexe TCR/CD3, el CD3 és reciclat cap a la superfície cel·lular, en canvi, l'heterodímer del TCR és degradat i reemplaçat per la síntesi de noves cadenes (Jose and Alarcon, 1999). Aquesta regulació a la baixa podria contribuir a la transducció de senyals afavorint l'encontre de molècules intracel·lulars al mateix temps que podria participar en la finalització de la resposta immunològica reduint el nombre de receptors presents en la superfície cel·lular (Cai et al., 1997).

Hi ha certs treballs que demostren una correlació entre la modulació a la baixa del TCR amb la resposta de la cèl·lula T mentre que d'altres demostren que no existeix una relació directe (Hemmer et al., 1998; Itoh et al., 1999). Recentment, s'ha demostrat que la lligació del TCR amb el seu lligand indueix la modulació a la baixa també dels TCRs que no s'han unit a lligand, implicant que el número de TCRs que es modulen a la baixa no ha de correspondre al número de TCRs que s'han unit al lligand (San Jose et al., 2000).

1.2.3.2. PROCESSOS INTRACEL·LULARS DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS

El reconeixement de l'antigen promou l'agrupament del complex de TCR, el CD4 i el CD8 cap als punts de contacte amb les cèl·lules APCs. Això induïx la fosforilació en tirosina de proteïnes associades al TCR i proteïnes adaptadores, que recluten i activen diferents molècules, permetent l'activació d'una sèrie de cascades de senyalització. Els enzims activats per cada una d'aquestes cascades, induiran l'activació de factors de transcripció que estimularan finalment l'expressió de diferents gens. Els gens que es transcriuen després de l'activació del TCR estan relacionats amb la resposta de les cèl·lules T i alguns d'ells són: *c-fos*, *cd40l*, *il2*, *il2r*, i *vla-4*, 5,6.

I Molècules implicades

a) PTKS (*protein tyrosine kinases*)

La fosforilació induïble en tirosines és un fenomen menys comú que la fosforilació en treonina o serina i generalment es reserva per punts crítics de regulació. Per tant, no és sorprenent que les quinases que regulen la fosforilació en tirosina siguin components essencials en moltes cascades intracel·lulars tant dels limfòcits T com d'altres tipus cel·lulars. Les PTKs medien la transferència del fosfat terminal de l'ATP al grup hidroxil del residu tirosina del substracte. Una PTK fosforila un número limitat de substractes, depenent de la seqüència d'aminoàcids que envolten la tirosina i de l'estructura terciària del substracte.

Dins de les PTKs trobem tres famílies que són importants per la cascada de senyalització iniciada pel reconeixement del TCR.

Família Src que inclou: Src, Yes, Fgr, Lck, Fyn, Lyn, Hck i Blk. Presenten un domini Src homòleg (SH1) (domini quinasa) i dos dominis interns anomenats SH2 (*Src homology-2*) i SH3 (*Src homology-3*) que els permeten d'interaccionar no covalentment amb altres proteïnes. El domini SH2, està constituït per uns 100 aa i s'uneix a tirosines fosforilades d'altres proteïnes. El domini SH3 està format per uns 60 aa i es creu que s'uneix a residus de prolina. L'extrem carboxi terminal, que sol ser on es troba el domini tirosin quinasa, conté el lloc d'unió al substracte i per l'ATP i un lloc d'autofosforilació en tirosina necessari per l'activitat quinasa. També presenta en l'extrem C-terminal, un segon residu de tirosina que serveix com a regulador de

INTRODUCCIÓ

l'activitat quinasa. En el cas del Lck, la fosforilació de la Tyr 505 comporta la seva inactivació mentre que la fosforilació de la Tyr 394, la seva activació. Les PTKs que fosforilen el residu d'inhibició són una altra família de PTKs i la més estudiada és Csk-1 (*c-Src kinase-1*). Algunes Src PTK, inclòs Lck, estan palmitolades en una o dos cisteïnes, modificacions regulades que permeten la seva localització en la membrana (Shenoy-Scaria et al., 1993; Yurchak and Sefton, 1995).

Família Syk/Zap-70. Syk s'expressa principalment en les cèl·lules B encara que es pot trobar en petites quantitats en les cèl·lules T i ZAP-70 (*ζ-chain-associated protein*) s'expressa només en limfòcits T i cèl·lules NK (*natural killer*) (Chan et al., 1992). Dins de les cèl·lules T, ZAP-70 s'expressa durant l'ontogènia tímica i es regula a la baixa en cèl·lules T madures, excepte en les cèl·lules T $\gamma\delta$. Presenta dos dominis SH2 que permetran que ZAP-70 s'uneixi a un parell de fosfotirosines presents en el motius ITAMs i sigui activat per Lck.

Família Tec (*tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*). Tec s'expressa en totes les cèl·lules hematopoiètiques, mentre altres membres de la família com Itk i Rlk estan restringits als limfòcits T, NK i mastòcits. L'activació de la cèl·lula T comporta que es doni un increment de PIP₃ en la membrana, fent que es reclutin Itk i Tec gràcies al domini PH (*pleckstrin homology domain*) que presenten. Després d'aquest reclutament es forma un complex format per membres de la família Tec, PLC γ 1, SLP-76, Gads i Grb-2. Aleshores Tec és transfosforilada per Src i seguidament s'autofosforila per completar la seva activació i permetre l'activació de PLC γ 1 (Veri et al., 2001). Itk intervé en la via de senyalització implicada en la mobilització de Ca²⁺ i l'activació d'ERK (*extracellular related kinase*) i JNK (*c-jun amini-terminal kinase*) (Lewis et al., 2001; Tomlinson et al., 2001). Rlk pot translocar-se al nucli després de l'activació del TCR (Debnath et al., 1999) i unir-se a regions del promotor de l'IFN- γ incrementant la seva activitat (Takeba et al., 2002).

b) PTPs (protein tyrosine phosphatases) i SHIP

Les PTP actuen retirant el fòsfat de les tirosines. Algunes PTPs es troben en la membrana cel·lular com el CD45, altres són proteïnes de citoplasma com SHP-1 i SHP-2 (*Src homology phosphatase-1 i 2*).

INTRODUCCIÓ

SHP-1. És una proteïna citosòlica amb activitat fosfatasa expressada principalment en les cèl·lules hematopoètiques (Matthews et al., 1992). En el seu extrem N-terminal presenta 2 dominis SH2, un domini fosfatasa i en l'extrem C-terminal presenta 2 residus de tirosines. S'ha observat que SHP-1 s'associa al TCR tant en les cèl·lules en repòs com activades, defosforilant la cadena ϵ després de la unió del TCR al seu lligand, encara que roman sense saber-se si aquesta defosforilació té algun significat fisiològic (Pani et al., 1996).

SHP-2, s'ha vist que pot interaccionar amb el CTLA-4 (Marengere et al., 1996).

SHIP (*SH2-domain containing inositol 5-phosphatase*) pot actuar com enzim o com molècula adaptadora. Després de l'activació s'indueix la seva fosforilació per eliminar grups fosfats de la posició 5' de PtdIns (3,4,5)P₃ (fosfatidilinositols) generant PtdIns (3,4)P₂, lípids involucrats en la cascada via PI3K (Rohrschneider et al., 2000). També el domini SH2 aïllat de SHIP pot unir-se als residus fosforilats presents en els ITAMs de les cadenes del CD3 (γ , δ i ϵ) i de la cadena ζ .

Existeix una altra fosfatasa involucrada en la degradació dels fosfatidilinositols generats per la PI3K que és la 3' fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) i que converteix PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns (4,5)P₂ (Cantley and Neel, 1999).

c) Molècules adaptadores

Les molècules adaptadores són proteïnes que medien la unió proteïna-proteïna i proteïna-lípid, degut a que presenten certs dominis que els hi permeten realitzar aquesta funció. Poden induir canvis conformacionals en les molècules a les que s'uneixen i per tant poden modificar l'activitat enzimàtica intrínseca d'aquestes molècules.

El LAT (*linker for activation of T cells*) és una proteïna de membrana de 36-38 kDa (Finco et al., 1998; Zhang et al., 1998b) amb un petit domini extracel·lular, un domini transmembrana i una llarga cua citoplasmàtica que conté 9 residus de tirosines. Presenta també dos residus de cisteïnes palmitolades post-traduccionalsment que són essencials per la seva localització constitutiva en els rafts i per la seva activació via fosforilació (Zhang et al., 1998a). LAT es troba associat al CD4 que sembla important per la seva fosforilació per ZAP-70 després de la unió del TCR (Bosselut et al., 1999). Les proteïnes que interactuen amb el LAT poden ser adaptadores o enzims.

INTRODUCCIÓ

La família del Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) inclou, Grb-2, Grap i Gads, molècules citoplasmàtiques constituïdes per un domini SH2 envoltat per dos dominis SH3. La unió al LAT fosforilat les porta a traslocar-se a la membrana cel·lular. Cbl, Shc i Sos s'uneixen a Grb-2 pel seu domini SH3 (Nel et al., 1995; Ravichandran et al., 1995). Sos, diamina i Sam68 es poden associar a Grap. Gads (MONA o Grf40) es troba exclusivament expressat en les cèl·lules hematopoietiques (Myung et al., 2000), s'uneix pel seu domini SH2 a LAT fosforilat (Liu et al., 1999) i específicament també interactua amb SLP-76 i amb la serin-treonin quinasa HPK (Liu et al., 2000b). Recentment s'ha postulat que Gads presentaria un lloc de trencament per caspases (Berry et al., 2001; Yankee et al., 2001).

SLP-76 (*SH2-containing leucocyte-specific phosphoprotein*) s'expressa exclusivament en les cèl·lules T. No presenta activitat enzimàtica i conté tres dominis d'unió (Jackman et al., 1995). A l'extrem N-terminal presenta múltiples tirosines que poden ser fosforilades després de la unió del TCR al lligand, un domini central ric en prolines i un domini SH2 a l'extrem C-terminal. En cèl·lules Jurkat que no expressen SLP-76 es dona una disminució de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular i no s'activa ERK (Yablonski et al., 1998). SLP-76 pot unir-se a LAT via la seva associació constitutiva a Gads (Liu et al., 1999). ZAP-70 actiu fosforila a SLP-76 en els seus residus de tirosina que serviran de lloc d'unió de diferents proteïnes que continguin dominis SH2, com Vav, Nck i Itk (Bubeck Wardenburg et al., 1998; Su et al., 1999). Vav i Nck participen en vies que porten a la transcripció de diferents gens i el reordenament del citoesquelet. La interacció de SLP-76 amb Itk permet que Itk s'apropi a PLC γ 1, permetent una òptima fosforilació i activació de PLC γ 1 (Liu et al., 1998). Amb la regió rica en prolines, SLP-76 interactua amb el domini SH3 de la PLC γ 1 (Yablonski et al., 2001) i amb el domini SH2 interactua amb SLAP-130 (*SLP-76-associated phosphoprotein*) (Musci et al., 1997). A través de Nck, WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*) s'uneix a SLP-76 (Rivero-Lezcano et al., 1995). D'aquesta manera SLP-76 uneix la maquinària molecular central involucrada en la polimerització de l'actina. En la figura 1.5 s'indica esquemàticament les principals vies activades per les molècules adaptadores LAT i SLP-76.

INTRODUCCIÓ

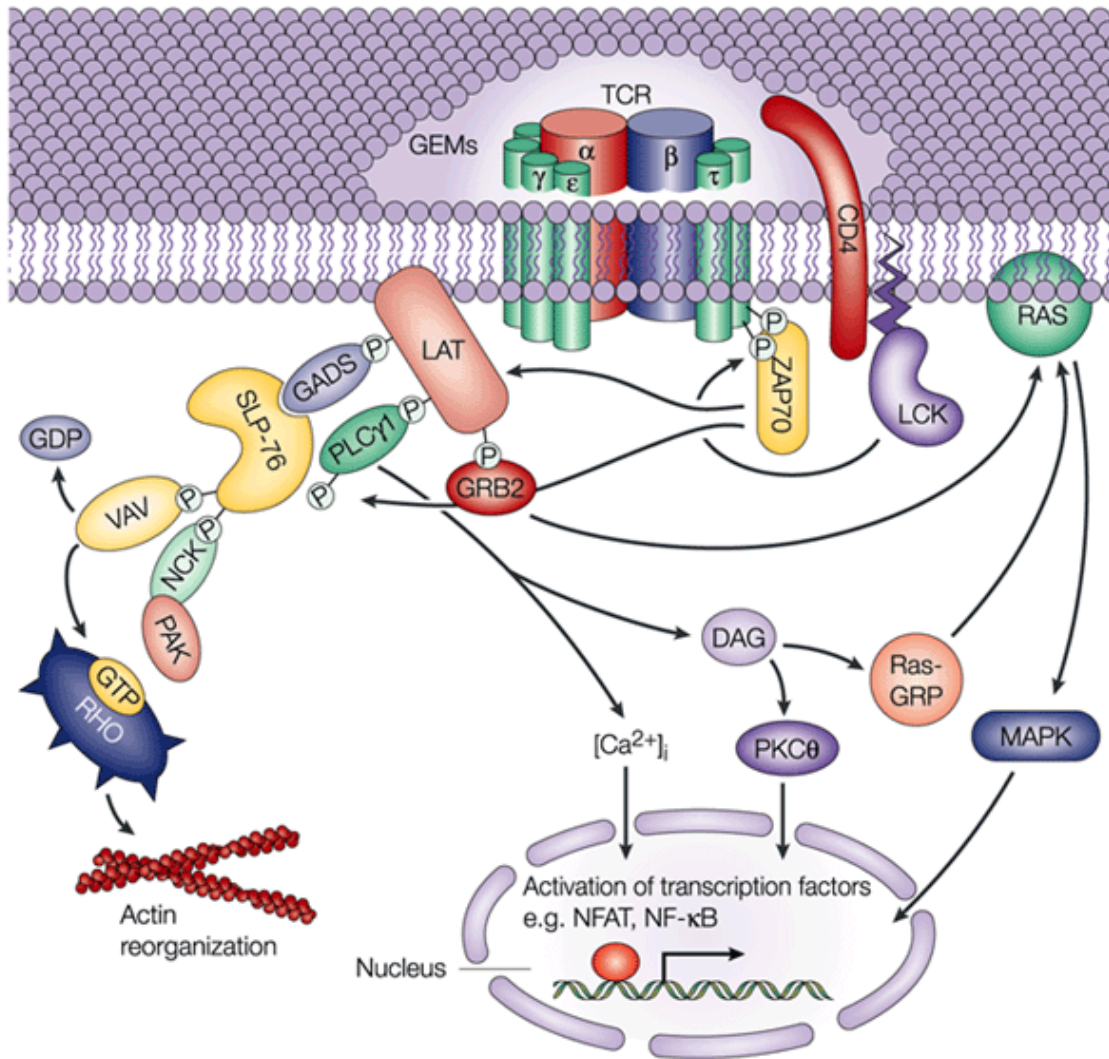


Figura 1.5. Model en el que es representa les funcions del LAT i SLP-76 com a molècules adaptadores dins de la cascada de senyalització via TCR. Després de la unió del lligand al TCR, es produeix l'activació de la família Src (tiosin-quinases), produint la fosforilació del CD3 i l'activació posterior del ZAP-70. El ZAP-70 un cop activat, fosforila a LAT i SLP-76. L'activació de LAT comporta el reclutament d'una sèrie de molècules com Grb2, Gads i PLCγ1 cap als rafts. Degut a la seva associació constitutiva a Gads, SLP-76 és reclutat per LAT, comportant l'activació completa de la PLCγ1, desencadenant la hidròlisi de PIP₂ i generant IP₃ i DAG. Com a conseqüència final es produirà una reorganització dels citoesquelet d'actina i una activació de diferents factors de transcripció, que desencadenaran la resposta cel·lular a l'activació. (Koretzky and Myung, 2001).

Dins del grup d'enzims que poden interactuar amb LAT després de l'activació cal destacar a Itk, PI3K i PLCγ1 que a través dels seus dominis SH2 en l'extrem N-terminal interaccionen amb LAT (Gilliland et al., 1992; Weber et al., 1992).

II Reclutament i activació de quinases i proteïnes adaptadores

Els primers processos que es donen després de l'agregació del TCR i coreceptors és l'activació de PTKs, Lck i Fyn (Straus and Weiss, 1992). Lck pot ser activada per la defosforilació d'una tirosina (Y505) pel CD45 i per l'autofosforilació d'una altra tirosina (Y394). Un cop actiu, Lck fosforila les tirosines presents en els ITAMs (Reth, 1989). Fyn realitza una funció similar a Lck, fosforilant els motius ITAMs.

ZAP-70 s'uneix als ITAMs fosforilats (Wange et al., 1993) i allà és fosforilat en tirosina per Lck (van Oers et al., 1996). Així adquirirà activitat tirosin quinasa per fosforilar altres substractes com LAT i SLP-76 i a ell mateix. Existeix un llindar crític d'activitat del ZAP-70 necessari perquè es pugui seguir en la via de senyalització.

Durant molts anys s'havia pensat que el principal esdeveniment per l'activació del limfòcit T era la fosforilació en tirosina de les molècules de CD3 principalment de la cadena ζ del CD3 per Lck (Weiss, 1999). Una publicació recent proposa que hi ha una altra via per la qual la unió al TCR porta a l'activació dels limfòcits T. Així després de la unió del lligand al TCR es produeix un canvi conformacional que exposa una regió rica en prolines de la cua ϵ del CD3 per permetre la unió de Nck (Gil et al., 2002). Aquesta via Nck seria independent de l'activació de les tirosin quinases.

III Processos citoplasmàtics

LAT s'uneix a d'altres proteïnes com Grb2 pel seu domini SH2 i és fosforilat en tirosina per ZAP-70 reclutant Sos (factor de canvi Ras GTP/GDP) cap a la membrana. Allà, Sos catalitza el canvi de GDP a GTP de Ras, família de proteïnes de 21 kDa. La seva activitat intrínseca és regulada per interaccions amb proteïnes d'intercanvi de nucleòtids de guanina com Sos i per GAPs (*GTPase-activating proteins*) (Izquierdo et al., 1992; Polakis and McCormick, 1993). Ras interacciona directament amb la serin treonin quinasa Raf-1, que és activada després de l'estimulació del TCR i pot regular l'activació de MEK, una serin tirosin treonin quinasa, per activar les MAPKs.

La cascada de MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) comporta al menys l'activació seqüencial de tres serin/treonin quinases (Robinson and Cobb, 1997) cada una de les quals fosforila i per tant activa al següent enzim de la cascada. Finalment s'activa un enzim, ERK (*extracellular receptor-activated kinase*) que fosforila a Elk.

INTRODUCCIÓ

Elk fosforilat estimula a Fos, component del factor de transcripció AP-1 (*activation protein-1*).

Paral·lelament a aquesta via, SLP-76 pot reclutar a Vav que actua sobre Rac, capaç d'unir nucleòtids. Rac-GTP inicia una cascada paral·lela a les MAPKs, resultant en l'activació de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) o SAP (*stress-activated protein*) que un cop activat pot fosforilar a c-Jun, el segon component del factor transcripció AP-1.

La PLC γ 1 és un enzim citosòlic que també és reclutat per adaptadors com LAT cap a la membrana on serà fosforilat per ZAP-70. Un cop PLC γ 1 és activada, catalitza la hidròlisi d'un fosfolípid de membrana PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfat) generant el IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfat) i DAG (diacilglicerol) (Rhee and Bae, 1997).

L'IP₃ difon a través del citoplasma cap el reticle endoplasmàtic on s'uneix al seu receptor i estimula l'alliberament de Ca²⁺ produint un augment de la seva concentració citoplasmàtica. A més, es produeix una obertura de canals de Ca²⁺ presents en la membrana citoplasmàtica per permetre l'entrada de Ca²⁺ extracel·lular i així mantenir el nivells citoplasmàtics elevats durant gairebé una hora. El Ca²⁺ citosòlic actua com una molècula de senyal unint-se a la calmodulina (*ubiquitous Ca²⁺-dependent regulatory protein*). El complexe Ca²⁺-calmodulina activa una sèrie d'enzims, incloent una proteïna serin/treonin fosfatasa anomenada calcineurina (inhibida per la Ciclosporina A) que es essencial per l'activació de factors de transcripció. Un altre enzim que respon a concentracions elevades de Ca²⁺ és CAM-Kinase (*multifuncional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase*) que pot tenir un efecte regulador negatiu sobre l'expressió del gen de la IL2 (Nghiem et al., 1994).

El DAG és molt hidrofòbic i es manté en la membrana citoplasmàtica. L'elevada concentració de Ca²⁺ intracel·lular provoca una translocació de la PKC del citosol a la membrana cel·lular on DAG l'activarà, produint un canvi conformacional per permetre que el centre actiu sigui accessible pel substracte. La PKC és un enzim que catalitza la fosforilació de residus de serina/treonina.

S'ha demostrat que el Ca²⁺ i DAG regulen un nou activador de Ras. Així PLC γ 1 pot controlar les vies de PI3K i MAPK (Dower et al., 2000; Ebinu et al., 2000).

Paral·lelament s'activa una altra via que implica substractes lipídics. PI3K és un enzim que fosforila la posició 3' de l'anell inositol que forma part dels lípids fosfatidilinositol (Hawkins et al., 1992). La forma bioquímica d'aquest enzim

INTRODUCCIÓ

relacionada amb els limfòcits és la de tipus 1. Està composta per dues subunitats, una subunitat reguladora p85, que serveix com adaptador i una subunitat catalítica, p110 (Toker and Cantley, 1997). Adaptadors com LAT i TRIM recluten la PI3K cap a la membrana plasmàtica després de l'activació del TCR (Bruyns et al., 1998; Zhang et al., 1998a) on fosforilarà el seu principal substracte PtdIns (4,5)P₂, generant PtdIns (3,4,5)P₃, que actuarà com a segon missatger per l'endocitosi del receptor, reorganització del citoesquelet, proliferació cel·lular i apoptosi (Toker and Cantley, 1997). S'ha demostrat que pot interactuar amb les TecK, GTPases, serin treonin quinases com PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), aquesta darrera relacionada amb el control de la proteïna amb activitat B (PKB) i PKC (*protein kinase C*).

Existeixen diferències entre les cèl·lules memòria i les *naive* a nivell de senyalització via TCR. Així cèl·lules humanes adultes *naive* activades amb OKT3, presenten nivells superiors de fosforilació en Tyr comparat amb les cèl·lules memòria, malgrat presentar nivells proteics similars de ZAP-70, Lck i CD3ζ, així com nivells superiors de Ca²⁺ intracel·lulars i d'IP₃ (Hall et al., 1999).

IV Mecanismes reguladors de l'activació

En la cascada de transducció de senyals via TCR també existeixen una sèrie de mecanismes que controlen o regulen l'activació de la cèl·lula T, com són:

a) Protein fosfatases

Donat que la cascada de transducció implica processos de fosforilació en tirosina/treonina/serina, cal que les PTKs i serin/treoninK es mantinguin en equilibri amb PTPases i serin/treonin fosfatases. Així s'ha vist que SHP-1 després de l'activació del TCR seria alliberada i reclutada cap els ITIMs (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) presents en certs receptors, defosforilant a certs membres de la família Src i de la família de les SyK. La seva funció també s'ha relacionat amb l'associació a SLP-76 i interaccions amb Vav, Grb-2, Sos i PI3K (Cuevas et al., 1999). La interacció de SHP-1 amb un ampli ventall de substractes, li permet de modular vies com Ras/MAPK, Ca²⁺ i la reorganització del citoesquelet.

INTRODUCCIÓ

S'ha observat que SHIP inhibiria l'activació de PLC γ 1, inhibint el reclutament de Tec i per tant la producció de DAG, IP3 i la mobilització de Ca²⁺ intracel·lular associat. També SHIP defosforila lípids generats per PI3K.

b) CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4)

Alguns senyals a través de la superfamília del B7-CD28 contribueixen com a senyal negativa per regular a la baixa la resposta de la cèl·lula T (Greenwald et al., 2002a).

CTLA-4 (CD152) s'expressa ràpidament després de l'activació dels limfòcits T i la coestimulació amb anti-CD28 incrementa la seva expressió. La unió del lligand a CTLA-4 bloqueja la normal fosforilació de les cadenes ζ associades al TCR i el seu nivell de senyal està directament relacionat amb la quantitat de CTLA-4 acumulat en la sinapsi immunològica (Egen and Allison, 2002).

CTLA-4 pot inhibir la resposta de la cèl·lula T competint amb CD28 pel seu lligand B7 (Lee et al., 1998). Fins i tot, CTLA-4 presenta major afinitat per B7-1 i B7-2 que CD28. Tant CD28 com CTLA-4 es poden unir a PI3K i a una serin/treonin-fosfatasa, demostrant que CTLA-4 antagonitza directament amb CD28. CTLA-4 pot inhibir l'activació mitjançant la regulació del cicle cel·lular, així *in vivo* pot prevenir la degradació de p27^{kip1} i per tant bloqueja la progressió del cicle cel·lular (Greenwald et al., 2002a). S'ha observat que CTLA-4 pot interaccionar amb SHP-2, reclutant aquesta fosfatasa a la membrana cel·lular (Lenschow et al., 1996) i també pot inhibir la coestimulació via ICOS (Riley et al., 2001). Recentment s'ha valorat la possibilitat de que CTLA-4 pugui limitar fins i tot l'ensamblament dels rafts (Rudd et al., 2002).

c) PD-1 (programed death gene-1)

PD-1 s'expressa en cèl·lules activades CD4⁺ i CD8⁺, en cèl·lules B i en cèl·lules mieloïdes (Agata et al., 1996) i interacciona amb dos nous membres de la família B7 (PD-L1 i PD-L2) (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Les cèl·lules T humanes expressen PD-L1 després de l'estimulació del TCR o amb mitògens (Dong et al., 1999).

La colligació del TCR i PD-1 resulta en una ràpida fosforilació en tirosina i activació de SHP-2, donant lloc a la defosforilació de molècules implicades en la cascada de senyal del TCR (Latchman et al., 2001). La unió de PD-1 amb PD-L1 ó PD-

INTRODUCCIÓ

L2 o utilitzant proteïnes de fusió PD-L1-Ig o PD-L2-Ig produeix la inhibició tant de la proliferació cel·lular com de la producció de citocines en cèl·lules CD4⁺ i CD8⁺ prèviament activades (Freeman et al., 2000). En canvi, en concentracions elevades d'antigen, la unió de PD-L1 i PD-L2 només aconsegueix disminuir la producció de citocines.

Recentment s'ha publicat que la inhibició via PD-1 es donaria davant una resposta que comportés baixa producció d'IL2 (coestimulació via ICOS), en canvi, quan la coestimulació produeix elevats nivells d'IL2 (coestimulació via CD28), la via d'inhibició es veuria atenuada (Bennett et al., 2003).

Per una altra banda, alguns autors indiquen que PD-L1 i PD-L2 en determinades circumstàncies, poden tenir una funció coestimuladora en la proliferació de les cèl·lules T (Dong et al., 1999; Tamura et al., 2001; Tseng et al., 2001).

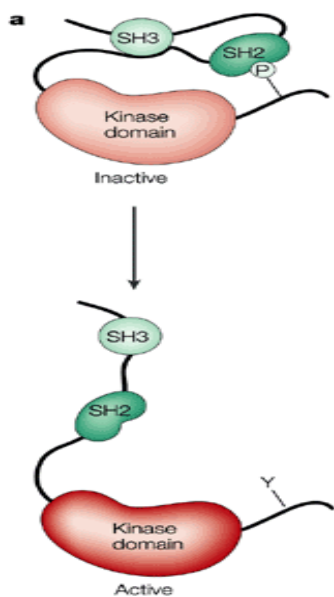
d) Tirosin quinases:Csk

Csk és una PTK que fosforila tirosines responsables de la inactivació de certes Src quinases, com en Lck on fosforila la tirosina Y505. La localització subcel·lular de Csk depèn d'un factor recentment descrit anomenat PAG (*phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains*) (Brdicka et al., 2000) o CBP (*CSK-binding protein*) (Kawabuchi et al., 2000). En cèl·lules T no estimulades PAG/CBP està fosforilat en tirosina i associat al domini SH2 de Csk fent que Csk es trobi en els rafts, mantenint a les Src quinases en els seu estat inactiu. Després de la unió del TCR al lligand, PAG/CBP es defosforila per una fosfatasa encara no coneguda, alliberant a Csk, i per tant alliberant a la família Src quinases de la fosforilació que media la seva inhibició.

e) Molècules adaptadores

Molècules adaptadores com el c-Cbl poden tenir un paper regulador negatiu en l'activació de les cèl·lules T. Presenta una regió N-terminal que consisteix en un domini TKB (*tyrosine kinase-binding*) de reconeixement de proteïnes fosforilades com ZAP-70 i un domini *RING-finger* que s'uneix a enzims conjugadors d'ubiquitina incrementant la seva activitat enzimàtica (Joazeiro et al., 1999; Yokouchi et al., 1999).

f) Altres mecanismes de regulació



Les Src poden presentar una interacció intramolecular entre el seu domini SH2 i la tirosina del seu domini C-terminal adoptant una conformació que limita l'accessibilitat dels substractes per fer que el seu domini quinasa resti inactiu com s'indica en la Figura 1.7. El seu domini SH3 col·labora en aquests procés (Young et al., 2001).

Figura 1.7. Inhibició al·lostèrica mitjançant els dominis adaptadors de les quinases de la família Src. (Koretzky and Myung, 2001).

Altres mecanismes que participen en la regulació de l'activació de les cèl·lules T estarien implicats en assegurar una producció transitòria de les citoquines. Un d'aquests mecanismes es dona a través de la regió 3' del seu mRNA, rica en AU que no es tradueix i que és present en moltes citoquines (Shaw and Kamen, 1986). Aquesta regió confereix inestabilitat al mRNA, assegurant que la producció sigui transitòria.

V Activació de factors de transcripció

Tres factors de transcripció són els principalment activats en les cèl·lules T després del reconeixement de l'antigen: NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), AP-1 i NF- κ B.

NFAT: és un factor de transcripció necessari per l'expressió de moltes citoquines (Taula 1.1). Hi ha diferents NFAT, cada un codificat per gens diferents (Northrop et al., 1994; Hoey et al., 1995). NFAT és present en el citoplasma dels limfòcits T en repòs en forma inactiva (fosforilat en serina) i és activat per la calcineurina que el defosforila per permetre la translocació al nucli cel·lular, on s'unirà a seqüències consens d'unió en les regions reguladores de citoquines (Clipstone and

INTRODUCCIÓ

Crabtree, 1992). Per tant, NFAT actuarà en combinació amb AP-1 (Fos:Jun) com a regulador transcripcional de la IL2.

AP-1: és un factor que es troba en diversos tipus cel·lulars però és especialment actiu en els limfòcits T que han estat activats via TCR. AP-1 és el nom d'una família de factors que formen dímers (c-fos i c-Jun) per unir-se al DNA en motius de cremallera de leucina (Karin et al., 1997). A diferència de NFAT, l'activació d'AP-1 no implica una translocació al nucli, sinó que implica la transcripció de *fos* i la fosforilació de Jun per JNK. La transcripció de *fos* està incrementada per la via ERK i també per PKC. L'activació d'AP-1 suposa la convergència de diverses vies iniciades pel TCR.

NF-kB: és un factor de transcripció que és activat en resposta a la senyal via TCR i és essencial per la síntesi de citoquines. NF-kB són homodímers o heterodímers de proteïnes homòlogues al producte d'un oncogen anomenat *c-rel*. La família NF-kB, conté una seqüència de localització nuclear i els seus membres estan involucrats en la unió al DNA, dimerització i interacció amb les proteïnes IκB (Ghosh et al., 1998). En condicions de no estimulació, els dímers de NF-kB es troben en el citoplasma en forma inactiva com a conseqüència de la seva associació a inhibidors de kB (IκB). El senyal via TCR permet la fosforilació en serina d'IκB per la IκB quinasa (IKK). En les cèl·lules T, diferents membres de la família MAPKs poden activar IKKs (Tsatsanis et al., 1998; Lin et al., 1999; Hehner et al., 2000; Tuosto et al., 2000). Posteriorment es produeix la unió de múltiples ubiquitines que fan que l'IκB ubiquitinat sigui substracte del proteosoma citosòlic. Així IκB degradat deixa d'unir-se a NF-kB i aquest és translocat al nucli, on participa en l'activació transcripcional de diferents gens de citoquines i dels seus receptors. Els dos primers gens que es van veure regulats per NF-kB foren els que codifiquen per IL2 i per la cadena α del receptor de la IL2 (CD25). NF-kB també activa la transcripció de gens de productes que protegeixen a les cèl·lules de la mort i per tant suposa un component important en la maquinària de supervivència de la cèl·lula. Anàlisis en cèl·lules transformades i cèl·lules activades amb mitògens han relacionat els NF-kB amb el cicle cel·lular a través del sistema de CDK/CK1 (*cyclin-dependent kinase i cyclin-dependent kinase inhibitors*) (Joyce et al., 2001). En la taula 1.1. s'indiquen els principals gens que són activats després de l'activació dels limfòcits T via NFAT, AP-1 i NF-kB.

INTRODUCCIÓ

Taula. 1.1. Principals gens activats per NFAT, AP-1 i NF-kB.

FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ	GENS ACTIVATS
NFAT	IL2, IL3, IL4, IL5, IL13, GM-CSF, INF γ 1, TNF α , CD40L
AP-1	IL2, IL4, IL5, CD40L, GM-CSF
NF-kB	IL2, IL2R α , IL8, IL1, TNF α , IL12 i molècules d'adhesió

En la figura 1.6 es mostra un resum de les principals cascades de senyalització que s'activen després de la unió del lligand al TCR.

INTRODUCCIÓ

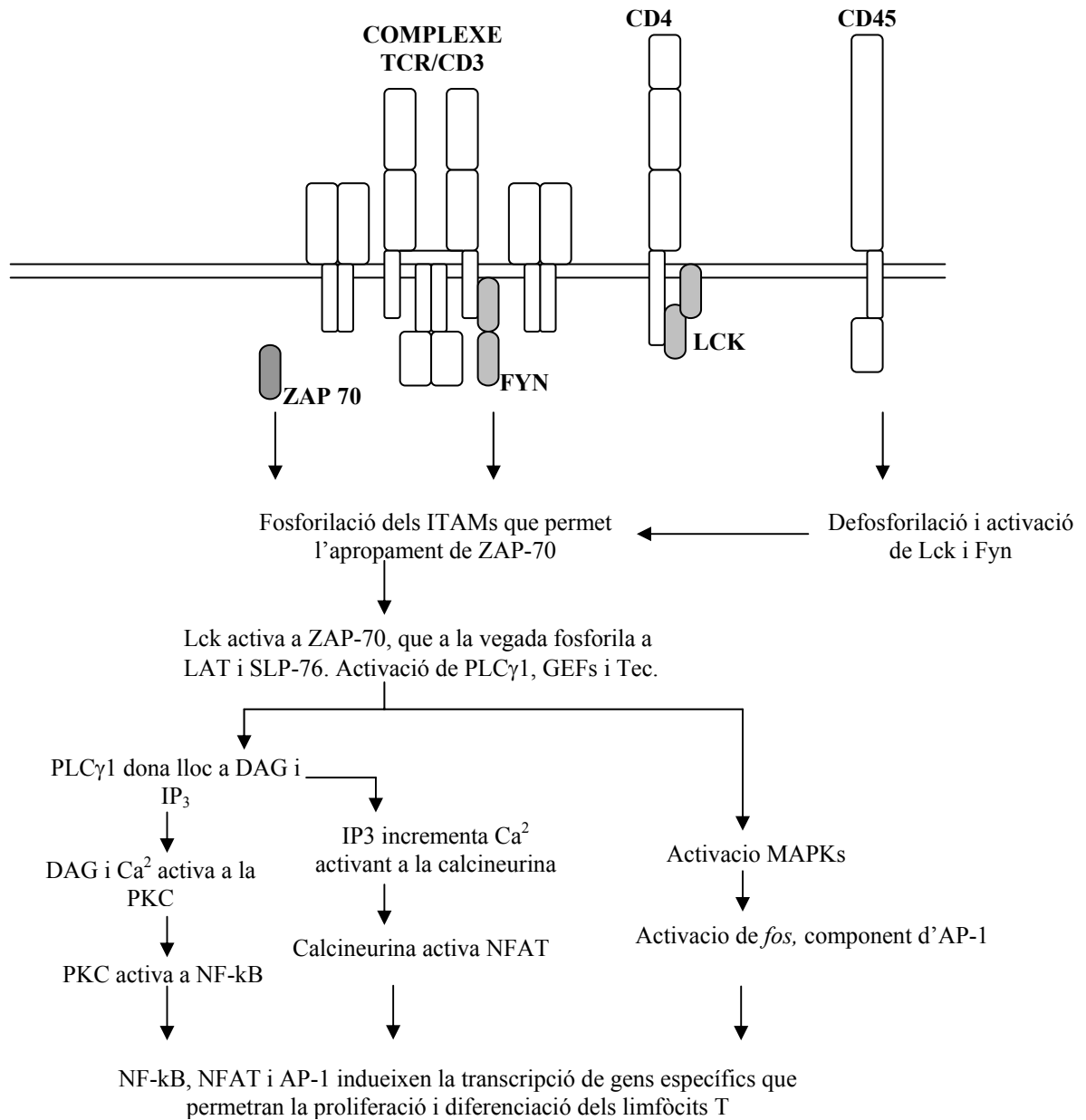


Figura 1.6. Es mostra un esquema de les cascades més importants que es generen després de l'activació dels limfòcits T via TCR. La defosforilació i activació del Lck, comportarà la fosforilació dels ITAMS presents en la cua citoplasmàtica del CD3 i cadena ζ i activació posterior de ZAP-70. Com a conseqüència, s'activarà ZAP-70, que reclutarà a una sèrie de proteïnes adaptadores, LAT i SLAP-76. L'activació de la PLC γ 1 i de la cascada de les MAKs, comportarà l'activació dels factors de transcripció: NFAT, AP-1 i NF- κ B.

1.2.3.3. COESTIMULACIÓ VIA CD28 EN L'ACTIVACIÓ DE CÈL·LULES T

Dins de les molècules de coestimulació una de les més ben estudiades en els limfòcits T és el CD28. La unió del CD28 amb anticossos o amb el seu lligand natural B7 porta a una sèrie de processos que estan involucrats en la cascada de senyalització dels limfòcits T, incrementant el nivell de la senyal induïda pel TCR. Alternativament, la senyal de coestimulació pot activar vies que convergiran en les activades per TCR o poden activar vies independents a la senyalització per TCR. Una de les principals conseqüències de la coestimulació via CD28 és l'increment en la producció de certes citokines, IL2, IL4, IL5, IL13, IFN γ i GM-CSF. El CD28 també promou la proliferació i diferenciació dels limfòcits T, així com la supervivència dels mateixos. Per tant el CD28 exerciria un efecte positiu sobre la proliferació, producció de citokines i supervivència dels limfòcits T (Frauwirth and Thompson, 2002).

Després de l'activació del CD28 la seva cua citoplasmàtica s'uneix a Lck pel seu domini SH3 augmentat la seva activitat quinasa (Holdorf et al., 1999). L'activació de CD28 també suposa l'activació de PI3K que facilita el canvi de GDP per GTP de Ras i per tant l'activació de la via de les MAPKs i l'activació de Vav. També s'ha vist que la senyal via CD28 augmenta la capacitat d'Itk d'activar la PLC γ 1 en les cèl·lules T (Michel et al., 2001). La coestimulació del CD28 suposa un potent estímul per mantenir una llarga regulació a la baixa d'IkB α , així com la regulació a l'alça de l'activitat d'IKK i per tant augmentant la translocació de NF-kB cap al nucli. En el promotor de la IL2 s'han localitzat llocs d'unió per NF-kB així com seqüències d'unió anomenades CD28RE (*CD28-responsive element*), similars a les seqüències d'unió per NF-kB, que confereixen resposta a anticossos anti-CD28, anti-CD3/TCR o amb ésters de forbol i ionòfor. D'aquesta manera s'estableix una connexió entre l'activació via CD28 i l'activació de NF-kB. c-Rel, RelA i p50 poden unir-se a CD28RE després de l'activació amb anti-CD28 (Kane et al., 2002). Una de les vies activades que sembla exclusiva de CD28 és l'activació de c-Jun. La fosforilació de c-Jun necessita de l'activació via TCR i de l'activació de la JNK1 i JNK2 per CD28 (Nunes et al., 1996).

1.2.4. RESPOSTA DELS LIMFÒCITS T A L'ANTIGEN I A LA COESTIMULACIÓ

La senyal de transducció és el lligam entre el reconeixement de l'antigen pel TCR i la seva resposta funcional. La conseqüència de la transducció de senyal originada per l'activació del TCR es pot dividir en:

1. Esdeveniments bioquímics primerencs: fosforilació de proteïnes (comentat en els apartats anteriors), alcalinització del citoplasma, fluxe iònic promovent un canvi en el pH citoplasmàtic i flux de nucleòtids.

2. Resposta cel·lular: canvis en el citoesquelet i en el cas de les cèl·lules CD8, activació del mecanisme citolític.

3. Activació de gens: gens primerencs, gens de citoquines i expressió de molècules de superfície.

1.2.4.1. TRANSCRIPCIÓ DE GENS

La transcripció de gens és responsable de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules T activades. Després de l'activació de certs factors de transcripció, resultat de l'activació del limfòcit T via TCR, s'inicia la transcripció de diferents gens primerencs que contribuiran a l'activació d'altres gens i així consecutivament, fent que a mesura que es van transcrivint els gens i traduint les proteïnes, s'iniciïn altres cascades de senyalització que portaran a la diferenciació i proliferació dels limfòcits T.

C-fos and *c-myc* són dels primers gens que es transcriuen (Lewin, 1991; Karin et al., 1997). L'increment de Ca^{2+} intracel·lular o l'activació via PKC i la transcripció d'aquests dos gens es pot detectar després de 5 a 10 minuts a partir de l'activació via TCR. Els productes d'aquests primers gens, inclòs AP-1, participen en la transcripció dels gens de citoquines responsables en gran part de la resposta de la cèl·lula T a l'activació (Jain et al., 1992).

Encara que la regulació transcripcional representa el principal mecanisme per controlar la producció de citoquines, existeixen també mecanismes de regulació post-transcripcional.

La IL2 és la principal citoquina produïda pels limfòcits *naïve* després de la seva activació. La funció de la IL2 és la de promoure la progressió del limfòcit en el cicle

INTRODUCCIÓ

cel·lular i la capacitat d'induir aquesta progressió depèn de la unió de la IL2 al seu receptor d'alta afinitat. La formació del receptor d'alta afinitat depèn de les tres cadenes (α , β i γ) i es creu que és el que pot unir IL2 en concentracions fisiològiques, internalitzar-lo i iniciar la proliferació dels limfòcits T. CD25 ó cadena α de l'IL2R, és una proteïna de membrana amb una constant d'afinitat baixa (Leonard et al., 1984) i és el receptor que s'expressa més abundantment després de l'activació dels limfòcits T. La cadena β de l'IL2R conjuntament amb la cadena γ constitueixen el receptor d'afinitat intermitja, que es detecta a baixos nivells en les cèl·lules T *naive*, NK i cèl·lules B. La cadena β i γ del receptor presenten una cua citoplasmàtica responsable de la senyal de transducció via receptor interaccionant amb les PTKs, Jak1 i Jak3 respectivament (Miyazaki et al., 1994). També s'ha demostrat que IL2R pot activar altres PTKs com Lck, Fyn i SyK (Hatakeyama et al., 1991; Horak et al., 1991; Minami et al., 1995). L'expressió de la cadena α de l'IL2R és regulada transcripcionalment, sent indetectable en les cèl·lules T en repòs. IL2 i la cadena α del l'IL2R estan sotmesos a una regulació diferent. La regulació de la cadena α de l'IL2R difereix de la del seu lligand IL2. La IL2 pot incrementar l'expressió d'IL2R α (Smith and Cantrell, 1985) i per altra banda reactius que activen només a la PKC poden induir l'expressió del CD25 (Leonard et al., 1985).

Certs treballs descriuen que les cèl·lules memòria proliferen més ràpidament *in vivo* que les cèl·lules *naive* (Bruno et al., 1995; Garcia et al., 1999b). En estat de repòs les cèl·lules de memòria contenen més RNA i proteïnes que les cèl·lules *naive*, fet que suposaria que estan en la fase G₁ del cicle cel·lular (Stout and Suttles, 1992). Les cèl·lules memòria al ser activades per l'antigen tenen la capacitat de secretar altres citoquines a part d'IL2.

Diferències en l'expressió de factors reguladors específics condicionen que els limfòcits puguin expressar diferents tipus de citoquines. A part de factors com GATA-3 i T-bet (Seder et al., 1992; Hsieh et al., 1993; Zheng and Flavell, 1997; Szabo et al., 2000), la presència de citoquines així com l'existència de diferents senyals generats pels receptors de superfície, per les proteïnes citoplasmàtiques que estan expressades en diferents limfòcits T o bé per senyals donades quan s'uneixen a receptors expressats en les APCs, poden condicionar el desencadenament d'una resposta de tipus Th1 o Th2.

1.2.4.2. EXPRESSIÓ DE MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE

L'activació de les cèl·lules T per l'antigen porta a la producció de diferents molècules per ser secretades o expressades en la superfície de la cèl·lula i així poder exercir diferents funcions efectores i reguladores. Dins de les molècules que s'expressen després de l'activació dels limfòcits T trobem CD25, CD69, OX40 (CD134), CD40L i Fas-L. Aquest dos últims pertanyen a la família del TNF i OX40 pertany a la família del TNFR. La cinètica d'expressió d'aquestes molècules no és idèntica, algunes apareixen en moments molt primerencs després de l'activació (CD25 i CD69) i altres poden tardar dies en expressar-se (OX40).

El CD40L és una proteïna de membrana que pertany a la família TNF. La seva expressió es restringeix principalment a cèl·lules CD4 activades, encara que també s'ha trobat en una petita proporció de cèl·lules CD8, NK, monòcits, mastòcits, basòfils i cèl·lules B (Foy et al., 1996). La unió del CD40L present en la cèl·lula T i el seu lligand CD40 present en l'APC (limfòcits B, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules endotelials) incrementa la resposta a antígens. CD40L és un important mediador en les funcions efectores dels limfòcits T, ja que la unió a CD40 estimula la producció d'anticossos per les cèl·lules B, activa els macròfags perquè fagocitin els patògens i activa les APCs que incrementen l'expressió de B7 i la secreció de citoquines, per promoure la diferenciació dels limfòcits T (Caux et al., 1994; Kennedy et al., 1994). L'ús d'anticossos anti-CD40L s'han utilitzat per prevenir els rebuigs en l'al·lotrasplantaments de pell en ratolins o de ronyó en primats (Larsen et al., 1996; Kirk et al., 1997). En cèl·lules CD4⁺ humanes purificades s'ha demostrat que al ser activades amb anti-CD3 immobilitzat, el CD40L pot causar una transitòria proliferació i activació, caracteritzada per un increment de l'expressió de les molècules d'adhesió i producció de IFN γ , TNF α i IL10 en absència de coestimulació via CD28 (Blair et al., 2000). La unió CD40/CD40L és important en el desenvolupament de cèl·lules productores d'IFN γ ja que és necessària per la producció d'IL12 per part de les cèl·lules dendrítiques durant la presentació de l'antigen a les cèl·lules *naïve* (Stuber et al., 1996).

L'expressió de la proteïna de transmembrana OX40 s'indueix després de l'activació de les cèl·lules T. El seu lligand, OX-40L, s'expressa en les cèl·lules dendrítiques. S'ha relacionat OX40 amb la regulació fisiològica del desenvolupament

INTRODUCCIÓ

de les cèl·lules, augmentant la diferenciació cap a cèl·lules productores d'IL-4 (Ohshima et al., 1998). La unió d'OX40 amb el seu lligand incrementa les funcions efectores de les cèl·lules augmentant la producció d'IL2. OX40 també promou l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L i per tant seria essencial per la supervivència a llarg plaç de les cèl·lules T CD4⁺ (Rogers et al., 2001). També promou l'expansió dels limfòcits T després d'un estat de no resposta i permet la recuperació de la seva funcionalitat (Bansal-Pakala et al., 2001).

En les cèl·lules T *naive* de cordó la lligació d'OX40 incrementa la producció d'IL4 promovent els seu desenvolupament a cèl·lules efectores productores de citocines Th2 (IL4, IL5 i IL13) (Ohshima et al., 1998).

El Fas-L és una proteïna homotrimèrica de membrana que s'expressa en els limfòcits T després de la seva activació per l'antigen i IL2. La seva unió amb el seu receptor, Fas, comporta la mort cel·lular per apoptosi de la cèl·lula Fas⁺. Aquest mecanisme és important per l'eliminació dels limfòcits que són repetidament estimulats pel mateix antigen, així com també per la regulació negativa de les respostes immunitàries i pel manteniment de la tolerància. Així Fas-L està involucrat en la mort per apoptosi dels limfòcits T activats (AICD) (Alderson et al., 1995). També s'ha demostrat que l'activació de cèl·lules T humanes amb anti-CD3 en presència de Fas-L soluble incrementa la seva proliferació (Kennedy et al., 1999). Fas-L té la capacitat de regular positivament les cèl·lules CD8⁺ i CD4⁺ en la perifèria, procés que es donaria abans de la mort mediada per la interacció Fas-Fas-L, encara que aquest procés es dona en menys mesura en les CD4⁺ (Suzuki and Fink, 2000).

1.3. APOPTOSI EN ELS LIMFÒCITS T

Hi ha moltes situacions biològiques en les que les cèl·lules moren i són eliminades per fagocitosi en un procés anomenat apoptosi. En el sistema immune l'apoptosi és important per l'eliminació d'aquells limfòcits potencialment perillosos que apareixen al llarg de la maduració i després de l'activació de les cèl·lules madures. D'aquesta manera l'apoptosi esdevé essencial per la regulació del desenvolupament i de l'homeostasi dels limfòcits.

1.3.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

L'apoptosi representa una forma de suïcidi cel·lular en el que la cèl·lula inicia la seva pròpia mort a través de l'activació d'un programa intern molt conservat evolutivament, mitjançant l'activació d'unes proteases (Ellis et al., 1991; Williams and Henkart, 1994; Kumar, 1995; Chinnaiyan and Dixit, 1996; Golstein, 1997). Com a resultat, la integritat del citoesquelet es perd i la cèl·lula comença a encongir-se, la membrana comença a formar invaginacions i perd l'asimetria normal, es perden residus d'àcid siàlic i la molècula fosfatidilserina s'exposa a la cara externa de la membrana (Castedo et al., 1996). L'apoptosi comporta també l'activació de les endonucleases que presenten afinitat per regions del DNA internucleosomal i que degradaran el DNA. Un primer esdeveniment que es dona durant l'apoptosi es la pèrdua de la funció mitocondrial (Zamzami et al., 1996), produint una redistribució del citocrom c i una pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial (Kluck et al., 1997; Susin et al., 1997; Yang et al., 1997). La fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques no està associada amb un augment de marcadors d'activació o de citokines en la cèl·lula fagocítica. Les cèl·lules apoptòtiques que no són immediatament fagocitades romanen superficialment intactes, formant els cossos apoptòtics (restes cel·lulars envoltats per membrana cel·lular). Al mantenir la integritat de la membrana, els cossos apoptòtics poden ser eliminats sense promoure una resposta inflamatòria.

1.3.1.1. INICIACIÓ DE L'APOPTOSI

La supervivència de les cèl·lules *in vivo* depèn d'un constant aport de senyals de supervivència que són produïts per les cèl·lules veïnes, per la matriu extracel·lular o per factors de creixement. La manca d'aquests factors pot portar a la mort de la cèl·lula per apoptosi.

L'apoptosi també es pot donar per un mecanisme que implica el reconeixement de receptors de mort cel·lular presents en la superfície pel seu lligand i així iniciar la transducció de senyals que conduirà a la mort cel·lular (Nagata, 1996). Els receptors de mort (Taula 1.2) són membres de la família del TNFR, que poden induir l'apoptosi via un domini citoplasmàtic de mort quan són estimulats pels seus lligands (Ashkenazi and Dixit, 1999). El senyals iniciats pels receptors de la família del TNF sembla que

INTRODUCCIÓ

s'integren en un punt comú que involucra l'activació de proteases (Fraser and Evan, 1996).

Taula 1.2. Receptors de mort descrits fins el moment.

TNF-R1 (CD120a)
Fas (CD95)
DR3 (<i>TNF-R-related apoptosis-mediating protein</i>)
TRAIL-R1 (<i>TNF related apoptosis-inducing ligand receptor</i> , DR4)
TRAIL-R2 (DR5)
DR6
NGF-R (<i>nerve growth factor</i>)
EDA-R (<i>ectodermal dysplasia receptor</i>)

Existeixen factors intracel·lulars que poden originar la mort per apoptosi. Així s'ha vist que el dany en el DNA pot induir apoptosi principalment a través de p53 (Oren, 1994). Es considera que qualsevol pertorbació del metabolisme o del cicle cel·lular que persisteixi pot dur a l'apoptosi, així l'elevació del Ca^{2+} intracel·lular, una disminució del pH o alteracions en el potencial redox poden incrementar la tendència a morir per apoptosi (Thompson, 1995). En la figura 1.8. es mostra esquemàticament diferents vies que poden portar a la mort de la cèl·lula per apoptosi.

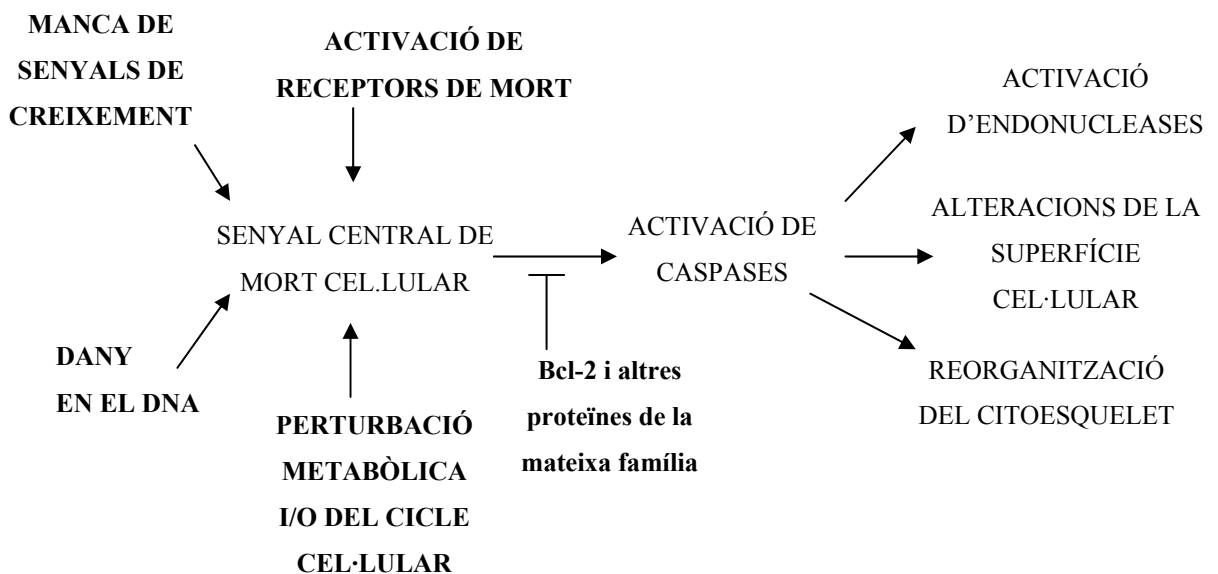


Figura 1.8. Representació esquemàtica dels principals esdeveniments que porten a la mort per apoptosi.

1.3.2. MECANISMES DE MORT EN LIMFÒCITS T ACTIVATS

Generalment la resposta immune a antígens no propis implica la generació d'un grup de cèl·lules efectores a través d'un procés d'activació, proliferació i diferenciació seguit de la mort dels limfòcits activats. La majoria dels limfòcits que existeixen en el pic de la resposta immune moren després. Es coneix amb el nom de AICD (*activation-induced cell death*), el conjunt de processos que porten a la mort cel·lular després de l'activació dels limfòcits.

En condicions *in vitro*, els hibridomes o els timòcits al ser activats a través de la molècula de CD3 moren per apoptosi (Shi et al., 1989; Lenardo et al., 1999). En canvi, els limfòcits T primaris són resistents a AICD perquè expressen elevats nivells de FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) que és un homòleg de la caspase 8 sense activitat enzimàtica (Hu et al., 1997). La disminució dels nivells de FLIP després de l'estimulació en presència d'IL2 es correlaciona amb la progressió dins del cicle cel·lular i és a la fase S quan els nivells de FLIP estan disminuïts (Algeciras-Schimmich et al., 1999). Per tant, aquí la IL2 juga un paper important, inicialment promovent el creixement de les cèl·lules per després sensibilitzar-les a morir per apoptosi. Això podria estar relacionat amb un concepte més ampli que considera a l'AICD com un punt de control dins del cicle cel·lular on la mort de les cèl·lules T pot ser regulada per factors de transcripció involucrats amb la inducció del propi cicle cel·lular.

L'apoptosi després de l'activació es pot donar en absència de receptors de mort en el fenomen anomenat "retirada o manca de citoquines" (Lohman et al., 1996; Van Parijs et al., 1998). Moltes vegades s'ha referit a aquesta darrera com a mort passiva per distingir-la de la mort activa que es dona per la unió a receptors de mort cel·lular (Lenardo et al., 1999). Donat que el terme mort passiva podria implicar que la cèl·lula T no participa en la seva pròpia mort i la cèl·lula sí que participa en la inducció de síntesi de mRNA i de proteïnes, és preferible anomenar ACAD (*activated T cell autonomous death*) a la mort per manca de citoquines.

1.3.2.1. AICD (*ACTIVATION INDUCED-CELL DEATH*)

Durant l'activació, les cèl·lules T expressen de manera transitòria Fas-L i TNF α , que poden unir-se als seus respectius receptors presents en les cèl·lules veïnes. La trimerització o oligomerització de Fas per la unió del seu lligand comporta el reclutament de molècules adaptadores com FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*, també es pot anomenar MORT1). L'altre extrem de FADD conté dos dominis efectors de mort que permeten el reclutament de les caspases, definides com a proteases citosòliques que contenen un residu de cisteïna en el seu domini actiu i trenquen els seus substractes després d'un residu aspàrtic. Així caspase 8 i 10 són reclutades formant el DISC (*death-inducing signaling complex*), on s'activen i donen lloc a l'activació d'altres caspases (Gupta, 2001). També es pot donar el reclutament de FLIP que interfereix en l'activació de la caspase-8 a nivell del DISC (Irmeler et al., 1997). Dins del context de la senyal via Fas, altres molècules són reclutades en presència de FLIP (RIP, TRAF-1, TRAF-2 i Raf-1) (Kataoka et al., 2000). Quan s'activa la caspase 8, aquesta activarà a caspase 3 que a la vegada activarà a altres caspases (caspase 6 i 7), trencant proteïnes del citoesquelet, degradant a ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) per alliberar a CAD (*caspase-activated DNase*), produint finalment la pèrdua de la integritat cel·lular. Paral·lelament, caspase-8 pot trencar a Bid, una proteïna de la família de les *BH3-only*, generant tBid que inactiva a Bcl-2 en la mitocondria i permet que s'alliberi el citocrom c i DIABLO, que activaran a la caspase-9, a més a més d'inhibir a IAPs (*inhibitor of apoptosis*). Aquest procés s'esquematitza en la figura 1.9.

Molts experiments han descrit el paper *in vivo* de Fas en el desencadenament d'AICD mitjançant exposicions repetides a l'antigen, altes dosis d'antigen o exposicions a antigens expressats sistèmicament (Strasser et al., 1995; Van Parijs et al., 1998; Zhou et al., 2002). En aquests treballs s'indicava que les cèl·lules només seran susceptibles a Fas si troben l'antigen mentre estan en cicle cel·lular.

INTRODUCCIÓ

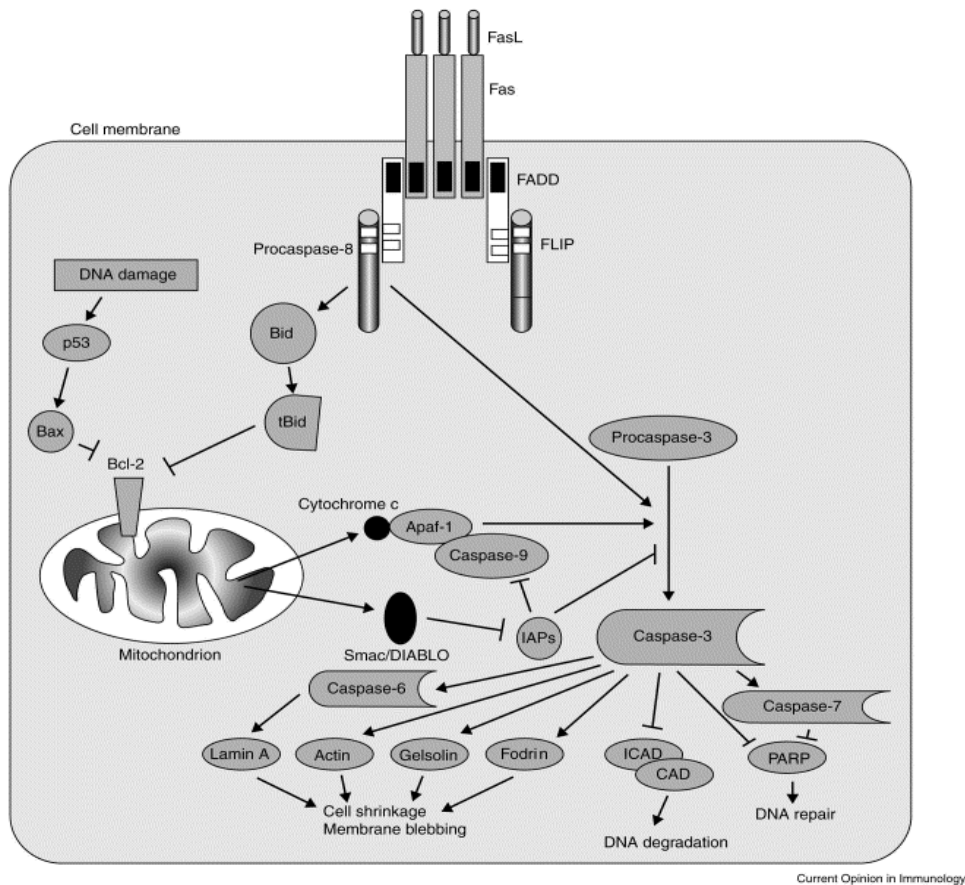


Figura 1.9. AICD via Fas. L'oligomerització de Fas per Fas-L produeix el reclutament de FADD cap a la cua citoplasmàtica de Fas pels seus dominis DD. Per l'altre extrem de FADD, es produeix el reclutament de la pro-caspasa 8 o FLIP. La caspasa 8 pot trencar la proteïna Bid, donant lloc a tBid, que inactivarà Bcl-2. Això permetrà l'alliberació del citocrom c i DIABLO, permetent l'activació de la caspasa 9 i 3 desencadenant el trencament de proteïnes del citoesquelet i la degradació d'ICAD (*inhibitor of caspase-activated Dnase*). (Budd, 2002).

En el treball de Kataoka T et al. es demostra una unió de les vies de Fas i les d'ERKs i NF- κ B mitjançant FLIP, aquest no només bloquejaria la via de mort per Fas sinó que també, augmentaria l'activació de NF- κ B i ERK (Kataoka et al., 2000).

Les caspases no només estan involucrades en la mort per apoptosi, sinó també estan relacionades en la progressió de la cèl·lula dins del cicle cel·lular (Los et al., 2001). Així les cèl·lules T activades amb anti-CD3 es produeix el processament de la

INTRODUCCIÓ

caspace 8 (Kennedy et al., 1999) i també de les caspases 3, 6 i 7, mantenint la viabilitat de les cèl·lules i la seva capacitat proliferativa (Alam et al., 1999).

Recentment s'ha descobert un tipus de mort mitjançant Fas, independent de les caspases i que implica a RIP (*receptor Interacting protein*) (Holler et al., 2000). Aquest tipus de mort es caracteritza per una morfologia similar a la necrosi o dany en la mitocòndria sense alliberació de citocrom c. RIP és una serin treonin quinasa (Stanger et al., 1995) que s'uneix a Fas de manera directe, independentment de FADD. S'ha vist que RIP és important en la mort independent de caspases via TNF i TRAIL.

1.3.2.2. BCL-2 i ACAD (*ACTIVATED T CELL AUTONOMOUS DEATH*)

En els mamífers almenys existeixen 20 membres relacionats amb la família del Bcl-2 i tots comparteixen un domini conservat d'homologia Bcl-2 anomenat BH (*Bcl-2 homology domain*). Les proteïnes de la família Bcl-2 regulen els esdeveniments que inicien o amplifiquen l'activitat de les caspases (Marsden and Strasser, 2003).

Aquestes proteïnes poden tenir una activitat pro- o anti-apoptòtica i es classifiquen principalment en tres categories:

- a) proteïnes anti-apoptòtiques que presenten dominis homòlegs BH1-4 (Chao and Korsmeyer, 1998).
- b) proteïnes pro-apoptòtiques amb dominis BH1-3 (Bax i Bak) (Chittenden et al., 1995).
- c) proteïnes pro-apoptòtiques anomenades "*BH3-only*" on l'única homologia amb Bcl-2 resideix en 9 aa compresos en el domini BH3 (Huang and Strasser, 2000).

Les proteïnes pro-apoptòtiques causen l'apoptosi via mitocòndria, permetent l'alliberació de factors apoptogènics de la mitocòndria, activant caspases, col·lapsant el potencial de transmembrana de la mitocòndria i produint la mort final de la cèl·lula. En la taula 1.3. es mostren els diferents membres relacionats amb la família del Bcl-2.

INTRODUCCIÓ

Taula 1.3. Membres relacionats amb la família Bcl-2

Anti-apoptòtics	Pro-apoptòtics	
Família Bcl-2	Família Bax	Família BH3-only
Bcl-2	Bax	Bid Bim
Bcl-x _L	Bak	Bik Bad
A1	Bcl-x _S	Bmf Hrk
Bcl-w	Bok	Noxa Puma
Mcl-1		

Tant Bcl-2 com el seu homòleg Bcl-x_L poden localitzar-se en la cara citoplasmàtica de la membrana cel·lular del reticle endoplasmàtic, de la mitocondria i del nucli mitjançant el seu domini hidrofòbic carboxi terminal. L'expressió de Bcl-2 promou la integritat de la membrana mitocondrial (Vander Heiden et al., 1997), permetent l'exportació d'ions H⁺ de l'espai intermitocondrial, potser a través de la capacitat de formar un canal iònic (Adams and Cory, 1998).

Bax en les cèl·lules viables es troba en forma de monòmer en el citosol i Bak és una proteïna oligomèrica integral de la membrana mitocondrial. Ambdós durant l'apoptosi modifiquen la seva conformació, Bax integrant-se en la membrana mitocondrial i formant oligòmers i Bak formant grans agregats (Antonsson et al., 2001; Nechushtan et al., 2001). Els oligòmers de Bax i Bak actuarien provocant o contribuint a la permeabilització de la membrana externa mitocondrial i permetent el flux de proteïnes apoptòtiques (Gross et al., 1999). En les cèl·lules viables les proteïnes *BH3-only* estan controlades per diferents mecanismes. Per exemple, Bim i Bmf estan segrestats en els microtúbuls i el citoesquelet d'actina (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001). El Bad fosforilat s'uneix a les proteïnes 14.3.3 (Zha et al., 1996) i Bid es sintetitza com a precursor necessitant de ser trencat proteolíticament per ser actiu (Luo et al., 1998). Recentment s'ha documentat que Bim produeix la mort de cèl·lules *T in vivo* activades (Hildeman et al., 2002).

El procés pel qual les proteïnes Bcl-2 antagonitzen la funció pro-apoptòtica de Bax no està massa clar, doncs interaccions directes entre els dos membres no es donen fisiològicament i només s'han observat amb determinats detergents no iònics (Hsu and Youle, 1998). A més, encara que altes concentracions de proteïnes anti-apoptòtiques preveuen l'oligomerització de Bax i l'activitat dels possibles canals formats en la membrana mitocondrial (Antonsson et al., 2001), l'entrecreuament no revela complexos de Bcl-2-Bax (Mikhailov et al., 2001).

INTRODUCCIÓ

Davant d'un estímul apoptòtic, Bim és alliberat dels microtúbuls. Alts nivells de Bcl-2 eviten l'apoptosi perquè segresten a Bim, mentre que alts nivells de Bim promouen que Bax i/o Bak formin porus en la membrana mitocondrial que permeten la sortida de dos mediadors crítics de l'apoptosi: citocrom c i DIABLO. En els primers moments, el citocrom c es redistribueix pel citosol (Kluck et al., 1997; Vander Heiden et al., 1997; Yang et al., 1997) on forma complexes amb Apaf-1 i recluta a la caspase-9 formant l'apoptosoma (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). En presència d'ATP es produeix un canvi conformacional de la caspase-9 que passa a la forma activa capaç d'activar a la caspase 3. Per la seva part, DIABLO inactiva a IAP (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Tots aquests esdeveniments comporten l'activació de diferents caspases, ICAD i molècules imprescindibles per la integritat de la cèl·lula que la duran finalment a la mort. En la figura 1.10 es mostra un esquema de l'apoptosi per manca de citoquines.

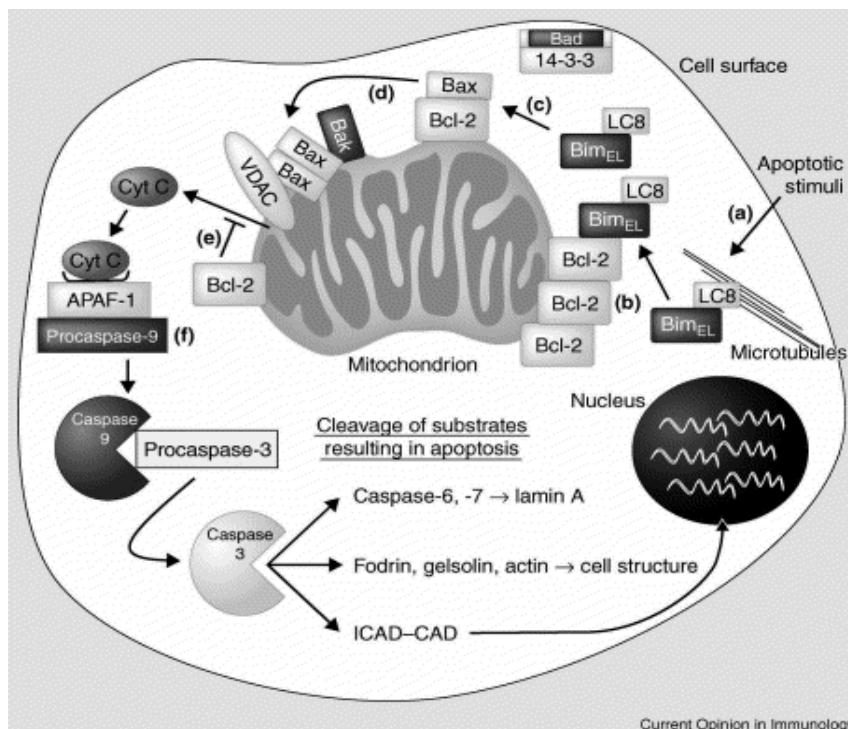


Figura 1.10.
Esquema de l'apoptosi de les cèl·lules T per manca de citoquines.
Davant d'un estímul d'apoptosi, Bim és alliberat dels microtúbuls promovent que Bax i/o Bak formin porus en la membrana mitocondrial, permetent la sortida de dos mediadors crítics de l'apoptosi, el citocrom c i DIABLO. El citocrom c es redistribuirà en el citosol on formarà complex amb Apaf-1 i reclutarà a la caspase-9

formant l'apoptosoma. En presència d'ATP es produirà un canvi conformacional de la caspase-9, passant a la seva forma activa, capaç d'activar a la caspase 3. El segon mediador és DIABLO, el qual inactiva a IAP (*inhibitor of apoptosis*). Tot aquests esdeveniments produiran l'activació de caspases, ICAD i molècules importants per la integritat de la cèl·lula comportant finalment la seva mort. (Hildeman et al., 2002).

INTRODUCCIÓ

Alguns membres de la família del Bcl-2 també s'han relacionat amb el cicle cel·lular. Quan les cèl·lules sobreexpressen Bcl-2, presenten menys retinoblastoma fosforilat, element clau per la progressió del cicle cel·lular (Mazel et al., 1996). Per una altra part, la sobreexpressió de Mcl-1 inhibeix la progressió del cicle cel·lular a través de la fase S (Fujise et al., 2000).

Durant el pic d'activació dels limfòcits T, els nivells de Bcl-2 estan disminuïts en comparació amb les cèl·lules T en repòs inclinant la balança a favor dels membres pro-apoptòtics (Marrack et al., 1999; Mitchell et al., 1999). Tres mecanismes que no s'exclouen mútuament poden explicar aquesta disminució de Bcl-2 *in vivo*. El primer comportaria que citoquines com IL2, que mantenen els nivells de Bcl-2, es troben limitants. El segon seria que espècies reactives oxigenades poden disminuir els nivells de Bcl-2 (Hildeman et al., 1999) i el tercer implicaria a PTEN (Suzuki et al., 2001).

1.3.3. REGULACIÓ DE L'APOPTOSI

En termes generals l'apoptosi pot ser regulada genèticament i previnguda per diferents estímuls d'activació, incloent el reconeixement específic de l'antigen, factors de creixement (IL2) i la coestimulació.

La supervivència dels limfòcits en repòs depèn de les senyals de supervivència que les cèl·lules rebin del seu ambient. Dos tipus de senyals extracel·lulars han estat identificades per mantenir la supervivència dels limfòcits en repòs. La primera prové de l'estroma cel·lular que pot secretar citoquines per receptors que comparteixen la cadena γ i la segona prové del receptor per l'antigen. A part d'aquestes senyals, la supervivència dels limfòcits T també depèn de l'expressió intrínseca de Bcl-2 (Nakayama et al., 1993; Veis et al., 1993).

Les cèl·lules T *naïve* contenen grans quantitats de FLIP que inhibeix la mort induïda per Fas. En certs sistemes cel·lulars, la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L pot prevenir la mort mediada per Fas (Rodriguez et al., 1996; Boise and Thompson, 1997).

El CD28 promou no només la proliferació cel·lular sinó també la supervivència cel·lular a l'augmentar l'expressió de forma transitòria i específica de Bcl-x_L (exclusivament en cèl·lules activades via antigen) (Boise et al., 1995b; Radvanyi et al., 1996), de FLIP i al disminuir l'expressió de Fas-L en blastes reestimulats (Kirchhoff et

al., 2000). La senyal CD28 via PKB també inhibeix el processament de la procaspase-8 prevenint la seva translocació al DISC independentment de FLIP i per tant la mort per apoptosi (Jones et al., 2002).

Les citokines IL2, IL4, IL6, IL7, IL9 i IL15 mitjançant la cadena γ comú dels seus respectius receptors promouen la supervivència cel·lular i la progressió en el cicle cel·lular perquè recluten i activen Jak3 (Miyazaki et al., 1994; Boise et al., 1995a; Park et al., 1995). Això comporta l'augment de Bcl-2 i la inhibició de l'apoptosi (Wen et al., 2001).

1.3.4. CONTROL DE LA SUPERVIVÈNCIA DE LES CÈL·LULES T

Les cèl·lules *naive* i memòria depenen de diferents factors de supervivència. Les cèl·lules CD4⁺ *naive* requereixen de contactes no molt freqüents amb el pèptid-MHC per poder sobreviure. La naturalesa de la senyal de supervivència desencadenada per aquests contactes encara no es coneix. En canvi, generalment, s'accepta que la supervivència de les cèl·lules memòria és antigen-independent. Pel que fa a les citokines, s'ha vist que la IL7 és la principal citocina involucrada en la supervivència de les cèl·lules *naive* (Tan et al., 2001; Vivien et al., 2001; O'Neill et al., 2003). Encara que IL4, IL6 i IL15 també poden rescatar de l'apoptosi a les cèl·lules *naive in vitro* (Teague et al., 1997; Vella et al., 1997), aquestes citokines no participen en la supervivència de les cèl·lules *naive in vivo* i no poden compensar l'absència de la IL7 (Vivien et al., 2001). Per altra banda, les cèl·lules CD4⁺ memòria poden sobreviure en ratolins deficientes en la cadena comú γ dels receptors de citokines (IL2, IL4, IL7, IL9 i IL15), indicant que cap d'aquestes citokines serien essencials pel manteniment de la seva supervivència (Lantz et al., 2000).

1.4. SANG DE CORDÓ UMBILICAL

La sang de cordó umbilical (SCU) ha resultat ser una bona alternativa al trasplantament de moll d'òs en el tractament de diferents malalties hematològiques. A part d'aquest ús, les cèl·lules de cordó són una bona eina per l'estudi de la resposta immunològica en l'època neonatal, sense oblidar que la resposta de les cèl·lules de cordó umbilical poden estar influenciades per l'entorn fisiològic durant l'embaràs i en el moment del part. Molts dels estudis de la capacitat immunològica de les cèl·lules T neonatals s'han realitzat en models murins, però sembla que el sistema immune de l'humà en el moment de néixer és un sistema més desenvolupat que el murí.

1.4.1. TRASPLANTAMENT DE SANG DE CORDÓ UMBILICAL

La presència de progenitors hematopoiètics relativament madurs en SCU va ser demostrada per Knudtzon en el 1974 (Knudtzon, 1974). Però no va ser fins el 1989 que Broxmeyer demostrava que la sang de cordó umbilical era rica en cèl·lules progenitores hematopoiètiques i que la SCU es podia utilitzar en el trasplantament de cèl·lules hematopoiètiques (Broxmeyer et al., 1989). L'any 1989 es va realitzar el primer trasplantament de cèl·lules hematopoiètiques provinents de SCU. Es va reconstituir el sistema hematopoiètic d'un nen amb anèmia de Falconi gràcies a la utilització de SCU del germà amb un HLA (*human leucocyte antigen*, MHC humà) idèntic (Gluckman et al., 1989). Posteriorment l'any 1993 es va realitzar el primer trasplantament de cordó umbilical de donant no emparentat (Kurtzberg et al., 1994).

Des d'aleshores, existeix un gran interès en l'ús de les cèl·lules hematopoiètiques de la SCU com una alternativa per al trasplantament al·logènic de moll d'òs després d'una teràpia mieloablative (Wagner, 1994). S'han realitzat fins ara uns 2000 trasplantaments en pacients amb malalties tant hematopoiètiques com genètiques; leucèmies mieloïdes i limfoides, anèmia de Falconi, síndrome de Wiskott-Aldrich, β -talassèmia i neuroblastoma. Els trasplantaments de cordó umbilical es realitzen entre germans HLA idèntics, o bé entre donants no emparentats amb 0-2 al·lels incompatibles en el sistema de HLA.

Existeixen una sèrie d'avantatges i desavantatges en l'ús del cordó umbilical pel trasplantament al·logènic que es resumeixen en la Taula 1.4.

INTRODUCCIÓ

Taula 1.4. Resum dels avantatges i desavantatges que comporta l'ús del cordó umbilical en el trasplantament al·logènic.

Avantatges:

1. La SCU es pot obtenir fàcilment sense risc per la mare ni pel nadó.
2. Hi ha una baixa contaminació vírica, incloent citomegalovirus i el virus de l'Epstein Barr.
3. Es poden criopreservar les mostres de SCU en bancs d'emmagatzematge per ser utilitzats quan sigui necessari. Això contrasta amb la necessitat que el moll d'òs sigui fresc degut a la seva vida mitja limitada.
4. S'ha vist que la resposta al·logènica dels limfòcits T neonatals, incloent la producció de citokines associades a una resposta Th1, és menor que en els limfòcits T adults i podria portar a la menor reactivitat de l'injert contra l'hoste (Chalmers et al., 1998; D'Arena et al., 1998a; Kadereit et al., 1999).
5. Possibilitat de menor compatibilitat de HLA.
6. Baixa incidència de la malaltia de l'injert contra l'hoste (GVHD), fins i tot acceptant 1-2 al·lels incompatibles en el HLA dels injerts no emparentats.

Desavantatges:

1. Limitació en el número de progenitors hematopoètics presents en la SCU, això dificulta el seu ús en pacients adults.
2. Retardament en l'injertament.
3. Transmissió potencial de malalties genètiques.
4. No es poden obtenir més cèl·lules hematopoètiques del donant en el cas d'un fracàs en l'injertament.

Les característiques de l'injert s'han vist que són importants per la cinètica d'injertament de les cèl·lules donants en el receptor. Dins de les característiques s'inclouen la dosi cel·lular, contingut en cèl·lules CD34⁺ i la incompatibilitat de HLA (Paulin, 1992). La principal causa de la fallada i el retardament en l'injertament mieloide en pacients trasplantats amb SCU és la baixa dosi de cèl·lules soca hematopoètiques que es trasplanten, doncs la dosi de cèl·lules nucleades i CD34⁺ és un logaritme menor si es compara amb els injerts al·logènics convencionals (Paulin, 1992; Bender et al., 1994). Encara que també pot haver altres factors que s'haurien d'estudiar *in vivo*, com són: les molècules d'adhesió expressades en les cèl·lules soca

INTRODUCCIÓ

hematopoiètiques de SCU, les seves característiques d'assentament en el lloc de maduració, l'estat de maduració de les cèl·lules progenitores i/o una alteració en l'alloreactivitat entre els limfòcits de l'injert del cordó umbilical i les cèl·lules presentadores de l'hoste (Han and Hodge, 1999).

S'ha vist que la sang de cordó umbilical pot ser una alternativa al trasplantament de moll d'òs en adults perquè s'ha observat una menor incidència del GVHD, malgrat hi hagi disparitat en el HLA i encara que la reconstitució hematopoiètica sigui més lenta.

Donada la menor incidència de GVHD es pot emprar en el trasplantament de SCU donants més incompatibles en HLA que en el trasplantament de moll d'òs. Per explicar aquest fet, diferents autors han argumentat que: a) SCU presenta alt percentatge de cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$; b) baixos nivells de proliferació i baixa producció de citokines quan els limfòcits SCU són estimulats i c) més policlonalitat del TCR comparat amb les cèl·lules T adultes. De totes maneres, tots aquest resultats s'han obtingut en estudis *in vitro* i per tant podria ser que aquestes característiques diferencials podrien veure's compensades *in vivo*. I a més a més, en el nostre estudi alguns d'aquests aspectes també queden en entredit.

1.4.2. COMPOSICIÓ DE LA SANG DE CORDÓ UMBILICAL

1.4.2.1. CÈL·LULES PROGENITORES

Diversos estudis han determinat l'existència de diferències entre les cèl·lules soca primitives hematopoiètiques i els progenitors cel·lulars de la SCU i de moll d'òs. (Theilgaard-Monch et al., 1999). D'aquesta manera es considera que la SCU presenta més freqüència de cèl·lules progenitores hematopoiètiques o HSPC, amb alta capacitat proliferativa, que el moll d'òs, mesurat pel número d'unitats formadores de colònies (HPP-CFC).

La molècula CD34 s'expressa virtualment en tots els progenitors hematopoiètics, incloent les cèl·lules soca multipotents (Civin et al., 1984; Greaves et al., 1992; Almici et al., 1995; Krause et al., 1996). En el moll d'òs es troba un 1-3 % de cèl·lules $CD34^+$ i en el cordó umbilical un 0,1-0,4 %, mentre que en la sang perifèrica d'adult (SPA) només un 0,01-0,1 % de les cèl·lules són $CD34^+$. S'ha publicat que el plasma de SCU potencia la proliferació i expansió de les cèl·lules $CD34^+$ si es compara

INTRODUCCIÓ

amb la SPA (Ruggieri et al., 1994). En la taula 1.5. s'indica el % de cèl·lules CD34⁺ en SCU, SPA i moll d'òs.

Taula 1.5. Cèl·lules progenitores de SCU, SPA i moll d'òs.

Mesura	SCU	SPA	Moll d'òs	Ref
CD34	0,1-0,4%	0,01-0,1%	1,3%	D'Arenas 96
HPP-CFC	53,5%	N.D.	6,5%	Lu, Xiao 93

N.D. No determinat

1.4.2.2. LIMFÒCITS

Les principals diferències hematològiques entre la SPA i la de SCU recauen en que la SCU presenta macrocitosi, leucocitosi, limfocitosi i nivells més elevats d'hemoglobina en les cèl·lules vermelles (D'Arena et al., 1998b). A la taula Taula 1.6. es mostra un estudi de la composició de les poblacions que componen la SCU i SPA.

Taula 1.6. Poblacions cel·lulars en la sang de SCU i SPA.

Població	SCU	SPA
Cèl·lules vermelles ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5014\pm424	4626\pm317
Hemoglobina (g/dl)	15,3\pm0,7	14,1\pm0,9
Cèl·lules blanques ($\times 10^9/\text{l}$)	13696\pm3,52	5887\pm1,65
Neutròfils (%)	50,8\pm14,2	56,9\pm3,8
Limfòcits (%)	38,3\pm10,8	33,2\pm3,5
Monòcits (%)	6,3 \pm 4,7	6,5 \pm 0,3
Eosinòfils (%)	3 \pm 1,7	2,3 \pm 1,6
Basòfils (%)	0,7 \pm 0,7	1 \pm 1

En negreta s'indiquen les diferències estadístiques. (Giovanni D'Arena. Haematologica.1998).

També s'ha determinat que la SCU presenta un percentatge relativament elevat d'eritròcits nucleats (0-35%) que són CD45 negatius (Han et al., 1995; D'Arena et al., 1996).

INTRODUCCIÓ

A nivell de marcadors de superfície, més del 95 % de les cèl·lules T neonatals expressen la molècula CD38 que es troba també expressada en la majoria del timòcits. Això suggereix que les cèl·lules T neonatals representarien un estat immadur transitori entre els timòcits i les cèl·lules T adultes (Clement et al., 1990; Ferrero and Malavasi, 1999). Els limfòcits de SCU no expressen el marcador CD57 (Lucivero et al., 1996; D'Arena et al., 1998b; Delespesse et al., 1998). A més recentment s'ha demostrat que els limfòcits T de SCU representarien un estat particular en l'ontogènia, conegut com emigrants tímics recents, caracteritzat entre altres coses per un major nivell de TRECS (*T-cell excision circles*) comparat amb les de SPA (Hassan and Reen, 2001).

La proporció de cèl·lules CD2⁺, CD5⁺, TCR α/β ⁺, CD4⁺ i CD8⁺ és similar entre la sang de cordó umbilical i la sang perifèrica, malgrat que alguns autors descriuïen certes diferències com es mostra en la taula 1.7.

Taula 1.7. Percentatge de diferents poblacions limfocitàries en SCU i SPA.

CD3+		CD4+		CD8+		CD4+CD45RA+		Ref.
SCU	SPA	SCU	SPA	SCU	SPA	SCU	SPA	
74,0±7	70,0±7	43,7±10	43,3±7	31,7±4	29,3±8			Miscia 99
59,9±12	74,9±4	42,4±9	43,9±4	24,8±4	28,5±3	36,8±5	19,6±9	D'Arena 98
44,8±13	71,9±6	31±10	42,4±7	26,4±6	32,1±6	22,1±11	14,6±7	Herzog 92
61,3±8	70,6±6	43,8±5	46,1±9	33,9±7	31,9±6			Han P 95

Una de les principals diferències entre SPA i SCU recau en el percentatge de cèl·lules amb fenotip *naive* (CD45RA⁺) present en gran proporció en la SCU. En SPA aproximadament un 50 % de les cèl·lules T són memòria (CD45RO⁺), aquesta proporció pot anar augmentant fins un 80 % a la vellesa. En canvi, en la SCU només es troba fins un 10 % de cèl·lules T CD45RO⁺ (Harris et al., 1992; Cossarizza et al., 1996). Els nivells d'expressió de la molècula CD45 són heterogenis, així per citometria de flux es pot diferenciar dues subpoblacions, una d'expressió alta i una altra d'expressió feble. Concretament, la major part de la població CD45RA de cordó umbilical té una expressió feble. Per tant, la mitja de la intensitat de fluorescència (MFI) de l'expressió de CD45RA i CD45RO de les cèl·lules T CD4⁺ de SPA és superior a la de SCU (Hassan and Reen, 1997).

INTRODUCCIÓ

Estudis amb animals han determinat que existeix una reversió de CD45RO⁺/RA⁻ a RO⁻/RA⁺. En els humans aquests estudis són més limitats, però s'ha postulat que les cèl·lules CD45RO⁺/RA⁻ poden readquirir la isoforma CD45RA sense perdre la CD45RO (Arlettaz et al., 1999). Altres estudis consideren que la població CD45RA⁺ en els adults estaria formada en part per la població *naive* i per cèl·lules memòria que han adquirit de nou el fenotip RA⁺ (Michie et al., 1992; Hargreaves and Bell, 1997), encara que aquesta reversió en el CD45 no sigui predominant en la perifèria (Young et al., 1997).

Pel que es refereix al repertori $\alpha\beta$ del TCR de les cèl·lules T, la SCU presenta un repertori policlonal totalment format, observant-se la total representació de les famílies V β del TCR amb una distribució que indica una manca d'estimulació antigènica prèvia (Garderet et al., 1998). En la taula 1.8 s'indica el percentatge d'algunes de les poblacions que constitueixen la SCU i la SPA.

Taula 1.8. Expressió de marcadors en cèl·lules de SCU i SPA en repòs.

Marcador	SCU %	SPA %	Ref
CD38/CD3 ^{a)}	94,1±2,4	49,9±10,6	D'Arena 98
CD57	1,0±1	9,5±5,8	“
CD2	72,1±8,9	80,0±5,2	“
CD5	58,2±11,9	77,2±5,8	“
CD45RA/CD3	91,3±10 (80,6±9.4)*	58,0±15 (97,2±7,8)	D'Arena 98 Hassan 97
CD25	9,8±5,2	8,6±5,3	Hodge 01
CD69	6,7±6	5,8±3	“
DR	5,5±4,9	6,6±3,7	“
CD152	3,9±1	2,9±3	“

a) Expressió del marcador respecte a la població CD3⁺ * MFI (mesura de la mitja de la intensitat de fluorescència de la molècula CD45RA)

1.4.3 RESPOSTA DELS LIMFÒCITS DE SANG DE CORDÓ

Existeix un gran ventall d'estudis que utilitzen diferents mecanismes d'activació i diferents tipus cel·lulars, com són les cèl·lules mononuclears, cèl·lules T i CD45RA per tal d'analitzar la capacitat de resposta així com l'expressió de molècules d'activació i producció de citoquines en la SCU (Resum en les Taules 1.9 i 1.10).

Els limfòcits T de SCU responen a una primera al·loestimulació però no proliferen en un segon encontre amb el mateix al·loantigen (Risdon et al., 1994; Risdon et al., 1995; Paiva et al., 1998). La no resposta es pot sobrepassar amb el tractament amb PMA i ionomicina o altes dosis d'IL2, però no es sobrepassa malgrat hi hagi una activació del TCR i coestimulació, suggerint un defecte en la via de senyalització de Ras (Porcu et al., 1998). Recentment s'ha demostrat que davant d'una l'al·loestimulació utilitzant cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits, les cèl·lules T de SCU presenten el doble de cèl·lules en divisió que les de SPA (Matthews et al., 2000).

La resposta de les cèl·lules T de SCU i SPA a PHA en cultius de cèl·lules mononuclears és similar en termes de proliferació, morfologia, expressió de CD25 i DR o percentatge de cèl·lules en fase S i producció d'IL2 (Gerli et al., 1989; Pirenne-Ansart et al., 1995; D'Arena et al., 1998b). Les cèl·lules T de SCU presenten menys resposta a anti-CD2 (Gerli et al., 1989; Pirenne-Ansart et al., 1995) i la coestimulació amb anti-CD28+anti-CD2 incrementa els nivells de proliferació de les cèl·lules T de SCU, així com els nivells de NF-kB i IL2, però segueixen sent inferiors als nivells observats en la SPA (Hassan et al., 1995). El defecte de les cèl·lules T de SCU a activar-se amb anti-CD2 es pot sobrepassar per la incorporació de PMA, petites quantitats de cèl·lules accessòries autòlogues, al·logèniques adultes o per IL1 (Gerli et al., 1989).

Davant l'estimulació amb anti-CD3, s'ha trobat una diferent resposta de les cèl·lules en funció del cultiu utilitzat per mesurar la resposta (Gerli et al., 1989; Pirenne-Ansart et al., 1995; Risdon et al., 1995). El fet que les cèl·lules T de SCU responen a PMA i iònofor de calci, suggereix que el defecte en la resposta a anti-CD3, estaria associat a un defecte en la senyal d'activació per TCR de les cèl·lules T de SCU per sobre de la PLC γ 1 (Bertotto et al., 1990; Miscia et al., 1999). Sembla que les cèl·lules T de SCU presenten menys activació de la PLC γ 1, baixos nivells de Lck i ZAP-70 i baixos nivells de NFAT1 comparat amb les de SPA (Kadereit et al., 1999). També hi ha

INTRODUCCIÓ

diferents patró d'expressió de les isoformes de PLC γ 1 entre les cèl·lules T de SCU i SPA. La PLC β 1 i δ 1 s'expressa més en SCU mentre que la β 2 i γ 1 s'expressa més en SPA i en canvi, es troba igual expressió per δ 2 i γ 2 (Miscia et al., 1999).

Les cèl·lules T neonatals produeixen menys IL2, després d'una activació amb cèl·lules dendrítiques, anti-CD3 i anti-CD2 (Gerli et al., 1989; Pirenne-Ansart et al., 1995; Matthews et al., 2000) malgrat que la producció d'IL2 de SCU sigui similar a SPA quan s'incorpora PMA al cultiu de anti-CD2+anti-CD28, suggerint que la maquinària de producció d'IL2 en SCU seria correcte (Hassan and Reen, 1997). De totes maneres existeixen resultats contradictoris en la literatura, doncs destaca un estudi on s'observa una superior translocació al nucli de NF- κ B en les cèl·lules de SCU comparades amb les cèl·lules de SPA després d'una activació amb PMA+ionomicina (Kilpinen et al., 1996).

Les cèl·lules de cordó semblen més susceptibles a la tolerància induïda per Superantígens, sent un fenomen inherent al propi SCU i no dependent de factors externs. Així enfront a Superantígens, com TSST-1 o SEA, SCU i SPA presenten una capacitat similar per respondre, però la reestimulació amb TSST-1 porta a un estat de no resposta només a les cèl·lules de SCU i a una baixa producció d'IL2 i IL4 (Takahashi et al., 1995).

INTRODUCCIÓ

Taula 1.9. Capacitat de resposta de les cèl·lules mononuclears (MNC) i T de SCU i SPA.

CULTIU/ESTÍMUL	Tipus cel·lular	Mesura	SCU	SPA	Ref
anti-CD3	MNC	cpm	6000	21000	Gerli 89
anti-CD2	“	“	49000	52000	“
PHA	“	“	120000	100000	“
anti-CD3	T	cpm	45391	29564	Risdon 94
anti-CD3 (soluble)	T	cpm	2761	38820	Miscia 99
PMA+ionomicina	“	“	31916	33309	“
PHA	MNC	IFN γ (U/ml)	<1	760	Pirenne 95
anti-CD3	“	“	<1	250	“
anti-CD2	“	“	<1	760	“
PHA	“	IL2 (U/ml)	35	47	“
anti-CD3	“	“	<1	22	“
anti-CD2	“	“	<1	15	“
PMA+ionomicina	MNC	IL2 (%posit)	8	39	Chambers 98
	“	IL4	1	11	“
	“	IFN γ	7	54	“
	“	TNF α	9	54	“
PHA	MNC	DR+(%posit)	40,3 \pm 10	42,1 \pm 5,5	Arena 98
	“	CD25+(%posit)	44,3 \pm 55,8	55,8 \pm 16	“
	“	fase-S(%posit)	10 \pm 1	9 \pm 5	“
Al·loantigen	T	pèrdua CFSE	56%	27%	Mathews 00
anti-CD3	T enr.	IL2(U/ml)	170-1888	ND	Demeure 94
anti-CD2	T	IL2 (U/ml)	0,1-0,2	6,5-7	Gerli 89
anti-CD2+PMA	“	“	8-8,4	6,8-7,9	“
anti-CD2+IL1	“	“	5-6,4	6-7,2	“
TSST-1 (reestimulació)	T	IL2 (U/ml)	40	300	Takahashi 95
PHA	T	IL2 (U/ml)	0,2 \pm 0,4	1,0 \pm 2,1	Mathews 00
	“	IFN γ (pg/ml)	<1	620 \pm 988	“
					“
Cèl·lules dendrítiques al·logèniques	T	IL2 (U/ml)	0,7 \pm 1,0	4,6 \pm 3,9	“
	“	IFN γ (pg/ml)	191 \pm 166	257 \pm 130	“

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules T neonatals de SCU amb coestimulació produeixen elevats nivells d'IL2, IFN γ i TNF β i baixos nivells d'IL4 i IL13 (Delespesse et al., 1998; Ohshima et al., 1998). A més de produir IL2, les cèl·lules *naive* de cordó activades amb anti-CD3 immobilitzat o cèl·lules CD45RA⁺ activades amb anti-CD3 soluble en presència de cèl·lules accessòries, poden produir LT α 3 i TNF α , (Ohshima et al., 1999). L'activació amb OKT3+coestimulació també induïx la producció d'IL10 pels limfòcits de SCU, però no pels limfòcits adults (Rainsford and Reen, 2002).

Les cèl·lules *naive* de SCU i SPA arriben a una resposta similar quan se les activa amb anti-CD2+PHA, IL-2+PHA i anti-CD2+APCs, però en canvi, s'ha demostrat la major capacitat de les cèl·lules de SCU a respondre a IL4. Així, l'activació amb IL4, IL4+anti-CD2 o IL4+PHA induïx la proliferació de les cèl·lules de SCU però no a les de SPA (Early and Reen, 1996).

Estudis *in vivo* indiquen que en el moment de néixer, gairebé tots els nens presenten una resposta polaritzada a Th2 cap als al·lèrgens presents en l'ambient maternal (Prescott et al., 1998). Això es pot explicar per la presència de productes en la placenta com progesterona, IL4, IL10 i PGE2 associats amb una resposta de tipus Th2. També amb una estimulació *in vitro* en condicions neutres, les cèl·lules T neonatals tendeixen preferentment a desenvolupar-se a Th2 efectores (Yang et al., 1995). Així les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU activades amb PMA+ionomicina produeixen menys IFN γ que les de SPA possiblement com a conseqüència d'hipermetilacions en el promotor de l'IFN γ de les cèl·lules *naive* de cordó, que evitaria la unió de factors nuclears a aquest promotor (Pirenne-Ansart et al., 1995; Matthews et al., 2000; White et al., 2002).

Les cèl·lules de SCU presenten una apoptosi espontània superior que SPA i citoquines com IL2 la redueix i arriba fins i tot a no detectar-se apoptosi en presència d'IL4 i IL7 (Hassan and Reen, 1998). Això, podria estar relacionat amb el fet que les cèl·lules en repòs *naive* de cordó expressen l'IL7R (receptor de la IL7) (Webb et al., 1997) i la seva expressió es va perdent a mesura que les cèl·lules *naive* responen a aquesta citoquina (Hassan and Reen, 1998).

Una única activació via TCR condueix a apoptosi a cèl·lules neonatals de ratolí però no a les adultes. Aquesta mort pot ser evitada per la IL2 en excés però fent que les

INTRODUCCIÓ

cèl·lules així rescatades no siguin funcionals. Només el rescat amb IL6 permet a les cèl·lules de respondre a un segon estímul (Adkins et al., 1996). Cèl·lules *naive* de ratolí activades amb anti-TCR moren després de 18 hores i aquesta mort pot ser inhibida per anti-CD28 o bé per IL6, mentre que s'incrementa la mort en presència d'IL4 i IL7 (Kishimoto and Sprent, 1999).

Taula 1.10.S'indica un resum de la capacitat de resposta dels limfòcits *naive* de SCU i SPA.

CULTIU/ESTIMUL	Tipus cel·lular	Mesura	SCU	SPA	Ref
anti-CD2	<i>Naive</i> T	cpm	<100	1000	Hassan 97
anti-CD2+anti-CD28	“	“	50000	80000	“
anti-CD2+anti-CD28+PMA	“	“	52000	70000	“
IL4	CD4CD45RA	cpm	10000	<1000	Early 96
anti-CD2+IL2	“	“	<1000	<1000	“
anti-CD2+IL4	“	“	27000	<1000	“
PHA+IL2	“	“	14000	21000	“
PHA-IL4	“	“	19000	<1000	“
anti-CD2	<i>Naive</i> T	IL2 (pg/ml)	<10	<10	Hassan 97
anti-CD2+anti-CD28	“	“	<10	1000	“
anti-CD2+anti-CD28+PMA	“	“	6500	8500	“
PMA+ionomicina	CD4CD45RA	IFN γ (x10 ³ pg/ml)	8,4-9,0	190-330	White 02
(PHA+IL2)+(PMA+ionomicin a)	CD4CD45RA	IL2 (U/ml)	263±63	141±126	Early 99
	“	IFN γ (U/ml)	5,5±1	34±30	“
	“	IL4 (U/ml)	<0,03	<0,03	“
anti-CD3+fibroblastes (B7.1)	CD45RA	IL2 U/ml	70		Oshima 99
	“	TNF α (ng/m)	2,5		“
	“	IL13 (ng/ml)	1,5		“
	“	LT α (ng/ml)	100	20	“
	“	IFN γ (ng/ml)	3		“
	“	IL4 (ng/ml)	1,7		“
anti-CD3+IL2	<i>Naive</i> T	IL10 (ng/ml)	2	<0,1	Rainsford 02
anti-CD3+IL2+anti-CD28	“	IL10 (ng/ml)	2,3	<0,1	“

1.4.3.1. EXPRESSIÓ DE MARCADORS D'ACTIVACIÓ

L'estudi de l'expressió de diferents marcadors de superfície en les cèl·lules de SCU també s'ha realitzat seguint diversos protocols d'estimulació en diferents poblacions cel·lulars donant com a conseqüència algunes vegades a resultats contradictoris (Resum en la taula 1.11).

Després d'una activació amb PHA i anti-CD2, les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU adquireixen la molècula CD45RO més ràpidament que les CD4⁺CD45RA⁺ de SPA, indicant que les cèl·lules *naïve* de SCU són capaços d'una resposta eficient *in vivo* (Early and Reen, 1996).

Quan les cèl·lules mononuclears de SCU i SPA són estimulades amb anti-CD3, la cèl·lules T de SCU mostren una expressió de CD40L (CD154) amb una cinètica diferent a les SPA. En canvi, si es deplecciona de cèl·lules B i monòcits, els limfòcits T de SCU i SPA estimulats amb anti-CD3 mostren uns patrons d'expressió de CD40L similars (Elliott et al., 2000).

Cèl·lules T de SCU activades amb PMA+ionomicina, no expressen CD40L, fet que podria explicar la manca de producció d'immunoglobulines en l'època neonatal (Brugnoni et al., 1994; Durandy et al., 1995; Nonoyama et al., 1995). Malgrat això, un altre treball demostra nivells similars de CD40L entre cèl·lules T de SCU i SPA després de l'activació amb anti-CD3 (MoAb 64.1) (Splawski et al., 1996). També activant amb Superantígens (SEA, SEB i TSST), en presència de cèl·lules de Langerhans madures es demostra que les cèl·lules *naïve* de SCU i SPA poden expressar baixos nivells de CD40L mentre que bloquejant el CD40 amb un anticòs anti-CD40, a les 12 hores de cultiu fins un 40% de les cèl·lules són positives per CD40L (Ludewig et al., 1996).

S'ha demostrat que les cèl·lules T de SCU poden expressar CD25 i DR al ser activades amb ConA i PHA i anti-CD3 immobilitzat en la placa (Lucivero et al., 1996; Webb et al., 1997). Després d'una activació amb anti-CD2 o anti-CD2+anti-CD28, els limfòcits *naïve* de SCU expressen CD25 però amb menor grau que els limfòcits de SPA (Hassan and Reen, 1997). Les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU activades amb anti-CD3 immobilitzat en cèl·lules transfectades amb CD32/B7.1 poden expressar OX40, assolint el pic d'expressió a les 48 hores de cultiu. La coestimulació via OX40 s'ha vist

INTRODUCCIÓ

que podria augmentar la diferenciació a cèl·lules productores d'IL4 (Ohshima et al., 1998).

Alguns autors han observat un major percentatge de cèl·lules T en repòs CD28⁺ en la SCU que en la SPA. A més a més, quan les cèl·lules s'estimulen amb anti-CD3, CD28 s'expressa amb major intensitat en les cèl·lules T de SCU que en SPA (Elliott et al., 1999).

Recentment s'ha descrit que els limfòcits T de SCU presenten menys expressió de CTLA-4 tant a nivell de proteïna com de mRNA (Miller et al., 2002). La baixa expressió de CTLA-4 s'ha relacionat amb la baixa expressió de NFAT que s'ha demostrat en cèl·lules T de SCU, així com en la seva possible regulació per certes citokines com l'IFN γ (Tivol et al., 1995; Alegre et al., 1998; Kadereit et al., 1999; Kato and Nariuchi, 2000). L'expressió de CTLA-4 és menor en les cèl·lules de SCU que en SPA quan s'estimulen amb PMA+ionomicina i és fins i tot indetectable en les cèl·lules T de SCU estimulades amb anti-CD3. En canvi, l'expressió intracel·lular de CTLA-4 és equivalent en els limfòcits de SCU i SPA estimulats amb PMA+ionomicina (Elliott et al., 1999).

La manca d'expressió de Fas-L així com baixos nivells de CD25 també s'han observat quan els limfòcits T de SCU són activats amb anti-CD3 immobilitzat+anti-CD28 a les 16 hores de cultiu. Això podria demostrar una baixa capacitat de reaccionar contra les cèl·lules al·logèniques i per tant podria explicar en part la baixa incidència en GVHD observada en el trasplantament de SCU (Sato et al., 1999). En canvi, en un altre estudi, cèl·lules mononuclears de cordó estimulades amb PMA+ionomicina o amb anti-CD3, expressen elevats nivells de Fas-L, encara que menys nivells de Fas comparat amb SPA. Això podria indicar una alta capacitat d'induir apoptosi per part de les cèl·lules de SCU però una baixa capacitat de ser matades per la via Fas-Fas-L (Drenou et al., 1998).

INTRODUCCIÓ

Taula 1.11. Expressió de marcadors de superfície en SCU i SPA, després d'una activació.

CULTIU/ESTÍMUL	TIPUS CEL·LULAR	MESURA	SCU	SPA	Ref
PHA	MNC (CD3 ⁺)	CD25	84,8±11,1	56±14,1	Lucivero 96
	“	DR	30,25±3,9	59,7±12,3	“
Con A	“	CD25	87,5±9,5	69±6,4	“
	“	DR	19,1±5,7	49±7,4	“
anti-CD3 (soluble)	“	CD25	67,9±8	55,4±13,5	“
	“	DR	44,3±11,3	43,1±12,2	“
PMA+ionomicina	T	CD40L (%)	9	54	Nonoyama 95
	“	CD69 (%)	99,4	98,4	“
anti-CD3	T CD4	CD40L (%)	34,7±8.2	43,4±9	Splawski 96
anti-CD2	CD4CD45RA	CD25 (%)	9	20	Hassan 97
anti-CD2+anti-CD28	“	CD25 (%)	16	51	“

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

Des de que en l'any 1989 es va realitzar el primer trasplantament de cèl·lules hematopoiètiques procedents de la sang de cordó umbilical a un pacient amb anèmia de Falconi, ha anat creixent l'interès per les característiques immunològiques de la sang de cordó umbilical. Una de les principals avantatges que presenta la SCU és la baixa incidència en GVHD que es desencadena després del trasplantament entre pacients no emparentats. Això ha donat lloc a nombrosos estudis per determinar la capacitat immunològica de les cèl·lules que componen la sang de cordó umbilical. Fins el moment tots els treballs han demostrat que els limfòcits T de SCU presenten un fenotip $CD45RA^+$ que indicaria en un principi la manca d'exposició prèvia a antígens. En un principi, aquesta característica ha comportat que es considerés als limfòcits *naive* de SCU com immunològicament immadurs i amb una resposta peculiar enfront a diversos estímuls.

En molts treballs citats l'ús de diferents condicions experimentals i sistemes d'activació donen lloc a resultats no comparables i a vegades fins i tot contradictoris. Per una banda, cultius heterogenis amb cèl·lules mononuclears o utilitzant cèl·lules T sense separar comporten una difícil interpretació dels resultats, ja que l'activitat de les cèl·lules accessòries i la proporció de les subpoblacions T entre SCU i SPA no són iguals. Per altra banda, algunes tècniques de separació comporten la pèrdua selectiva de poblacions cel·lulars o produeixen perturbacions funcionals. A part, l'ús de diversos agents per activar les cèl·lules que intervenen a diferents nivells de la cascada de senyalització poden donar lloc a resultats difícils d'interpretar.

A més, en molts estudis s'ha utilitzat indiscriminadament el terme *naive* per designar tots aquells limfòcits que presenten el fenotip $CD45RA^+$ independentment de que el seu origen fos la sang de cordó umbilical o la sang perifèrica d'adult, sense considerar que les cèl·lules *naive* de SCU es comporten com emigrants tímics recents.

Per tot això, l'objectiu general d'aquesta tesi ha estat caracteritzar amb detall la població limfocitària majoritària de la sang de cordó umbilical, els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$. Amb aquesta finalitat s'ha comparat l'estat funcional i la capacitat de resposta dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de sang de cordó umbilical i sang perifèrica d'adult, utilitzant aquesta població altament purificada per evitar distorsions de resultats per la presència d'altres cèl·lules mononuclears que també formen part de la sang.

En concret els objectius han estat:

OBJECTIUS

1.- Avaluar el fenotip dels limfòcits de SCU, comparant: a) la composició de les diferents subpoblacions de SCU i SPA; i b) els nivells d'expressió de diferents antígens de superfície que caracteritzen els limfòcits T.

2.- Estudiar el comportament dels limfòcits *naive* de SCU mantinguts en cultiu sense cap estimulació externa i comparar-lo amb els de SPA.

3.- Determinar la capacitat d'activació i expansió dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ davant un estímul via TCR/CD3 en absència o presència de segona senyal (anti-CD28 o IL-2). Aquesta anàlisi inclou aquells esdeveniments propis d'una activació limfocitària, com són: canvis morfològics, expressió de marcadors d'activació, proliferació i producció de citoquines.

4.- Analitzar la inducció d'altres processos cel·lulars que podrien donar-se de forma diferencial en els limfòcits de SCU després d'activació via TCR, com l'apoptosi.

5.- Estudiar els nivells proteics de les molècules implicades en la cascada de transducció de senyal via TCR i comparar els canvis que es donen en els perfils de fosforilació en tirosines durant els esdeveniments primerencs de l'activació dels limfòcits *naive* de SCU i SPA via TCR/CD3.

3.1. MOSTRES CEL·LULARS

La sang perifèrica d'adult es va obtenir de voluntaris sans del Banc de sang de l'Hospital Sant Pau i la sang de cordó umbilical de donants del Banc de cordó umbilical de Barcelona.

El material amb el que es va treballar principalment van ser cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ purificades i en determinats estudis, també es van fer servir cèl·lules mononuclears i cèl·lules T purificades, que provenien de sang de cordó i de sang perifèrica.

3.1.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS

L'obtenció de les cèl·lules T i $CD4^+CD45RA^+$ purificades comporta una primera separació de les cèl·lules mononuclears (MNC) presents en la sang (s'indica en l'esquema 3.1 un resum del protocol seguit). Les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ representen aproximadament el 80 % dels limfòcits T presents en la sang de cordó umbilical i aproximadament el 45 % en la sang perifèrica d'adult (D'Arena et al., 1998b).

Per obtenir les MNC, es va utilitzar un gradient de densitat amb una solució de ficoll (Lymphoprep) que conté: diatrizoate sòdic (9,1 % w/v) i polisacàrid (5,7 % w/v) (Boyum, 1968).

Tot el protocol que es descriu a continuació es va realitzar en condicions d'esterilitat. Es va procedir de la següent manera:

1. Diluir la sang total amb sèrum fisiològic (SF) a raó de 3/4 de sang per 1/4 de SF. Barrejar.
2. Afegir 15 ml de ficoll, Lymphoprep (Oslo, Noruega) a un tub de 50 ml.
3. Dipositar la sang diluïda lentament sobre el ficoll sense trencar el gradient.
4. Centrifugar durant 30 minuts, a 2000 rpm (Beckman TJ-6), a temperatura ambient (TA). Recuperar la interfase cel·lular on es localitzen les cèl·lules mononuclears (limfòcits i monòcits principalment) amb l'ajuda d'una pipeta pasteur estèril.
5. Lisar els eritròcits amb H_2O estèril durant uns 60 segons. Després de la lisi, rentar les cèl·lules amb SF i resuspendre amb el tampó de marcatge (BT), prèviament passat per un filtre de $0,22 \mu m$, per esterilitzar-lo.
6. Recompte cel·lular fent una dilució 1/40 amb líquid Turck, utilitzant una

càmara de Neubauer i marcar les cèl·lules amb anticossos anti-CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Coulter), per determinar per citometria de flux el percentatge de limfòcits totals i de limfòcits CD3⁺ que hi ha a la mostra (apartat 3.3 dels Materials i mètodes). Aquests marcatge es realitza per tenir una idea aproximada dels limfòcits CD3⁺ que s'obtindran després de la purificació.

3.1.2. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES T CD3⁺

Per obtenir les cèl·lules T es va utilitzar el Pan T Cell Isolation Kit (Milteny Biotec). Consisteix en un mètode de selecció negativa per depleccionar les cèl·lules B, NK, cèl·lules dendrítiques, plaquetes i basòfils, utilitzant una barreja d'anticossos que estan conjugats amb un haptè. Aquest haptè serà reconegut en una segona incubació, per un anticòs anti-haptè que es troba conjugat amb unes microboles magnètiques. Les cèl·lules que queden així marcades són depleccionades de la mostra total al quedar retingudes a una columna magnètica (MidiMACS) situada en un suport magnètic.

El kit està format per:

Barreja d'anticossos conjugats amb haptens:

ANTICÒS MARCAT AMB HAPTÈ	POBLACIÓ CEL·LULAR RECONEGUDA
anti-CD11b (rata IgG _{2b})	marcador de granulòcits, monòcits i cèl·lules NK
anti-CD16 (ratolí IgM)	marcador de NK, granulòcits i macròfrags
anti-CD19 (ratolí IgG ₁)	marcador de cèl·lules B
anti-CD36 (ratolí IgG _{2a})	marcador monòcits i plaquetes
anti-CD56 (ratolí IgG _{2b})	marcador de NK

- Boles coloïdals conjugades amb anticossos monoclonals anti-haptè.

El protocol seguit fou:

1. Rentar les cèl·lules mononuclears amb el tampó BT, centrifugar durant 5 minuts a 1750 rpm a 4°C (Hermile Z400K) i eliminar el sobrenedant. Resuspendre el botó cel·lular amb 80 µl de tampó BT per cada 10⁷ cèl·lules totals.

2. Afegir al botó cel·lular 20 µl d'una barreja d'anticossos conjugats amb haptè per cada 10⁷ cèl·lules mononuclears totals.

3. Incubar durant 30 minuts en un bany de gel (6-12 °C). Posteriorment rentar les cèl·lules amb tampó BT. Resuspendre el botó cel·lular amb 80 µl del tampó BT per cada

10^7 cèl·lules totals i incubar 30 minuts amb 20 μ l de les microboles anti-haptè per cada 10^7 cèl·lules totals.

4. Rentar les cèl·lules amb el tampó BT i resuspendre el botó cel·lular amb 1 ml de tampó BT.

5. Posar la columna magnètica MidiMacs que té una capacitat màxima de 2×10^9 cèl·lules totals i 10^8 cèl·lules marcades magnèticament, en el suport magnètic dissenyat per Milteny per aquest fi, i hidratar-la amb 3 ml de tampó BT.

6. Filtrar les cèl·lules a través de xeringues que contenen llana de vidre esterilitzada per autoclau, per evitar que quedin restes cel·lulars. Les xeringues han estat preparades de la següent manera:

6.1. Rentar la llana de vidre amb alcohol.

6.2. Tallar petites quantitats de llana de vidre i introduir-la dins de xeringues de plàstic estèrils de 2 ml de volum.

6.3. Rentar les xeringues que contenen la llana de vidre durant 10 minuts amb H₂O destil·lada.

6.4. Autoclavar les xeringues que contenen la llana de vidre.

7. Passar les cèl·lules filtrades per la columna magnètica.

8. Recollir les cèl·lules que no queden retingudes en la columna en un tub de 50 ml situat en un bany de gel. Aquesta fracció correspon a les cèl·lules CD3⁺.

Una alíquota de la fracció recollida, es marca amb anticossos anti-CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Coulter) i s'avalua el grau de puresa obtingut per citometria de flux (apartat 3.3. dels Materials i mètodes). Es van descartar aquelles mostres que presentaven menys del 98% de cèl·lules T CD3⁺.

3.1.3. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES CD4⁺CD45RA⁺

De les cèl·lules T purificades segons l'apartat anterior, es va determinar el número total de cèl·lules CD45RO⁺ i CD8⁺ marcant les cèl·lules T CD3⁺ amb anticossos anti-CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Coulter) i anti-RO conjugat amb FITC (Caltag), per citometria de flux. Mitjançant una segona selecció negativa es van depleccionar les cèl·lules T que no eren CD4⁺CD45RA⁺ utilitzant simultàniament anticossos anti-CD8 (Caltag) i anti-CD45RO (Leinco Technologies), ambdós marcats amb biotina i utilitzant posteriorment estreptavidina conjugada amb microboles magnètiques.

MATERIALS I MÈTODES

Es va procedir de la següent manera:

1. Marcar les cèl·lules T prèviament rentades amb tampó BT, amb anti-CD8 (5 µl per 10⁶ cèl·lules CD3⁺) i amb anti-RO (10 µl per 10⁶ cèl·lules RO⁺) ambdós marcats amb biotina. Incubar durant 30 minuts en un bany de gel.

2. Rentar amb el tampó BT. Resuspendre el botó cel·lular amb 80 µl de tampó BT i incubar durant 30 minuts amb estreptavidina marcada amb microboles (Streptavidin Microbeads Miltenyi Biotec). Rentar de nou i resuspendre el botó cel·lular amb 500 µl del tampó BT.

3. Passar les cèl·lules per una nova columna magnètica, MidiMacs, prèviament hidratada amb 3 ml del tampó BT.

4. Deixar fluir les cèl·lules i recollir en un tub de 50 ml aquelles que no queden retingudes.

5. Contar les cèl·lules que no han quedat retingudes i determinar el seu fenotip per citometria de flux utilitzant anticossos anti-CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 i anti-RO-FITC. El grau de puresa obtingut fou de: cèl·lules CD3⁺ > 98%, CD4⁺ > 98%, CD45RA⁺ > 98%, CD45RO⁺ < 0.5% i CD8⁺ < 0.5%, en les mostres utilitzades per l'estudi.

Tampó BT:

PBS	
EDTA	2mM
BSA	0.5%
Filtració per 0,22 µm per esterilitzar.	

PBS:

NaCl	0,15 M
------	--------

Tampó fosfat:

Fosfat bisòdic	0,39 M
----------------	--------

Fosfat monopotàssic	0,11 M
---------------------	--------

pH=7,2

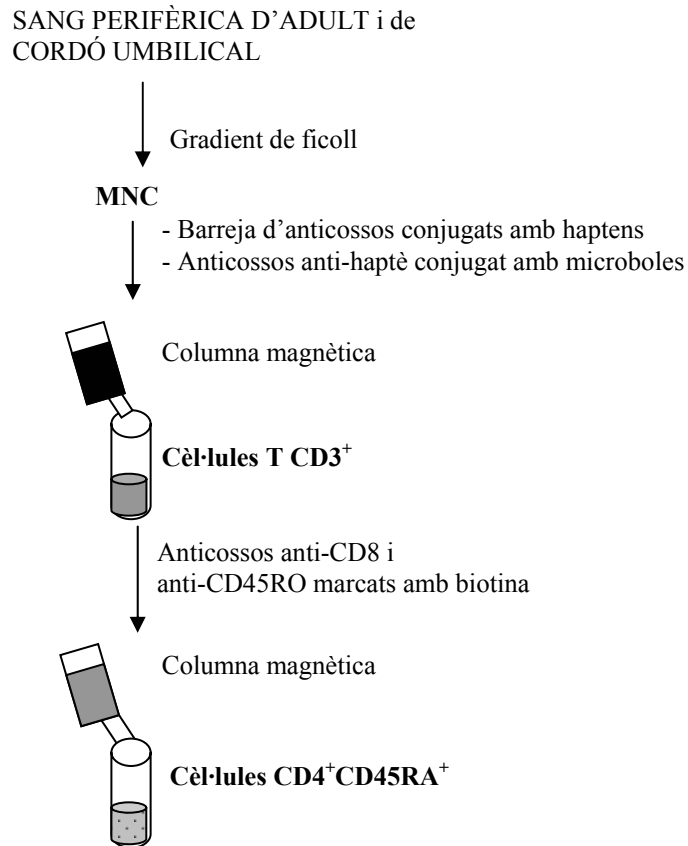
Líquid Turck:

Àcid acètic	10 %
-------------	------

Solució de Blau de Metilè	1%
---------------------------	----

Esquema 3.1. Protocol de purificació de les cèl·lules CD3⁺ i CD4⁺CD45RA⁺.

MATERIALS I MÈTODES



3.2. CULTIUS CEL·LULARS

3.2.1. ACTIVACIÓ CEL·LULAR

Les cèl·lules T es poden activar amb diferents agents: agents farmacològics, anticossos anti-CD3/TCR, enterotoxines i lectines.

Encara que és possible l'activació de les cèl·lules T amb anticossos anti-TCR/CD3 en solució durant el cultiu, aquesta activació depèn de l'entrecruament de l'anticòs amb el receptor Fc present en les cèl·lules accessòries. Aquest entrecruament alternativament es pot substituir enganxant l'anticòs a la placa de cultiu i per tant es poden activar les cèl·lules T sense la presència de les cèl·lules presentadores. L'anticòs anti-CD3 (OKT3) es pot emprar unit a placa de cultiu, donat que les immunoglobulines tenen la propietat d'enganxar-se al plàstic, si se les deixa uns 90 minuts a 37 °C.

Com que vam observar que la sensibilització de la placa de cultiu directament amb anti-CD3 diluït en PBS no era suficient per induir una activació efectiva de les

MATERIALS I MÈTODES

cèl·lules (proliferaió, canvis morfològics), vam procedir a presensibilitzar les plaques de cultiu de pou pla (Nunclon) amb immunoglobulines (Igs) de conill anti-ratolí (Dako) donat que l'anticòs anti-CD3 és d'origen murí, a una concentració final de 5 µg/ml diluïdes en PBS, segons el mètode descrit per Ellen M Palmer et al. (Palmer et al., 2001). Posteriorment, es va unir a la placa els anticòssos ratolí anti-CD3 humà (OKT3, ATCC: American Tissue Culture Collection) i ratolí anti-CD28 humà (Caltag). Tot el procediment es va realitzar en condicions d'esterilitat treballant en càmera de flux laminar.

El protocol seguit fou:

1. Afegir Igs conill anti-ratolí (5 µg/ml) a cada pou de la placa. Depenent del tamany del pou s'afegiren diferents volums de la concentració d'Igs per sensibilitzar-la:

Nº de pous	Volum
96	125 µl
48	300 µl
24	780 µl
6	3,75 ml

2. Incubar tota la nit a 4 °C, tapant la placa per evitar l'evaporació.

3. Rentar tres vegades els pous amb SF i incubar a TA durant 1 hora amb els anticòssos corresponents: OKT3 ratolí anti-Igs humanes (a una concentració final de 0,7 µg/ml); anti-CD28 (Caltag) ratolí anti-humà (concentració de 0,5 µg/ml) filtrat per 0,22 µm per esterilitzar.

4. Rentar tres vegades la placa amb SF i incubar les cèl·lules (MNC, T o CD4⁺CD45RA⁺) ajustades a una concentració de 1,25 x 10⁶ /ml, amb medi complet.

5. A determinats pous se'ls incorpora interleuquina 2 recombinant humana (IL2) (Boehringer Mannheim Biochemica) a una concentració final de 50 U/ml.

6. Mantenir les cèl·lules en una càmera de cultiu (5 % CO₂, 37 °C i 95 % humitat, NUAIRE) durant diferents temps, depenent dels paràmetres que es vulguin analitzar: 24, 48, i 72 hores.

Medi complet:

RPMI

sèrum fetal boví 10%

penicil·lina 100 U/ml

estreptomicina	100 µg/ml
L-glutamina	2 mM

3.2.2. PROLIFERACIÓ

Per quantificar l'efecte de diferents estímuls sobre la proliferació cel·lular, es pot calcular el percentatge de cèl·lules que entren en cicle com a resposta a un estímul. El paràmetre que es mesura és la síntesi de DNA. Com que en el medi de cultiu s'ha afegit Timidina tritiada [³H], les cèl·lules al sintetitzar el nou DNA incorporaran timidina-[³H], a més de la timidina no marcada que ja estava present en el medi. La incorporació a la cadena de DNA d'una timidina-[³H], bloqueja el procés de síntesi de manera que les cèl·lules repliquen el DNA però no es segueixen dividint. La incorporació de timidina-[³H] serà proporcional a la síntesi total de DNA que s'hagi donat i es mesura en un comptador de centelleig després de descartar aquella timidina tritiada no incorporada (Curso de formació de supervisors. Unitat de protecció radiològica-OSSMA. Barcelona 2002).

Es va procedir de la següent manera:

1. Cultivar les cèl·lules en plaques de cultiu amb els diferents estímuls d'activació i incorporar a les 24, 48 o 72 hores timidina tritiada [³H], a una concentració final de 1 µCi de timidina-[³H] (25mCi/mmol d'activitat específica, Amersham).

2. Filtrar els cultius utilitzant l'aparell de filtració (SKATRONAS) després de 8 hores. Mesurar la quantitat de radiació beta emesa per cada filtre (FilterMat. Skatron), afegint 1 ml de líquid de centelleig (OptiPhase "Hisafe" Wallac) durant 1 minut en un comptador de centelleig (Tri-Carb 2100TR Packard).

Els resultats s'expressen en cpm (comptes per minut).

Per comprovar que la incorporació de timidina-[³H], es corresponia amb un increment en el número de cèl·lules presents en el pou de cultiu, es va procedir a realitzar el comptatge cel·lular de les cèl·lules activades segons apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes. Es va procedir de la següent manera:

1. Després de 72 hores de cultiu, recuperar totes les cèl·lules del pou de cultiu, amb un volum final de 300 µl de medi (200 µl de les cèl·lules cultivades més 100 µl de PBS).

2. Utilitzar la tècnica de citometria de flux, per comptar en un temps limitat de 50 segons, totes les cèl·lules que es troben en la regió limfocitària en un histograma FS/SS.

3.3. CITOMETRIA DE FLUX

El terme citometria serveix per definir la mesura de les característiques físiques i químiques de les cèl·lules. Quan aquesta mesura es realitza amb cèl·lules inmerses en un flux que atravesava una càmera on incideix un raig de làser, s'anomena citometria de fluxe (Shapiro 1988). Les característiques físiques i químiques de les cèl·lules es classifiquen en paràmetres extrínsecs (antígens de superfície) o intrínsecs (tamany, morfologia cel·lular i rugositat citoplasmàtica), depenent de si es requereixen o no reactius per analitzar-los. Els paràmetres Forward Scatter (FS) i Side Scatter (SS) permeten diferenciar les cèl·lules pel seu tamany i per la seva rugositat, respectivament. D'aquesta manera es pot identificar dins d'una mostra de cèl·lules mononuclears, els limfòcits, monòcits, polimorfonuclears, eritròcits i restes cel·lulars. La principal aplicació immunològica de la citometria de flux, és la utilització d'anticossos que reconeixen antígens de superfície per identificar les diferents poblacions i subpoblacions limfocitàries.

3.3.1. MARCATGE DE LES CÈL·LULES DE LA SANG

Per marcar les cèl·lules presents en la sang sense separar es va procedir de la següent manera:

1. Marcar 100 µl de la sang amb els anticossos corresponents durant 10 minuts a TA.

2. Passar les mostres pel TQ-prep (Coulter) que és un aparell que permet de forma automàtica, lisar els eritròcits, establir el pH i fixar les cèl·lules. L'aparell TQ-prep dispensa:

2.1. Solució A: Àcid fòrmic (lisa els eritròcits).

2.2. Solució B: Carbonat sòdic, clorur sòdic i sulfat sòdic (estabilitza el pH i l'osmolaritat).

2.3. Solució C: Paraformaldehid (fixa les cèl·lules).

Els anticossos utilitzats foren:

ESPECIFICITAT	MARCA	μl
Anti-CD45-FITC/CD4-RD1/CD8- ECD/CD3-PC5	Coulter	3 μl
Anti-CD16	Coulter	3 μl
Anti-CD45-FITC	Coulter	3 μl
Anti-CD3-PC5	Coulter	3 μl

3. Analitzar les poblacions cel·lulars marcades, seleccionant prèviament la població limfocitària en un histograma de dues dimensions lineal mitjançant els paràmetres FS i SS (360 i 100 volts respectivament, amb uns guanys de 2 i 50, respectivament).

3.3.2. MARCATGE DE CÈL·LULES PURIFICADES EN SUSPENSÍO

El protocol que es va seguir per marcar cèl·lules en cultiu o bé en suspensió després de la seva purificació fou:

1. Rentar les cèl·lules amb tampó de marcatge.
2. Marcar les cèl·lules durant 15 minuts en gel amb la dilució corresponent de l'anticòs monoclonal utilitzat.
3. Rentar les cèl·lules amb tampó de marcatge.
4. Resuspendre el botó cel·lular amb 500 μl de tampó de marcatge.
5. Analitzar les poblacions cel·lulars marcades, seleccionant prèviament la població limfocitària en un histograma de dues dimensions lineal mitjançant els paràmetres FS i SS (360 i 100 volts respectivament, amb uns guanys de 2 i 50 respectivament).

Com a controls negatius de les tincions, es van incubar les cèl·lules amb un anticòs irrellevant però del mateix isotip que l'anticòs utilitzat per marcar-les. Aquests controls permeten de situar els eixos per determinar el límit entre positivitat i negativitat. El número de cèl·lules que es van analitzar fou d'entre 2500 i 5000.

Tampó de marcatge:

PBS	
Sèrum fetal boví (FCS)	5 %
Azida sòdica	0,1 %

3.3.3. EXPRESSIÓ DEL TCR/CD3

Un dels primers processos que es donen després de l'activació dels limfòcits T via el seu TCR és la desaparició progressiva del complex TCR/CD3 de la superfície cel·lular (Viola and Lanzavecchia, 1996).

El protocol seguit per analitzar aquest fenomen fou:

1. Presensibilitzar i sensibilitzar la placa de cultiu segons els descrit en l'apartat 3.2.1. dels Materials i mètodes.

2. Rentar la placa sensibilitzada amb l'anticòs tres vegades amb SF.

3. Ajustar les cèl·lules a una concentració de 2×10^6 cèl·lules/ml amb medi RPMI complet. Deixar a TA, fins que les cèl·lules s'atemperin i dipositar 200 µl de les cèl·lules a la concentració determinada

4. Incubar les cèl·lules a diferents temps. Passat el període d'incubació recuperar les cèl·lules, rentar 2 vegades els pous amb 150 µl de PBS fred per recuperar totes les cèl·lules.

5. Rentar dues vegades les cèl·lules amb PBS i posteriorment marcar-les amb:

anti-CD3-PC5 (Coulter Clone) 3 µl

anti-CD4-FITC (Caltag) 3 µl

anti-CD45RA-PE (Caltag) 4 µl

durant 10 minuts en un bany de gel.

A continuació s'indica la combinació d'anticossos utilitzats per marcar les diferents subpoblacions limfocitàries:

CULTIU CEL·LULAR	COMBINACIÓ D'ANTICOSSOS
MNC	Anti-CD3/anti-CD4/anti-CD45RA
T	Anti-CD3/anti-CD4/anti-CD45RA
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	Anti-CD3

6. Rentar i analitzar pel citòmetre de flux l'expressió del CD3 en les diferents

subpoblacions cel·lulars, seleccionant la població limfocitària segons el descrit en l'apartat 3.3.1 dels Materials i mètodes.

Els valors de disminució de l'expressió en superfície de la molècula de CD3 es calculen de la següent manera:

$$\frac{\text{MFI amb anti-CD3} - \text{MFI basal}}{\text{MFI basal}} \times 100$$

Sent MFI (mitja de la intensitat de fluorescència, una aproximació a la mesura de la quantitat de molècules CD3 presents en la superfície d'una cèl·lula) considerada com el sumatori de totes les intensitats multiplicat pel comptatge cel·lular en cada punt i dividit per l'àrea total. En la fórmula usada per calcular la disminució de l'expressió de CD3, s'indica com:

- MFI amb anti-CD3= el valor de la MFI de l'expressió del CD3 en les cèl·lules activades amb anti-CD3.
- MFI basal= valor de la MFI de l'expressió del CD3 en les cèl·lules no activades.

3.3.4. EXPRESSIÓ DE MARCADORS DE SUPERFÍCIE

Existeixen molècules de superfície que estan relacionades amb l'activació cel·lular (CD25, CD69, CD28), diferenciació (CD45RO), apoptosi (CD95), capacitat de col·laborar amb les cèdules B (CD154 o CD40L) o de derivar a cèl·lules amb fenotip Th1 o Th2 (CD134 o OX40). L'estudi de la seva expressió dona una valuosa informació sobre l'estat funcional de les cèl·lules. Mitjançant la utilització d'anticossos monoclonals que reconeixen aquestes molècules es va determinar el seu nivell d'expressió per citometria de flux segons apartat 3.3.

A partir de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ cultivades segons el descrit en l'apartat 3.2.1. es va procedir de la següent manera:

1. Recuperar les cèl·lules de la placa de cultiu després dels temps determinats i rentar-les amb tampó de marcatge (descrit en l'apartat 3.3.2 dels Materials i mètodes).
2. Eliminar el tampó de marcatge i resuspendre el botó cel·lular. Marcar les cèl·lules amb els anticossos corresponents durant 10 minuts en un bany de gel. Els

MATERIALS I MÈTODES

anticossos que es van utilitzar van ser:

ESPECIFICITAT	ESPÈCIE	MARCA	ISOTIP	CONJUGAT amb	Quantitat d'Ab (μ l)/ 1×10^5 cèl·lules
CD25	Ratolí	Caltag	IgG ₁	PE	3
CD45RO	Ratolí	BD	IgG _{2a}	FITC	3
CD45RA	Ratolí	BD	IgG _{2b}	PE	3
CD69	Ratolí	Caltag	IgG _{1κ}	FITC	3
CD28	Ratolí	BD	IgG _{1κ}	FITC	3
Fas	Ratolí	Caltag	IgG ₁	PE	3
CD154	Ratolí	BD	IgG _{1κ}	FITC	5
CD134	Ratolí	BD	IgG _{1κ}	FITC	5

La major part dels marcadors es van analitzar individualment, en certs casos per marcar simultàniament les cèl·lules es va realitzar algunes combinacions d'anticossos: anti-CD45RA+anti-CD45RO; anti-CD28+anti-CD95. La resta dels marcadors es van analitzar individualment.

3. Rentar les cèl·lules amb tampó de marcatge i afegir 500 μ l d'aquest tampó, vòrtex i analitzar per citometria de flux segons apartat 3.3 dels Materials i mètodes.

3.3.5. APOPTOSI CEL·LULAR

Els canvis morfològics en la membrana cel·lular són un dels primers processos que es donen quan les cèl·lules entren en mort cel·lular per apoptosi.

Per determinar la proporció de cèl·lules en apoptosi es va utilitzar el Kit comercial Annexin V-FITC (Bender MedSystem) que conté: Annexina V-FITC, tampó de marcatge 4x (10 mM Hepes/NaOH pH=7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂); i iodur de propidi (20 μ g/ml). La tècnica es basa en la detecció del fosfolípid fosfatidilserina, present en la cara interna de la membrana cel·lular que passa a la cara exterior quan s'inicia el procés d'apoptosi. L'Annexina-V és una proteïna, dependent de Ca²⁺, que s'uneix amb elevada afinitat a la fosfatidilserina. A l'estar conjugada amb un fluorocrom, permet detectar per citometria de flux aquelles cèl·lules que es troben en apoptosi.

La combinació d'Annexina-V amb iodur de propidi (PI), permet discriminar les cèl·lules que es troben a l'inici del procés d'apoptosi (Annexina⁺, PI⁻), d'aquelles que ja

es troben en moments més avançats de la mort cel·lular (Annexina⁺, PI⁺).

El protocol seguit fou:

1. Diluir el tampó de marcatge (4x) del kit a raó de 1:4 amb H₂O destil·lada.
2. Recuperar les cèl·lules de la placa de cultiu i rentar-les amb PBS.
3. Resuspendre el botó cel·lular amb 200 µl del tampó de marcatge i afegir 2,5 µl d'Annexina-V marcada amb FITC. Incubar durant 10 minuts a TA.
4. Rentar les cèl·lules amb PBS.
5. Resuspendre les cèl·lules amb 200 µl del tampó de marcatge i afegir 5 µl de iodur de propidi, vòrtex.
6. Analitzar per citometria de flux seleccionant la població limfocitària i posteriorment analitzant en un histograma de dues dimensions (FL-1-comptatge cel·lular) el percentatge de cèl·lules positives per AnnexinaV⁺ (tant PI⁺ com PI⁻).

3.3.5.1. ANÀLISI DE L'APOPTOSI VIA FAS-FAS-L

Per determinar la implicació de la via Fas-Fas-L en l'apoptosi en els cultius amb anti-CD3 es va utilitzar la proteïna quimèrica Fas:Fc (Fas recombinant humà soluble) (R&D) que inhibeix l'apoptosi mediada per Fas-L (Cheng et al., 1994). Per determinar la concentració a la que Fas:Fc és capaç d'inhibir l'apoptosi *in vitro* es va emprar el següent experiment control.

1. Activar 5x10⁵ cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, obtingudes per gradient de Ficoll, amb PHA (10µg/ml) durant 48 hores. Després d'aquest període les cèl·lules incrementen l'expressió de Fas.
2. Rentar les cèl·lules en medi de cultiu.
3. Incubar-les amb concentracions decreixents de 4 µg/ml fins 1 µg/ml de Fas:Fc diluït en medi de cultiu complet, concentracions recomanades pel fabricant per inhibir el 50% de l'apoptosi produïda per 200 ng/ml d'anti-Fas, i com a control positiu d'apoptosi afegir a un pou un anticòs anti-Fas humà (Reactiva), a una concentració final de 200 ng/ml.
4. Passades 48 hores, analitzar per citometria de flux les cèl·lules apoptòtiques presents en els cultiu (segons apartat 3.3.5).

Un cop observat que en les condicions descrites disminuïa l'apoptosi mediada per Fas-Fas-L en els cultius de cèl·lules MNC de SPA, es va procedir a realitzar

l'experiment amb les cèl·lules purificades CD4⁺CD45RA⁺ de SCU. El protocol seguit fou:

1. Cèl·lules activades segons l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes, se'ls va afegir concentracions decreixents (8 µg/ml fins 1 µg/ml) de Fas:Fc diluït en medi de cultiu.
2. Després de 72 hores de cultiu, analitzar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques segons el descrit en l'apartat anterior.

3.4. QUANTIFICACIÓ D'INTERLEUQUINA 2

La determinació de la quantitat d'interleuquina 2 (IL2) present en els sobrenedants dels cultius cel·lulars es va realitzar per la tècnica d'ELISA.

Després de cultivar els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de sang perifèrica i cordó umbilical segons el descrit en l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes, es va recollir el sobrenedant i es va processar de la següent manera:

1. Centrifugar durant 10 minuts a 14000 rpm (Centrifuge 5415-R).
2. Recuperar el sobrenedant amb pipetes estèrils.
3. Congelar-lo a -80 °C fins el moment del seu ús.

Per determinar les concentracions òptimes dels anticossos de captura i de detecció, es va realitzar un ELISA previ. L'anticòs de captura anti-IL2 (BD. Clon 5344.111) es va utilitzar des de 0.5 µg/ml fins a 2.0 µg/ml i l'anticòs de detecció (BD. Clon B33.2) es va utilitzar a 1 µg/ml i a 2 µg/ml. Per la corba estàndard la IL2 recombinant humana, (Boehringer Mannheim Biochemica) es va diluir des de 10000 pg/ml fins 30 pg/ml. Al final de l'ELISA, es van determinar quines eren les concentracions òptimes d'anticòs de captura i d'anticòs de detecció, sent aquelles concentracions mínimes que permetien obtenir la mínima inespecificitat i la màxima diferència dels positius amb el fons. Per l'anticòs de captura seria 2 µg/ml i pel de detecció seria 1 µg/ml.

Així el protocol seguit per determinar la quantitat d'IL2 en el sobrenedant dels cultius cel·lulars fou:

1.Captura de l'anticòs:

- 1.1. Diluir l'anticòs anti-IL2 de captura (IGg1 BD, clon 5344.111) a 2µg/ml amb el tampó A.

1.2. Afegir 50 µl d'aquesta solució als pous de la placa de 96 pous d'ELISA (Nunclon).

1.3. Tapar la placa i incubar 12-16 hores a 4 °C.

2. Bloqueig:

2.1. Retirar l'anticòs sobrant de la placa i bloquejar amb 200 µl del tampó B.

2.2. Tapar la placa i incubar a TA durant 2 hores.

2.3. Rentar tres vegades amb PBS/Tween (tampó C).

3. Mostres i estàndards:

3.1. Diluir l'estàndard (IL2 humana recombinant, Boehringer Mannheim Biochemica) des de 10000 pg/ml fins 20 pg/ml i les mostres diluïdes 1/2 i 1/10 amb el tampó D. Incubar 100 µl de les dilucions per duplicat durant 4 hores a TA.

3.2. Rentar 4 vegades amb tampó C.

4. Detecció de l'anticòs:

4.1. Diluir l'anticòs de detecció anti-IL2 marcada amb biotina (anticòs anti-IL2 humana de BD conjugat amb biotina Clon B33.2), a una concentració de 1 µg/ml en el tampó D.

4.2. Incubar 100 µl de la dilució anterior durant 1 hora a TA.

4.3. Rentar 4 vegades amb el tampó C.

4.4. Diluir l'estreptavidina marcada amb peroxidasa (Sav-HRP,BD) a 1/2000 amb el tampó D. Incubar 100 µl durant 30 minuts a TA.

4.5. Rentar 5 vegades amb el tampó C.

5. Reacció colorimètrica:

5.1. Dissoldre en 20 ml d'H₂O els reactius (OPD (0,4 mg/ml), hidrogen peroxidasa d'urea (0,4 mg/ml) i tampó citrat fosfat (0,05 M)), que conté el kit Sigma Fast-o-Phenylenediamine Dihydrochloride tables sets (Sigma). Afegir 100 µl a cada pou.

5.2. Després de 45 minuts aproximadament de reacció protegint de la llum, parar la reacció amb 50 µl d'àcid sulfúric al 25 %. Llegir en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 492 nm i restar el valor obtingut de densitat òptica al llegir a una longitud d'ona de 620 nm, per substracció del fons.

Tampó A:

Hidrogen fosfat sòdic 0,1 M

Ajustar a pH=9

Tampó B:

BSA 1%

PBS q.s.p

Tampó C:

Tween 20 0,05 %

PBS q.s.p

Tampó D:

Tween 20 0,05 %

Tampó B q.s.p

3.5. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

La tècnica de Laemli (Laemli UK. 1970) permet la separació dels components d'una mostra proteica per les seves masses moleculars. La presència d'un detergent iònic com SDS (dodecilsulfat sòdic) en el gel, en el tampó de carrera i també en el tampó de mostra, permet que les proteïnes quedin carregades negativament i només migrin en l'electroforesi pel seu pes molecular. La velocitat de migració és inversament proporcional a la massa molecular de cada component de la mostra.

3.5.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS

Els nivells proteics de molècules implicades en la cascada de transducció de senyal i apoptosi es van analitzar mitjançant la tècnica de Western Blot (transferència i immunodetecció). Es van obtenir extractes cel·lulars a partir de cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺.

El protocol seguit fou:

1. Centrifugar $0,75 \times 10^6$ cèl·lules durant 5 minuts a 11000 rpm (Centrifuge 5415R).
2. Eliminar el sobrenedant i lisar el botó cel·lular amb 50 µl de tampó de lisi.
3. Incubar 20 minuts en bany de gel i tornar a centrifugar durant 15 minuts a 11000 rpm (Centrifuge 5415R).

4. Aliquotar el sobrenedant per quantificar-lo pel mètode de Lowry. Guardar els sobrenedants a - 80°C fins el moment del seu ús.

Tampó de lisi:

Tris pH=7,4	0,01 M
NaCl	0,05 M
EDTA	0,005 M
Inhibidors de proteases (Sigma)	1 x
PMSF	0,001 M
Ortovanadat sòdic	0,001 M
Triton X-100	0,5%

3.5.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA

Per a la quantificació de proteïna total en els extractes proteics, obtinguts a partir de les cèl·lules purificades de cordó umbilical i sang perifèrica d'adult, (apartat 3.1 i apartat 3.2.1) es va seguir el mètode de Lowry (Lowry, 1951)

La determinació es fonamenta en els complexos formats entre proteïna i el reactiu colorant Coomassie Brilliant Blue G-250. L'assaig es va dur a terme utilitzant el kit BIO-RAD DC Protein Assay Format (BIO-RAD) que és compatible amb la presència de detergents en l'extracte i permet la quantificació a partir de volums petits de mostra.

El kit conté:

- Reactiu A, solució alcalina de tartrat de coure
- Reactiu B, reactiu Folin diluït
- Reactiu S

El protocol seguit fou:

1. A una placa d'ELISA de pou pla (Nunc), aplicar 5 µl de la mostra d'extracte que es vol quantificar, així com dels estàndards preparats amb albúmina sèrica bovina (BSA) diluïts en el mateix tampó que tenim preparats els extractes.

2. Afegir 25 µl del reactiu A' (reactiu A + el reactiu S a una relació de 1ml de A/ 20 µl del reactiu S).

3. Afegir 200 µl del reactiu B i barrejar.

4. Després de 15 minuts de reacció, llegir en un lector d'ELISA a una longitud d'ona de 620 nm.

Com a corba patró es va utilitzar BSA a concentracions decreixents: 2 mg/ml fins 0.2 mg/ml, diluïda en el mateix tampó que la mostra. La concentració de les mostres es va determinar a partir d'aquesta corba patró (absorbància dels estàndards en l'eix d'ordenades enfront de la seva concentració en l'eix d'abscisses).

3.5.3. SEPARACIÓ EN GEL D'ACRILAMIDA I TRANSFERÈNCIA

Els extractes cel·lulars obtinguts en l'apartat 3.5.1 es van analitzar en gels d'acrilamida amb SDS en condicions desnaturalitzants, per tal de que les proteïnes es disposessin segons el seu pes molecular.

Després de quantificar els extractes segons apartat 3.5.2 es van ajustar tots els extractes a 3 µg en un volum final de 18 µl, després d'afegir 3 µl de tampó de mostra 3X. Posteriorment les mostres es van bullir durant 5 minuts, per permetre la desnaturalització de les proteïnes just abans de ser aplicades en el gel.

Es van utilitzar cassettes de plàstic (Invitrogen, 10x10 cm) i de 1 mm de gruix com a suports per polimeritzar els gels d'acrilamida.

Preparació del gel d'acrilamida:

Gel separador:

Tampó Tris-HCl pH= 8,8	375 mM
Solució stock d' Acrilamida/Bisacrilamida	8% o 10% o 12%*
SDS	0,1%
Persulfat amònic	0,075%
Temed	5 mM

* segons tamany de proteïna a separar.

S'omple el cassette amb aquesta solució fins a dos centímetres de la part superior. A continuació es diposita una fina capa de solució d'interfase damunt procurant que no es barregi amb l'acrilamida del gel separador. La composició d'aquesta solució és la mateixa que la del gel separador però sense incloure l'acrilamida. La seva finalitat és aconseguir que la polimerització sigui correcte i que la superfície del gel sigui plana i uniforme. Aquesta interfase es retira quan el gel està totalment polimeritzat (aproximadament 30 minuts).

MATERIALS I MÈTODES

A continuació es prepara el gel de concentració que omplirà la resta del cassette.

Gel de concentració:

Tampó Tris-HCl pH=6,8	130 mM
Solució stock d'Acrilamida/Bisacrilamida	5%
SDS	0,1%
Persulfats amònic	0,08%
Temed	4 mM

Un cop polimeritzat el gel de concentració, es va situar el gel dins de la cubeta d'electroforesi (XcellIII Mini-Cell, NOVEX) i es va omplir el recipient amb el tampó de carrera SDS per procedir de la següent manera:

1. Aplicar 20 µl dels extractes, prèviament bullits, en cada un dels pous dels gels d'acrilamida.
2. Córrer les mostres a 150 V i 20 mA paràmetres limitants durant aproximadament 1 hora 30 minuts.

Després de l'electroforesi del gel, es van transferir les proteïnes en condicions semihumides utilitzant l'equip de transferència Biometra, que permet transferir fins un màxim de 2 gels. Aquest sistema permet una ràpida transferència al crear-se un elevat camp elèctric entre l'ànode i el càtode només separats pel gruix del gel i els papers Watman que l'acompanyen. Es va procedir de la següent manera:

1. Treure el gel del cassette ajudant-nos d'una espàtula.
2. Submergir el gel en el tampó 3, durant 15 minuts en agitació suau.
3. Paral·lelament, hidratar la membrana de PVDF (que presenta característiques hidrofòbiques) de la següent manera:
 - 3.1. Submergir-la durant 15 segons amb metanol.
 - 3.2. Retirar el metanol i submergir-la durant 2 minuts amb H₂O destil·lada.
 - 3.3. Finalment retirar l'H₂O i submergir-la 10 minuts en tampó 2 en agitació suau.

Un cop passat els 15 minuts:

1. Col·locar en aquest ordre: tres fulles de paper Watman (de tamany 9 x 9 cm), mullades amb el tampó 1, al pol positiu de l'aparell de transferència, 2 papers mullats amb tampó 2, la membrana de PVDF, el gel i finalment 5 papers mullats amb tampó 3. D'aquesta manera es crea un gradient de pH que facilita la transferència. Transferir

MATERIALS I MÈTODES

durant 1.30 minuts a 300 mA i 5 W a 4°C.

2. Passat aquest temps, treure la membrana de l'aparell de transferència evitant que s'assequi i bloquejar-la tota la nit (12-16 hores) amb el tampó de bloqueig. Prèviament al bloqueig, tallar de la membrana el carril dels marcadors (Broad Range, BioRad) que es tenyeix amb negre amido per poder visualitzar les proteïnes estàndard. La tinció amb negre amido consisteix en:

2.1. Tenyir la membrana durant 2 minuts amb la solució de negre amido, amb agitació suau.

2.2. Destenyir la membrana amb la solució de destenyit durant 15 minuts amb agitació suau, fent diversos canvis per eliminar la tinció no específica.

Els marcadors Broad Range (Bio-Rad) utilitzats presenten els següents tamanys molecular.

Estàndards	kDa
Miosina	200
β -galactosidasa	116
Fosforilasa b	97,6
Albúmina sèrica bovina	66,2
Ovoalbúmina	45
Anidrasa carbònica	31
Inhibidor tripsina	21,5
Lisozima	14,4
Aprotinina	6,5

Tampó 1:

Tris pH=10,4	0,3 M
Metanol	10%

Tampó 2:

Tris pH=10,4	25 mM
Metanol	10%

Tampó 3:

Tris pH=9,4	25 mM
Glicina	19,2 mM
Metanol	10%

MATERIALS I MÈTODES

Solució de tinció de membrana de PVDF amb negre amido:

Negre amido	0,1%
Isopropanol	25%
Àcid acètic	10%
H ₂ O q.s.p	

Solució de destenyir de membrana de PVDF amb negre amido:

Isopropanol	25%
Àcid acètic	10%
H ₂ O q.s.p	

3.5.4. IMMUNODETECCIÓ

L'immunoblot és una tècnica que permet detectar diferents proteïnes immobilitzades en una membrana mitjançant la utilització d'anticossos específics. En els nostres estudis vam utilitzar anticossos marcats amb peroxidasa de rave (HRP). Els anticossos primaris poden ser monoclonals o policlonals i conjugats directament amb HRP o no, per poder ser posteriorment visualitzats. Si no estan conjugats directament, cal una segona incubació amb un anticòs conjugat amb HRP que reconegui a l'anticòs primari. Per detectar les proteïnes a estudiar es va procedir:

Després de bloquejar la membrana tota la nit amb el tampó de bloqueig, incubar la membrana amb els anticossos diluïts amb el tampó de bloqueig, durant 2 hores a TA. Els anticossos que es van emprar foren:

ESPECIFICITAT	MARCA	ESPÈCIE	ISOTIP	DILUCIÓ
Anti-Lck (p ⁵⁶ lck)	Zimed	Ratolí	IgG _{2b}	1/2000
Anti-ZAP-70	Upstate	Ratolí	IgG _{2a}	1/2000
Anti-PLC γ 1	Santa cruz	Conill	Policlonal	1/2000
Anti-LAT	Santa Cruz	Conill	Policlonal	1/2000
Anti-FAS-L	Pharmingen	Ratolí	IgG ₁	1/1000
Anti-SLP-76	BD	Ratolí	IgG ₁	1/2000
Anti-cCbl	BD	Ratolí	IgG ₁	1/5000
Anti-GRB2	BD	Ratolí	IgG ₁	1/5000
Anti-Vav	BD	Conill	Policlonal	1/2000
Anti- ζ	Pharmingen	Ratolí	IgG ₁	1/200
Anti- β -Actina	Sigma	Ratolí	IgG ₁	1/50000

MATERIALS I MÈTODES

2. Descartar l'excés d'anticòs primari i rentar durant una hora fent 4 canvis amb el tampó de rentat a TA.

3. Descartar el líquid de rentat i incubar amb l'anticòs secundari durant 1 hora. Depenent de l'espècie de l'anticòs primari, com a secundari es va utilitzar un dels següents anticossos marcats amb HRP.

ESPECIFICITAT	ESPÈCIE	MARCA	DILUCIÓ
Anti-ratolí IgGs totals	Cabra	Pierce	1/100000
Anti-ratolí IgG _{2b}	Cabra	Caltag	1/2000
Anti-conill	Ase	ECL	1/2000

4. Descartar l'anticòs secundari i rentar durant una hora amb el tampó de rentat, fent 4 canvis.

5. Detectar les proteïnes a estudiar utilitzant el Kit de Super Signal, West Dura (Pierce) que permet la immunodetecció utilitzant anticossos conjugats amb HRP. Aquest kit conté: *Super Signal West Dura Luminol/Enhancer solution* i *Super Signal West Dura Stable Peroxide Solution*. La tècnica es base en la detecció de la quimioluminiscència produïda en la reacció d'oxidació del luminol per la peroxidasa de rave, conjugada a l'anticòs, en presència d'H₂O₂ i compostos químics potenciadors com els fenols. La reacció emet llum a un màxim de 428 nm de longitud d'ona. Consisteix en barrejar volums iguals dels 2 reactius i dipositar un volum adient per cobrir tota la membrana. Deixar reaccionar durant 5 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, eliminar l'excés de reactiu i posar a contactar la membrana amb un film autoradiogràfic (AGFA, CURIX RP2), per obtenir la imatge de la immunodetecció. Per quantificar les bandes immunodetectades, es va fer servir el programa *Quantity One*. És un programa informàtic per analitzar imatges a partir de gels, de membranes i de colònies. Pot analitzar quimioluminiscència, fluorescència, tincions de color, així com pot densitometrar imatges a partir d'autoradiografies. Per analitzar les imatges cal la seva captura, que es realitza utilitzant l'aparell Fluor-S MultiImager (BIO-RAD). El Fluor-S és un sistema d'imatge quantitatiu per capturar imatges digitals d'alta resolució a partir de fluorescència, quimioluminiscència, quimiofluorescència i anàlisi colorimètrics. Consisteix en:

- Mòdul òptic, format per una càmera i una roda amb diferents filtres que permeten de discriminar els diferents colors de les imatges i la detecció de diferents

colors fluorescents.

- Mòdul d'escaneig, format per una safata per poder detectar la quimioluminiscència, un transil·luminador, i dos epi-iluminadors (un UV i un altre de llum visible).

Tampó de Bloqueig:

Tris 1M pH= 7,5	0,01 M
NaCl 3M	0,1 M
Tween 20	0,001%
Albúmina Bovina sèrica (BSA)	1%

Tampó de Rentat:

Tris 1M pH= 7,5	0,01 M
NaCl 3M	0,1 M
Tween 20	0,001%

Per reutilitzar les membranes i poder detectar altres proteïnes sobre els mateixos extractes es va realitzar "*stripping*" de les membranes de Western blot. Es va utilitzar la solució *Restore Western Blot Stripping Buffer* (PIERCE) que consisteix en desenganxar els anticossos primaris i secundaris que s'han unit durant les consecutives incubacions, sense alterar la disposició de les bandes proteiques que han estat transferides. Aquesta solució és l'escollida si es realitza la immunodetecció de les proteïnes amb Super Signal Pierce.

Es procedeix de la següent manera:

1. Rentar la membrana de Western blot dues vegades durant 10 minuts a TA amb PBS.
 2. Submergir la membrana de PVDF amb tampó de "*stripping*" i deixar-la durant 15 minuts a TA en agitació suau.
 3. Passat aquest temps, agitar la membrana submergida en el líquid de "*stripping*" durant 15 minuts més a 37°C.
 4. Rentar la membrana dues vegades amb tampó de rentat i procedir al bloqueig de la membrana durant 12-16 hores a 4 °C.
 5. Seguir amb el protocol de detecció com el descrit en apartat 3.5.4.
- El tampó de rentat i de bloqueig són els mateixos que els utilitzats en l'apartat 3.5.4.

3.6. SEGUIMENT DE LA FOSFORILACIÓ DE PROTEÏNES EN TIROSINA

Alguns dels mecanismes que modulen la resposta immune després de l'activació via TCR, han estat associats a fets que es donen a la part més proximal de la membrana, com l'activació seqüencial de quinases i la fosforilació en tirosines (PTyr) de molècules implicades en la cascada de transducció de senyals.

Aquesta fosforilació comporta que altres molècules també s'activin desencadenant un procés que recorre des de la cara extracel·lular de la membrana fins el nucli cel·lular.

3.6.1. ACTIVACIÓ CEL·LULAR EN SUSPENSIO I PREPARACIÓ D'EXTRACTE

L'activació de les cèl·lules T amb anticossos monoclonals via CD3/TCR en suspensió és possible quan es dona l'entrecruament dels anticossos a través dels receptors Fc de les cèl·lules accessòries. Per tant, en la suspensió cel·lular de cèl·lules T o CD4⁺CD45RA⁺ purificades es va substituir a les cèl·lules accessòries per un anticòs de cabra F(ab')₂ anti-ratolí IgG (H+L).

Les cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ es van rentar i ajustar amb medi de cultiu RPMI sense FCS, per evitar la contaminació amb fosfats presents en el FCS, a una concentració final de 25 x 10⁶ cèl·lules/ml. Les cèl·lules es van activar a diferents temps: 0, 1 min, 5 min, 15 min i 30 min. Es va procedir de la següent manera:

1. Utilitzar tubs eppendorfs per incubar les cèl·lules en un bany sec a 37°C durant 10 minuts. Passat aquest temps afegir l'anticòs F(ab')₂ (Cabra anti-ratolí IgG (H+L), Caltag) i incubar 2 minuts a 37°C. La mostra que s'utilitza com a control basal, conté només l'anticòs F(ab')₂.
2. Afegir a les cèl·lules l'anticòs anti-CD3 (OKT3) i incubar durant els temps corresponents (1, 5, 15 o 30 minuts).
3. Parar la reacció amb precisió afegint el tampó de parada mantingut en bany de gel.
4. Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 11000 rpm (Centrifugue 5415R).
5. Eliminar el sobrenedant i lisar el sediment cel·lular amb el tampó de lisi mantingut en un bany de gel. Incubar i després centrifugar 15 minuts a 11000 rpm a

4°C.

6. Recuperar el sobrenedant per analitzar per immunodetecció o bé utilitzar-lo per immunoprecipitar les proteïnes fosforilades en tirosina.

Segons si es vol fer un seguiment de la fosforilació en tirosina de les proteïnes totals o immunoprecipitant els extractes cel·lulars obtinguts amb un anticòs anti-P-Tyr, el número de cèl·lules de que es parteix és diferent i per tant les quantitats d'anticossos i tampons també són diferents. A continuació s'indiquen les quantitats utilitzades per un o altre experiment.

	SEGUIMENT DE PROTEÏNES PTyr	IP ANTI-PTyr
Quantitat de cèl·lules	1,25 x 10 ⁶ (50 µl)	4,5 x 10 ⁶ (180 µl)
Anticòs F(ab') ₂	0,8 µg	1,6 µg
Anticòs anti-CD3	0,5 µg	1,9 µg
Tampó parada	140 µl	200 µl
Tampó lisi	90 µl	160 µl
Temps d'incubació amb tampó de lisi	20 minuts	30 minuts

3.6.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ ANTI-FOSFOTIROSINA

Les immunoprecipitacions anti-fosfotirosines en condicions desnaturalitzants amb SDS, permeten d'immunoprecipitar exclusivament aquelles proteïnes que estan fosforilades en tirosina, sense mantenir els complexos que puguin estar formant amb altres proteïnes.

El número de cèl·lules emprat per realitzar la immunoprecipitació (IP) fou més elevat que en un immunoblot d'un extracte total, donat que només obtindriem la fracció de proteïnes fosforilades en tirosina.

S'utilitzà proteïna G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia), que té afinitat per l'anticòs que reconeix a les tirosines fosforilades perquè és del subtipus IgG₁ de ratolí.

Després de l'obtenció de l'extracte cel·lular, es va procedir a realitzar la immunoprecipitació en condicions desnaturalitzants tal com s'indica:

MATERIALS I MÈTODES

1. Recuperar el sobrenedant després de lisar l'extracte amb el tampó de lisi i afegir 7,5 µl de SDS 20%.
2. Incubar durant 5 minuts a 100 °C.
3. Afegir 1350 µl de tampó de lisi.
4. Paral·lelament rentar la proteïna G Sepharose 4 Fast Flow amb tampó de parada i diluir-la a la meitat amb tampó de lisi.
5. Afegir 25 µl de la proteïna G Sepharose diluïda a la meitat amb tampó de lisi, a l'extracte cel·lular per eliminar les possibles inespecificitats.
6. Incubar rotant les mostres durant 10 minuts a 4 °C i centrifugar a 14000 rpm a 4°C durant 10 minuts.
7. Recuperar el sobrenedant i transferir-lo en un nou eppendorf. Afegir 5 µl de l'anticòs que reconeix les tirosines fosforilades (ratolí anti-IgG₁ humana. Clon: PT-66, SIGMA).
8. Incubar amb rotació durant 15 minuts a 4°C. Passat aquest temps afegir a l'eppendorf 10 µl de Proteïna G Sepharosa diluïda a la meitat amb tampó de lisi i deixar rotant tota la nit a 4 °C.
9. Passat aquest temps centrifugar la mostra durant 5 minuts a 14000 rpm a 4°C i descartar el sobrenedant. El sediment està constituït per les proteïnes fosforilades en tirosina enganxades a la proteïna G Sepharosa.
10. Rentar tres vegades amb tampó de lisi. En l'últim rentat retirar el màxim de sobrenedant i afegir a la proteïna G Sepharosa 10 µl de tampó de mostra 2 x (tampó de mostra de gel MOPS).
11. Escalfar la proteïna G Sepharosa en un bloc sec a 70 °C durant 10 minuts, per desenganxar les proteïnes fosforilades en tirosina de la proteïna G Sepharosa.
12. Centrifugar 5 minuts a 14000 rpm a 4°C i recuperar el sobrenedant on estaran les proteïnes fosforilades en tirosina per analitzar-les en un gel MOPS segons apartat 3.6.3.

Tampó parada fosfotirosina:

NaCl	150 mM
Tris -HCl pH=7,5	10 mM
EDTA pH=8	1 mM
Ortovanadat sòdic	1 mM

MATERIALS I MÈTODES

PMSF	0,2 mM
Inhibidors de proteases*	1 x
<i>Tampó de lisi fosfotirosina</i>	
NaCl	150 mM
Tris -HCl pH=7,5	10 mM
EDTA pH=8	1 mM
NP40	0,5 %
Triton x-100	1 %
Ortovanadat sòdic	1 mM
PMSF	0,2 mM
Inhibidors de proteases	1 x

**Inhibidors de proteases*: ortovanadat sòdic, molibdat sòdic, tartrat sòdic i imidazol (cockatil 2, SIGMA).

3.6.3. IMMUNODETECCIÓ DE LES PROTEÏNES FOSFORILADES EN TIROSINA

Per separar electroforèticament les proteïnes fosforilades en tirosina, tant de les procedents de l'extracte total com de la IP, es van utilitzar gels MOPS (NuPage Electrophoresis System Invitrogen Bis-Tris Gels) de gradient del 4% al 12%, que malgrat no contenen SDS permeten una electroforesi en condicions desnaturalitzants amb un tampó de carrera amb SDS. A més, permeten obtenir unes bandes nítides i la distribució de les proteïnes és molt similar entre diferents gels. Al moment de l'electroforesi s'afegeix 500 µl d'antioxidant (Cat nº NP0005) a 200ml del tampó de carrera que es dipositarà al càtode per prevenir que les mostres reduïdes es reoxidin i per prevenir l'oxidació d'aminoàcids àcids com la metionina. Per augmentar la nitidesa de les bandes, s'afegeix al tampó de mostra (tampó de mostra del gel MOPS), un agent reductor (0,5 M de DTT, 10x) just abans d'escalfar les mostres durant 10 minuts a 70 °C.

La carrera del gel es realitza en la cubeta d'electroforesi durant 3 hores aproximadament, a 20 mA i 150 V com a paràmetres limitants.

La transferència es realitza en condicions semihumides, seguint el mètode descrit en l'apartat de 3.5.3.2.

Per detectar les proteïnes fosforilades en tirosina en la membrana de PVDF,

MATERIALS I MÈTODES

s'utilitza una proteïna recombinant anti-fosfotirosina-RC20 conjugada amb HRP (BD).

El protocol seguit fou:

1. Després del bloqueig de la membrana, incubar-la amb un dilució 1/2000 de la proteïna recombinant anti-fosfotirosina, diluïda en tampó de bloqueig.

2. Descartar l'anticòs i rentar la membrana a temperatura ambient durant 1 hora, fent 4 canvis de solució de rentat.

3. Descartar el rentat i realitzar la detecció de les fosfotirosines amb el Kit Super Signal (Pierce) (segons el descrit en l'apartat 3.5.4).

Tampó de mostra gel MOPS (4x):

Glicerol	4 g
Tris base	0,68 g
Tris-HCl	0,66 g
LDS (dodecil sulfat de liti)	0,8 g
EDTA	0,006 g
Serva Blue G250 (stock 1%)	0,75 ml
Phenol Red (stock 1%)	0,25 ml
H ₂ O q.s.p. 10 ml	
pH=8,5 però no ajustar ni amb àcid ni amb base.	

Tampó de carrera MOPS SDS:

MOPS	1 M
Tris base	1 M
SDS	69,3 mM
EDTA	20,5 mM
pH=7,7 no ajustar ni amb àcid ni amb base.	

3.7. OBTENCIÓ DE RNA TOTAL

Es va emprar el Kit d'extracció de RNA, Ultraspec RNA isolation system (Biotechx) basat en la utilització d'una solució de guanidina i urea que actuen com agents desnaturalitzants (Chomczynski and Sacchi, 1987). Consisteix en homogeneïtzar les cèl·lules o el teixit cel·lular del qual es vol obtenir el RNA en la solució Ultraspec. L'homogenat es separa en dues fases després d'afegir-li cloroform. El RNA total es troba exclusivament en la fase aquosa, mentre que el DNA i les proteïnes són extretes

MATERIALS I MÈTODES

en la fase orgànica i en la interfase. El RNA total es precipita de la fase aquosa mitjançant isopropanol, es renta amb alcohol, i es solubilitza amb H₂O tractada amb DEPC (H₂O DEPC).

Es va seguir el protocol descrit en el kit:

1. Atemperar la solució Ultraspec.
2. Homogeneïtzar les cèl·lules utilitzant una pipeta, contingudes en un eppendorf utilitzant 1 ml de la solució Ultraspec RNA per 5-10 x 10⁶ cèl·lules i deixar incubar 5 minuts en gel
3. Afegir 200 µl de cloroform i agitar vigorosament durant 15 segons.
4. Incubar 5 minuts en gel per permetre la completa dissociació dels complexos nucleoproteics.
5. Centrifugar 15 minuts a 4 °C a 12000 x g.
6. Recollir la fase aquosa que conté el RNA i passar-la a un tub eppendorf.
7. Afegir el mateix volum d'isopropanol que fase aquosa recollida.
8. Deixar incubar tota la nit a -20°C per permetre la precipitació del RNA.
9. Centrifugar durant 10 minuts a 12000 x g 4 °C.
10. Eliminar el sobrenedant i rentar dues vegades utilitzant 1 ml d'etanol 75%, centrifugant a 7500 x g durant 5 minuts a 4° C. En l'últim rentat intentar d'eliminar el màxim possible l'etanol.
11. Deixar assecar el sediment de RNA fins la completa evaporació de l'alcohol.
12. Resuspendre el sediment de RNA amb 50 µl d'aigua DEPC i quantificar el RNA purificat a una longitud d'ona de 260 nm en un espectrofotòmetre.

Per calcular la quantitat de RNA que obtenim utilitzar la següent fórmula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Absorbància a 260 nm} \times 40 \times \text{factor de dilució}$$

3.8. ASSAIG DE PROTECCIÓ DE RIBONUCLEASA

La protecció de ribonucleasa és un mètode altament sensible i específic per a la detecció i quantificació de diferents mRNAs en una mateixa mostra. Es va utilitzar el Kit comercial RiboQuant Multi-Probe RNase que conté una sèrie de sondes de diferent tamany que cada una representa una seqüència diferent de mRNA. El conjunt de sondes marcades amb ³²P s'hibriden en excés amb la mostra de RNA a analitzar.

MATERIALS I MÈTODES

Posteriorment s'incuben amb RNasa. Així les cadenes híbrides de RNA i sonda que queden protegides de la digestió, es poden purificar i analitzar en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida-urea. Es van utilitzar dos conjunts de sondes anomenades: hAPO 2 i hAPO 3. Cada conjunt està format pel següent grup de sondes que reconeixen a diferents gens:

hAPO2	hAPO3
<i>Bclx-1</i>	<i>caspase-8</i>
<i>bfl1</i>	<i>fas-1</i>
<i>blk</i>	<i>fas</i>
<i>bak</i>	<i>fadd</i>
<i>bax</i>	<i>dr3</i>
<i>bcl-2</i>	<i>fap</i>
<i>mcl-1</i>	<i>faf</i>
	<i>trail</i>
	<i>tnfr p55</i>
	<i>tradd</i>
	<i>rip</i>

El RNA total que es va obtenir segons l'apartat 3.7, provenia de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ sense cultivar (apartat 3.1.3) i activades (apartat 3.2.1).

El protocol seguit fou el descrit en el kit:

1. Síntesi de les sondes:

1.1. Per cada conjunt de sondes, afegir en ordre a un eppendorf:

- 1 µl RNasin (40U/ml)
- 1 µl de la mescla de NTPs (GACU) (2,75 mM)
- 2 µl DTT
- 4 µl 5x del tampó de transcripció
- 1 µl del conjunt de sondes RPA (50 ng/µl)
- 10 µl [α^{32} P] UTP (10 mCi/ml)
- 1 µl T7 RNA polimerasa (20 U/µl)

Incubar durant 1 hora a 37°C.

1.2. Finalitzar la reacció afegint 2 µl de DNasa (10U/µl). Barrejar suaument i incubar 30 minuts més a 37°C.

1.3. Afegir en ordre els següents reactius:

MATERIALS I MÈTODES

26 µl de 20 mM EDTA

25 µl de Tris saturat en fenol

25 µl de cloroform: isoamil alcohol (50:1)

2 µl de tRNA de llevat (2µg/µl)

Barrejar en vòrtex i microcentrifugar durant 5 minuts a TA.

1.4. Transferir la part aquosa a un nou eppendorf. Afegir 50 µl de cloroform:isoamil alcohol (50:1). Barrejar en vòrtex i tornar a microcentrifugar 2 minuts a TA.

1.5. Transferir la part aquosa a un nou eppendorf. Afegir: 50 µl d'acetat d'amoni 4 M i 250 ml d'etanol 100 % fred. Deixar precipitar una hora a -80 °C.

1.6. Centrifugar 15 minuts a 4°C i retirar el sobrenedant. Afegir 100 µl d'etanol, 90 % i centrifugar 5 minuts.

1.7. Retirar el sobrenedant i deixar assecar el sediment d'àcids nucleics. Afegir 50 µl del tampó d'hibridació, solubilitzar el sediment i barrejar en vòrtex durant 20 segons.

Quantificar la radioactivitat incorporada per duplicat en 1µl de la sonda marcada, utilitzant un comptador de centelleig. Deixar les sondes a -20°C fins el moment del seu ús.

2. Preparació de les mostres de RNA i hibridació:

Utilitzar 2 µg de RNA de cada mostra. Incloure com a control de fons RNA de llevat (2 µg) i com a control positiu RNA de cèl·lules Hela (2µg).

2.1. Liofilitzar les mostres en una bomba de buit durant 1 hora.

2.2. Afegir 8 µl del tampó d'hibridació a cada mostra. Solubilitzar el RNA.

2.3. Diluir el conjunt de sondes marcades amb tampó d'hibridació, a raó de: hAPO: $2,5 \times 10^5$ cpm/µl i hAPO3: $4,3 \times 10^5$ cpm/µl.

2.4. Afegir 2 µl del conjunt de sondes ja diluïdes a cada mostra de RNA. Afegir una gota d'oli mineral per evitar evaporacions i microcentrifugar.

2.5. Incubar les mostres en un bany sec prèviament escalfat a 90 °C. Un cop es posen les mostres baixar el bany a 56 °C i deixar-les 12-16h hores.

3. Tractament amb RNasa:

3.1. Després de 12-16 hores d'incubació baixar la temperatura del bloc sec a 37 °C i deixar les mostres durant 15 minuts.

3.2. Preparar la barreja de RNasa (per mostra):

MATERIALS I MÈTODES

125 µl del tampó RNasa

0,3 µl de RNasa A (80ng/µl) +T1 mix 250 U/µl)

Afegir 100 µl de la barreja per sota de la gota d'oli. Centrifugar 10 segons i incubar 45 minuts a 30 °C.

3.3. Preparar la barreja de Proteinase K (per mostra):

19,5 µl del tampó Proteinase K

1,5 µl Proteinase K (10 µg/µl)

1,5 µl tRNA de llevat (2 µg/µl)

3.4. Retirar de la part inferior de l'oli la mostra digerida amb RNase i transferir-la a un eppendorf nou que contingui 18 µl de la barreja de Proteinase K. Incubar 15 minuts a 37 °C.

3.5. Afegir 65 µl de Tris saturat amb fenol i 65 µl de cloroform: isoamil alcohol (50:1). Barrejar en vòrtex i microcentrifugar 5 minuts a TA.

3.6. Retirar la part aquosa, superior, i passar-la a un tub nou. Afegir 120 µl d'acetat d'amoni 4 M i 650 µl d'etanol 100% fred. Barrejar i deixar a -80 °C durant una hora perquè precipitin els àcids nucleics.

3.7. Centrifugar 15 minuts i descartar el sobrenedant. Afegir 100 µl d'etanol 90% fred, i centrifugar 5 minuts.

3.8. Descartar el sobrenedant i deixar assecar el sediment. Afegir 5 µl del tampó de mostra, barrejar en vòrtex durant 2-3 minuts.

3.9. Escalfar les mostres durant 3 minuts a 90 °C i deixar-les en gel fins el moment d'aplicar-les al gel de poliacrilamida.

4. Preparació del gel de resolució:

4.1. Rentar els vidres (tamany 38 x 33 cm) on es polimeritzarà el gel de resolució seguint aquest ordre: sabó, H₂O bidestil·lada, etanol, silanitzar, H₂O bidestil·lada i finalment etanol. Utilitzar separadors de 0,4 mm.

4.2. Preparar la barreja del gel:

Solució acrilamida (19:1 acrilamida/bisacrilamida)

⎧	8,85 ml d'acrilamida al 40 %
	9,31 ml de bisacrilamida al 2 %
⎧	7,45 ml TBE 10 x
	35,82 g d'urea
	H ₂ O qsp 74,5 ml

Afegir a la barreja:

450 µl de persulfat d'amoni 10 %

60 µl Temed

Utilitzar per realitzar l'electroforesi la cubeta Model S2 (Life Technologies). Pre-córrer el gel durant 45 minuts a 40 W i aplicar les mostres (5 µl). Córrer el gel a 50 W aproximadament durant 1 hora i 30 minuts fins que el blau de bromofenol arribi a una distància de 30 cm del pou de càrrega. Un cop finalitzada la carrera, assecar el gel i posar-lo a contactar amb pel·lícules autoradiogràfiques per poder densitometrar les bandes en l'equip d'imatge FLUORS.

3.9. MANTENIMENT D'HIBRIDOMES EN CULTIU CEL·LULAR

El manteniment en cultiu d'hibridomes permet obtenir anticossos monoclonals que es secreten constantment al medi de cultiu fins a la saturació del medi (aproximadament 5 dies de cultiu sense retirar el medi, abans de fer-se tòxic pel creixement cel·lular). L'anticòs s'acumula en el sobrenedant degut a que no es metabolitza.

L'hibridoma que es va mantenir en cultiu fou l'OKT3 (ATCC). S'havia produït per la fusió de cèl·lules de mieloma de ratolí (P3X63Ag801) amb esplenòcits de ratolí CAF1 immunitzat amb limfòcits de sang perifèrica humana. Com ha resultat es produeix un anticòs monoclonal (IgG_{2a}) que reacciona amb les cèl·lules T perifèriques humanes. El protocol seguit fou:

1. Mantenir l'hibridoma cel·lular OKT-3 (ATCC) en medi RPMI complert, fins que hi ha un augment de la terbolesa del medi degut al sobrecreixement cel·lular.
2. Decantar el sobrenedant en tubs de 50 ml i centrifugar durant 10 minuts a 1500 x g per eliminar restes cel·lulars.
3. Transferir el sobrenedant en recipient estèrils i guardar-lo congelat a -20 °C fins el moment de purificar l'anticòs.

3.9.1. PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS

Per a la purificació dels anticossos monoclonals obtinguts per sobrecreixement cel·lular, es va realitzar una cromatografia d'afinitat usant Proteïna A Sepharosa CL-4B (Amersham Biosciences):

MATERIALS I MÈTODES

1. Pesar uns 5 mg de Proteïna A Sepharosa i hidratar-la amb H₂O destil·lada. deixar sedimentar-la i retirar el sobrenedant.
2. Afegir 25 ml del tampó 1.
3. Agitar durant 10 min a TA.
4. Centrifugar 2 minuts a TA a 2000 rpm.
5. Descartar el sobrenedant i afegir 25 ml més de tampó 1 al botó de proteïna A Sepharosa.
6. Agitar durant 5 minuts a TA i repetir la centrifugació.
7. Afegir 40 ml del sobrenedant que conté l'anticòs a la proteïna A sepharosa i deixar en rotació a 4 °C 16 hores.
8. Centrifugar a 2000 rpm durant 2 minuts a 4 °C.
9. Descartar el sobrenedant i al sediment afegir-li 40 ml més del sobrenedant amb l'anticòs.
10. Deixar en rotació a 4 °C durant 6 hores i posteriorment tornar a centrifugar en les mateixes condicions que abans i retirar el sobrenedant.
11. Afegir 25 ml del tampó 1 al sediment i tornar a centrifugar.

Un cop obtingut el sediment de Proteïna A Sepharosa amb l'anticòs monoclonal enganxat procedir a l'empaquetament de la proteïna A Sepharosa. S'utilitzen xeringues d'1 ml de capacitat a les quals se'ls incorpora llana de vidre a la seva part inferior i un disc de paper de filtre, perquè no s'escapi la proteïna A Sepharosa.

1. Eluir l'anticòs monoclonal utilitzant 1.5 ml del tampó 2 (tampó de caràcter àcid). En els tubs on es recull l'eluit, afegir 25 µl del tampó 3, per tal de mantenir la solució final a un pH neutre.
2. Dialitzar l'anticòs purificat enfront PBS durant 2 dies a 4 °C, fent canvis del tampó de diàlisi cada 16 hores aproximadament.
3. Filtrar per esterilitzar utilitzant filtres de 0,22 µm (Millex GP).
4. Quantificar la proteïna a una longitud d'ona de 280 nm i utilitzar la fórmula:

$$(\text{mg/ml Ig}) = \text{OD}_{280} \times \text{factor de dilució} \times 812$$

O bé utilitzar la tècnica de Lowry, per calcular la quantitat de proteïna purificada (apartat 3.5.2).

MATERIALS I MÈTODES

Tampó 1:

Tampó fosfats:

NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ 0,01 M

EDTA 0,01 M

NaCl 0,15 M

Ajustar el pH a 7

Tampó 2:

Glicina-HCl 0,2 M

El pH de la solució ha de ser de 2.2

Tampó 3:

Tris base 2 M

El pH de la solució ha de ser 10.25

3.10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic de les dades obtingudes, es va realitzar pel test de Fisher's PLSD o Mann-Whitney, amb un nivell de significància del 5 %. S'indica amb un asterisc un nivell de significació de $p < 0,05$, amb dos asteriscs $p < 0,01$ i amb tres asteriscs una $p < 0,001$.

MATERIALS I MÈTODES

4.1. IMMUNOFENOTIP DE LES CÈL·LULES DE CORDÓ UMBILICAL

En primer lloc es va analitzar el percentatge d'algunes de les diferents poblacions cel·lulars que componen la sang de cordó umbilical (SCU) i la sang perifèrica d'adult (SPA).

L'estudi immunofenotípic es va realitzar utilitzant sang sense separar, marcant les diferents subpoblacions amb anticossos monoclonals i analitzant-les posteriorment per citometria de flux. En estudis previs, s'havia localitzat la població limfocitària en un histograma de dues dimensions per les seves coordenades de FS i SS (ForwardScatter i SideScatter) i així diferenciar-la de la resta de poblacions presents en la sang (monòcits i cèl·lules polimorfonuclears). A partir de la selecció de la població limfoide i utilitzant un anticòs anti-CD3, es va comparar el percentatge de les subpoblacions de limfòcits T.

En la taula 4.1 es mostra els marcadors utilitzats i el percentatge observat de cada una de les subpoblacions limfocitàries analitzades en la sang de cordó umbilical i la sang perifèrica d'adult.

Taula 4.1. Percentatges observats d'algunes subpoblacions cel·lulars presents en la sang de cordó i sang perifèrica d'adult i.

MARCADOR	SUBPOBLACIÓ LIMFOCITÀRIA	SPA (n=18) ^{a)}	SCU (n=32)
CD3⁺	Limfòcits T	68,48 ± 12,86 ^{b)}	59,09 ± 18,25
CD3⁺CD4⁺	Limfòcits T col·laboradors	40,15 ± 15,33	45,12 ± 13,82
CD3⁺CD8⁺	Limfòcits citotòxics	26,53 ± 10,3	14,02 ± 7,26***
CD3⁻CD8⁺	Subpoblació NK	8,96±5,8	13,43±9,35
CD3⁻CD16⁺	Subpoblació NK	13,42 ± 8,32	22,25 ± 1,59
CD4⁺CD45RA⁺	Limfòcits col·laboradors <i>naïve</i>	19,7 ± 9,5	40,0 ± 7,8***
CD4⁺CD45RO⁺	Limfòcits col·laboradors memòria	20,9 ± 10	4,8 ± 3,7***
CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺		1,95 ± 1,6	3,79 ± 1,77***
CD3⁻CD8⁺/CD8⁺		26,28 ± 15,74	48,02 ± 25,05**

^{a)} Número de mostres ^{b)} Mitja±SD en % **Diferència estadística (p<0,01) ***Diferència estadística (p<0,001)

RESULTATS

No es van observar diferències significatives en el percentatge de limfòcits CD3⁺, així com tampoc en el percentatge de limfòcits CD4⁺.

Malgrat que el percentatge de limfòcits CD3⁺CD4⁺ era similar entre SCU i SPA, quan restringíem el quocient a CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, aquest era significativament superior en SCU.

Per determinar el percentatge de limfòcits NK, es van marcar les cèl·lules amb un anticòs anti-CD16, excloent les CD3⁺. No es van observar diferències entre SPA i SCU en el percentatge de cèl·lules CD3⁻CD16⁺ ni CD3⁻CD8⁺.

Una de les principals diferències observades i que ja havia estat descrita (Bradley et al., 1989; Han et al., 1995) és que en SPA només un 19,7% dels limfòcits T són CD4⁺CD45RA⁺, en canvi en SCU un 40,0% de limfòcits T són CD4⁺CD45RA⁺.

4.1.1. EXPRESSIÓ DE MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR

Mitjançant citometria de flux es van determinar els nivells d'expressió utilitzant una mesura relativa de la quantitat de molècules expressades en la superfície cel·lular i que és el paràmetre de MFI (mitja de la intensitat de fluorescència). Es van comparar els nivells de les molècules CD3, CD45 i CD4 en la SCU i SPA.

Una alíquota de sang (100µl) de cordó umbilical i d'adult es va marcar amb dos barreges d'anticossos: 1) CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5 i 2) CD4-FITC, CD45RA-PE, CD3-PC5 per analitzar els nivells d'expressió de CD3, CD45 i CD4 en cadascuna de les diferents subpoblacions limfocitàries.

EXPRESSIÓ DE CD3

Els nivells d'expressió de CD3 en els limfòcits T de SCU estava incrementada unes 1,25 vegades comparat amb els de SPA. Si es seleccionava la població CD3⁺CD4⁺ i la població CD4⁺CD45RA⁺ els nivells d'expressió del CD3 es mantenien superiors en la sang de cordó umbilical comparat amb SPA, així com també en la població CD3⁺CD8⁺. (Figura 4.1).

RESULTATS

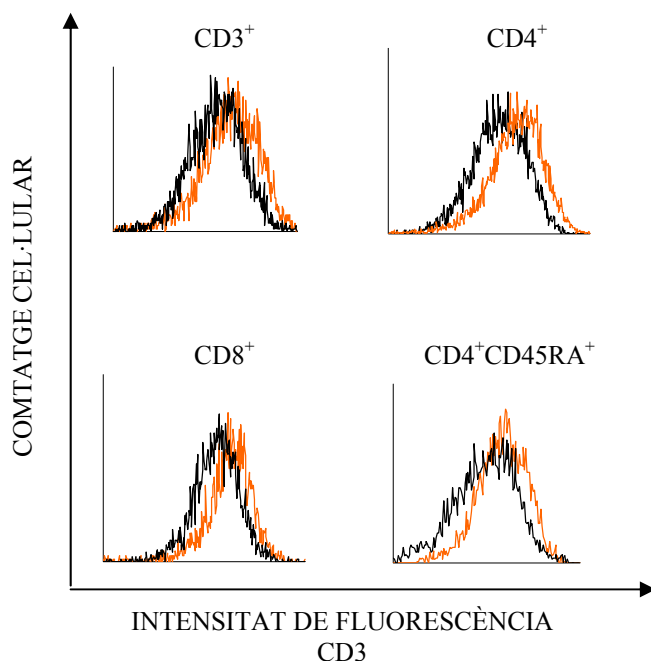


Figura 4.1. Expressió de la molècula CD3. Mitjançant citometria de flux, es va determinar l'expressió de membrana de la molècula CD3 en la sang sense separar de cordó umbilical i de sang perifèrica. Es mostra un histograma on es compara l'expressió (intensitat de fluorescència), enfront del nº de cèl·lules (comptatge cel·lular) de la molècula CD3 entre les cèl·lules de SPA (-) i de SCU (-). Es van analitzar 12 mostres tant de SPA com de SCU.

EXPRESSIÓ DE CD45

L'expressió de la molècula CD45 es va estudiar en els limfòcits CD4⁺ i en els CD8⁺. En ambdues subpoblacions l'expressió de CD45 fou superior en SPA que en SCU (Figura 4.2). A més, cal destacar que l'expressió de CD45 fou superior en la població CD8⁺ respecte a la població CD4⁺ tant en SCU com en SPA, encara que en SCU la diferència d'expressió era superior.

RESULTATS

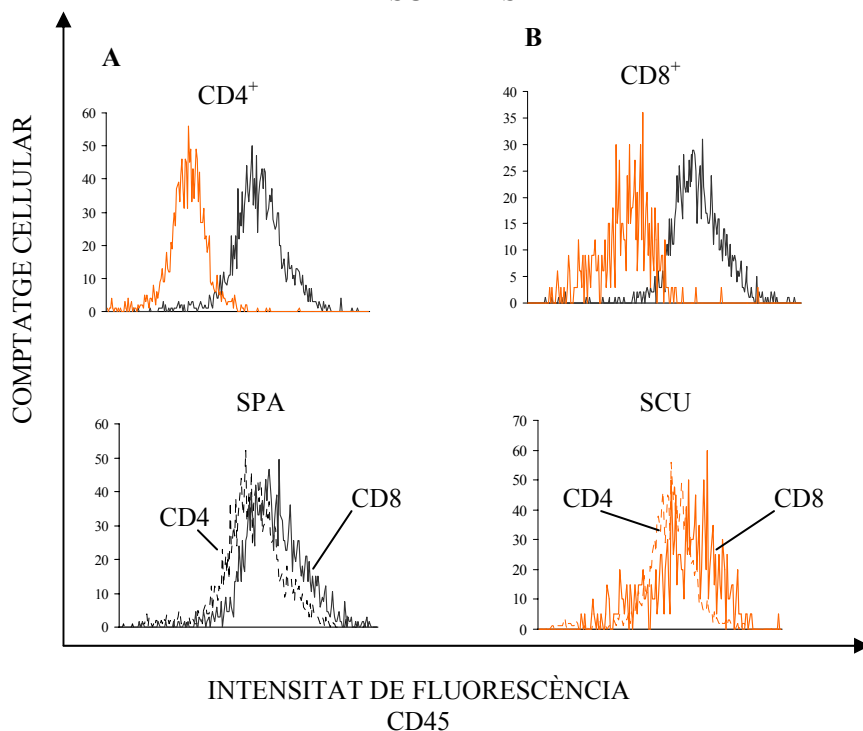


Figura 4.2. Expressió de la molècula CD45 en la població CD4⁺ i CD8⁺. Mitjançant citometria de flux, es va determinar l'expressió de membrana de la molècula CD45 en la sang sense separar de cordó umbilical i de sang perifèrica d'adult. A) Es mostra un histograma on es compara l'expressió (intensitat de fluorescència), enfront del n° de cèl·lules (comptatge cel·lular) de la molècula CD45 en la població CD4⁺ entre SPA (-) i de SCU (-). B) Histograma on es compara l'expressió de la molècula CD45 en la població CD8⁺ entre SPA (-) i SCU (-). Es van analitzar 11 mostres tant de SPA com de SCU. C) Es mostra un histograma on es compara l'expressió de la molècula CD45 entre la població CD4⁺ i CD8⁺ tant de SPA com de SCU.

A l'analitzar la intensitat de fluorescència de la molècula CD45RA en concret dins de la població CD4⁺, es va observar que l'expressió era inferior en la SCU que en la SPA. (Figura 4.3).

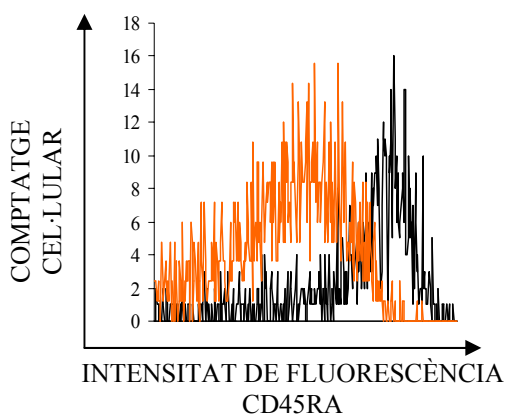


Figura 4.3. Expressió de la molècula CD45RA en els limfòcits CD4⁺. Mitjançant citometria de flux, es va determinar l'expressió de membrana de la molècula CD45RA, en la sang sense separar de cordó umbilical i de sang perifèrica d'adult. Es mostra un histograma on es compara l'expressió (intensitat de fluorescència), enfront del n° de cèl·lules (comptatge cel·lular) de la molècula CD45RA entre les cèl·lules de SPA (-) i SCU (-). Es van analitzar 8 mostres tant de SPA com de SCU.

EXPRESSIÓ DE CD4

Quan es va analitzar l'expressió de la molècula CD4 en la població limfocitària CD45⁺, no es van observar diferències significatives entre la SPA i SCU. (Figura 4.4).

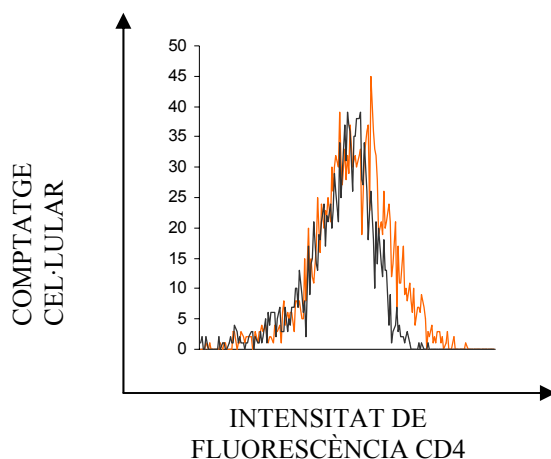


Figura 4.4. Expressió de la molècula CD4. Mitjançant citometria de flux, es va determinar l'expressió de membrana de la molècula CD4 en la sang sense separar de cordó umbilical i de sang perifèrica d'adult. Es mostra un histograma on es compara l'expressió de la molècula CD4 entre les cèl·lules de SPA (—) i de SCU (—). Es van analitzar 11 mostres tant de SPA com de SCU.

4.2. ESTAT FUNCIONAL DE LES CÈL·LULES CD4⁺CD45RA⁺

Un dels factors determinants de la capacitat de resposta de les cèl·lules és el seu estat funcional “per se”. Aquest estat es reflexa entre altres processos per la capacitat espontània d'entrar en la fase S del cicle cel·lular i en conseqüència proliferar, o per patir apoptosi en absència de factors externs.

4.2.1. SÍNTESI DE DNA

Rocarolo i col·laboradors han demostrat que tant les MNC com les cèl·lules T de SCU en cultiu presenten una síntesi de DNA espontània superior a l'observada en les cèl·lules de SPA. Això sí, sempre dins d'uns valors considerablement més baixos respecte a la síntesi de DNA que es dona en la proliferació després d'una activació (Roncarolo et al., 1994). Donat que no hi ha estudis sobre la proliferació espontània dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ purificats, vam realitzar cultius cel·lulars de MNC, T i CD4⁺CD45RA⁺ purificades per determinar si les cèl·lules accessòries participaven o influïen en la capacitat de sintetitzar de nou DNA.

RESULTATS

Amb aquesta fi, es van cultivar 4×10^5 cèl·lules/200 μ l (MNC, T o $CD4^+CD45RA^+$) en una placa de 96 pous, durant 48 hores. Passat aquest temps, es va afegir timidina tritiada- $[^3H]$ i es va mesurar la seva incorporació a les 8 hores.

En la taula 4.2 es mostren els valors de comptes per minut (cpm) observats en els diferents cultius. S'observà que les MNC de SCU presentaven una síntesi de DNA superior a les de sang perifèrica d'adult. En canvi, els valors observats en les cèl·lules T purificades eren molt similars entre SPA i SCU. En quant a la síntesi de DNA en els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ purificats, no s'observava diferències estadísticament significatives entre els dos tipus cel·lulars, perquè els valors obtinguts en la SCU eren heterogenis.

Taula 4.2. Valors d'incorporació espontània de timidina- $[^3H]$ a les 48 h del cultiu de cèl·lules mononuclears, cèl·lules T i $CD4^+CD45RA^+$ de sang perifèrica i de cordó umbilical.

CULTIU	SPA	SCU
MNC	732 \pm 281 ^{a)} (n=11) ^{b)}	1578 \pm 805 ** (n=16)
T	1195 \pm 620 (n=6)	1163 \pm 563 (n=11)
$CD4^+CD45RA^+$	673 \pm 332 (n=11)	1369 \pm 1064 (n=12)

^{a)} Mitja \pm SD ^{b)} Número de mostres analitzades ** Diferència estadística (p<0,01)

Posteriorment, es va analitzar la cinètica de proliferació de les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ cultivant $2,5 \times 10^5$ cèl·lules/200 μ l en una placa de 96 pous. Es va observar que els valors de cpm es mantien superiors en SCU a les 24, 48 i 72 hores, encara que la diferència no era estadísticament significativa, però s'apreciava una tendència a disminuir en les dues poblacions al llarg del temps. (Taula 4.3).

RESULTATS

Taula 4.3. Valors d'incorporació espontània de timidina-[³H] dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ al llarg del temps.

TEMPS ANALITZATS	SPA	SCU
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺	CD4 ⁺ CD45RA ⁺
24 hores	1433 ± 910 ^{a)} (n=2) ^{b)}	1583 ± 111,72 (n=2)
48 hores	673 ± 332 (n=11)	1369 ± 1064 (n=12)
72 hores	380 ± 86 (n=2)	757 ± 272 (n=3)

a) Mitja±SD^{b)} Número de mostres analitzades

4.2.2. APOPTOSI ESPONTÀNIA

Les cèl·lules mononuclears de sang cordó umbilical cultivades en medi de cultiu complet en absència d'estímuls externs entren en apoptosi espontània (Tu et al., 2000). Un dels objectius va ser estudiar l'apoptosi espontània de les cèl·lules T i de les CD45RA⁺ en absència de cèl·lules accessòries (ni B ni no limfoides), per determinar l'efecte de la presència de cèl·lules CD45RO⁺ sobre l'apoptosi espontània. Cultivant cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺, s'havia observat que les cèl·lules *naive* de SCU presentaven un percentatge d'apoptosi espontània superior que les cèl·lules *naive* adultes (Hassan and Reen, 1998; Hassan and Reen, 2001).

4.2.2.1. CÈL·LULES T

Primerament es van realitzar cultius cel·lulars de 4x10⁵ cèl·lules/200µl en plaques de 96 pous i es va mesurar l'apoptosi a les 48 hores dels limfòcits T purificats, segons el protocol descrit en l'apartat 3.3.5. dels Materials i mètodes. S'observà que els valors d'apoptosi determinats pel percentatge de cèl·lules positives per Annexina-V-FITC, eren similars entre els limfòcits T de SPA i SCU. Aquests resultats es mostren en la Figura 4.5.

RESULTATS

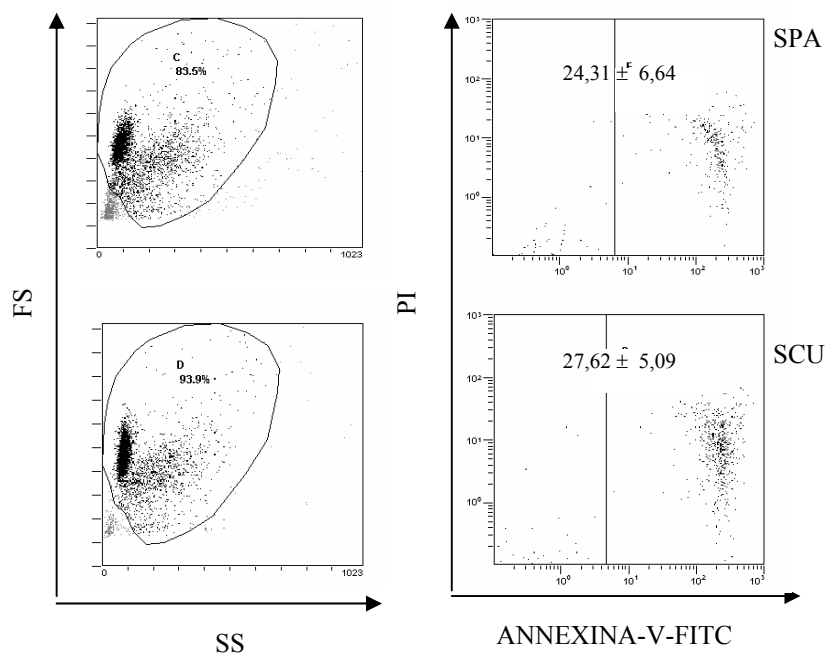


Figura 4.5. Percentatge d'apoptosi espontània de les cèl·lules T purificades de sang perifèrica i de cordó umbilical. Després de 48 hores de cultiu, els limfòcits T es van marcar amb Annexina-V segons el protocol descrit en l'apartat 3.3.5 dels Materials i mètodes. S'indica el percentatge de cèl·lules T positives per Annexina-V-FITC (valor de cèl·lules en apoptosi) determinat per citometria de flux, de quatre mostres independents.

4.2.2.2. CÈL·LULES CD4⁺CD45RA⁺

Seguidament, es va comparar els valors d'apoptosi espontània de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i de SPA quan es cultivaven en absència de cap estímul extern.

El percentatge de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺-Annexin-V⁺ era superior en SCU comparat amb SPA a partir de les 48 hores. Aquests resultats que es mostren en la taula 4.4. estan expressats com a percentatge d'apoptosi de les cèl·lules, considerant que en el moment d'iniciar el cultiu, pràcticament el 100% de les cèl·lules eren viables.

A les 24 hores de cultiu, les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de cordó umbilical presentaven un 11,71±5,62% d'apoptosi. Aquest valor s'incrementava fins assolir 20,01±6,03% a les 48 hores i 21,59±6,37% a les 72 hores de cultiu. En canvi, les cèl·lules de SPA mantenien un percentatge d'apoptosi similar al llarg de les 72 hores de cultiu.

RESULTATS

Taula 4.4. Percentatge d'apoptosi espontània dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA.

TEMPS DE CULTIU	TIPUS CEL·LULAR	
	SPA	SCU
24 hores	3,44% ± 1,91 ^{a)} (n=3) ^{b)}	11,71% ± 5,62 (n=5)
48 hores	7,98% ± 4,77 (n=10)	20,01% ± 6,03*** (n=19)
72 hores	7,44% ± 2,23 (n=7)	21,39% ± 6,03*** (n=11)

^{a)} Mitja±SD expressada en % ^{b)} Número de mostres analitzades *** p<0,001

S'observà que el percentatge de cèl·lules T apoptòtiques era similar al percentatge de cèl·lules apoptòtiques CD4⁺CD45RA⁺ en SCU. En canvi, els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA presentaven un percentatge de cèl·lules apoptòtiques unes 4 vegades inferiors als observats en els seus cultius de limfòcits T. Això suggereix, que els limfòcits CD45RO⁺ entren en apoptosi espontània més fàcilment que les cèl·lules CD45RA⁺ de SPA, encara que no es pot descartar un possible paper dels limfòcits CD8⁺. Per tant, podem concloure que la composició limfocitària de la SPA afecta al percentatge de cèl·lules que entren en apoptosi en absència de cap estímul extern.

4.2.2.3. EFECTE DEL PROPI SÈRUM EN L' APOPTOSI ESPONTÀNIA

S'ha especulat sobre l'existència de factors solubles presents en els sèrums tant de SPA com de SCU que podrien modular la viabilitat cel·lular (Cohen et al., 1998).

Per analitzar *in vitro* la presència d'aquests factors solubles, es van realitzar cultius de 2,5x10⁵ cèl·lules/200µl suplementats amb diferents concentracions de sèrum fetal boví (10% i 5%) i cultius suplementats amb un 10 % del sèrum provenint de la pròpia sang perifèrica i la de cordó. Després de 48 hores de cultiu es va determinar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques per citometria de flux.

La presència d'un 10 % del propi sèrum en el cultiu cel·lular no modificava el percentatge de cèl·lules Annexina-V⁺ en els diferents cultius tant de SPA com de SCU quan es comparaven amb el valors d'apoptosi obtinguts d'aquestes mateixes cèl·lules cultivades amb medi complet.

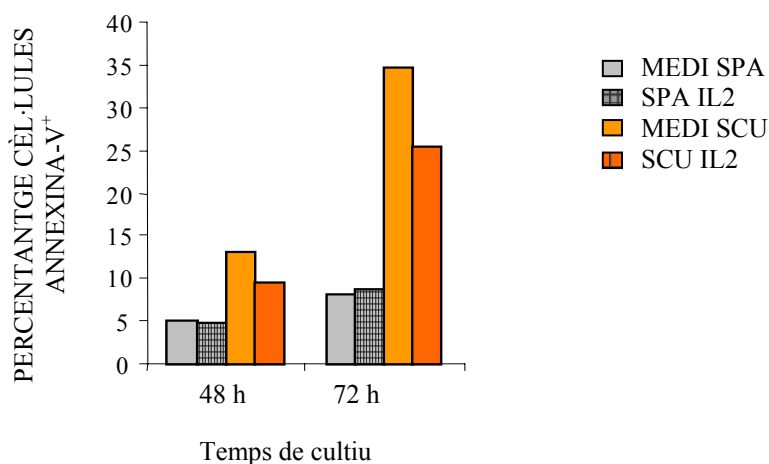
RESULTATS

En les nostres condicions experimentals sembla que no hi ha factors solubles que puguin rescatar a les cèl·lules de l'apoptosi espontània ni incrementar la mort cel·lular.

4.2.2.4. RESCAT DE L'APOPTOSI ESPONTÀNIA

S'ha descrit que interleuquines com IL6 i altres que comparteixen la cadena γ del receptor de la IL2, poden rescatar de l'apoptosi espontània a les cèl·lules T de ratolí (Teague et al., 1997; Hassan and Reen, 1998; Soares et al., 1998; Hassan and Reen, 2001). En alguns casos la IL7 seria la principal interleuquina que podria rescatar a les cèl·lules *naive* de l'apoptosi espontània. En les nostres condicions de cultiu, ens vam plantejar d'estudiar si la IL2, que és considerada un factor de creixement, de supervivència i diferenciació pels limfòcits, així com per la progressió dels limfòcits des de la fase G_1 a la fase S del cicle cel·lular, tindria algun efecte sobre l'apoptosi espontània observada en la sang de cordó umbilical.

En la figura 4.6. es mostra un resultat representatiu de com la presència d'IL2 exògena als cultius cel·lulars $CD4^+CD45RA^+$ disminueix el percentatge d'apoptosi espontània en la SCU entre un 15-30 % en els cultius de 48 i 72 hores. En canvi el percentatge d'apoptosi observat en el cultiu de 48-72 hores de sang perifèrica no es veia afectat per la presència d'IL2.



RESULTATS

Figura 4.6. Efecte de la presència d'IL2 exògena en els cultius cel·lulars sobre l'apoptosi espontània.

Es representa el percentatge d'apoptosi, determinat per citometria de flux, marcant les cèl·lules amb Annexina-V-FITC segons apartat 3.3.5 dels Materials i mètodes. Cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de sang de cordó umbilical i sang perifèrica d'adult, es van cultivar durant 48 i 72 hores, en absència o en presència de 50 U/ml d'IL2 exògena. Es mostra un experiment representatiu de 4 experiments independents.

En la taula 4.5. s'indiquen els percentatges de cèl·lules apoptòtiques dels 4 experiments realitzats a 48 hores de cultiu i també el percentatge de disminució de l'apoptosi espontània que s'observà en presència d'IL2 exògena.

Taula 4.5. Percentatge de cèl·lules apoptòtiques en presència i absència d'IL2 al medi de cultiu.

SPA			SCU		
∅ ^{a)}	IL2 ^{b)}	% DISMINUCIÓ D'APOPTOSI ^{c)}	∅	IL2	% DISMINUCIÓ D'APOPTOSI
5,3	4,8	9,4	13,25	9,58	27,6
7,2	6,8	5	22,4	14,5	35,2
			17,6	15	14,7
			41	21,2	48,2

a) % apoptosi espontània en absència d'IL2

b) % apoptosi espontània en presència d'IL2

c) $\frac{\% \text{ apoptosi en absència IL2} - \% \text{ apoptosi en presència IL2}}{\% \text{ apoptosi en absència IL2}} \times 100$

4.2.2.5. EXPRESSIÓ DE GENS

Tant l'apoptosi espontània de les cèl·lules de SCU com el seu rescat per IL2, ens va fer plantejar l'estudi dels canvis que es podrien donar en els nivells d'expressió d'alguns gens relacionats amb l'apoptosi mitjançant la tècnica de protecció de RNAs (RPA). Concretament, els nivells de mRNAs d'alguns gens de la família del Bcl-2 com els anti-apoptòtics: *bcl-x_L*, *bcl-2*, *bfl1*, *mcl1* i els pro-apoptòtics *bax* i *bak*.

Cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ purificades de SPA i SCU es van cultivar durant 48 hores en presència o absència d'IL2 (50 U/ml). Després d'aquest període es va obtenir el RNA total d'aquestes cèl·lules i de cèl·lules no cultivades que es considerarien com a condicions bassals. Utilitzant el kit de RPA es va mesurar en una mateixa mostra simultàniament els nivells de mRNA dels diferents gens. Després de la hibridació amb

RESULTATS

les sondes dels diferents gens i posteriorment la precipitació dels RNAs protegits, es van separar electroforèticament en gels d'acrilamida en condicions desnaturalitzants i un cop secs es posaren a contactar amb pel·lícules autoradiogràfiques. Cada una de les bandes es va quantificar i normalitzar segons l'expressió del gen *L32* utilitzant el programa *Quantity One* en l'equip d'imatge FLUOR-S (Bio-Rad) donant com a resultat unitats arbitràries de densitat òptica (DO) que permeten la comparació entre diferents mostres. La figura 4.7 és el resultat d'un dels experiments.

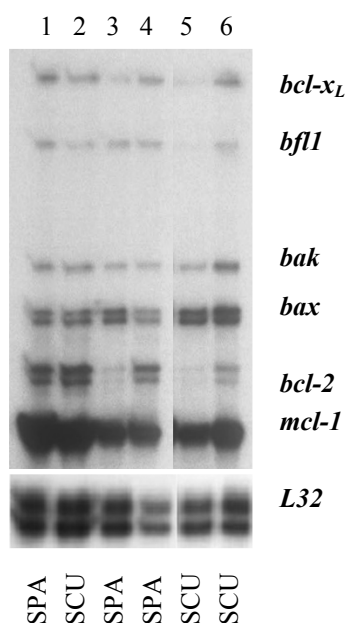


Figura 4.7. Expressió de diferents gens de la família de Bcl-2, en limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ bassals o cultivats en absència o presència d'IL2. Cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU es van cultivar en presència o absència d'IL2 exògena (50 U/ml). Es va obtenir el RNA total després de 48 hores, que s'utilitzà per mesurar els nivells de mRNA de gens pro-anti-apoptòtics mitjançant la tècnica de RPA (segons apartat 3.8 dels Materials i mètodes). Carrils 1 i 2 condicions bassals, 3 i 5 cultius sense IL2 exògena i carrils 4 i 6 cultius amb presència d'IL2.

Per realitzar l'experiment es van utilitzar dues mostres de SCU i SPA per cada condició. En el cas de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ no cultivades es va fer una barreja del RNA de 3 mostres independents.

Resum dels resultat de l'expressió dels gens hAPO2:

Gens pro-apotòtics:

***bax*:** No s'observaven diferències entre les cèl·lules de SPA i SCU en condicions bassals ni cultivades sense cap estímul extern, així com tampoc quan els limfòcits es cultivaven en presència d'IL2.

RESULTATS

bak: A nivell basal i cultivades sense estimulació no s'observaren diferències entre les cèl·lules de SPA i SCU. L'addició d'IL2 al cultiu, provocà que l'expressió de *bak* s'incrementés lleugerament en SPA i SCU (1,5 i 1,7 vegades respectivament).

Gens Anti-apoptòtics:

bcl-x_L: S'observaren diferències a nivell basal (71,1 DO en SPA i 61,05 DO en SCU). Amb l'addició d'IL2 al cultiu s'incrementà l'expressió de *bcl-x_L* tant en SPA com en SCU de 1,8 vegades i 1,4 vegades respectivament.

bcl-2: No s'observaren diferències a nivell basal. Després de 48 hores de cultiu sense estimular els nivells de *bcl-2* van disminuir unes 4 vegades tant en SPA com en SCU. La incorporació al cultiu d'IL2, va donar lloc a un increment en l'expressió de *bcl-2* de 9,25 vegades en SPA i de 4,6 vegades en SCU. Al realitzar el quocient entre *bcl-2/bax* en el cultiu amb IL2 exògena (quocient que s'utilitza per determinar la tendència anti-pro-apoptòtica) aquest resultat ser inferior en el cultiu de les cèl·lules de SCU (40,5 per SPA i 15,4 per SCU).

En el cas dels gens *bfl-1* i *mcl-1* no s'observaren diferències en cap de les condicions estudiades.

4.3. ACTIVACIÓ VIA EL RECEPTOR DEL LIMFÒCIT T

Els limfòcits quan s'activen, experimenten un patró de canvis ben definit: transformació i proliferació blàstica, diferenciació cap a cèl·lules efectores, diferenciació cap a cèl·lules memòria i mort cel·lular programada.

Abans de l'estimulació antigènica o policlonal, els limfòcits són petits i es troben en fase G₀ del cicle cel·lular. En resposta a l'estimulació antigènica (o policlonal), els limfòcits en repòs entren en la fase G₁ del cicle cel·lular. Després augmenten de tamany i s'anomenen blastes. La progressió a la fase S del cicle cel·lular continua i els blastes es divideixen. Aquesta seqüència d'esdeveniments s'anomena, transformació blàstica. La divisió mitòtica és la responsable de la proliferació dels clons de limfòcits que responen enfront de certs antígens.

Existeixen estudis sobre la capacitat d'activació de les cèl·lules de SCU utilitzant al·loantígens, mitògens o anticossos mitogènics i aquests donen lloc a una gran varietat de resultats dels que s'extreuen a vegades conclusions conflictives. Per determinar la capacitat d'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de cordó umbilical en condicions

RESULTATS

controlables experimentals, ens vam plantejar la utilització d'un anticòs anti-CD3 (OKT3) que permetia l'activació dels limfòcits T, mimetitzant el reconeixement de l'antigen pel receptor de la cèl·lula T.

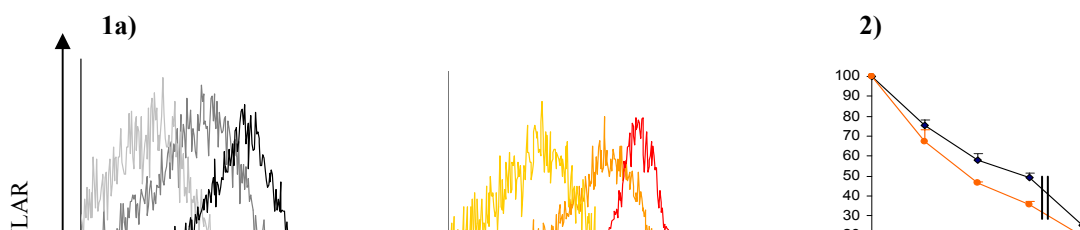
4.3.1. MODULACIÓ A LA BAIXA DEL COMPLEXE TCR/CD3

Un dels primers esdeveniments que es donen després de l'activació dels limfòcits T via el seu receptor és la modulació a la baixa del complexe TCR/CD3. Per això, es va comparar la cinètica de la modulació a la baixa de l'expressió de TCR/CD3 durant l'activació entre els limfòcits de la sang de cordó umbilical i la sang perifèrica adulta.

Cultius de cèl·lules mononuclears, cèl·lules T i cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ purificades es van estimular i processar segons el descrit en apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes. L'anàlisi de l'expressió del CD3 es realitzà a diferents temps: 45 minuts, 90-120 minuts i després de 18 hores de cultiu amb i sense anticòs anti-CD3 segons el protocol descrit en l'apartat 3.3.3, utilitzant la citometria de flux i la modulació a la baixa per mesurar la MFI (mitja de la intensitat de fluorescència)

Com es mostra en la figura 4.8, després del cultiu de cèl·lules mononuclears i de cèl·lules T es va poder identificar i seleccionar als limfòcits $CD4^+$, així com a les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ gràcies al marcatge múltiple amb anticòs monoclonals (anti-CD4 marcat amb FITC i anti-CD45RA marcat amb PE) i la posterior selecció de cada subpoblació per citometria. Finalment es va analitzar independentment la modulació a la baixa de les diferents subpoblacions limfocitàries d'interès.

CULTIUS DE CÈL·LULES MONONUCLEARS



RESULTATS

CULTIUS DE CÈL·LULES T

CULTIUS DE CÈL·LULES CD4⁺CD45RA⁺

COMPTATGE CEL·LULAR

Figura 4.8. Modulació a la baixa de la molècula CD3 després de l'activació via TCR/CD3 en les diferents subpoblacions de SCU i SPA. Després de l'activació dels limfòcits via TCR/CD3 es va

RESULTATS

mesurar la MFI del CD3 per citometria de flux a partir de les diferents poblacions seleccionades. Per això es van marcar les cèl·lules amb anti-CD3-PC5, anti-CD4-FITC i anti-CD45RA-PE. S'indica com: A) cultiu de cèl·lules mononuclears, B) cultiu de cèl·lules T CD3⁺ purificades, i C) cultiu de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ purificades.

1) Es mostra el resultat representatiu de 5 experiments independents indicant la modulació a la baixa del CD3 en 3 temps diferents de cultiu: cèl·lules de SPA – (0), – (90 minuts), – (18 hores); cèl·lules de SCU – (0), – (90 minuts), – (18 hores). 1a) cèl·lules T i 1b) cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺. S'indica la intensitat de fluorescència enfront el comptatge cel·lular.

2) S'indica el percentatge d'expressió de CD3 (eix Y) en les cèl·lules de SPA (–) i SCU (–) després de l'activació via TCR/CD3, calculat segons l'indicat en l'apartat 3.3.3 dels Materials i mètodes, en els diferents temps analitzats. 1) 45 minuts; 2) 1,30 hores; 3) 2,15 hores i 4) 18 hores de cultiu (eix X).

Als 45 minuts de cultivar les cèl·lules de SCU i SPA amb anticossos anti-CD3 s'observà una disminució de l'expressió del CD3 del 25-35 % tant en la subpoblació CD3⁺ total, en la CD3⁺CD4⁺ i en la subpoblació CD4⁺CD45RA⁺. A la 1 hora 30 minuts-2 hores de cultiu, el percentatge d'expressió del CD3 es trobà entre el 45-55 % de l'expressió original, arribant al 15-25 % d'expressió a les 18 hores de cultiu.

No existeixen diferències en la cinètica de regulació a la baixa del CD3 entre la SCU i SPA al llarg dels períodes de temps analitzats. Ambdós tipus cel·lulars arribaven a valors similars d'expressió del CD3 després de 18 hores de cultiu. Tampoc existeixen diferències significatives en la modulació a la baixa del CD3 entre les diferents subpoblacions limfocitàries analitzades (mononuclears, T i CD4⁺CD45RA⁺ purificades). Malgrat això, es va observà una sensible menor expressió del CD3 en les subpoblacions de la sang de cordó umbilical comparat amb la sang adulta en els primers temps analitzats després de l'activació.

Per estudiar si la regulació a la baixa del complex TCR/CD3 era un fenomen específic que no es donava en d'altres antígens de superfície, es va determinar la MFI de la molècula de CD4 al llarg dels cultius cel·lulars, marcant les cèl·lules amb un anticòs monoclonal anti-CD4 conjugat amb FITC. Com es pot observar en la figura 4.9 l'expressió de la molècula de CD4 es mantenia constant al llarg del temps, tant en les cèl·lules no activades com en les activades. Per tant es pot concloure que la baixada de l'expressió del CD3 és un fenomen específic.

RESULTATS

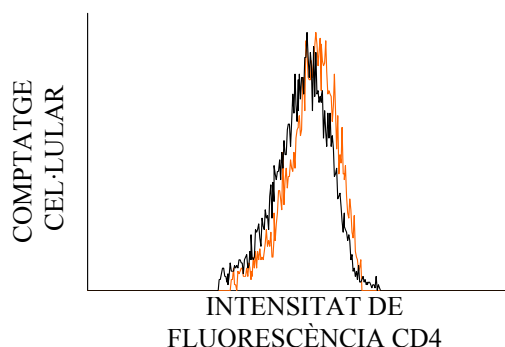


Figura 4.9. Expressió de la molècula CD4 en les cèl·lules de SPA i SCU. Es compara l'expressió de la molècula de CD4 a les 18 hores de cultiu després de l'activació del TCR/CD3. S'indica la intensitat de fluorescència de CD4 enfront el comptatge cel·lular, SPA (—) i SCU (—).

Per comprovar que el CD3 realment s'internalitzava i no només quedava emmascarat per l'anticòs anti-CD3 utilitzat per l'activació de les cèl·lules, es van marcar les cèl·lules amb un anticòs conill anti-Ig de ratolí conjugat amb FITC (DAKO). No es va detectar per citometria de flux la presència d'Ig en la superfície cel·lular en cap cas.

Per corroborar que la diferència d'expressió de la molècula CD3 no era un fenomen relacionat amb l'epítip reconegut per l'anticòs anti-CD3-PC5, (clon UCHT1, Coulter), es va utilitzar un altre anticòs anti-CD3 (clon HIT3a, Coulter). Els resultats que es van obtenir foren similars.

4.3.2. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Com s'ha comentat anteriorment, un dels fenòmens que es dona després de l'activació dels limfòcits és l'expansió dels clons activats que es tradueix en proliferació cel·lular.

Per analitzar la capacitat proliferativa de les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de SCU es va procedir a activar les cèl·lules de SCU i SPA utilitzant l'anticòs monoclonal anti-CD3 (OKT3) que permet una activació policlonal, per després mesurar la incorporació de timidina tritiada [3H] i determinar la síntesi de DNA en els diferents cultius realitzats.

L'anti-CD3 prové de la fracció IgG dels sobrenedants de l'hibridoma OKT3 (ATCC), purificat segons l'apartat 3.9 dels Materials i mètodes. Per determinar la concentració a emprar en els experiments es va establir un cultiu preliminar utilitzant dilucions decreixents d'OKT3 immobilitzat en placa des de 7 $\mu g/ml$ fins 0,7 ng/ml per tal d'observar a partir de quina concentració es donava la proliferació de cèl·lules T ,

RESULTATS

segons el descrit en l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes. La concentració en la qual s'assolien els valors de proliferació més elevats fou la concentració 0,7 µg/ml (40100 cpm). Per tant, tots els experiments de proliferació i activació en placa es van realitzar afegint una concentració de 0,7 µg/ml de l'anticòs anti-CD3 (OKT3).

4.3.3. CAPACITAT DE PROLIFERAR DE LES CÈL·LULES CD4⁺CD45RA⁺

Un cop determinada la concentració òptim de l'anticòs OKT3, ens vam plantejar comparar la capacitat proliferativa de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA. Cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA es van cultivar en presència o absència d'OKT3 durant 48 hores. Després d'aquest període es va incorporar al cultiu timidina-[³H]. En la figura 4.10 es mostren els valors en cpm de les diferents condicions de cultiu.

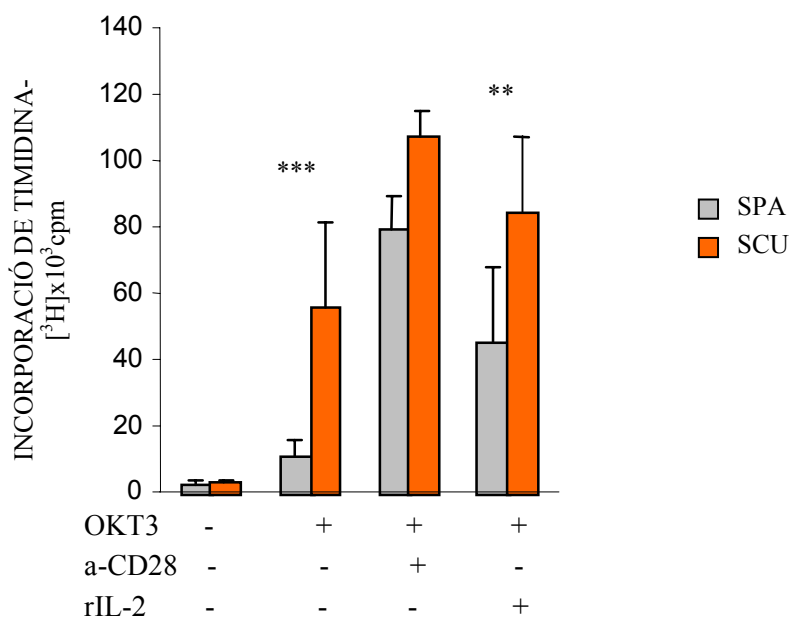


Figura 4.10. Proliferació amb una senyal d'activació (OKT3) i amb coestimulació (OKT3+anti-CD28), OKT3+IL2 a les 48 hores de cultiu. S'indiquen els valors de proliferació (cpm), de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de cordó umbilical i de sang perifèrica en els cultius cel·lulars, activats segons l'apartat 3.2.11 dels Materials i mètodes. S'analitzaren 4 mostres per cada condició i per cada tipus cel·lular.

** Diferència significativa (p<0,01) *** Diferència significativa (p<0,001).

RESULTATS

Com es pot observar s'incrementava la proliferació de les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de SCU unes 40 vegades comparat amb la incorporació espontània de timidina. En canvi en les mateixes condicions de cultiu, les cèl·lules *naive* de SPA no presenten un increment tan important i per tant es donava una diferència significativa entre la síntesi de DNA en els cultius amb OKT3 de SCU i SPA ($p < 0,001$).

Per comprovar que la incorporació de timidina- $[^3H]$ es corresponia amb un increment en el número de cèl·lules en els cultius de SCU i SPA activats amb OKT3, es va procedir a realitzar el recompte cel·lular després del cultiu amb concentracions decreixents de l'anticòs anti-CD3 provenint d'un nou lot de sobredant de l'hibridoma OKT3 (2,5 $\mu\text{g/ml}$ fins 0,01 $\mu\text{g/ml}$). (Figura 4.11).

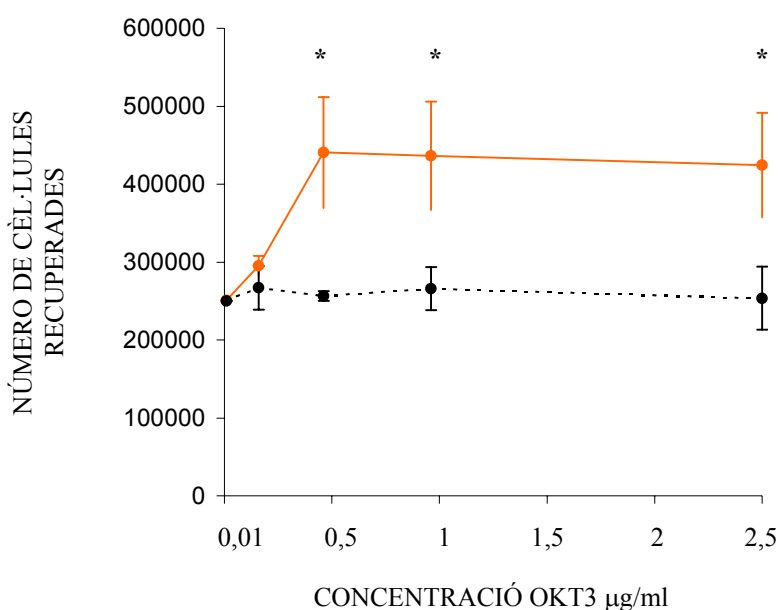


Figura 4.11. Comptatge cel·lular dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SPA i SCU activats amb OKT3. S'indica l'increment en el número de cèl·lules dels cultius de limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SPA (–) i SCU (–) activats amb concentracions decreixents d'OKT3 a les 72 hores de cultiu, respecte als cultius sense estimulació. * $< 0,05$ (Test de Mann-Whitney).

En la figura 4.11 es mostra l'increment de cèl·lules recollides dels cultius de cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de SCU i de SPA en presència de les diferents concentracions de OKT3, respecte al cultiu basal. S'observà que la incorporació de timidina- $[^3H]$ es correlacionava amb el número de cèl·lules que es recuperaven tant de SCU com de SPA. Així es produïa un increment en el número de cèl·lules de SCU, mentre que per

RESULTATS

SPA no s'observava un canvi significatiu respecte al número de cèl·lules de partida en cap de les concentracions utilitzades.

S'ha descrit que per una òptima activació dels limfòcits es necessita de la participació d'una segona senyal d'activació. Aquesta segona senyal pot venir donada per IL2, IL1, IL6 i IL4, o per molècules expressades en les cèl·lules presentadores com per exemple el B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) i CD40.

Per estudiar com afectava la coestimulació a la proliferació de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺, vam realitzar cultius cel·lulars de 48 hores, activant les cèl·lules amb OKT3 a la concentració 0,7 µg/ml i coestimulant-les amb un anticòs anti-CD28 (0,5 µg/ml) segons el descrit en l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes.

La coestimulació amb anti-CD28 produïa que les cèl·lules de SCU incrementessin la seva proliferació aproximadament 2 vegades respecte a una estimulació amb anti-CD3. En canvi, en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA l'increment era de 7 vegades, respecte a la proliferació només amb anti-CD3 (Figura 4.10).

Donat que la IL2 és un factor autocrí de creixement important per les cèl·lules T, es va analitzar la influència d'aquesta citoquina en la proliferació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺. Es van realitzar cultius cel·lulars activats amb OKT3 i OKT3+IL2 durant 48h per posteriorment mesurar la incorporació de timidina-[³H]. En presència d'IL2 exògena tant les cèl·lules de SCU com les de SPA van experimentar un increment en la proliferació de 1,5 vegades en SCU i de 4,4 vegades en SPA, respecte al cultiu amb anti-CD3. Com a resultat, la proliferació entre les dues poblacions fou estadísticament diferent (p<0,01). Aquests valors foren sensiblement més baixos que els obtinguts en els cultius amb coestimulació (OKT3+anti-CD28), tant en SCU com en SPA. (Figura 4.10).

4.3.4. CANVIS MORFOLÒGICS

Un dels principals processos que es produeixen després de l'activació cel·lular, és el canvi morfològic que comporta un augment en tamany i complexitat de les cèl·lules, convertint-les en blastes. Els paràmetres Forward Scatter (FS) i Side Scatter (SS) en citometria de flux permeten de mesurar l'augment de tamany i complexitat de les cèl·lules respectivament. Així vam estudiar els canvis morfològics que es produïen en els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ després de l'activació amb OKT3, OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2 a les 24, 48 i 72 hores. En la figura 4.12. es mostra un experiment representatiu de l'anàlisi a les 48 hores de cultiu.

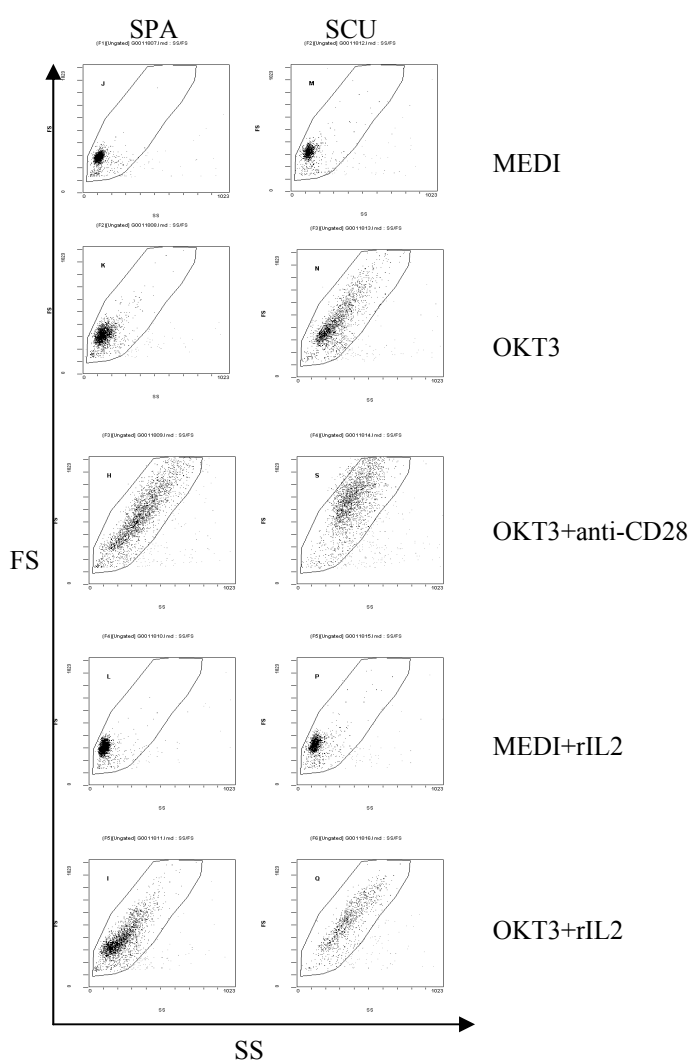


Figura 4.12. Canvis morfològics dels limfòcits de sang perifèrica i de cordó umbilical després de l'activació amb OKT3, OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2. Es mostren els canvis morfològics experimentats per les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de sang perifèrica d'adult (SPA) i de sang de cordó umbilical (SCU), a les 48 hores en les diferents condicions de cultiu. El paràmetre FS (y-axis) indica el canvi en el tamany cel·lular i el paràmetre SS (x-axis) indica els canvis en la complexitat de la cèl·lula. Es mostra un experiment d'un total de 20.

RESULTATS

Després d'activar les cèl·lules amb OKT3 vam observar una significativa transformació blàstica de les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de SCU que ja era apreciable a les 24 hores de cultiu i anava augmentant fins fer-se més evident a les 72 hores, quan pràcticament totes les cèl·lules (80%) de l'histograma es localitzaven en les coordenades característiques de cèl·lules blàstiques (alt FS i SS).

En canvi, en la SPA el canvis morfològics no eran evidents fins les 72 hores de cultiu però sense arribar als nivells de SCU, doncs el percentatge de cèl·lules que es localitzava en les coordenades de blastes era significativament inferior que en SCU (<20%). La coestimulació amb anti-CD28 desplaçava les poblacions de SCU i SPA cap a la morfologia típica de blastes, fet ja evident a partir de les 24 hores de cultiu.

4.3.5. EXPRESSIÓ DE MARCADORS D'ACTIVACIÓ

L'activació cel·lular promou l'expressió de diferents molècules de superfície cel·lular que juguen diversos papers en la resposta immunològica posterior: CD25, CD40L (CD154), CD69, CD28, OX40 (CD134), i CD45RO.

Es van realitzar cultius de cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ cultivant-les amb OKT3, coestimulant-les amb anti-CD28 o bé amb la presència d'IL2 exògena. La cinètica d'expressió dels diferents marcadors es va determinar per citometria de flux a les 24, 48 i 72 hores de cultiu, tenint com a referència a les cèl·lules que van estar cultivades només amb medi de cultiu sota les mateixes condicions. Per cada marcador es va valorar tant el percentatge de cèl·lules positives en quant a l'expressió de la molècula com la MFI. Aquest darrer paràmetre permetria estudiar si es donava un desplaçament del màxim d'intensitat al llarg del temps en les diferents condicions de cultiu. Per cada marcador, es van analitzar més de 4 mostren independents de cada tipus de sang.

Els resultats obtinguts s'indiquen a continuació:

Expressió de CD69. El CD69 és un marcador d'activació primerenca, que s'expressa en la superfície dels limfòcits T després de l'activació.

En la taula 4.6 s'indica que l'expressió basal (\emptyset) del CD69 es mantenia constant al llarg del temps i no es veien diferències d'expressió entre SPA i SCU. El pic d'expressió es donava ja a les 24 hores (90 % en SPA i 89 % en SCU) en les tres

RESULTATS

condicions de cultiu sense veure un canvi en el percentatge de cèl·lules CD69⁺ al llarg del temps després de l'activació. A les 24 hores de cultiu, s'observà que el cultiu amb OKT3+anti-CD28 presentava els valors de MFI més elevats tant per SPA com per SCU. Aquest valor es mantenia a les 48 hores de cultiu, per començar a baixar a les 72 hores tant en SPA com en SCU.

Taula 4.6. Cinètica d'expressió de CD69 en els cultius de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU.

24 h ^{a)}	% CD69		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	2,42±0,4 ^{b)}	3,1±3,38	2,47±1,6	3,84±0,741
OKT3	92,6±5,52	86,43±6,71	15,4±2,83	13,66±2,92
OKT3+CD28	95,4±3,39	92,5±4,78	21,75±2,62	20,36±2,91
OKT3+rIL2	92,85±5,02	88,5±5,22	16,9±1,7	15,6±3,50
48 h	% CD69		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	0,79±0,01	3,24±3,73	2,67±0,9	4,91±1,85
OKT3	92,7±1,27	89,5±5,04	19,55±3,46	21,6±1,91
OKT3+CD28	95,2±0,85	92,16±2,8	22,7±2,12	23,6±1,8
OKT3+rIL2	93,2±1,41	93,65±2,66	20,4±0,85	22,77±3,18
72 h	% CD69		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	0,54±0,37	2,81±2,88	3,64±2,35	4,86±1,06
OKT3	93,4±4,67	92,53±1,5	16,75±1,77	17,36±5,74
OKT3+CD28	89,45±4,31	93,3±2,95	11,36±5,86	13,5±4,09
OKT3+rIL2	91,05±4,31	93,2±2,85	14,45±0,64	13,13±3,15

^{a)} Temps d'estimulació ^{b)} Mitja±SD ^{c)} MFI que correspon a les cèl·lules positives pel marcador

Expressió de CD40L. La molècula CD40L és una molècula de la família del TNF. Es troba expressada principalment en limfòcits CD4⁺ activats, encara que també en una petita proporció de limfòcits CD8⁺ activats, monòcits, NK, i basòfils. La unió del CD40 (que predominantment s'expressa en els limfòcits B, però també en cèl·lules dendrítiques foliculars, epitelí tímic, cèl·lules endotelials i macròfags activats) amb el seu lligand, CD40L, incrementa l'agregació dels limfòcits B, la seva proliferació, la secreció d'Ig i el “switching” de classes d'Igs, així com la producció de certes

RESULTATS

citoquines pels monòcits, l'expressió de molècules d'adhesió i la producció d'IL12 pels macròfags.

En les nostres condicions de cultiu no s'observaren diferències d'expressió de CD40L entre les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA. En la taula 4.7. es mostren els valors del percentatge de cèl·lules CD40L⁺. Les cèl·lules de SPA i SCU tenien una cinètica de l'augment de l'expressió de CD40L similar. El màxim percentatge de cèl·lules CD40L⁺ es donava a les 48 hores en el cas de l'activació amb OKT3+anti-CD28 (74,13±12,21 % per SPA i 77,15±8,27 % per SCU) mentre que quan les cèl·lules s'activaven només amb OKT3 o amb OKT3+IL2 el pic es donava més tard. El màxim de MFI es donava a les 48 hores en les tres condicions de cultiu de les dues poblacions, sent en OKT3+anti-CD28 els valors més alts.

Taula 4.7. Cinètica d'expressió de la molècula de CD40L en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU.

24 h ^{a)}	% CD40L		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	1,31±0,56 ^{b)}	1,35±0,49	1,74±0,47	1,4±0
OKT3	24±7,07	20,95±4,59	2,27±0,17	1,65±0,07
OKT3+CD28	49,7±9,05	47,05±13,78	3,25±0,21	2,55±0,91
OKT3+rIL2	27,4±5,66	21,9±6,78	2,46±0,08	1,75±0,21
48 h	% CD40L		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	3,42±1,24	1,2	1,59±0,27	1,8
OKT3	38,37±4,65	38,4±0,28	3,21±0,27	3,165±0,04
OKT3+CD28	74,13±12,21	77,15±8,27	6,96±0,76	6,6±1,69
OKT3+rIL2	48,4±12,8	53,8±7,7	3,58±0,11	3,60±0,24
72 h	% CD40L		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	2,45±1,2	2,55±0,63	1,49±0,3	1,4±0
OKT3	48±12,73	63,5±7,77	3,35±0,06	3,45±0,07
OKT3+CD28	80,9±0,99	80,25±13,08	6,07±2,03	3,45±1,02
OKT3+rIL2	70,85±6,86	76,6±3,11	4,47±0,24	3,65±0,63

^{a)} Temps d'estimulació ^{b)} Mitja±SD ^{c)} MFI que correspon a les cèl·lules positives pel marcador

Expressió de CD28. Constitutivament es troba expressat en la majoria de cèl·lules T però a nivell baix (Elliott et al., 1999) amb una expressió dinàmica al llarg

RESULTATS

del temps, que vol dir que s'incrementa transitòriament després de l'activació, disminuint després de la unió amb el seu lligand (B7.1 i B7.2). En les nostres determinacions vam considerar com cèl·lules positives aquelles que superaven els nivells d'expressió basal dels cultius sense estimular. Tant en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA com de SCU el màxim de cèl·lules positives es donava a les 72 hores en les tres condicions de cultiu, assolint valors superiors al 80 %. Destacà els baixos nivells de CD28 a les 24 hores en els cultius tant de SCU com de SPA en presència d'anti-CD28 (8,8% i 12,7% respectivament), com a conseqüència d'una transitòria modulació a la baixa del CD28 per la unió de l'anticòs anti-CD28 (Linsley et al., 1993). En aquests cultius, l'expressió de CD28 es recuperava a les 48 hores i arribava a valors comparables amb els de OKT3 i OKT3+IL2 que foren màxims a les 72 hores. En les nostres condicions de cultiu no hi havia diferències en l'expressió del CD28 entre la sang de cordó umbilical i la sang perifèrica, com s'indica en la taula 4.8.

Taula 4.8. Cinètica d'expressió de CD28 en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU, cultivats durant 24, 48 i 72 hores, amb diferents estímuls.

24 h ^{a)}	% CD28	
	SPA	SCU
∅	1,54±0,48 ^{b)}	1,43±0,98
OKT3	31,05±18,31	47,2±9,57
OKT3+CD28	12,74±8,72	8,8±3,36
OKT3+rIL2	27,65±0,78	44,26±14,35
48 h	% CD28	
	SPA	SCU
∅	2,43±1,88	1,87±1,35
OKT3	73,1±6,36	76,08±5,14
OKT3+CD28	50,7±9,05	41,92±18,5
OKT3+rIL2	69,9±2,69	76,05±11,63
72 h	% CD28	
	SPA	SCU
∅	4,72±3	1,89±1,64
OKT3	85,95±8,84	81,53±7,1
OKT3+CD28	89,2±1,7	72,86±19,36
OKT3+rIL2	87,6±3,39	89,1±5,01

^{a)} Temps d'estimulació ^{b)} Mitja±SD

RESULTATS

Expressió de CD25: Una de les molècules que s'expressa ràpidament després de l'activació dels limfòcits T és la cadena α el receptor de la IL2 (p55,CD25, IL2R α). Els resultats es recullen en la taula 4.9 i Figura 4.13 on es mostra l'expressió de CD25 a les 48 hores d'un experiment representatiu d'un total 4.

En els cultius de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ no activades els nivells d'expressió de CD25 eren gairebé indetectables, i no variaven al llarg del temps. Els limfòcits de SCU activats amb anti-CD3 presentaven més CD25 respecte a l'expressió basal (\emptyset) i respecte als de SPA en les mateixes condicions. El pic d'expressió de CD25 es donava ja a les 24 hores de cultiu tant per SPA com per SCU, tenint en compte que l'expressió era superior en SCU. La coestimulació amb anti-CD28 augmentava l'expressió del CD25, tant a la sang de cordó umbilical com a la sang perifèrica respecte al cultiu amb OKT3, assolint percentatges i nivells d'expressió similars en ambdues poblacions, sent el pic d'expressió entre les 24 i 48 hores de cultiu. En presència d'OKT3 i IL2 exògena també s'observà un increment en l'expressió de CD25, sent més elevada en els limfòcits SCU ja a les 24 hores de cultiu i mantenit-se aquesta diferència fins a les 72 hores de cultiu ($p < 0,01$). Cal destacar un augment de la MFI tant en SPA com en SCU en els cultius amb OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2 al llarg del temps, assolint els valors més elevats a les 72 hores de cultiu. Els valors de MFI en els cultius amb OKT3 es mantenien al llarg del temps.

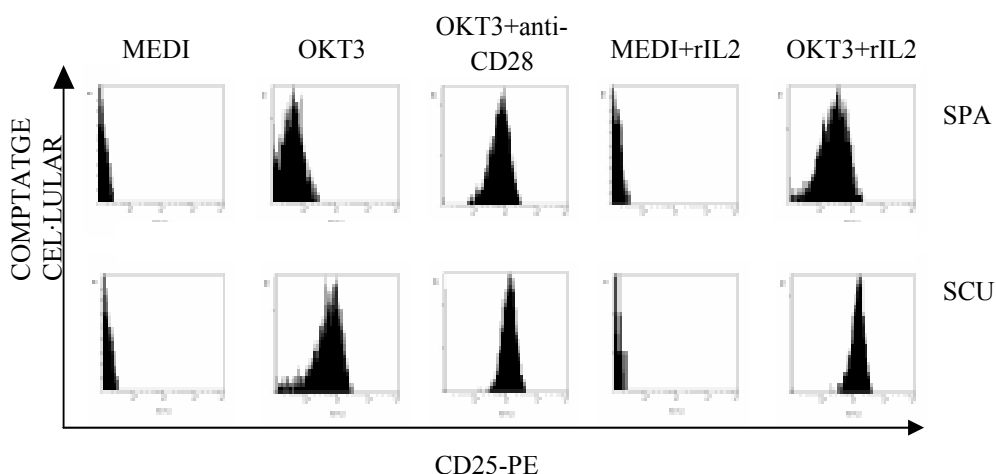


Figura 4.13. Histograma de l'expressió de CD25 en les diferents condicions de cultiu en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de sang de cordó i de sang perifèrica d'adult. Mitjançant citometria de flux es va determinar l'expressió de CD25 en les diferents condicions de cultiu (\emptyset , no activació; OKT3, activació amb anti-CD3; OKT3+anti-CD28; coestimulació amb anti-CD28; OKT3+IL2, presència d'IL2 exògena al medi de cultiu).

RESULTATS

Taula 4.9. Cinètica d'expressió de CD25 en els cultius de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU.

24 h ^{a)}	% CD25		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	1,95 ^{b)}	0,91	0,91	1,2
OKT3	31,7±5,37	67,55±3,6*	1,06	2,46
OKT3+CD28	76,7	82,3±7,63	2,2	4,64
OKT3+rIL2	57,4	84,2	1,42	4,38
48 h	% CD25		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	1,81±0,05	5,64±3,5	0,9	1,5
OKT3	51,35±22,69	68,2±15,4	1,7	3,43±1,7
OKT3+CD28	92,5±0,7	89,85±7,42	6,63	11,7
OKT3+rIL2	80,5	91,4	3,13	12,2
72 h	% CD25		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	2,52±1,8	3,07±1,02	1,84±0,99	1,79±0,69
OKT3	31,92±9,11	69,34±12,12**	1,66±0,6	3,95±1,7
OKT3+CD28	69,34±12,12	92,7±5,8	9,09±2,55	10,9
OKT3+rIL2	78,3±1,35	93±5,56**	9,19±5,04	15,4±5,16

a) Temps d'estimulació b) Mitja±SD c) MFI que correspon a les cèl·lules positives pel marcador
* Diferència significativa (p<0,05) ** Diferència significativa (p<0,01)

Expressió d'OX40. La molècula CD134 (OX40) pertany a la família del TNFR i la seva expressió es limita als limfòcits T activats (Mallett et al., 1990). El seu lligand OX40L és induïble en les cèl·lules B i les cèl·lules dendrítiques a través de la interacció amb OX40. Se l'ha relacionat amb la capacitat de les cèl·lules a derivar cap al fenotip Th2 (Ohshima et al., 1998).

En la taula 4.10 es mostren els valors de la cinètica d'expressió d'OX40 en els cultius de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA. A les 48 hores els cultius de SCU presentaven un percentatge superior de cèl·lules OX40⁺ si s'els comparava amb els de SPA en les tres condicions, diferència que es mantenia almenys fins a les 72 hores. En canvi, els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA només assolien valors d'expressió d'OX40 pròxims als de SCU quan és coestimulaven amb anti-CD28 a les 72 hores de cultiu. En quant a la MFI de les cèl·lules positives no s'observaven diferències entre SCU i SPA, donant-se el pic de màxima expressió a les 72 hores de cultiu.

RESULTATS

Taula 4.10. Cinètica d'expressió d'Ox40 en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ a les 48 i 72 hores de cultiu.

48 h ^{a)}	% OX40		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	5,43±1,5 ^{b)}	4,7	2,48±0,04	3,9
OKT3	40,93±14,84	68,5±9,19**	2,43±0,38	2,8±0,93
OKT3+CD28	74,15±5,44	92,7±1,41	4,5±1,56	5,86±3,53
OKT3+rIL2	43,55±13,36	80,3±2,33**	2,65±0,5	3,5±0,7
72 h	% OX40		MFI	
	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	4,76±2,5	5,75±0,35	3,3±0,43	2,95±1,06
OKT3	69,7±12,3	90,6±3,39**	3,43±0,46	5,4±0,84
OKT3+CD28	92,4±5,66	96,2±1,69	6,94±1,63	4,6±0,56
OKT3+rIL2	80,55±0,91	92,95±1,48*	3,99±1,14	4,17±1,31

^{a)} Temps d'estimulació ^{b)} Mitja±SD ^{c)} MFI que correspon a les cèl·lules positives pel marcador
 * Diferència significativa (p<0,05) ** Diferència significativa (p<0,01)

Expressió de CD45RO: Es va estudiar l'expressió de la isoforma CD45RO, que és un marcador de diferenciació, en els cultius de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ tant de SCU com de SPA.

S'observà que en cap dels temps analitzats i en cap condició de cultiu ni en SCU ni SPA es produïa una conversió total de les cèl·lules de CD45RA⁺ a CD45RO⁺. Cal destacar una coexpressió de CD45RA⁺RO⁺ que es donava en una part significativa (22,63±9,33 %) de les cèl·lules de SCU quan eren coestimulades amb anti-CD28 durant 72h, encara que aquesta coexpressió ja començava a donar-se les 48 hores de cultiu, tal com s'indica en la taula 4.11 i figura 4.14.

RESULTATS

Taula 4.11. Cinètica d'expressió de la molècula CD45RO en els cultius de CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU.

48 h ^{a)}	% CD45RA ⁺		% CD45RA ⁺ RO ⁺		% CD45RO ⁺	
	SPA	SCU	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	93,95±3,18 ^{b)}	87,3±4,27	0,54±0,14	1,59±1,24	0,32±0,31	0,39±0,54
OKT3	93,2±5,37	86,46±2,15	1,4±1,24	3,29±0,85	0,38±0,17	0,54±0,44
OKT3+CD28	93,05±5,58	85,73±2,19	1,81±1,64	6,67±1,09***	0,02±0,03	2,65±0,28
OKT3+IL2	93,25±6,35	88,8±0,14	0,79±0,78	2,91±0	0,19±0,26	1,45±0,58
72 h	% CD45RA ⁺		% CD45RA ⁺ RO ⁺		% CD45RO ⁺	
	SPA	SCU	SPA	SCU	SPA	SCU
∅	94,05±6,71	85,9±3,29	0,38±0,53	2,32±1,98	0,35±0,5	0,83±0,96
OKT3	93,7±7,21	90,33±0,85	1,82±2,15	3,37±2,67	0,09±0,12	0,99±1,43
OKT3+CD28	93,5±5,79	72,03±11,73	3,33±2,85	22,63±9,33 ***	0,43±0,3	1,53±1,56
OKT3+IL2	95,2±5,86	91,83±3,85	1,6±1,91	3,64±2,98	0,17±0,07	1,02±1,13

a) Temps d'estimulació^{b)} Mitja±SD *** Diferència significativa (p<0,001)

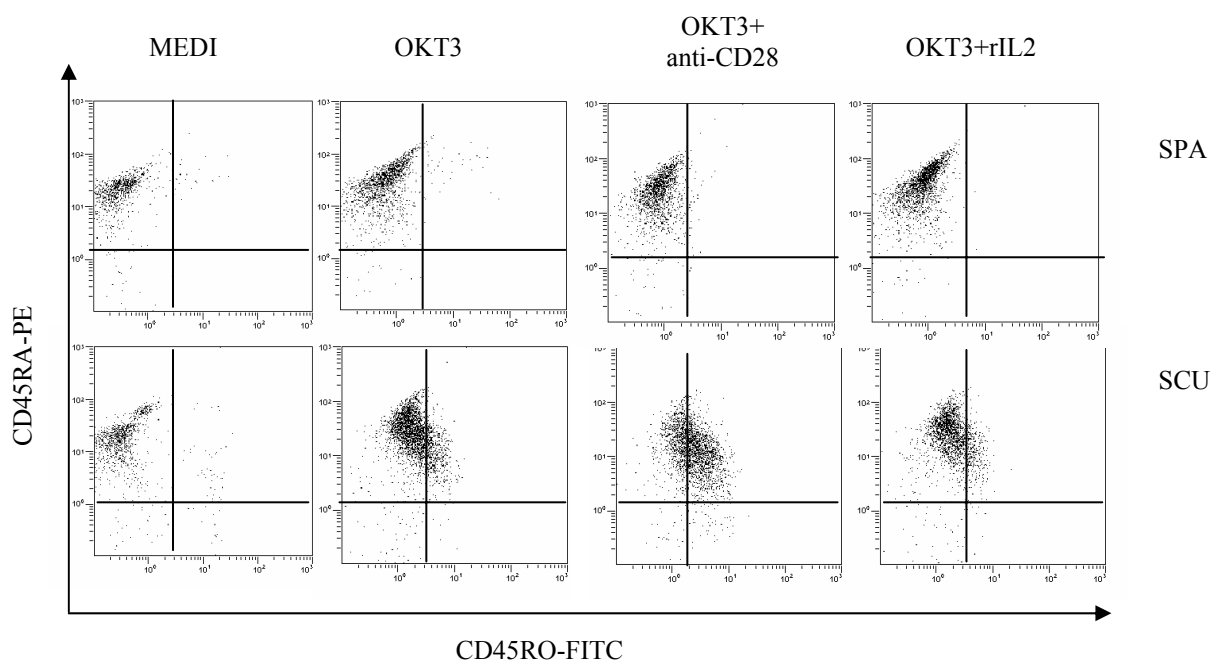


Figura 4.14. Cinètica d'expressió de la isoforma CD45RO en cultius de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU. Mitjançant citometria de flux es va determinar l'expressió del CD45RO en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de sang perifèrica i de cordó umbilical, marcant les cèl·lules amb anticossos anti-CD45RA-PE i anti-CD45RO-FITC. S'indica un experiment representatiu d'un total de 4 experiments independents.

D'aquest grup de resultats podríem concloure que els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU tenen la capacitat d'expressar els diferents marcadors d'activació analitzats. En certs casos l'expressió és comparable amb la de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i en altres, com és el cas del CD25 i l'OX40, existeixen diferències significatives entre els dos tipus cel·lulars.

4.3.6. QUANTIFICACIÓ D'INTERLEUQUINA 2 (IL2)

La principal citoquina que poden produir les cèl·lules *naïve* després de la seva activació és la IL2.

Utilitzant la tècnica d'ELISA descrita en l'apartat 3.4 dels Materials i mètodes, es va quantificar la IL2 present en els sobredants procedents dels diferents cultius (OKT3 i OKT3+anti-CD28) de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA. Es determinà la concentració d'IL2 a les 24, 48 i 72 hores de cultiu. Com a control negatiu es van utilitzar els sobredants de cultius sense activar. El límit de detecció de l'ELISA fou de 40 pg/ml amb una corba estàndard que abarcava de 10000 pg/ml fins 20 pg/ml.

A les 24 hores de cultiu, els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU activats amb OKT3 produïen IL2 (146 ± 51 pg/ml), en canvi en els de SPA només 1 de 4 mostres analitzades produïa IL2 al límit de detecció (80 pg/ml). A les 48 i 72 hores de cultiu amb OKT3 no es van trobar nivells detectables de producció d'IL2 ni en SCU ni SPA. La coestimulació amb anti-CD28, produïa un increment estadísticament significatiu de la producció d'IL2 tant en els limfòcits de SCU com de SPA a les 24 hores ($p < 0,05$ per SCU i $p < 0,01$ per SPA), i també a les 48 hores encara que amb concentracions inferiors ($8200 \pm 3145,36$ per SPA vs $10650 \pm 5660,09$ per SCU a les 24 hores i $5230 \pm 2085,55$ per SPA vs $4944 \pm 2798,37$ per SCU a les 48 hores) possiblement degut a un consum per les cèl·lules CD25⁺.

4.3.7. APOPTOSI

Cèl·lules T neonatals *naïve* de ratolí es moren per apoptosi després d'una senyal d'activació primària via TCR/CD3 (Adkins et al., 1996). Per això, es va estudiar com afectava l'activació primària a la viabilitat dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA.

RESULTATS

Cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ es van estimular amb OKT3, OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2 i després de 24, 48 i 72 de cultius es va mesurar l'apoptosi cel·lular per citometria de flux, utilitzant Annexina-V conjugada amb FITC (Figura 4.15).

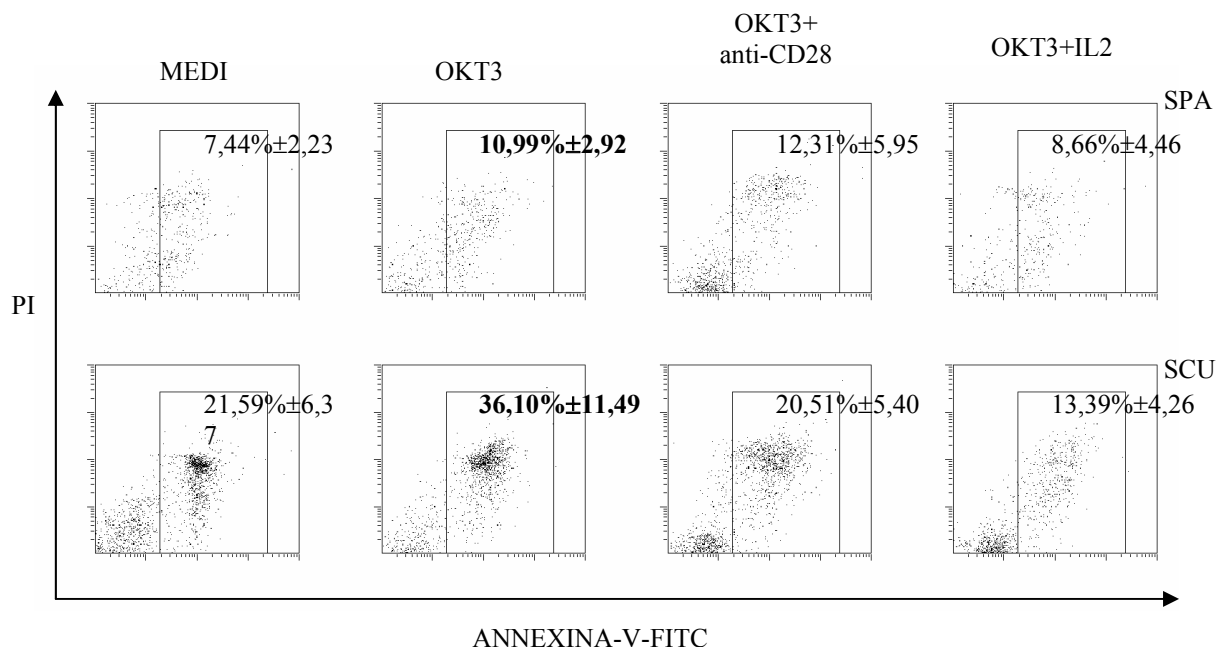


Figura 4.15. Apoptosi després de 72 hores d'activació. Es mostra el percentatge de cèl·lules positives per Annexina-V i per PI determinat mitjançant citometria de flux, tant de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU com de SPA, en els diferents cultius cel·lulars. S'indica el percentatge de cèl·lules que són Annexina-V⁺, que inclou aquelles que són PI⁺ així com les que són PI⁻. S'indica la mitja ± SD d'un total de 6 experiments independents.

A les 24 de l'estimulació amb OKT3, els nivells d'apoptosi dels cultius de SCU es mantien similars als dels cultius només amb medi (apoptosi espontània), però a les 48 hores s'incrementava el percentatge de les cèl·lules Annexina-V⁺ en SCU, fent-se encara més evident a les 72 hores de cultiu quan s'arribà a valors del 34-55 %. Per altra banda, en els cultius de cèl·lules de SPA sense activar i activats amb OKT3 el percentatge de cèl·lules en apoptosi eren similars tant a les 24, 48 i 72 hores, (12%).

La coestimulació via CD28 incrementà la supervivència dels limfòcits T de SCU doncs disminuï el percentatge de cèl·lules Annexina-V⁺ respecte a les cèl·lules cultivades només amb OKT3.

Per avaluar l'efecte de la IL2 sobre l'apoptosi observada en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU, es va afegir IL2 (50 U/ml) als cultius cel·lulars activats amb

OKT3 (apartat 3.2.1. dels Materials i mètodes). La presència d'IL2 al cultiu de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU produïa una disminució de l'apoptosi fins a valors del 13,39±4,26 a les 72 hores. En canvi, en els de SPA, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques era comparable en totes les condicions de cultiu.

De tots aquests resultats podem concloure que l'activació amb OKT3 comportà que un major percentatge de cèl·lules de SCU entren en apoptosi sota les mateixes condicions respecte a les cèl·lules de SPA ($p < 0,0001$, $n=6$). La coestimulació amb anti-CD28 i la presència d'IL2 exògena fan disminuir el percentatge de cèl·lules apoptòtiques presents en els cultius de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU. En canvi, es mantenen gairebé invariables els valors d'apoptosi en els cultius paral·lels de SPA.

4.3.8. EXPRESSIÓ DE GENS

Per tal d'entendre els possibles mecanismes que tenen lloc després de l'activació amb OKT3 i que porten a les cèl·lules de SCU a la mort cel·lular, a més a més de com la IL2 o la coestimulació amb anti-CD28 poden intervenir com a factors de rescat en l'apoptosi d'aquestes cèl·lules, ens vam plantejar l'estudi de l'expressió de gens relacionats amb diferents vies que porten a la mort cel·lular per apoptosi. Primer, es va obtenir el RNA total de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ en repòs i activats durant 48 hores en plaques de cultiu amb anti-CD3 immobilitzat. Després, mitjançant la tècnica de protecció de RNAs (RPA), es va analitzar l'expressió del mRNA de diferents gens de la família del Bcl-2 (hAPO2) i de la família del TNFR (hAPO3).

Per densitometria de les radiografies obtingudes de l'exposició dels gels d'acrilamida es va adjudicar un valor per cada gen i posteriorment es va normalitzar amb el del gen *L32* en cada mostra. D'aquesta manera, l'expressió de cada gen té associat un valor final expressat en unitats arbitràries de densitat òptica que anomenem DO (Figura 4.16 i Figura 4.17). En el cas del gen *bcl-2* també es mostra el resultat d'una exposició més llarga degut a la baixa expressió observada en exposicions de curt temps.

A continuació es mostra el resultat de l'hAPO 2 realitzada amb els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA.

RESULTATS

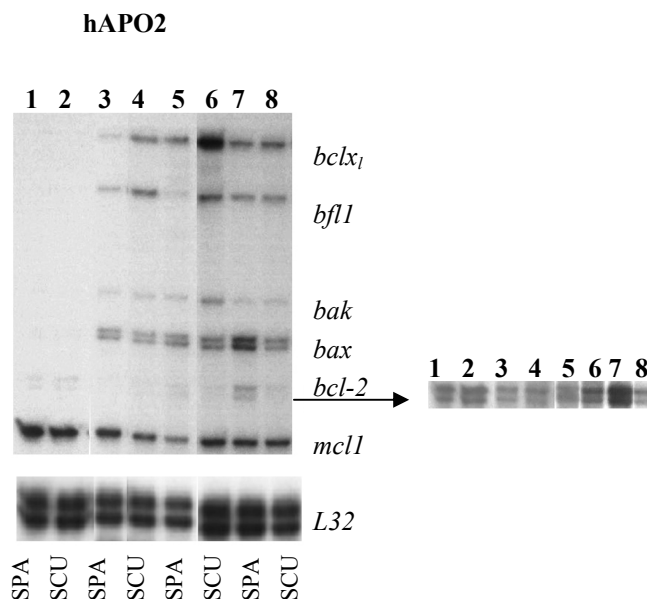


Figura 4.16. Expressió del mRNA d'alguns gens relacionats amb l'apoptosi. A partir de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de sang perifèrica i de cordó umbilical, es van realitzar cultius cel·lulars durant 48 hores. Es va obtenir el RNA total i mitjançant la tècnica de RPA, es va analitzar l'expressió del mRNA de diferents gens relacionats amb la mort cel·lular per apoptosi. S'indiquen en els carrils 1 i 2 cèl·lules cultivades sense estimulació (condicions bassals), 3 i 4 activació amb OKT3, 5 i 6 activació amb coestimulació (OKT3+anti-CD28) i 7 i 8 activació en presència d'IL2 (OKT3+IL2). Es mostra una mostra representativa de cada condició de l'hAPO2. A la part dreta de la figura s'indica l'expressió de *bcl-2* en una exposició més llarga. S'utilitzaren dos o tres mostres independents de cèl·lules de cordó umbilical i de sang perifèrica, en els cultius cel·lulars activats, i per la mostra en condicions bassals es va emprar una barreja d'igual quantitat de RNA procedent de 3 mostres independents.

Resum dels resultats de l'expressió dels gens hAPO2:

Gens pro-apotòtics:

***bax*:** En condicions bassals l'expressió de *bax* fou baixa en les mostres analitzades. Després de l'activació amb OKT3, OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2, la seva expressió s'incrementava, no observant-se diferències entre els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA. Cal ressaltar, la variabilitat en l'expressió de *bax* en les mostres després de l'activació amb OKT3+IL2.

***bak*:** L'expressió basal de *bak* en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA fou baixa, incrementant-se després de l'activació. No s'observaren diferències en l'expressió de *bak* en cap de les condicions d'activació entre SCU i SPA.

Gens Anti-apoptòtics:

bcl-x_L: En condicions bassals l'expressió de *bcl-x_L* fou baixa. Quan les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ s'activaren amb OKT3 i OKT3+anti-CD28, l'expressió de *bcl-x_L* s'incrementà i fou superior en SCU (14,48±1,75 de DO per OKT3 i 30,11±1,96 per OKT3+anti-CD28) comparat amb SPA (4,48±1,82 de DO per OKT3 i 19,18±2,51 per OKT3+anti-CD28). En canvi quan les cèl·lules s'activaren amb OKT3+IL2 els nivells d'expressió de *bcl-x_L* s'igualaren entre SCU i SPA (19,06±0,197 de DO per SCU i 16,04±0,5 per SPA).

bfl1: L'expressió de *bfl1* en condicions bassals fou baixa i s'incrementà després de l'activació, sent superior en SCU quan les cèl·lules s'activaven amb OKT3 i OKT3+anti-CD28 (27,31±10,03 i 16,72±0,96 per SCU activat amb OKT3 i OKT3+anti-CD28 respectivament vs 4,89±2,71 i 6,12±1,51 per SPA activat amb OKT3 i OKT3+anti-CD28 respectivament). L'activació amb OKT3+IL2 igualava els nivells d'expressió de *bfl1* entre SCU i SPA.

bcl-2: En condicions bassals es detectà expressió de *bcl-2* similar entre SPA i SCU. Quan els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ s'activaren, els nivells d'expressió de *bcl-2* es mantien similars respecte els nivells bassals, no observant-se diferències entre SCU i SPA en les tres condicions d'activació estudiades.

mcl-1: En condicions bassals l'expressió de *mcl-1* fou similar entre SPA i SCU i els nivells d'expressió es mantien després de l'activació, no observant-se diferències entre SCU i SPA.

Quan es realitzà el quocient entre els nivells d'expressió de *bcl-2* i *bax* en els cultius activats amb OKT3 no s'observaren diferències entre SPA i SCU (15,42±1,52 per SPA vs 13,62±0,21 per SCU).

A continuació es mostra en la Figura 4.17 el resultat de l'hAPO 3 realitzada amb els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA.

RESULTATS

hAPO 3

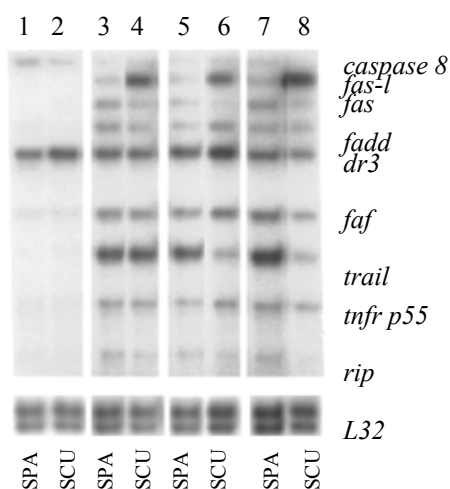


Figura 4.17. Expressió del mRNA d'alguns gens relacionats amb l'apoptosi. A partir de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de sang perifèrica i de cordó umbilical, es van realitzar cultius cel·lulars durant 48 hores. Es va obtenir el RNA total i mitjançant la tècnica de RPA, es va analitzar l'expressió del mRNA de diferents gens relacionats amb la mort cel·lular per apoptosi. S'indiquen en els carrils 1 i 2 cèl·lules cultivades sense estimulació (condicions bassals), 3 i 4 activació amb OKT3, 5 i 6 activació amb coestimulació (OKT3+anti-CD28) i 7 i 8 activació en presència d'IL2 (OKT3+IL2). S'utilitzaren dos o tres mostres independents de cèl·lules de cordó umbilical i de sang perifèrica, en els cultius cel·lulars activats, i per la mostra en condicions bassals es va emprar una barreja d'igual quantitat de RNA procedent de 3 mostres independents.

Resum dels resultat de l'expressió dels gens hAPO3:

Gens Pro-apoptòtics:

caspase 8: Destacà principalment el nivell superior d'expressió basal de la caspase 8 en els limfòcits de SPA comparat amb els nivells d'expressió en SCU (25,21 DO de SPA vs 17,23 DO de SCU). Quan els limfòcits s'activaren s'observà una disminució dels nivells de mRNA en les tres condicions de cultiu, tant en SPA com en SCU.

fas-l: Es va observar una expressió superior del *fas-l* en condicions bassals en la sang perifèrica (6,69 DO per SPA i 4,58 DO per SCU), malgrat que en la imatge mostrada aquesta expressió es veu molt dèbilment. Quan les cèl·lules s'activaren, tant amb OKT3 com amb OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2, els nivells observats d'expressió de *fas-l* eren superiors en les cèl·lules de SCU comparat als observats en SPA.

RESULTATS

fas: L'expressió basal de *fas* fou superior en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA comparat amb SCU, malgrat que en la imatge mostrada l'expressió de *fas* es veu molt dèbilment. Els nivells d'expressió s'incrementaven entre 2 i 4 vegades tant en SPA com en SCU quan les cèl·lules s'activaren, sent superior l'increment en els cultius suplementats amb IL2 exògena. Cal dir, però, que els nivells de mRNA bassals observats de *fas-l* i *fas* en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ eren molt baixos si es comparaven amb l'expressió d'altres gens, com *caspase 8*, *dr3* i *tnfr*.

trail: Cal destacar que no s'observà expressió basal de *trail* ni en SPA ni SCU. Quan les cèl·lules s'activaven en les tres condicions de cultiu els nivells s'incrementaven entre 7 i 10 vegades. S'observà una variable expressió del *trail* en els limfòcits de SCU activats amb OKT3+CD28 i OKT3+IL2. Un cop normalitzats els valors no s'observaren diferències en l'expressió entre SCU i SPA.

fadd, dr3: No s'observaren diferències entre SPA i SCU a nivell basal ni a nivell d'activació. L'expressió de *faf*, *tnfr* i *rip* s'incrementava quan les cèl·lules s'activaven amb OKT3, OKT3+CD28 i OKT3+IL2, tant en SPA com en SCU.

4.3.8.1 EXPRESSIÓ DE FAS I FAS-L

Per estudiar si els diferents nivells d'expressió dels mRNAs del *fas* i *fas-l* també es traduïa en diferents nivells d'expressió de proteïnes, es va estudiar el nivell proteic del Fas i Fas-L en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA, donada la coneguda rellevància d'aquestes dues molècules en una de les principals vies implicades en la mort cel·lular després de l'activació (Strasser et al., 1995; Van Parijs and Abbas, 1996).

L'expressió del Fas (CD95) es va determinar per citometria de flux a les 24, 48 i 72 hores de cultiu, utilitzant un anticòs monoclonal conjugat amb FITC que reconeix el Fas humà. L'expressió de Fas no variava al llarg del temps en els dos tipus de cèl·lules cultivades amb medi sol, en canvi els nivells de Fas augmentava significativament en les cèl·lules de SPA però menys en les de SCU en presència de OKT3, OKT3+CD28 i OKT3+IL2. A les 24 de cultiu amb OKT3, el percentatge de cèl·lules Fas⁺ en SPA era superior al de SCU (p<0,001) i aquesta diferència es mantenia fins a les 72 hores. En el cultiu amb OKT3+anti-CD28 augmentava el percentatge de cèl·lules Fas⁺ en SCU però sense assolir els valors obtinguts en els cultius de SPA en les mateixes condicions. (Figura 4.18 i Taula 4.12).

RESULTATS

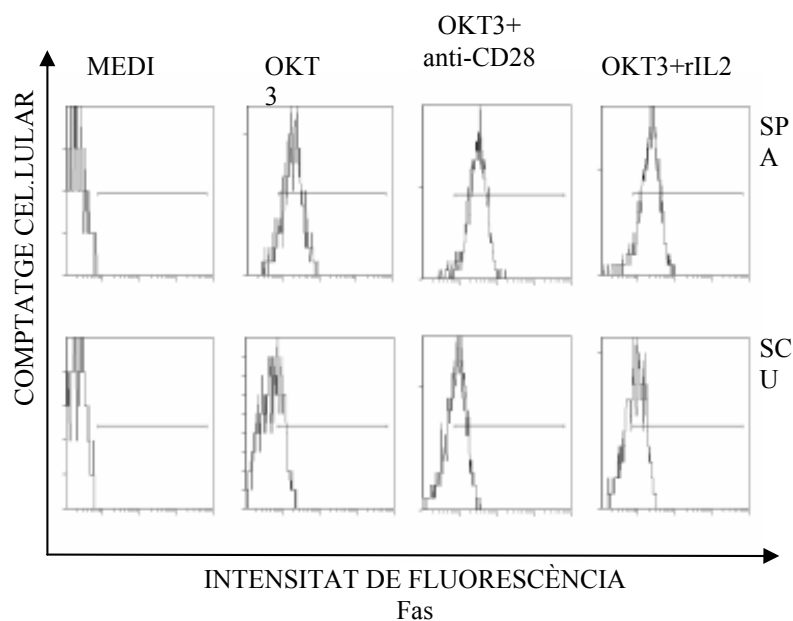


Figura 4.18. Expressió de Fas (CD95) en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU a les 48 hores de cultiu. Mitjançant citometria de flux utilitzant un anticòs monoclonal anti-Fas-FITC es marcaren les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ després del cultiu cel·lular de 48 hores. S'indica un histograma representatiu d'un total de tres mostres independents.

Taula 4.12. Cinètica d'expressió de Fas (CD95) en els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de sang de cordó umbilical i sang perifèrica d'adult, a les 24, 48 i 72 hores de cultiu.

24 h ^{a)}	% Fas	
	SPA	SCU
∅	5,61±4,38 ^{b)}	1,68±0,4
OKT3	34,95±7,42	4,85±0,07***
OKT3+CD28	56,79±5,95	22,5±3,81***
OKT3+IL2	39,6±10,32	15,65±0,49**
48 h	% Fas	
	SPA	SCU
∅	5,08±2,28	5,46±2,15
OKT3	76,63±14,3	38,8±13,33***
OKT3+CD28	92,03±4,53	66,45±12,94**
OKT3+IL2	90,1±6,75	62,73±10,22**
72 h	% Fas	
	SPA	SCU
∅	6,17±3,6	3,75±0,63
OKT3	88,6±12,86	40,2±26,58**
OKT3+CD28	96,05±3,74	72,3±6,08
OKT3+IL2	95,55±2,19	67,35±2,61*

^{a)}Temps d'estimulació ^{b)} Mitja±SD * Diferència significativa (p<0,05) ** Diferència significativa (p<0,01) *** Diferència significativa (p<0,001).

RESULTATS

Per tant, la diferència observada en els nivells de mRNA del Fas entre les cèl·lules cultivades de SCU i SPA, també es traduïa en una diferència en els nivells proteics. En les tres condicions de cultiu, els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA expressaven més Fas que els de cordó umbilical.

Donades les dificultats tècniques per utilitzar anticossos comercials anti-FasL en citometria de flux (Smith et al., 1998), els nivells proteics de Fas-L es van estudiar per Immunoblot (apartat 3.5.4 dels Materials i mètodes). Primer es van realitzar extractes proteics de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA activats segons l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes. Després la proteïna es va immunodetectar per mitja d'un anticòs monoclonal que reconeix el Fas-L humà (clon G247-4). Els extractes es van quantificar segons l'apartat 3.5.2 dels materials i mètodes i a més a més, com a control de càrrega també es va mesurar la β -Actina utilitzant un anticòs monoclonal específic (clon Ac-15).

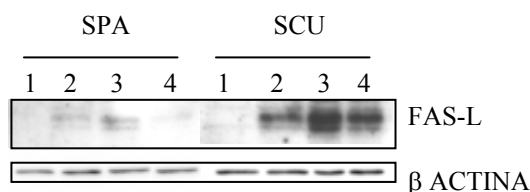


Figura 4.19. Expressió proteica del Fas-L en extractes cel·lulars de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU. Es prepararen gels d'acrilamida del 12 % carregant 3 μ g dels extractes cel·lulars (quantificats segons apartat 3.5.2 dels Materials i mètodes) de limfòcits CD4⁺CD45RA⁺. La detecció del Fas-L es va realitzar utilitzant un anticòs monoclonal que reconeix el Fas-L humà. S'indiquen les diferents condicions de cultiu: 1= cèl·lules sense activar, 2= activació amb OKT3, 3= coestimulació amb anti-CD28 i 4= presència d'IL2 exògena. L'experiment es va realitzar utilitzant 2 mostres de cada condició de cultiu tant de SPA com de SCU.

Com es pot observar en la figura 4.19, les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU expressaven més proteïna Fas-L que els limfòcits de SPA (entre 7 i 18 vegades) en les cèl·lules activades amb OKT3, així com en les activades amb OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2. Per tant, els nivells més alts de mRNA del *fas-l* en les cèl·lules de SCU es traduïen en nivells superiors de proteïna respecte als de SPA en les tres condicions de cultiu estudiades.

RESULTATS

Donat que les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ de SCU expressaven Fas i alts nivells de Fas-L, ens vam plantejar d'estudiar la funcionalitat de la via Fas-Fas-L en l'apoptosi observada en les cèl·lules *naive* de SCU quan eren activades amb OKT3. Com s'indica en l'apartat 3.3.5.1 del Materials i mètodes, s'utilitzà una proteïna quimèrica Fas:Fc per bloquejar la via de mort cel·lular Fas-Fas-L. Es realitzaren cultius cel·lulars de limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU activats amb OKT3 als que es va afegir Fas:Fc a concentracions decreixents (8 $\mu\text{g/ml}$ fins 1 $\mu\text{g/ml}$) i com a control de l'efectivitat del bloqueig de la via per part d'aquesta proteïna quimèrica es varen utilitzar blastes procedents de cèl·lules mononuclears de PBL activades amb PHA (10 $\mu\text{g/ml}$) que es van cultivar posteriorment amb anti-Fas (Clon CH-11) (200 ng/ml) i la proteïna Fas:Fc (4 $\mu\text{g/ml}$, mínima concentració de Fas:Fc que produïa el màxim d'inhibició de l'apoptosi) (Cheng et al., 1994). L'anàlisi de l'apoptosi es va realitzar per citometria de flux utilitzant Annexina-V FITC.

Els cultius de blastes control amb anti-Fas en presència de la proteïna Fas:Fc presentaven una disminució d'apoptosi del 70% respecte als cultius només amb anti-Fas. En canvi, en els cultius dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU amb OKT3 en presència de Fas:Fc (4 $\mu\text{g/ml}$ i 2 $\mu\text{g/ml}$) s'observava una disminució només del 12% del percentatge de cèl·lules apoptòtiques respecte als valors obtinguts en l'activació amb OKT3. Per tant, en les nostres condicions de cultiu la via Fas-Fas-L no seria la principal via implicada en la mort cel·lular dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU al ser activats amb OKT3. Cal destacar que els cultius amb 8 $\mu\text{g/ml}$ de Fas:Fc augmentava la mort cel·lular, segurament degut a la toxicitat del propi reactiu.

4.4. TRANSDUCCIÓ DE SENYALS DESPRÉS DE L'ACTIVACIÓ VIA TCR/CD3

Els resultats dels estudis sobre l'activació de les cèl·lules T de SCU suggerien la participació de mecanismes intracel·lulars característics en la modulació de la resposta immune que es donen després del reconeixement del TCR.

4.4.1. NIVELLS PROTEICS DE PROTEÏNES IMPLICADES

RESULTATS

En primer lloc es va estudiar els nivells proteics de diferents proteïnes implicades en la cascada de transducció de senyals via activació del TCR/CD3 en les cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA.

Es van quantificar aquelles proteïnes claus que intervenen en els primers processos de la cascada de senyal d'activació via el TCR/CD3 (Lck, ZAP-70, cadena ζ i PLC γ 1) i molècules adaptadores (LAT, Cbl, SLP-76, Vav, Grb-2). Per això, primer, es van obtenir extractes de cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ no cultivades tant de SCU com de SPA, segons apartat 3.5.1 de Materials i mètodes. Després, es va carregar l'extracte proteic corresponent a 3×10^5 cèl·lules per carril del gel d'acrilamida. Finalment, per normalitzar els valors obtinguts després de densitometrar les pel·lícules autoradiogràfiques, es va determinar els nivells de β -actina a cadascun dels carrils. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 4.20.

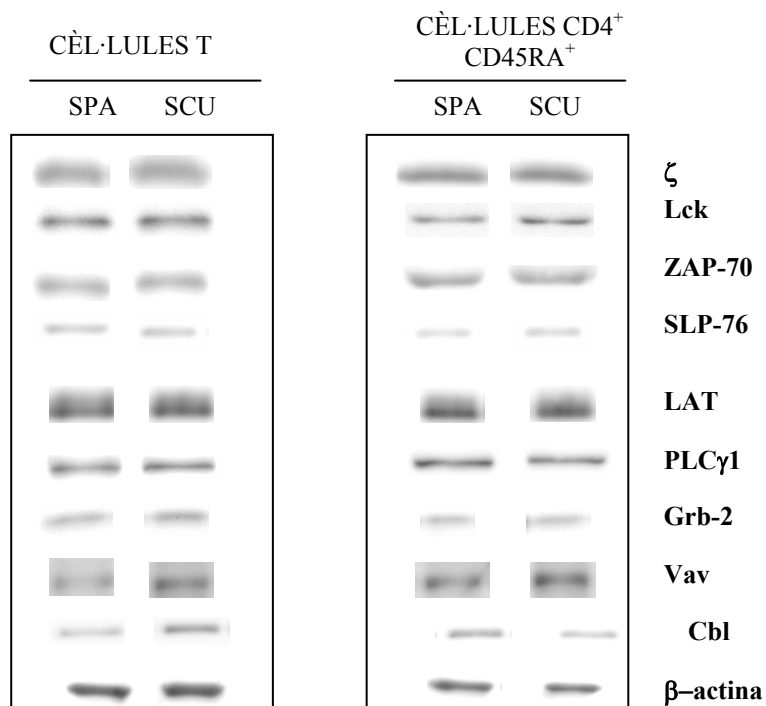


Figura 4.20. Expressió proteica de molècules relacionades en la cascada de transducció de senyals via TCR/CD3. Extractes cel·lulars de limfòcits T (part esquerra de la figura) i CD4⁺CD45RA⁺ (part dreta de la figura) de sang de cordó umbilical i de sang perifèrica, es van resoldre en gels d'acrilamida del 10 %. S'indiquen les diferents proteïnes analitzades, així com els nivells de β -actina. Es mostra un exemple d'un total de 2 mostres de SPA i de 3 de SCU.

Mitjançant la tècnica de “*stripping*” es van reutilitzar les mateixes membranes per detectar totes les proteïnes a estudiar.

RESULTATS

L'estudi comparatiu de les cèl·lules T de SCU i SPA demostrà l'existència de diferències en l'expressió de la molècula Cbl i Vav. L'anàlisi de la resta de molècules no va mostrar diferències significatives entre les cèl·lules T de SCU i SPA. Cal dir, que en aquests dos casos, només es va analitzar una mostra de SPA i una de SCU donat que el principal objectiu era l'estudi de les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ i evitar la contribució de les cèl·lules CD45RO⁺ en la SPA.

Un cop quantificats i comparats els nivells proteics de totes aquestes molècules en les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ no es van observar diferències significatives entre la SCU i SPA.

4.4.2. CINÈTICA DE FOSFORILACIÓ EN TIROSINES

Dins de la transducció de senyals, la fosforilació de residus en tirosina de certes molècules és un procés indispensable perquè hi hagi una bona circulació del senyal fins el nucli cel·lular. Donat que no vam observar diferències significatives en la quantificació de les principals proteïnes implicades en els processos primerencs de la senyalització via TCR, vam analitzar si existien diferències a nivell de la fosforilació en residus de tirosina en els primers moments després de l'activació via TCR/CD3.

Cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU es van activar segons es descriu a l'apartat 3.2.1 dels Materials i mètodes. Després es van obtenir els extractes cel·lulars que es van resoldre en gels MOPS (carregant l'extracte proteic corresponent a 3×10^5 cèl·lules/carril). Finalment, per la immunodetecció de les proteïnes fosforilades en tirosina s'utilitzà una proteïna recombinant anti-PTyr marcada amb HRP (RC-20).

La determinació dels pesos moleculars de les diferents bandes es va realitzar pel Programa *Quantity One-4.2.1* (Bio-Rad), utilitzant com a referència una estàndards comercials (Broad-Range Bio-Rad).

A l'estudiar el patró de fosforilació de les cèl·lules T abans de l'activació, s'observà que existia una sèrie de bandes que corresponien a proteïnes fosforilades constitutivament tant en SCU com en SPA. Destacà que les cèl·lules T de SPA presentaven més proteïnes fosforilades en fosfotirosines que les cèl·lules T de SCU. L'activació dels limfòcits T de SCU i SPA, produïa diferències qualitatives com quantitatives en els canvis de patró de fosforilació en residus de tirosina, tant entre les cèl·lules de SPA i les de SCU. (Figura 4.21).

RESULTATS

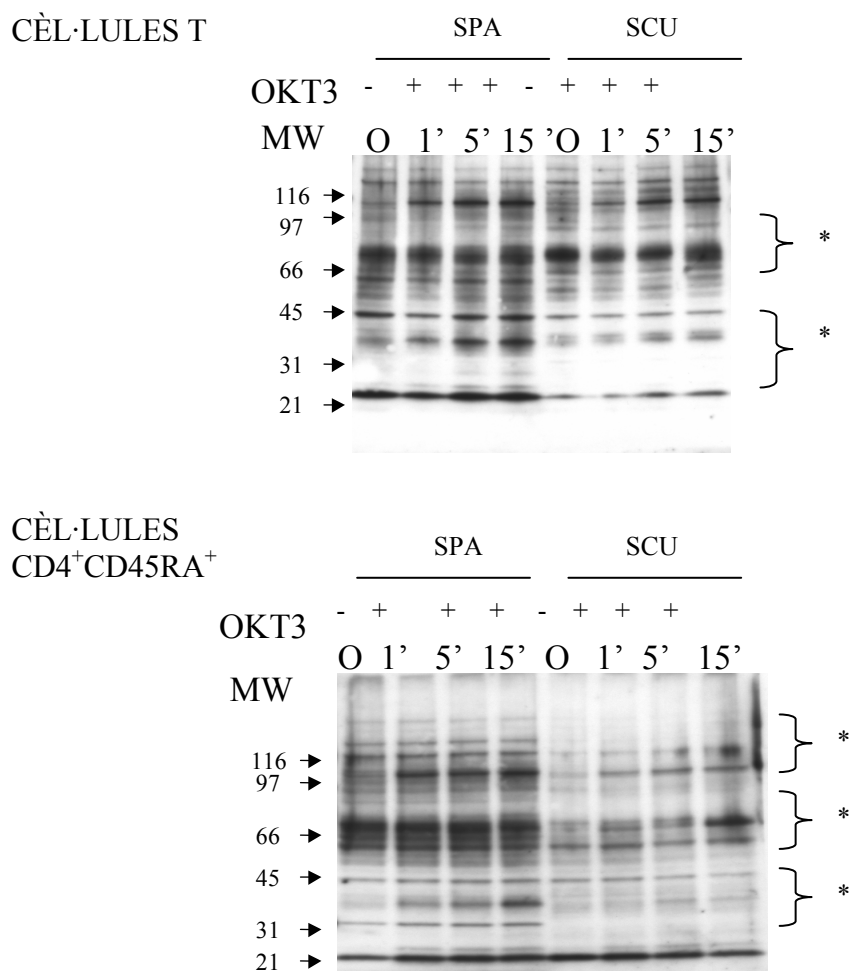


Figura 4.21. Cinètica de fosforilació en tirosina després de l'activació via TCR/CD3. Extractes cel·lulars de cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU, es van activar segons apartat 3.2.1. Es mostra un exemple d'un total de tres experiments independents. A la banda dreta del gel es mostren els pesos moleculars (MW) (Broad range, Bior-Rad). S'indica amb * els bandejats diferencials entre el cordó i la sang perifèrica.

A l'analitzar el patró de fosforilació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ en general s'observà que les cèl·lules de SPA i de SCU presentaven constitutivament nivells similars de proteïnes fosforilades en tirosina, malgrat que es donava certa variabilitat entre les diferents mostres.

L'activació canviava la intensitat de fosforilació de certes bandes (incrementant-les o disminuint-les). Tant en les cèl·lules T com CD4⁺CD45RA⁺ de SPA com de SCU, s'observava uns bandejats entre 66-100 kDa i 31-60 kDa, la fosforilació del qual es veia modificada després de l'activació amb OKT3. Repetidament, tant en les cèl·lules T com

RESULTATS

CD4⁺CD45RA⁺ s'observa una banda d'uns 36 kDa que patia una forta fosforilació després de l'activació amb OKT3, així com una sèrie de bandes de petit pes molecular (aproximadament 21 kDa), que també incrementaven la seva fosforilació després de l'activació.

4.4.3. IMMUNOPRECIPITACIÓ ANTI-FOSFOTIROSINES

Per poder reconèixer algunes de les proteïnes que es fosforilen en tirosina després de l'activació via TCR/CD3, es va procedir a la immunoprecipitació amb un anticòs monoclonal que reconeix als residus de tirosina fosforilats (clon PT-66) (Sigma) tal com s'indica en l'apartat 3.6.2 dels Materials i mètodes.

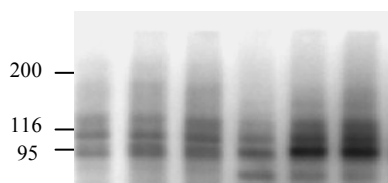
Les immunoprecipitacions en condicions desnaturalitzants permeten capturar només les proteïnes fosforilades en Tyr, però no a aquelles proteïnes que es troben formant complexos proteics amb les primeres i que poden no estar fosforilades en Tyr. S'activaren cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i de SCU i lisaren segons l'apartat 3.6.1 dels Materials i mètodes. L'extracte proteic s'immunoprecipità amb un anticòs anti-PTyr i la detecció de les proteïnes fosforilades en Tyr, es va realitzar utilitzant la proteïna recombinant RC-20 anti-PTyr marcada amb HRP (BD). Els pesos moleculars de les proteïnes immunodetectades es van determinar utilitzant el programa *Quantity One-4.2.1* (Bior-Rad), tenint com a referència els pesos moleculars estàndards (Broad range, BiorRad).

Els resultats de la figura 4.22 corresponen a un exemple representatiu d'un total de quatre immunoprecipitacions independents. Les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU presentaven constitutivament patrons de fosforilació en tirosines característics. L'activació cel·lular amb OKT3 comportava l'aparició de noves bandes o l'increment d'intensitat tant en SCU com en SPA, altres bandes es mantenien constantment fosforilades al llarg del temps i per últim d'altres disminuïen fins a desaparèixer. En l'exemple indicant en la figura 4.22, es mostren 15 i 30 minuts d'activació.

A)

IP: Anti-PTyr
(clon PT-66)

anti-PTyr (RC20)	SPA			SCU		
	0'	15'	30'	0'	15'	30'



B)

RESULTATS

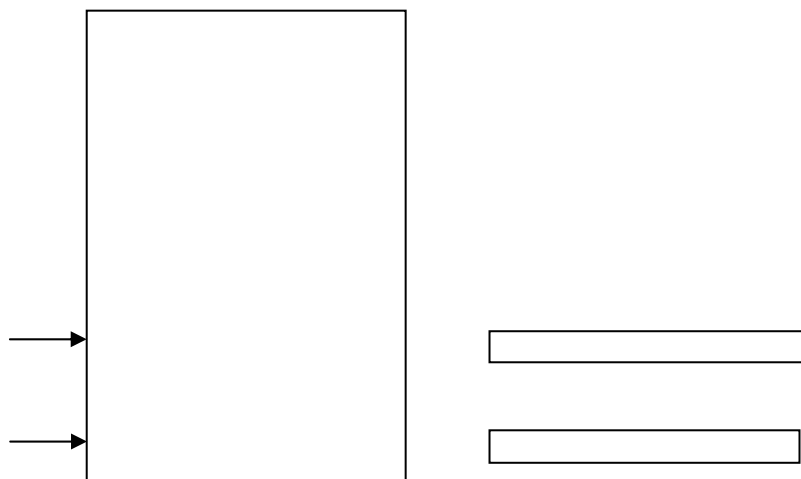


Figura 4.22. Immunoprecipitació amb anti P-Tyr en condicions desnaturalitzants. S'indica un exemple d'un total de 4 experiments independents. A) 5×10^6 cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$, es van immunoprecipitar amb un anticòs anti-PTyr (clon PT-66). Les proteïnes es van resoldre en un gel MOPS i posteriorment la immunodetecció de les tirosines fosforilades es va realitzar utilitzant una proteïna recombinant anti-PTyr marcada amb HRP (BD).

B) Per la identificació de les proteïnes fosforilades, es va fer “*stripping*” de la immunoprecipitació i es va immunodetectar diferents proteïnes implicades en la senyalització via TCR (l'immunoblot resultant s'indica a la part dreta de la figura). b.1) immunoblot anti-LAT i b.2) immunoblot anti-cadena ζ .

Les diferències entre SCU i SPA que es van observar repetidament al realitzar la IP anti-PTyr es localitzaven principalment en proteïnes de pesos moleculars aproximats de: 60-96kDa i 21-45 kDa. La regió de 60 kDa es una zona on es co-localitza la cadena pesada de les Igs i un elevat número de proteïnes amb pesos moleculars similars. Aquestes dificultats van complicar la posterior identificació de les proteïnes que es comportaven diferent en les cèl·lules de SCU i de SPA. En les cèl·lules de SPA es va trobar repetidament bandes de pesos moleculars inferiors a 36 kDa després de l'activació amb OKT3.

Per abordar si algunes de les proteïnes que participen a l'inici de la cascada de senyal via TCR configuraven el patró diferencial de fosforilació entre SCU i SPA es realitzà el “*stripping*” de les membranes de les IP i sobre aquestes mateixes es va realitzar un immunoblot amb els respectius anticossos (cadena ζ i LAT).

Al densitometrar la fosforilació de la banda corresponent a la cadena ζ i la quantitat de molècules ζ immunoprecipitades vam observar que existia variabilitat entre les diferents mostres analitzades, fet que dificultava la conclusió d'un resultat definitiu. En la meitat de les IP anti-PTyr realitzades, la quantitat de proteïna ζ

RESULTATS

immunoprecipitada fou similar entre SCU i SPA, en canvi, en l'altra meitat de les IP, la quantitat de ζ immunoprecipitada fou superior en SCU comparat amb SPA com s'observa en l'experiment representatiu que apareix a la figura 4.22 b.2.

En la figura 4.22.b.1 es mostra un dels immunoblots realitzats amb un anticòs monoclonal específic per LAT humà sobre una membrana amb les proteïnes fosforilades en tirosines. Abans de l'activació ($t=0$), la quantitat de molècules LAT fosforilades era aproximadament el doble en els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU que en SPA. En totes les IP realitzades, la quantitat de proteïna LAT immunoprecipitada fou sempre superior en SCU comparat amb SPA. Per tant, els valors obtinguts al realitzar el quocient entre la proteïna fosforilada en Tyr i la quantitat de proteïna immunoprecipitada foren:

Immunoprecipitació (IP)	Quocient: LAT PTyr/ Proteïna IP	
	SPA	SCU
IP1	3,2	1,32
IP2	5,7	2,06
IP3	1,0	0,84

L'activació comportà un augment del número de molècules fosforilades de LAT tant en SCU com en SPA, així com un augment en la fosforilació per molècula. Per tant, tant els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU com SPA presenten una cinètica d'activació del LAT similar, essent els nivells de LAT en condicions bassals la principal diferència entre SCU i SPA.

A continuació es mostra una taula resum (Taula 4.13) de les diferències observades en aquest treball entre SCU i SPA.

PARÀMETRES	SPA	SCU
FENOTIP		
$CD3^+CD8^+$ (%)	26,53±10,3	14,02±7,26
$CD4^+CD45RA^+$ (%)	19,7±9,5	40,0±7,8
$CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ (quocient)	1,95±1,6	3,79±1,77
CD3 superficial	+	++

RESULTATS

CD45RA superficial		++	+
ESTAT FUNCIONAL			
Proliferació espontània (cpm)			
MNC		732±281	1578±805
T		1195±620	1163±563
CD4 ⁺ CD45RA ⁺		673±332	1369±1064
Apoptosi espontània (%)			
T (48h)		24,1±6,64	27,62±5,09
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ (48h)		7,98±4,77	20,01±6,03
Apoptosi amb IL2 (%)			
		5,8±1,41	15,07±4,76
Expressió gens			
<i>bcl-x_L</i>	bassal	++	+
<i>bcl-2/bax</i>	cultiu IL2	++	+
ACTIVACIÓ VIA TCR/CD3		ESTIMULACIÓ	
Modulació a la baixa CD3		similar cinètica	
Proliferació (cpm)			
	OKT3	9244±6787	55877±25040
	OKT3+anti-CD28	78798±10542	106605±8786
	OKT3+IL2	44885±23092	84478±22166
Canvis morfològics			
	OKT3	+	++
Marcadors activació			
CD69/CD28/CD40L	totes les condicions	similar cinètica expressió	
CD25/OX40	OKT3, OKT3+IL2	+	++
Fas	totes les condicions	++	+
Fas-L	totes les condicions	+	++
CD45RO	OKT3+anti-CD28	3,33±2,85	22,63±9,33
Producció IL2			
	OKT3	<80 pg/ml	146±51 pg/ml
Apoptosi (%)			
	OKT3	10,99±2,92	36,10±11,49
	OKT3+anti-CD28	12,31±5,95	20,5±5,40
	OKT3+IL2	8,66±4,45	13,39±4,26

RESULTATS

5. DISCUSSIÓ

L'estudi fenotípic i funcional dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de sang de cordó umbilical va demostrar que aquesta població limfocitària presentava característiques que la diferenciava de la població $CD4^+CD45RA^+$ de la sang perifèrica d'adult. Així s'observà, que l'activació via TCR/CD3 amb una sola senyal anti-CD3 portà als limfòcits *naïve* de SCU a activar-se, dividir-se i finalment a morir per apoptosi. Aquesta activació anava acompanyada de fosforilació en Tyr de proteïnes implicades en els primers processos de la cascada de senyalització via TCR, transformació blàstica, expressió de marcadors d'activació en superfície i divisió cel·lular.

La majoria dels estudis funcionals comparatius fets fins ara entre la sang de cordó umbilical i la sang perifèrica d'adult s'han realitzat utilitzant cèl·lules mononuclears o cèl·lules T purificades, sense considerar que aquestes poblacions no són homogènies i presenten diferències de composició entre la SPA i la SCU. Així, la utilització de cèl·lules mononuclears per determinar l'activació de les cèl·lules T és un sistema complex en el que nombroses cèl·lules i molècules poden interactuar generant diferents senyals d'activació. Per tant, calien uns estudis de la població limfocitària $CD4^+CD45RA^+$, població majoritària en la sang de cordó umbilical on no intervinguessin les diferències immunofenotípiques existents entre la sang perifèrica i la sang de cordó umbilical.

L'obtenció de les cèl·lules T i $CD4^+CD45RA^+$ purificades tant de SCU com de SPA es va realitzar mitjançant una selecció negativa utilitzant boles magnètiques, per evitar possibles alteracions degudes a la manipulació de les cèl·lules que poguessin interferir en els resultats. Després de la selecció negativa, les cèl·lules T i les $CD4^+CD45RA^+$ tenien un fenotip de cèl·lula en repòs, ja que no presentaven cap dels marcadors d'activació que vam mesurar (CD69, CD25 i DR).

La utilització de l'anticòs OKT3 (anti-CD3) immobilitzat en placa, com a sistema d'activació, és una aproximació fisiològica de l'activació via TCR que es donaria independentment de la seva especificitat (Papadogiannakis et al., 1986). La utilització de l'anticòs anti-CD28 immobilitzat en placa de cultiu com a sistema de coestimulació, permet per una banda restringir la coestimulació només a les senyals

positives reconegudes per la molècula CD28 i per una altra, controlar les condicions experimentals.

5.1. IMMUNOFENOTIP DE SCU I SPA

L'estudi de l'immunofenotip de la sang total i de les cèl·lules mononuclears de cordó umbilical i sang perifèrica d'adult ens va demostrar que no hi havia diferències en el percentatge de limfòcits CD3⁺, de limfòcits CD3⁺CD4⁺ i tampoc de cèl·lules NK (CD16⁺) entre SCU i SPA. En canvi, vam trobar que el percentatge de limfòcits CD3⁺CD8⁺ era inferior en la sang de cordó umbilical respecte a la sang perifèrica d'adult. D'aquesta manera, al realitzar el quocient CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ aquest era superior en SCU.

Existeix un gran ventall de resultats dins dels diferents treballs realitzats per analitzar l'immunofenotip del cordó umbilical. Així, dos grups no trobaven diferències en el percentatge de limfòcits CD3⁺ entre SCU i SPA (Roncarolo et al., 1994; Miscia et al., 1999). En canvi, en tres treballs diferents es demostrava que SCU presentava un percentatge inferior de limfòcits CD3⁺ (Rabian-Herzog et al., 1992; Han et al., 1995; D'Arena et al., 1998a), al mateix temps que mostraven resultats dispars al comparar el percentatge de limfòcits CD4⁺, CD8⁺ i cèl·lules NK entre SCU i SPA. La diferència entre els nostres resultats i aquests tres darrers treballs podria ser deguda a que aquests només identifiquen la població limfocitària pels paràmetres FS i SS, sense excloure aquells eritròcits nucleats que es situen en la regió limfoide de l'histograma de dues dimensions FS-SS (Rabian-Herzog et al., 1992; Han et al., 1995). Cal indicar que en la determinació del percentatge de les diferents poblacions limfocitàries es va realitzar la lisi dels eritròcits, a més a més es van marcar les cèl·lules amb un anticòs anti-CD45 per escollir de forma inequívoca la població limfocitària durant l'anàlisi.

Hi ha d'altres autors que com nosaltres seleccionen els limfòcits utilitzant també un anticòs anti-CD45 però els percentatges que obtenen per la població CD3⁺ com CD4⁺ i CD8⁺ presenten una gran variabilitat entre les seves mostres analitzades (Han et al., 1995; D'Arena et al., 1998a). En el treball de Rabian-Herzog trobaven diferències en el percentatge de limfòcits CD4⁺ i CD8⁺ entre SCU i SPA. Cal indicar que en aquest estudi consideren la població CD4⁺ i CD8⁺ total, sense seleccionar aquelles que són CD3⁺, a diferència dels nostres anàlisis. L'estudi de les cèl·lules NK (CD16⁺) ens va

DISCUSSION

revelar que la sang de SCU i SPA presentaven un percentatge similar de cèl·lules NK. Degut a que el marcatge es va realitzar utilitzant un anticòs anti-CD16, possiblement només estaríem perdent la població minoritària CD16⁻CD56⁺ que representa menys del 10% del total de les NK (Cooper et al., 2001). Alguns treballs han trobat un percentatge superior de cèl·lules NK en SCU comparat amb SPA (Rabian-Herzog et al., 1992; D'Arena et al., 1998a) o d'altres un percentatge similar entre SCU i SPA (Han et al., 1995; Mills et al., 1996), encara que en números absoluts tots els treballs consideren que SCU presenta més NK que SPA. En resum, els diferents protocols de marcatge de la sang total o de cèl·lules separades, la inclusió de les cèl·lules CD16⁺CD56⁺ i la eliminació o no dels eritròcits nucleats, poden originar les diferències observades entre els diferents estudis.

Vam observar que la sang de cordó umbilical presentava un percentatge superior de cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ comparat amb la sang perifèrica d'adult. Aquesta diferència ha estat àmplia i repetitivament descrita, indicant que aquest resultat és independent de la variabilitat entre mostres (Bradley et al., 1989; Han et al., 1995).

Totes les subpoblacions limfocitàries de la SCU mostraven nivells d'expressió del CD3 superiors a les de sang perifèrica d'adult tant en sang sense separar com en cèl·lules T i CD4⁺CD45RA⁺ purificades. Aquesta diferència no havia estat descrita anteriorment. En dos treballs realitzats sobre la població mononuclear i sobre la població CD4⁺CD45RA⁺ purificada respectivament no observaven diferències en la MFI entre SCU i SPA (109,25±9,18 per SCU vs 103,79± 8,15 per SPA) (Roncarolo et al., 1994; Hassan and Reen, 1997), malgrat que es podia apreciar ja certa tendència a una major expressió de CD3 en els limfòcits de SCU. Aquesta diferència en els resultats obtinguts i d'altres autors es podria donar per la utilització de mètodes de separació diferents. En els nostres experiments l'expressió de CD3 es va comparar separatament en cada subtipus de cèl·lules T (CD4⁺ i CD4⁺CD45RA⁺) per evitar un efecte d'emascament degut a diferències en l'expressió de CD3 en les cèl·lules *naive* i memòria, o en les CD4⁺ i CD8⁺. A més a més, en el nostre cas vam considerar un factor tècnic important com fou la determinació comparativa de l'expressió del CD3 entre SCU i SPA al mateix dia, per tal d'evitar possibles fluctuacions del làser del citòmetre.

La sang perifèrica d'adult presentava una superior expressió de la molècula CD45 i en concret de CD45RA. Aquesta diferència d'expressió entre SCU i SPA de

CD45 ja havia estat descrita anteriorment on s'observà una superior expressió tant de CD45RA com de CD45RO en SPA comparat amb SCU (Han et al., 1995). Una possible explicació a aquesta diferent expressió del CD45 entre SCU i SPA podria ser per l'existència de diferències en l'associació del CD45 amb el TCR o CD4, fet que podria afectar a la seva estabilitat (Dianzani et al., 1990; Leitenberg et al., 1996). Alguns estudis han demostrat un augment de l'expressió i modificacions post-traduccionals de la molècula CD45 durant la maduració de les cèl·lules T (Kirberg and Brocker, 1996; Abdul-Salam et al., 2000).

La subpoblació CD45RA en SPA es considera una població *naive* que per poder mantenir-se en la perifèria ha d'estar en contacte amb el complex major d'histocompatibilitat i citoquines (Brocker, 1997; Kirberg et al., 1997; Clarke and Rudensky, 2000; Dorfman et al., 2000; Vivien et al., 2001). Per una altra banda, la població CD45RA de la sang perifèrica d'adult pot ser el resultat en part de la conversió de la molècula CD45RO a CD45RA, fenomen que ha estat descrit en rates i en humans (Michie et al., 1992). Tots aquests processos podrien incrementar l'expressió o estabilitat de la molècula CD45RA fent que fos superior en SPA respecte SCU.

A part de la diferència d'expressió de la molècula CD45 entre les cèl·lules de SCU i SPA, també es va observar que els limfòcits CD8⁺ presentaven una superior expressió de CD45 quan es comparava amb els nivells observats en els limfòcits CD4⁺ tant en SCU com en SPA. Això podria donar-se per les diferències en la funció efectora que realitzen els dos tipus cel·lulars, presentant diferents requeriments d'activació i d'aquí que l'expressió o estabilitat del CD45 pugui ser diferent en les dues subpoblacions (Frearson and Alexander, 1996).

5.2. ESTAT FUNCIONAL DELS LIMFÒCITS CD4⁺CD45RA⁺ DE SCU

Les cèl·lules mononuclears de SCU presentaren una síntesi de DNA espontània superior que les de SPA, mentre que la síntesi espontània dels limfòcits T i CD4⁺CD45RA⁺ purificats de SCU i SPA fou similar. Cal destacar, que la síntesi espontània de DNA era unes 40 vegades inferior a la que es va observar quan les cèl·lules s'activaven via TCR/CD3.

DISCUSSION

En el cultiu de cèl·lules mononuclears, la incorporació de timidina tritiada es podria donar tant en les cèl·lules accessòries (B, NK, monòcits) com en els limfòcits T. Per tant, la síntesi espontània de DNA superior en SCU observada podria indicar que les cèl·lules accessòries de SCU presents són funcionalment diferents de les de SPA o bé, que els limfòcits T necessitarien de la presència de les cèl·lules accessòries per poder proliferar.

En el cultiu de cèl·lules T, observarem una similar síntesi espontània de DNA entre SCU i SPA. Cal indicar, que dins d'aquesta població es troben tant limfòcits CD45RA⁺ com CD45RO⁺ i limfòcits CD4⁺ i CD8⁺ que podrien contribuir diferentment en la síntesi espontània.

S'havia demostrat que les cèl·lules mononuclears de SCU proliferaven espontàniament més que les de SPA, com en els nostres estudis, però també que els limfòcits T purificats de SCU presentaven una proliferació espontània superior que SPA, a diferència del que observàvem en els nostres experiments. Aquesta diferència podria venir donada pel grau de purificació dels limfòcits T, que en els treballs citats fou només del 70-90% (Roncarolo et al., 1994; Miller et al., 2002), mentre que en els nostres experiments fou sempre superior al 98%. Per tant, la síntesi espontània superior en els limfòcits T de SCU que aquests autors observaven pot ser només el reflex de la presència de cèl·lules accessòries contaminants en els cultius. Quan es van estudiar les poblacions purificades CD4⁺CD45RA⁺ de SPA i SCU s'observà que presentaven una síntesi de DNA espontània similar en tots els temps analitzats. Així, ja s'havia vist que a les 72 hores de cultiu la proliferació dels limfòcits *naive* de SCU i SPA era similar (Hassan and Reen, 2001). Per tant, a nivell de proliferació espontània els limfòcits *naive* de SCU i SPA es comportaven de la mateixa manera.

L'anàlisi de l'apoptosi espontània en els cultius dels limfòcits T de SCU i SPA, ens va indicar que ambdós tipus cel·lulars presentaven un percentatge similar de limfòcits Annexina-V⁺, en canvi l'anàlisi dels cultius amb limfòcits CD4⁺CD45RA⁺, ens mostrà una major apoptosi en els de SCU sense estimular. Aquests resultats ens indicarien que els limfòcits CD45RO⁺ serien més susceptibles a morir per apoptosi quan no reben cap tipus d'estímul extern, observant-se per tant major percentatge de cèl·lules apoptòtiques en els cultius de limfòcits T que en els de la subpoblació *naive* de SPA. Ja s'havia indicat que les cèl·lules CD45RO⁺ adultes eren més susceptibles a l'apoptosi espontània que les CD45RA⁺ (Salmon et al., 1994; Sprent and Tough, 1994). Tampoc es pot descartar, que el fet que els limfòcits *naive* de SCU presentin una elevada

DISCUSSION

apoptosi espontània, podria contrarestar una possible major capacitat de proliferació espontània.

L'apoptosi espontània observada en els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ SCU podia ser revertida per la presència d'IL2 exògena, per tant, l'apoptosi espontània podria ser el resultat d'una manca de factors de creixement en el cultiu, sent els limfòcits *naive* de SCU més sensibles a aquesta manca i per tant a l'apoptosi. L'efecte de la IL2 no s'acompanyava d'una proliferació cel·lular, ja que no vam observar síntesi de DNA significativa en els cultius suplementats amb IL2, a diferència del que s'havia observat amb la incorporació d'IL7 als cultius de les cèl·lules *naive* de SCU (Hassan and Reen, 2001). Això indicaria que l'efecte de la IL2 podria ser la modificació del llindar d'apoptosi de les cèl·lules $CD4^+CD45RA^+$ en repòs, realitzant possiblement el seu efecte a través del receptor d'afinitat intermitja, IL2R $\beta\gamma$, ja que en els nostres cultius de cèl·lules en repòs no observarem expressió de la cadena α del receptor de la IL2 (IL2R), i s'ha demostrat que l'IL2R $\beta\gamma$ participa en la supervivència via activació de Lck i PI3K permetent l'augment de *bcl-x_L* (Gonzalez-Garcia et al., 1997). La no detecció de factors solubles sèrics que poguessin modificar l'apoptosi espontània dels limfòcits de SCU, indicaria que possiblement l'apoptosi espontània dependria dels contactes cel·lulars entre els limfòcits *naive* i les cèl·lules presents en les parets dels vasos (Pilling et al., 2000).

Es va estudiar els nivells d'expressió de diferents gens de la família del Bcl-2, per determinar la seva contribució en l'apoptosi espontània i el rescat en presència d'IL2 exògena. En condicions bassals, els nivells de *bcl-x_L* eren superiors en SPA que en SCU, suggerint una major susceptibilitat a l'apoptosi espontània en SCU que en SPA. Quan les cèl·lules es cultivaven durant 48 hores, es produïa una disminució de l'expressió tant de *bcl-x_L* com de *bcl-2* mentre que la presència d'IL2 exògena al mateix temps que augmentava la supervivència dels limfòcits de SCU, també augmentava els nivells d'aquests dos gens tant en SCU com en SPA. Cal tenir present, que en els cultius i sobretot en els de SCU, donada l'elevada proporció de cèl·lules apoptòtiques després de 48-72 hores de cultiu, hi havia una barreja de cèl·lules viables i en apoptosi, i per tant els nivells dels gens analitzats inclourien l'expressió en cèl·lules viables i apoptòtiques. Tots aquests resultats indicarien que en SCU els gens de la família Bcl-2 analitzats podrien jugar un paper en l'apoptosi espontània i el rescat per IL2, encara que per

DISCUSSION

confirmar-ho també caldria estudiar els seus nivells proteics. No podem descartar que altres gens diferents de la família del Bcl-2 poguessin estar implicats en aquesta apoptosi i posterior rescat amb IL2, tal com s'ha suggerit en un treball on s'observa que el rescat de l'apoptosi espontània per la IL7 podria ser independentment de *bcl-2* (Nakayama et al., 1995).

El fet que en SPA també es donés un augment en els nivells de *bcl-2* i *bcl-x_L* en presència d'IL2 exògena sense canvis significatius en els nivells d'apoptosi, podria indicar diferents fets: que aquests gens en realitat tinguessin diferent expressió proteica perquè patissin una regulació post-transcripcional diferent en les cèl·lules de SCU i SPA, o que exercissin una funció diferent en les dues subpoblacions, ja que en SPA no poden participar en el rescat de la mort perquè pocs limfòcits *naive* de SPA entren en apoptosi després dels cultius sense estimular. Ja s'havia descrit que els limfòcits *naive* de SPA en repòs no presentaven mecanismes de resposta a IL2 exògena (Hassan and Reen, 2001).

Hi ha treballs on s'observa certa variabilitat entre les diferents mostres en quant a l'expressió de gens de la família del Bcl-2 durant l'apoptosi espontània i rescat per citocines en els limfòcits *naive* de SCU, utilitzant cèl·lules CD45RA⁺ o CD4⁺CD45RA⁺ purificades (Soares et al., 1998; Hassan and Reen, 2001). Tots ells demostren una expressió proteica variable de Bcl-2 i Bcl-x_L en els cultius després de 5-7 dies sense estimulació. La incorporació d'IL7 i IL4 fa que augmentin els nivells de Bcl-2 principalment en SCU, mentre que la IL2 augmenta l'expressió de Bcl-2 de forma similar en SCU i SPA. En canvi, la incorporació de qualsevol d'aquestes citocines no modifica l'expressió de Bax, mantenint-se els seus nivells similars als valors dels cultius sense estimulació (Soares et al., 1998), indicant que els nivells de Bax no participarien en el rescat de l'apoptosi espontània. Per tant, aquests resultats coincidirien amb els obtinguts en els nostres estudis a les 48 hores de cultiu. Malgrat tot, aquests autors no tenen en consideració que el número de cèl·lules de SCU viables després de 5-7 dies de cultiu són molt baixos.

5.3. ACTIVACIÓ DELS LIMFÒCITS DE SCU

Alguns treballs havien demostrat que les cèl·lules *naive* de SPA presentaven més requeriments que les cèl·lules memòria per poder ser activades.

En alguns estudis anteriors es demostrava una menor resposta dels limfòcits T de SCU a determinats anticossos mitogènics com anti-CD2 si se'ls comparava amb limfòcits T de SPA (Hassan and Reen, 1997), mentre que la coestimulació amb anti-CD28+anti-CD2 augmentava la proliferació de forma similar entre SCU i SPA (Hassan et al., 1995). Donat que no hi ha un indicador de quina és la cèl·lula activada en aquests cultius de cèl·lules T, la barreja de *naive* i memòria en la SPA podria complicar la interpretació dels resultats. Ja amb cèl·lules purificades CD4⁺CD45RA⁺, la SCU i SPA arriben a un estat d'activació diferent quan s'estimulen amb PHA, anti-CD2 o PMA+ionomicina (Gerli et al., 1989), però cal tenir en compte que en aquests casos les condicions experimentals no poden reproduir els mecanismes que s'inicien pel reconeixament del TCR.

L'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU amb OKT3 immobilitzat en placa de cultiu mitjançant un anticòs anti-Igs de ratolí portà a una proliferació acompanyada d'un augment en el número de cèl·lules. Per tant, els limfòcits *naive* de SCU entren en cicle cel·lular i es divideixen en presència només d'una primera senyal (OKT3). En canvi, altres autors havien observat que l'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ purificats de SCU amb anti-CD3 (OKT3) immobilitzat directament en placa, només donava lloc a una lleugera proliferació dels limfòcits SCU, comparable a l'espontània (Webb et al., 1997), sent aquest valor molt inferior als observats en els nostres estudis. Una possible explicació d'aquests resultats dispars als nostres seria que aquests autors no immobilitzen l'anticòs OKT3 a la placa de cultiu de forma prou efectiva. Un treball recent, en la mateixa línia que els nostres resultats ha demostrat que limfòcits neonatals murins entren més ràpidament en cicle cel·lular després d'una activació via TCR que els limfòcits adults (Adkins et al., 2003).

La utilització de concentracions decreixents consecutives d'OKT3 per activar les cèl·lules va permetre determinar el llindar crític d'activació de les cèl·lules de SCU. D'acord amb la idea que el reconeixament del TCR/CD3 és insuficient per induir la proliferació de les cèl·lules *naive* adultes, en cap de les concentracions provades vam

DISCUSSION

observar proliferació dels limfòcits *naive* de SPA. Això suggeriria que els limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU serien més susceptibles a ser activats i a proliferar, possiblement perquè en part l'activació de les cèl·lules $CD4^+$ *naive* de SCU no està sota un control tant restrictiu com les de SPA i en part perquè presenten uns nivells més elevats d'expressió de CD3 en la seva superfície comparat amb els limfòcits de SPA. S'ha postulat que l'activació del limfòcit T pot ser regulada per la quantitat de TCR que pugui presentar en la superfície cel·lular. Així la capacitat d'assolir el llindar d'activació dependria del número de TCRs presents en la superfície cel·lular (Viola and Lanzavecchia, 1996) i aquesta quantitat podria ser regulada per la síntesi, transport i ensembatge dels diferents components, la internalització i reciclatge del receptor (Clevers et al., 1988; Manolios et al., 1991).

Com ja ha estat descrit en cèl·lules T madures, també en SCU es donava la modulació a la baixa del complexe TCR/CD3 després de l'activació dels limfòcits T via els seu receptor (Niedergang et al., 1997; Salio et al., 1997; Valitutti et al., 1997; Itoh et al., 1999; Liu et al., 2000a). En els primers moments després de l'activació (45 min), els nivells d'expressió de CD3 foren sensiblement inferiors en SCU comparat en SPA, però després de 18 hores de cultiu els nivells d'expressió de CD3 foren mínims i similars entre ambdós tipus cel·lulars, indicant que a llarg termini no s'observaven diferències en la modulació a la baixa del CD3 després de l'activació via TCR. Certs treballs demostraven que es pot correlacionar la modulació a la baixa del receptor amb la capacitat de resposta d'una cèl·lula T (Bachmann et al., 1997; Hemmer et al., 1998). Encara que analitzant els nostres resultats, es podria dir que aquest no seria un dels mecanismes responsables del diferent comportament d'activació entre els limfòcits de SCU i SPA.

Probablement, hi ha diferents mecanismes de senyalització que s'inicien pels TCRs internalitzats que poden ser responsables dels diferents requeriments de les cèl·lules *naive* de SCU i SPA per entrar en cicle cel·lular i proliferar.

La coestimulació dels limfòcits *naive* de SCU amb anti-CD28 donava lloc a una elevada proliferació, similar a l'observada en presència d'IL2. En canvi en els limfòcits *naive* de SPA només la coestimulació amb anti-CD28 donava lloc a una màxima proliferació equiparable a la de SCU. D'aquesta manera, es podria dir que la maquinària que portà a la proliferació dels limfòcits $CD4^+CD45RA^+$ de SCU estaria menys restringida que la de SPA, ja que en primer lloc, no necessitaria de la coestimulació amb

DISCUSSION

anti-CD28 per poder proliferar, i en segon lloc, la presència d'IL2 en SCU feria que s'arribés a valors de proliferació pròxims als màxims observats amb anti-CD28. S'ha demostrat en diferents estudis que a més de promoure la síntesi d'IL2, el CD28 també pot regular el llindar d'activació i disminuir el nombre d'unions necessàries per una efectiva activació de la cèl·lula T (Viola and Lanzavecchia, 1996), pot promoure l'apropament del citoesquelet i els rafts cap a la sinapsi immunològica (Wulfiging and Davis, 1998; Viola et al., 1999), augmentar l'expressió de CTLA-4 i ICOS (McAdam et al., 2000), així com potenciar la proliferació per una via independent d'IL2 (Boulougouris et al., 1999). Els nostres resultats indicarien que en SCU a diferència de SPA, no serien imprescindibles alguns mecanismes que es desencadenen només després de l'activació via CD28 per tal d'assolir una eficaç activació cel·lular i només amb IL2 ja s'arribaria a aquest màxim en el cultiu dels limfòcits de SCU. En cada un dels casos estudiats, els nivells de proliferació observada es correlacionava amb el grau de transformació blàstica, inclòs en l'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU només amb OKT3. La coestimulació incrementava el canvi morfològic tant en SCU com en SPA.

La proliferació cel·lular depèn d'una sèrie de factors implicats en la capacitat de les subpoblacions de cèl·lules T a entrar en cicle cel·lular, en produir IL2, el principal factor de creixement de les cèl·lules T i en la regulació de l'expressió de CD25. En altres sistemes d'activació s'havia vist que els limfòcits de SCU eren capaços d'expressar CD25 (Brugnoni et al., 1994; Durandy et al., 1995; Ludwig et al., 1996), malgrat no s'havia arribat a comparar-los amb SPA. En les nostres condicions de cultiu els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU presentaven una expressió superior de CD25 comparat amb els de SPA quan s'activaven només amb OKT3 o OKT3+IL2, fet que es correlacionava amb la major proliferació de SCU. En canvi quan les cèl·lules de SCU i SPA es coestimulaven amb anti-CD28 presentaven una expressió similar de CD25.

L'anàlisi de la presència d'IL2 en els sobrenedants de les cèl·lules *naive* cultivades amb OKT3 ens va indicar que a les 24 hores de cultiu, les de SCU però no les de SPA produïen IL2, indicant que la producció d'IL2 estaria menys restringida en les cèl·lules *naive* de SCU. Donat que els limfòcits *naive* de SCU i SPA presenten un element silenciador en el promotor de la IL2 (Mouzaki et al., 1993), fa pensar que la regulació gènica no seria el principal mecanisme responsable de la diferent producció d'IL2 entre SCU i SPA. A més, també s'ha descrit que en les cèl·lules de SCU es dona una translocació al nucli de NF-κB més ràpida que en SPA (Kilpinen et al., 1996).

DISCUSSION

Malgrat l'efectiva activació de SCU via TCR, només es va detectar IL2 a les 24 hores i en baixes quantitats. La presència d'IL2 a les 24 hores de cultivar els limfòcits *naive* de SCU amb OKT3, coincidia amb el màxim nombre de cèl·lules CD25⁺ de SCU. No vam analitzar la producció abans de les 24 hores perquè aquesta és improbable donat que el pic d'expressió del gen de la IL2 en la majoria dels sistemes d'activació és a les 24 hores. Els baixos nivells d'IL2 podrien haver estat suficients perquè els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU poguessin entrar en cicle cel·lular i proliferar. El no detectar-se IL2 després de les 24 hores podria venir donat pel consum primerenc de la citoquina durant la posterior proliferació després del reconeixament de CD25 en la superfície de les cèl·lules de SCU activades. Un fet similar s'havia observat en cèl·lules T de SPA activades amb anti-CD3+anti-CD40L, on es dona una expressió de CD25 sense que es detecti IL2 ni en els sobredants ni a nivell de mRNA (Blair et al., 2000). També al coestimular les cèl·lules T via ICOS es permet la producció de petites quantitats d'IL2, que són consumides ràpidament evitant la seva detecció en els sobredants dels cultius (Riley et al., 2001). Com que la IL2 potencia l'expressió del seu receptor d'alta afinitat (CD25), l'expressió de CD25 que s'observà en els cultius de SCU amb OKT3 podria ser el resultat de l'IL2 produïda a l'inici del cultiu que potenciaria l'expressió de CD25, o alternativament vindria donada per un mecanisme independentment d'IL2, tal i com es dona en cèl·lules T IL2^{-/-}, on s'ha vist que la coestimulació amb B7 pot produir proliferació i expressió de CD25 (Razi-Wolf et al., 1996). La no detecció d'IL2 ni a les 24 ni 48 hores en els cultius dels limfòcits *naive* de SPA activats només amb OKT3, es correlacionava amb la falta de divisió cel·lular. Encara que la IL2 és la principal citoquina secretada per les cèl·lules *naive* activades, no es pot descartar una via independent a IL2 (Malek et al., 2001), que pugui permetre proliferar a les cèl·lules *naive* de SCU a l'activar-se amb OKT3.

Utilitzant cèl·lules *naive* de ratolí, s'ha demostrat que l'expressió de determinats marcadors (CD69, CD25, CD40L, OX40, Fas-L) i la proliferació són mecanismes que estan regulats independentment (Croft et al., 1997; Ise et al., 2002). Això explicaria com en els nostres estudis no vàrem observar diferències en l'expressió de CD69, CD28 i CD40L entre els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA, malgrat que els nivells de proliferació eren diferents. Les cèl·lules de SCU i SPA presentaven la mateixa capacitat d'expressar el CD69 i per tant la participació d'aquesta molècula en la funcionalitat seria equivalent entre les cèl·lules de SCU i SPA. Malgrat que la capacitat d'expressar

DISCUSSION

CD69 per part dels limfòcits de SCU ja havia estat descrita anteriorment (Brugnoni et al., 1994; Ludewig et al., 1996), mai s'havia demostrat utilitzant sistemes d'activació via TCR/CD3.

Els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA presentaven la mateixa cinètica d'expressió de CD28 després de la seva activació. La capacitat dels limfòcits *naive* d'expressar CD28 havia estat descrita anteriorment utilitzant cèl·lules T neonatals activades amb anti-CD3 o PMA+ionomicina (Elliott et al., 1999). Per altra banda, la coestimulació dels limfòcits *naive* amb anti-CD28 donà lloc a una disminució en l'expressió superficial del CD28 tant en SCU i SPA respecte als nivells d'expressió observats en el cultiu amb OKT3. La disminució en l'expressió superficial del CD28 no era resultat d'un enmascarament de l'antigen CD28 per l'anticòs anti-CD28 utilitzat per activar les cèl·lules, ja que l'anticòs d'activació i el de detecció provenien de dos clons diferents i possiblement reconeixien epítops diferents (clon CLB-402 i clon CD28.2, respectivament). La modulació a la baixa del CD28 per la unió amb el seu lligand s'ha descrit com a mecanisme regulador de la coestimulació en cèl·lules T adultes purificades (Linsley et al., 1993). Aquests resultats ens indicarien que els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU i SPA presentarien la mateixa capacitat de ser coestimulats via CD28 a l'expressar nivells similars i a l'assolir els mateixos nivells de proliferació quan es coestimulen en els cultius amb anti-CD28.

Fins al moment no s'havien comparat els nivells de CD40L entre les cèl·lules *naive* de SPA i SCU activades amb OKT3 i coestimulades amb anti-CD28 i IL2. L'absència de cèl·lules accessòries en els cultius evitava la modulació a la baixa del CD40L per la unió amb CD40 (Matthews et al., 2000). El fet que els limfòcits *naive* de SCU i SPA expressaven nivells similars de CD40L suggeriria que les cèl·lules *naive* d'ambdós orígens serien capaces de produir IL4 quan es coestimulessin pel CD40 present en les APCs, i també serien capaces d'estimular la producció d'IL12 per part de les cèl·lules dendrítiques i podrien col·laborar amb les cèl·lules B (Bullens et al., 1998). Cal indicar però, que existeix una forma soluble del CD40L que no vam mesurar i que també pot ser lligand del CD40 (Ludewig et al., 1996). Ja s'havia vist que les cèl·lules T de SCU activades amb anti-CD3 immobilitzat en placa o amb una activació al·loantigènica, així com una activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ amb superantígens en presència de cèl·lules de Langerhans produïa una expressió del CD40L en els limfòcits de SCU activats (Ludewig et al., 1996; Splawski et al., 1996; Matthews

DISCUSSIÓ

et al., 2000). Per altra banda a l'activar-se amb PMA+ionomicina, els limfòcits de SCU no podien expressar CD40L (Brugnoni et al., 1994; Nonoyama et al., 1995).

S'havia descrit que quan s'activaven cèl·lules *naive* de SCU amb OKT3 en presència de fibroblasts L transfectats amb CD32 i B7.1, l'expressió d'OX40 augmentava. En el nostre sistema experimental vam observar una expressió d'OX40 superior en les cèl·lules *naive* de SCU que en les de SPA quan se les activava amb OKT3 i OKT3+IL2, assolint el màxim d'expressió a les 72 hores de cultiu. En canvi, la coestimulació amb anti-CD28, permetia detectar nivells equiparables d'OX40 entre SCU i SPA, arribant al màxim d'expressió a les 48 hores en totes 2 subpoblacions. Una major expressió d'OX40 en els limfòcits *naive* de SCU als ser activats podria explicar en part la resposta desviada a Th2 observada en els neonats, doncs l'OX40 és una molècula que s'ha relacionat amb la diferenciació/maduració a cèl·lules productores d'IL4 (Ohshima et al., 1998).

Quan els limfòcits *naive* de SCU o SPA eren activats amb OKT3 i OKT3+IL2, no observàrem en cap dels temps analitzats l'expressió de la isoforma CD45RO. Només en el cas d'una coestimulació amb anti-CD28 s'induí l'expressió de la isoforma CD45RO que es detectà conjuntament amb la isoforma CD45RA en la subpoblació cel·lular dels limfòcits de SCU però no de SPA. Aquesta coexpressió de CD45RA⁺RO⁺ es donaria abans d'una conversió a CD45RA⁻CD45RO⁺ quan les cèl·lules es diferencien a memòria (Johannisson and Festin, 1995). La no detecció de la isoforma CD45RO amb OKT3 podria ser deguda a que no són suficients 3 dies de cultiu o que necessita d'altres vies de senyalització per poder-se expressar, a diferència dels altres marcadors analitzats. Ja en un altre sistema d'activació utilitzant anti-CD2+PHA en presència de cèl·lules presentadores, s'havia observat que les cèl·lules *naive* de SCU podien adquirir la isoforma CD45RO de manera més ràpida que les de SPA (Early and Reen, 1999), i presentarien funcions similars a les cèl·lules memòria, com són la col·laboració amb les cèl·lules B i producció d'IFN γ (Wallace and Beverley, 1990; Ferrer et al., 1992).

És important remarcar que, cadascun dels marcadors analitzats presentaven una cinètica d'expressió diferent, amb diferents requeriments per poder-se expressar en la superfície dels limfòcits *naive*. Així, trobàvem marcadors que començaven a expressar-se de manera primerenca: CD69 i CD25; d'expressió mitja: CD40L, CD28 i OX40 i d'expressió més tardana com el CD45RO. A més a més, en determinats casos, els

DISCUSSION

limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU presentaven diferents requeriments comparats amb els de SPA per poder expressar certs antígens d'activació analitzats (CD25, OX40 i CD45RARO).

Una de les principals conseqüències de l'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU amb OKT3 era que després d'iniciar un procés de proliferació entraven en apoptosi, mentre que els limfòcits *naive* de SPA quan s'activaven amb OKT3 es mantienien en un estat de no proliferació i no apoptosi.

La mort de les cèl·lules de SCU activades via TCR podria ser deguda a una sortida prematura del cicle cel·lular amb la conseqüent parada en la producció d'IL2. També es podria considerar que el manteniment de l'expressió de CD25 després d'haver consumit la IL2 podria ser negatiu per a la supervivència de les cèl·lules de SCU mentre es mantinguessin activades portant als limfòcits a la mort. L'efecte preventiu de la IL2 exògena i l'apoptosi mediada per TCR és consistent amb aquesta darrera hipòtesi. Els resultats no demostren que la proliferació sigui necessària per la senyalització apoptòtica, però és significatiu que més del 40% dels limfòcits presentaven una morfologia blàstica.

S'observà una successió en el temps entre la proliferació i l'apoptosi, ja que la proliferació amb OKT3 s'observava a les 24 hores, però l'augment de les cèl·lules en apoptosi no s'observava fins a les 48 hores. Estudis utilitzant cèl·lules de ratolins o clons activats via TCR amb anticossos o superantígens han demostrat que l'apoptosi requereix d'un estat de preactivació de la cèl·lula i sol estar associada a la proliferació (Kawabe and Ochi, 1991; Wesselborg et al., 1993). Malgrat això, tampoc no es pot descartar que un percentatge de les cèl·lules apoptòtiques provinguessin directament de les cèl·lules en repòs.

La coestimulació amb anti-CD28 produïa una disminució de l'apoptosi de les cèl·lules de SCU observada després de l'activació amb OKT3. Aquest mecanisme de rescat també s'havia observat en cèl·lules *naive* de ratolí en les quals una forta activació via TCR produïa una mort ràpida dels limfòcits activats i aquesta podia ser revertida per la coestimulació amb anti-CD28 (Kishimoto and Sprent, 1999).

En l'anàlisi de possibles gens implicats en l'apoptosi dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU vam observar que els limfòcits *naive* de SCU activats

DISCUSSION

presentaven nivells superiors de Fas-L i menors de Fas, tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna comparat amb els limfòcits de SPA. La coestimulació amb anti-CD28 i IL2 dels limfòcits de SCU incrementava l'expressió de mRNA i proteïna de Fas-L. Tanmateix, estudis amb cèl·lules mononuclears de SCU activades amb PHA+IL2, anti-CD3 o PMA+ionomicina havien demostrat nivells proteics inferiors de Fas i superiors de Fas-L que les de SPA (Aggarwal et al., 1997; Drenou et al., 1998).

Les nostres observacions suggereixen que el mecanisme conegut com AICD no sembla ser el principal mecanisme responsable de l'apoptosi de les cèl·lules de SCU via TCR, donat que els alts nivells de Fas-L no són els mediadors de la mort. Per altra banda, no es pot descartar que les cèl·lules FasL⁺ de SCU hagin adquirit major habilitat per induir la mort a cèl·lules diana Fas⁺ sensibles.

S'havia descrit que les cèl·lules primàries activades són resistents a AICD perquè presenten elevats nivells de FLIP. Perquè la cèl·lula mori via Fas cal la presensibilització amb IL2, que disminuirà els nivells de FLIP (Algeciras-Schimmich et al., 1999). La ràpida desaparició de la IL2 a les 48 hores podria impedir la disminució dels nivells de FLIP, i per tant, els limfòcits no serien sensibles a la mort per Fas-Fas-L. Aleshores, l'expressió d'aquestes dues proteïnes (Fas, Fas-L) en SCU, seria més el resultat de l'estat d'activació de la cèl·lula que es donaria prèviament a la sensibilització. S'ha demostrat que l'augment de l'expressió de Fas-L es pot donar per l'activació via TCR degut a l'activació de NFAT i NF-κB, ja que s'han trobat dos llocs d'unió per NFAT i un lloc d'unió de NF-κB en el promotor del Fas-L (Latinis et al., 1997; Kasibhatla et al., 1999). Tant la coestimulació via CD28 que incrementa la translocació al nucli de NF-κB (Harhaj and Sun, 1998; Khoshnan et al., 1999; Khoshnan et al., 2000), com via IL2 poden promoure l'expressió de Fas, Fas-L, TNFα i TNFβ així com els receptors de TNFR1 i TNFR2 (El Ghalbzouri et al., 1999; Hagihara et al., 1999), indicant l'estat d'activació de la cèl·lula. Recentment, s'ha demostrat que en cèl·lules T humanes l'alta expressió de CD28 confereix resistència a morir per apoptosi via Fas (Walker et al., 1998). Com que els limfòcits de SCU activats amb OKT3 expressaven alts nivells de CD28, també aquest mecanisme podria contribuir a restar importància a la via Fas-Fas-L.

Dins de l'anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la família del TNFR, es va observar una disminució dels nivells de mRNA de la caspase 8, comparat amb els nivells basals, tant a SCU com a SPA, després de l'activació amb OKT3, OKT3+anti-

DISCUSSION

CD28 i OKT3+IL2. Com en realitat, en cèl·lules CD45RA⁺ de SPA s'ha observat que distints sistemes d'activació porten a l'augment de l'activitat de les caspases però sense comportar la mort cel·lular (Sturm et al., 2002), segurament la regulació de l'activitat d'aquest enzim podria ser més important a nivell post-traducciona. Així, una baixada dels nivells de mRNA no comportaria necessàriament una baixada en l'activitat enzimàtica.

El fet que la via Fas-Fas-L no fos la principal responsable de la mort dels limfòcits activats de SCU ens va suggerir que podrien existir en aquest sistema altres mecanismes alternatius de mort cel·lular independents de Fas. Quan les cèl·lules s'activen i són deprivades de factors de creixement moren per apoptosi, per un procés anomenat ACAD. Aquest mecanisme implica membres de la família del Bcl-2, desencadenant una alliberació de membres de la família BH3-only (Bim) que segresten a Bcl-2/Bcl-x_L (Yamaguchi and Wang, 2002), formant-se porus en la membrana mitocondrial per Bax i Bak, i alliberant-se citocrom c i DIABLO que activen factors per finalment desencadenar la mort cel·lular.

Fins el moment no s'havien realitzat estudis sobre la modificació dels gens de la família del Bcl-2 en la població CD4⁺CD45RA⁺ humana purificada després d'una activació. Altres treballs, utilitzant cèl·lules T humanes adultes o de ratolí, observaven un augment de Bcl-2, Bcl-x i Bax després de l'activació de les cèl·lules i una disminució de Bcl-x en els limfòcits T de ratolí i de Bcl-2 i Bcl-x en els limfòcits T humans quan se'ls deprivava de citoquines després de l'activació inicial (Broome et al., 1995).

En els nostres estudis vam observar que després de l'activació amb OKT3, OKT3+anti-CD28 i OKT3+IL2, es mantenia l'expressió de *bcl-2*, però augmentava l'expressió de *bcl-x_L*, *bax*, *bak* i *bfl-1* respecte als nivells basals de les cèl·lules de SCU i SPA. L'expressió augmentada de *bcl-x_L* i *bfl-1* a les 48 hores podria reflexar l'estat d'activació de les cèl·lules, ja que en aquest moment, la majoria de les cèl·lules encara no havien entrat en apoptosi. A més, s'havia descrit que l'activació via CD3 pot incrementar *bfl-1* i *bcl-x_L* a través de NF-κB (Khoshnan et al., 2000; Lee et al., 2002). L'increment d'expressió d'aquests dos gens també podria ser un mecanisme per compensar els nivells elevats de *bax* i *bak* ja que Bfl-1 previndria la formació del complexe pro-apoptòtic (Bax/Bak), segrestant a proteïnes de la família BH3-only (Werner et al., 2002), mentre que l'increment de Bcl-x_L evitaria el balanç cap a les senyals pro-apoptòtiques. L'augment de l'expressió de *bax* i *bak*, també pot reflexar

l'estat d'activació de les cèl·lules, com s'ha observat a l'activar cèl·lules T de SPA amb PHA+IL2 en presència d'APCs (Akbar et al., 1996). Els executors de la mort via BH3-only serien Bak i Bax, en canvi Bcl-2 i Bcl-x_L només intentarien antagonitzar la funció (Zong et al., 2001). Possiblement, tots aquests resultats s'haurien de reconsiderar sota el punt de vista de certs autors que indiquen que és més important el balanç entre les proteïnes anti-pro-apoptòtiques que els valors absoluts de cada una d'elles (Akbar et al., 1996). Les nostres observacions indicarien que l'apoptosi via TCR no altera el balanç dels membres pro-anti-apoptòtics de la família del Bcl-2 associats a la mort cel·lular per manca de citoquines. Cal esmentar la possibilitat d'una heterogènia expressió proteica dels membres de la família del Bcl-2 en aquests cultius que no ha estat estudiada en aquest treball. Mentre que membres de la família Bcl-2 podrien estar involucrats en la mort per manca de citoquines en els limfòcits *naive* de SCU activats amb OKT3, en SPA serien mecanismes redundants, donat que la seva activació no porta a la divisió cel·lular ni a la seva mort. D'aquesta manera, els limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ de SCU podrien produir IL2 al ser activats amb OKT3, sent aquesta producció suficient per iniciar la divisió cel·lular però al no poder mantenir-la, les cèl·lules moririen per manca de factors de creixement.

Cal no descartar altres mecanismes via TNF α o TGF β , que serien independents però no exclusius dels anteriors i que podrien intervenir en la mort dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ activats de SCU. Ja s'havia vist que cèl·lules T de SCU són susceptibles a l'apoptosi per TNF α (Yang et al., 2001) i també la mort cel·lular pot venir donada pel TGF β (Sillett et al., 2001) essent ambdós tipus previnguts per la presència d'IL2.

5.4. CINÈTICA DE FOSFORILACIÓ EN TIROSINES

En un primer moment es va realitzar l'estudi dels nivells d'expressió de certes proteïnes implicades en els processos primerencs de la cascada de transducció de senyals via TCR/CD3 en els limfòcits T sense separar de SCU i SPA. Aquests estudis ens va revelar que en general no hi havia diferències en l'expressió proteica de la majoria de proteïnes analitzades, però a l'analitzar l'expressió de Cbl i Vav vam observar una expressió superior en SCU. Cal remarcar que en aquest anàlisi el número

DISCUSSION

de mostres fou molt limitat. És interessant considerar un treball on els autors detecten nivells inferiors de Lck, ZAP-70 i PLC γ 1 en cèl·lules T de SCU quan les comparaven amb SPA (Miscia et al., 1999) i en canvi en un altre, com nosaltres, no trobaven diferències en l'expressió proteica de CD3 ϵ , Lck i ZAP-70 entre els limfòcits T de SCU i SPA quan s'immunoprecipitava amb anticossos anti-CD3 ϵ , anti-Lck i anti-ZAP-70 respectivament (Sato et al., 1999). Les diferències observades pels autors del primer treball respecte als nostres resultats es podrien explicar perquè enriqueixen les cèl·lules T eliminant les cèl·lules adherents fins a un grau de purificació aproximat del 95%, així com també per la diferent composició de detergents en el tampó de lisi utilitzat per l'extracció de proteïnes.

L'anàlisi de l'expressió de les principals molècules de la cascada de transducció de senyal en limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ purificats entre SCU i SPA va mostrar que no hi havia diferències significatives entre SCU i SPA.

Cal indicar que, malgrat en l'anàlisi proteic per immunoblot de la cadena ζ no vam trobar diferències d'expressió entre SCU i SPA, per citometria de flux les cèl·lules de SCU presentaven un major número de molècules de CD3 en la seva superfície. Cal tenir en compte que la citometria de flux és una tècnica més sensible i quantitativa que l'immunoblot, ja que permet determinar l'expressió d'antígens en la cèl·lula individualment. A més a més, per citometria de flux utilitzarem un anticòs que reconeix la cadena ϵ del CD3 i en canvi per immunoblot utilitzarem un anticòs que reconeix la cadena no fosforilada ζ . Se sap, que una fracció de la cadena ζ està associada al citoesquelet d'actina, fracció que resulta insoluble a determinats detergents no iònics (Caplan and Baniyash, 1996) i que podria no estar totalment representada en l'extracte total proteic de l'immunoblot, o bé també, que el fet d'utilitzar un anticòs que no reconeix els epítops de Tyr fosforilades constitutivament, podria fer que la detecció també fos parcial.

S'havia descrit que existien diferències en el patró de fosforilació en Tyr entre les cèl·lules *naive* i les cèl·lules memòria de ratolí i sang perifèrica d'adult, però mantenint-se similars els nivells proteics de les proteïnes fosforilades en Tyr (Farber et al., 1997; Hall et al., 1999). Però fins el moment, no s'havia comparat la cinètica de fosforilació en Tyr entre les cèl·lules *naive* de SCU i SPA. Al realitzar la cinètica de fosforilació, es va trobar que a nivell basal la fosforilació en Tyr de les cèl·lules *naive* de SCU i SPA era similar, malgrat existia certa variabilitat entre les diferents mostres

DISCUSSION

analitzades. Al minut d'activació, s'observaren diferències quantitatives en la fosforilació en Tyr entre SCU i SPA, que encara foren més evidents als 15 minuts, moment que es va escollir per realitzar la immunoprecipitació amb anti-PTyr així com als 30 minuts.

Mitjançant la immunoprecipitació amb un anticòs anti-proteïnes fosforilades en Tyr en condicions desnaturalitzants vam detectar aquelles proteïnes fosforilades en Tyr, excloent aquelles que formessin complexos sense estar fosforilades en Tyr. A més a més, ens va permetre fer una aproximació quantitativa de la relació entre les molècules fosforilades i el nivell de fosforilació per molècula.

D'aquest estudi, vam observar que a nivell basal, les cèl·lules *naive* de SCU i SPA presentaven nivells similars proteics de la cadena ζ fosforilades en Tyr. La manca d'anticòs anti cadena ζ -fosforilada que permetin discriminar quins ITAMs estan fosforilats en Tyr després de l'activació limita la determinació acurada de possibles diferències entre SCU i SPA, ja que s'ha demostrat que perquè es doni una completa activació de la cadena ζ cal la fosforilació dels 6 ITAMs. En canvi, activacions amb antagonistes porten a la fosforilació de 4 residus de Tyr i a més, una productiva senyal de transducció via TCR depèn críticament de la completa fosforilació de la cadena ζ del complex TCR/CD3 (Kersh et al., 1999) i la posterior unió del ZAP-70 a aquest. Quan es realitzava una aproximació al número de proteïnes LAT fosforilades en Tyr a nivell basal, s'observà que SCU presentava més molècules fosforilades en Tyr a nivell basal que SPA. Després de l'activació, els nivells de molècules fosforilades i fosforilació per molècula s'igualaven entre SCU i SPA. El major nombre de molècules de LAT fosforilat en Tyr en condicions bassals podria repercutir en la plataforma de senyalització que forma amb altres proteïnes que se li uneixen (Grb-2, GADS, etc), facilitant en el cas del SCU l'activació dels limfòcits via TCR/CD3.

Totes aquestes diferències podrien repercutir en la resposta de les cèl·lules de SCU tal i com s'ha associat la disminució de la resposta dels limfòcits procedents de gent gran amb una baixa capacitat d'activació de la cadena ζ , Lck i ZAP-70, encara que els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes no es modifiquessin (Fulop et al., 1999; Whisler et al., 1999). D'aquesta manera, la conseqüència final d'un diferent

DISCUSSION

ensemblatge del complex molecular de transducció de la senyal pot alterar la transcripció gènica i que es doni una resposta immune diferent.

Hi ha d'altres mecanismes que podrien afavorir l'activació dels limfòcits CD4⁺CD45RA⁺ a nivell de senyalització com serien la diferent compartimentalització de proteïnes clau en la cascada de senyalització i una major fluïdesa de la membrana citoplasmàtica que facilitaria l'agregació del complex TCR/CD3 després de l'activació (Stulnig et al., 1995; Proust et al., 1996; Whisler et al., 1998). En certes patologies es dona un increment de l'associació dels rafts i de l'agrupament de la cadena ζ a la superfície cel·lular, d'aquí una anormal senyalització (Nambiar et al., 2002). Així com, també el fet que els limfòcits *naive* de SCU expressin menors nivells de CD45RA en la seva superfície comparat amb SPA, podria contribuir en el diferent comportament observat, donat que el CD45 pot modular el llindar de la senyal de transducció actuant tant com un regulador negatiu o positiu de l'activitat de les PTKs, mantenint fosforilada la Tyr autocatalítica o defosforilant la Tyr inhibidora de Lck i Fyn (Hermiston et al., 2003).

Cal indicar que en els nostres estudis no s'han analitzat els nivells de certes fosfatases així com d'altres molècules que participen en la regulació negativa de l'activació dels limfòcits T. D'aquesta manera, el particular estat de les cèl·lules de SCU també es podria explicar per una manca de la regulació negativa d'aquestes fosfatases (SHP-1, SHP-2) o per CTLA-4 i/o PD-1, o per una manca d'inhibició de les proteïnes implicades en la cascada. A part d'aquestes molècules, s'ha descobert una nova proteïna adaptadora, LAX, que podria jugar un paper inhibitori en la resposta dels limfòcits T (Zhu et al., 2002), i recentment s'ha identificat un nou receptor amb funcions similars a CTLA-4 i PD-1, BTLA, que s'expressa en les cèl·lules T *naive* després de la seva activació (Watanabe et al., 2003).

Recentment s'ha descrit una altra via d'activació dels limfòcits T que implicaria un canvi conformacional del CD3 ϵ i involucraria a la molècula Nck, fent que l'activació via TCR/CD3 comportés la fosforilació en Tyr de proteïnes clau i l'activació de Nck, molècula implicada en la reorganització del citoesquelet d'actina. Ambdós vies convergrien en un punt comú de l'activació, ja que tant Nck com proteïnes que s'uneixen a ell també són fosforilades en Tyr després de l'activació via TCR/CD3 (Gil et al., 2002). Per tant, per poder analitzar la capacitat total de resposta del limfòcit caldria estudiar les diferents vies que impliquen la seva activació.

DISCUSSION

A part, de les diferències entre les cèl·lules *naive* de SCU i SPA demostrades en aquest treball, ja s'havien descrit certes particularitats de les cèl·lules de SCU. Així, les cèl·lules *naive* de SCU expressen majoritàriament el marcador CD38. Aquesta molècula es considera un marcador d'activació que participa en l'activació dels limfòcits, i es troba associada al cua citoplasmàtic del Lck. Recentment, també s'ha demostrat que les cèl·lules T de SCU expressen menys CTLA-4 que les cèl·lules T de SPA, tant a nivell de proteïna com de RNA després de l'activació amb anti-CD3+anti-CD28 (Miller et al., 2002), fet que pot relacionar-se amb la progressió dins del cicle cel·lular, ja que ratolins deficientes en CTLA-4 presenten un augment en la proliferació (Greenwald et al., 2002b).

Després del trasplantament amb cèl·lules de SCU, la primera onada de reconstitució de cèl·lules T s'origina per les cèl·lules T donants madures presents en l'injert (Storek et al., 2001). L'estimulació de les cèl·lules de SCU a través del receptor per l'antigen sense coestimulació podria induir un estímul toleritzant mitjançant l'activació subòptima i la posterior eliminació d'una gran part de les cèl·lules activades (Schwartz, 1996). Amb la seva mort, el número total de cèl·lules T disminuiria i el número relatiu de cèl·lules T específiques enfront de determinats antígens també es modificaria substancialment.

No sabem si la resposta de les cèl·lules *naive* observada *in vitro* pot ser sobrepassada *in vivo* per altres factors i tampoc coneixem el paper de les cèl·lules de SCU en l'expansió perifèrica després del trasplantament. De totes maneres, és interessant destacar que els pacients trasplantats amb SCU presenten major proporció de cèl·lules T apoptòtiques en la sang perifèrica que els pacients que han rebut un trasplantament de moll d'òs o cèl·lules hematopoiètiques mobilitzades (Lin et al., 1997). En aquest cas, l'apoptosi és possiblement selectiva per cèl·lules reactives donants, fenomen que es contempla com la base de la tolerància en el trasplantament i que podria explicar l'aparent reducció del GVHD en els individus trasplantats amb SCU.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

1. En els nivells d'expressió de molècules de superfície característiques de limfòcits T (com CD3 i CD45) existeixen diferències entre els neonats i els individus adults, independentment de la subpoblació seleccionada, en canvi els nivells d'expressió d'altres molècules es mantenen pràcticament constants.
2. Per poder comparar funcionalment les cèl·lules T de SCU i SPA es requereix que l'anàlisi sigui fet amb cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ purificades, per tal d'evitar l'adjudicació de les diferències funcionals a diferències fenotípiques entre les dues poblacions de cèl·lules T.
3. En absència d'estímuls externs, les cèl·lules CD4⁺CD45RA⁺ de SCU tenen menor supervivència en cultiu *in vitro* que les de SPA. A més, la significativa presència de cèl·lules CD45RO⁺ i CD8⁺ en la SPA condiciona els resultats de supervivència dels cultius de cèl·lules T.
4. No sempre va associada una modulació a la baixa del complex TCR/CD3 a una resposta eficaç. Així, la modulació a la baixa del complex TCR/CD3 es un procés necessari però no suficient per a que les cèl·lules *naive* de SCU s'activin de forma efectiva.
5. L'activació amb anti-CD3 comporta un major grau de transformació blàstica, nivells de proliferació i expressió d'Ox40 i CD25 en SCU comparat amb SPA.
6. L'augment d'expressió de CD69, CD28 i CD40L es pot donar independentment del grau d'activació cel·lular que els limfòcits T assoleixin. En canvi, els més alts nivells de CD25 i Ox40, en les nostres condicions de cultiu, només s'observen quan s'ha donat una resposta que inclou transformació blàstica i proliferació.

CONCLUSIONS

7. Malgrat que amb anti-CD3 s'indueixi l'expressió de marcadors d'activació, això no és suficient per a que ni els limfòcits de SCU ni els de SPA expressin CD45RO. La coestimulació via CD28 porta als dos tipus cel·lulars a un estadi d'activació similar (transformació blàstica, marcadors d'activació, proliferació), excepte la coexpressió de la isoforma CD45RO que només s'observa en la SCU.
8. La majoria de les cèl·lules de SCU que entren en cicle cel·lular després d'activar-se via TCR/CD3 moren per apoptosi per una via Fas–Fas-L independent. La mort observada pot ser revertida per la presència d'IL2.
9. Existeixen diferències en el patró de fosforilació en Tyr entre SCU i SPA després de l'activació via CD3 que podrien contribuir a la diferent resposta observada entre els dos tipus cel·lulars.
10. Les cèl·lules *naive* de SCU són fenotípicament i funcionalment diferents a les de SPA.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Salam, F., Moulana, M. G., and Mansour, M. H. (2000). Age-related structural modulation of T lymphocyte-associated CD45 isoforms. *Mech Ageing Dev* *114*, 21-35.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* *281*, 1322-1326.
- Adkins, B., Chun, K., Hamilton, K., and Nassiri, M. (1996). Naive murine neonatal T cells undergo apoptosis in response to primary stimulation. *J Immunol* *157*, 1343-1349.
- Adkins, B., Williamson, T., Guevara, P., and Bu, Y. (2003). Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. *J Immunol* *170*, 4548-4556.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* *8*, 765-772.
- Aggarwal, S., Gupta, A., Nagata, S., and Gupta, S. (1997). Programmed cell death (apoptosis) in cord blood lymphocytes. *J Clin Immunol* *17*, 63-73.
- Akbar, A. N., Borthwick, N. J., Wickremasinghe, R. G., Panayiotidis, P., Pilling, D., Bofill, M., Krajewski, S., Reed, J. C., and Salmon, M. (1996). Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* *26*, 294-299.
- Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S., and Sekaly, R. P. (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* *190*, 1879-1890.
- Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* *181*, 71-77.
- Alegre, M. L., Shiels, H., Thompson, C. B., and Gajewski, T. F. (1998). Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* *161*, 3347-3356.
- Algeciras-Schimmich, A., Griffith, T. S., Lynch, D. H., and Paya, C. V. (1999). Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* *162*, 5205-5211.
- Almici, C., Carlo-Stella, C., Wagner, J. E., and Rizzoli, V. (1995). Umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. *Haematologica* *80*, 473-479.
- Anton van der Merwe, P., Davis, S. J., Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* *12*, 5-21.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* *276*, 11615-11623.
- Arlettaz, L., Barbey, C., Dumont-Girard, F., Helg, C., Chapuis, B., Roux, E., and Roosnek, E. (1999). CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol* *29*, 3987-3994.
- Aruffo, A., and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8573-8577.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 255-260.

BIBLIOGRAFIA

August, A., Gibson, S., Kawakami, Y., Kawakami, T., Mills, G. B., and Dupont, B. (1994). CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9347-9351.

B

Bachmann, M. F., Oxenius, A., Speiser, D. E., Mariathasan, S., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Ohashi, P. S. (1997). Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur J Immunol* *27*, 2195-2203.

Bansal-Pakala, P., Jember, A. G., and Croft, M. (2001). Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance. *Nat Med* *7*, 907-912.

Bender, J. G., Unverzagt, K., Walker, D. E., Lee, W., Smith, S., Williams, S., and Van Epps, D. E. (1994). Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* *70*, 10-18.

Bennett, F., Luxenberg, D., Ling, V., Wang, I. M., Marquette, K., Lowe, D., Khan, N., Veldman, G., Jacobs, K. A., Valge-Archer, V. E., *et al.* (2003). Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* *170*, 711-718.

Berard, M., and Tough, D. F. (2002). Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* *106*, 127-138.

Berry, D. M., Benn, S. J., Cheng, A. M., and McGlade, C. J. (2001). Caspase-dependent cleavage of the hematopoietic specific adaptor protein Gads alters signalling from the T cell receptor. *Oncogene* *20*, 1203-1211.

Bertotto, A., Gerli, R., Lanfranccone, L., Crupi, S., Arcangeli, C., Cerneti, C., Spinozzi, F., and Rambotti, P. (1990). Activation of cord T lymphocytes. II. Cellular and molecular analysis of the defective response induced by anti-CD3 monoclonal antibody. *Cell Immunol* *127*, 247-259.

Bi, K., and Altman, A. (2001). Membrane lipid microdomains and the role of PKC θ in T cell activation. *Semin Immunol* *13*, 139-146.

Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M. J., and Altman, A. (2001). Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol* *2*, 556-563.

Blair, P. J., Riley, J. L., Harlan, D. M., Abe, R., Tadaki, D. K., Hoffmann, S. C., White, L., Francomano, T., Perfetto, S. J., Kirk, A. D., and June, C. H. (2000). CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med* *191*, 651-660.

Boise, L. H., Minn, A. J., June, C. H., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995a). Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5491-5495.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995b). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* *3*, 87-98.

Boise, L. H., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3759-3764.

BIBLIOGRAFIA

- Bosselut, R., Zhang, W., Ashe, J. M., Kopacz, J. L., Samelson, L. E., and Singer, A. (1999). Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J Exp Med* *190*, 1517-1526.
- Boulougouris, G., McLeod, J. D., Patel, Y. I., Ellwood, C. N., Walker, L. S., and Sansom, D. M. (1999). IL-2-independent activation and proliferation in human T cells induced by CD28. *J Immunol* *163*, 1809-1816.
- Boyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* *97*, 7.
- Bradley, L. M., Atkins, G. G., and Swain, S. L. (1992). Long-term CD4+ memory T cells from the spleen lack MEL-14, the lymph node homing receptor. *J Immunol* *148*, 324-331.
- Bradley, L. M., Bradley, J. S., Ching, D. L., and Shiigi, S. M. (1989). Predominance of T cells that express CD45R in the CD4+ helper/inducer lymphocyte subset of neonates. *Clin Immunol Immunopathol* *51*, 426-435.
- Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., *et al.* (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* *191*, 1591-1604.
- Brocke, T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* *186*, 1223-1232.
- Broome, H. E., Dargan, C. M., Krajewski, S., and Reed, J. C. (1995). Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J Immunol* *155*, 2311-2317.
- Brown, D. A., and London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* *240*, 1-7.
- Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., and Boyse, E. A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 3828-3832.
- Brugnoni, D., Airo, P., Graf, D., Marconi, M., Lebowitz, M., Plebani, A., Giliani, S., Malacarne, F., Cattaneo, R., Ugazio, A. G., and *et al.* (1994). Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *Eur J Immunol* *24*, 1919-1924.
- Bruno, L., Kirberg, J., and von Boehmer, H. (1995). On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity* *2*, 37-43.
- Bruyns, E., Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Sagolla, K., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Bensussan, A., Meuer, S., and Schraven, B. (1998). T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* *188*, 561-575.
- Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J. Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., and Chan, A. C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* *9*, 607-616.
- Budd, R. C. (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* *109*, 437-441.
- Bullens, D. M., Kasran, A., Peng, X., Lorre, K., and Ceuppens, J. L. (1998). Effects of anti-IL-4 receptor monoclonal antibody on in vitro T cell cytokine levels: IL-4 production by T cells from non-atopic donors. *Clin Exp Immunol* *113*, 320-326.

BIBLIOGRAFIA

Bunnell, S. C., Diehn, M., Yaffe, M. B., Findell, P. R., Cantley, L. C., and Berg, L. J. (2000). Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* *275*, 2219-2230.

C

Cai, Z., Kishimoto, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., and Sprent, J. (1997). Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* *185*, 641-651.

Cambier, J. C. (1995). New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today* *16*, 110.

Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4240-4245.

Caplan, S., and Baniyash, M. (1996). Normal T cells express two T cell antigen receptor populations, one of which is linked to the cytoskeleton via zeta chain and displays a unique activation-dependent phosphorylation pattern. *J Biol Chem* *271*, 20705-20712.

Caplan, S., Zeliger, S., Wang, L., and Baniyash, M. (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4768-4772.

Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., and Kroemer, G. (1996). Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* *157*, 512-521.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* *180*, 1263-1272.

Chalmers, I. M., Janossy, G., Contreras, M., and Navarrete, C. (1998). Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* *92*, 11-18.

Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* *71*, 649-662.

Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* *16*, 395-419.

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* *263*, 1759-1762.

Chinnaiyan, A. M., and Dixit, V. M. (1996). The cell-death machine. *Curr Biol* *6*, 555-562.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R. J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* *14*, 5589-5596.

Choi, Y. W., Herman, A., DiGiusto, D., Wade, T., Marrack, P., and Kappler, J. (1990). Residues of the variable region of the T-cell-receptor beta-chain that interact with *S. aureus* toxin superantigens. *Nature* *346*, 471-473.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.

Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., and Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* *133*, 157-165.

BIBLIOGRAFIA

- Clarke, S. R., and Rudensky, A. Y. (2000). Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4⁺ T cells in the absence of self peptide:MHC complexes. *J Immunol* *165*, 2458-2464.
- Clement, L. T., Vink, P. E., and Bradley, G. E. (1990). Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct subpopulations of CD4⁺ cells in the human neonate. *J Immunol* *145*, 102-108.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* *6*, 629-662.
- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* *357*, 695-697.
- Cohen, S. B., Dominiguez, E., Lowdell, M., and Madrigal, J. A. (1998). The immunological properties of cord blood: overview of current research presented at the 2nd EUROCORD workshop. *Bone Marrow Transplant* *22 Suppl 1*, S22-25.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* *22*, 633-640.
- Cossarizza, A., Ortolani, C., Paganelli, R., Barbieri, D., Monti, D., Sansoni, P., Fagiolo, U., Castellani, G., Bersani, F., Londei, M., and Franceschi, C. (1996). CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev* *86*, 173-195.
- Croft, M., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1994). Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* *152*, 2675-2685.
- Croft, M., Joseph, S. B., and Miner, K. T. (1997). Partial activation of naive CD4 T cells and tolerance induction in response to peptide presented by resting B cells. *J Immunol* *159*, 3257-3265.
- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Mills, G. B. (1999). SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem* *274*, 27583-27589.
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., and Mescher, M. F. (1998). CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J Immunol* *160*, 3236-3243.

D

- D'Arena, G., Cascavilla, N., and Carotenuto, M. (1998a). Blastogenic response of activated human umbilical cord blood T-lymphocytes. *Haematologica* *83*, 1048-1050.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio, G., Fusilli, S., Zendoli, F., and Carotenuto, M. (1998b). Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* *83*, 197-203.
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Di Giorgio, G., Zendoli, F., and Carotenuto, M. (1996). Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* *81*, 404-409.
- Davis, S. J., and van der Merwe, P. A. (1996). The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* *17*, 177-187.
- DeBell, K. E., Conti, A., Alava, M. A., Hoffman, T., and Bonvini, E. (1992). Microfilament assembly modulates phospholipase C-mediated signal transduction by the TCR/CD3 in murine T helper lymphocytes. *J Immunol* *149*, 2271-2280.

BIBLIOGRAFIA

Debnath, J., Chamorro, M., Czar, M. J., Schaeffer, E. M., Lenardo, M. J., Varmus, H. E., and Schwartzberg, P. L. (1999). rtk/TXK encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. *Mol Cell Biol* *19*, 1498-1507.

Delespesse, G., Yang, L. P., Ohshima, Y., Demeure, C., Shu, U., Byun, D. G., and Sarfati, M. (1998). Maturation of human neonatal CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. *Vaccine* *16*, 1415-1419.

Dianzani, U., Luqman, M., Rojo, J., Yagi, J., Baron, J. L., Woods, A., Janeway, C. A., Jr., and Bottomly, K. (1990). Molecular associations on the T cell surface correlate with immunological memory. *Eur J Immunol* *20*, 2249-2257.

Diez-Orejas, R., Ballester, S., Feito, M. J., Ojeda, G., Criado, G., Ronda, M., Portoles, P., and Rojo, J. M. (1994). Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56lck with the alpha beta T-cell receptor (TCR): regulation of TCR-induced activation. *Embo J* *13*, 90-99.

Ding, Y. H., Baker, B. M., Garboczi, D. N., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1999). Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity* *11*, 45-56.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* *5*, 1365-1369.

Donnadieu, E., Cefai, D., Tan, Y. P., Paresys, G., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1992). Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J Immunol* *148*, 2643-2653.

Dorfman, J. R., Stefanova, I., Yasutomo, K., and Germain, R. N. (2000). CD4⁺ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat Immunol* *1*, 329-335.

D'Oro, U., and Ashwell, J. D. (1999). Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* *162*, 1879-1883.

Dower, N. A., Stang, S. L., Bottorff, D. A., Ebinu, J. O., Dickie, P., Ostergaard, H. L., and Stone, J. C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* *1*, 317-321.

Drenou, B., Choqueux, C., El Ghalbzouri, A., Blancheteau, V., Toubert, A., Charron, D., and Mooney, N. (1998). Characterisation of the roles of CD95 and CD95 ligand in cord blood. *Bone Marrow Transplant* *22 Suppl 1*, S44-47.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33-42.

Durandy, A., De Saint Basile, G., Lisowska-Grospierre, B., Gauchat, J. F., Forveille, M., Kroczeck, R. A., Bonnefoy, J. Y., and Fischer, A. (1995). Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* *154*, 1560-1568.

Dustin, M. L., and Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* *1*, 23-29.

Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* *9*, 27-66.

E

Early, E., and Reen, D. J. (1999). Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin Exp Immunol* *116*, 527-533.

Early, E. M., and Reen, D. J. (1996). Antigen-independent responsiveness to interleukin-4 demonstrates differential regulation of newborn human T cells. *Eur J Immunol* *26*, 2885-2889.

BIBLIOGRAFIA

Ebinu, J. O., Stang, S. L., Teixeira, C., Bottorff, D. A., Hooton, J., Blumberg, P. M., Barry, M., Bleakley, R. C., Ostergaard, H. L., and Stone, J. C. (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* *95*, 3199-3203.

Egen, J. G., and Allison, J. P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* *16*, 23-35.

El Ghalbzouri, A., Drenou, B., Blancheteau, V., Choqueux, C., Fauchet, R., Charron, D., and Mooney, N. (1999). An in vitro model of allogeneic stimulation of cord blood: induction of Fas independent apoptosis. *Hum Immunol* *60*, 598-607.

Elliott, S. R., Macardle, P. J., Robertson, D. M., and Zola, H. (1999). Expression of the costimulator molecules, CD80, CD86, CD28, and CD152 on lymphocytes from neonates and young children. *Hum Immunol* *60*, 1039-1048.

Elliott, S. R., Robertson, D. M., Zola, H., and Macardle, P. J. (2000). Expression of the costimulator molecules, CD40 and CD154, on lymphocytes from neonates and young children. *Hum Immunol* *61*, 378-388.

Ellis, R. E., Yuan, J. Y., and Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* *7*, 663-698.

F

Farber, D. L. (1998). Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *J Immunol* *160*, 535-539.

Farber, D. L., Acuto, O., and Bottomly, K. (1997). Differential T cell receptor-mediated signaling in naive and memory CD4 T cells. *Eur J Immunol* *27*, 2094-2101.

Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., and de la Hera, A. (1999). Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1547-1552.

Ferrer, J. M., Plaza, A., Kreisler, M., and Diaz-Espada, F. (1992). Differential interleukin secretion by in vitro activated human CD45RA and CD45RO CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol* *141*, 10-20.

Ferrero, E., and Malavasi, F. (1999). The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38. *J Leukoc Biol* *65*, 151-161.

Fields, B. A., Malchiodi, E. L., Li, H., Ysern, X., Stauffacher, C. V., Schlievert, P. M., Karjalainen, K., and Mariuzza, R. A. (1996). Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature* *384*, 188-192.

Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* *9*, 617-626.

Foy, T. M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J. E., and Noelle, R. J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* *14*, 591-617.

Fraser, A., and Evan, G. (1996). A license to kill. *Cell* *85*, 781-784.

Frauwirth, K. A., and Thompson, C. B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* *109*, 295-299.

Frearson, J. A., and Alexander, D. R. (1996). Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today* *17*, 385-391.

Freedman, A. S., Freeman, G., Horowitz, J. C., Daley, J., and Nadler, L. M. (1987). B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J Immunol* *139*, 3260-3267.

BIBLIOGRAFIA

Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, V. A., Jr., Lombard, L. A., Gray, G. S., and Nadler, L. M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909-911.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E. T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275, 39458-39465.

Fulop, T., Jr., Gagne, D., Goulet, A. C., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., and Dupuis, G. (1999). Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp Gerontol* 34, 197-216.

G

Garcia, K. C., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1999a). Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-397.

Garcia, S., DiSanto, J., and Stockinger, B. (1999b). Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 11, 163-171.

Garderet, L., Dulphy, N., Douay, C., Chalumeau, N., Schaeffer, V., Zilber, M. T., Lim, A., Even, J., Mooney, N., Gelin, C., *et al.* (1998). The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood* 91, 340-346.

Gerli, R., Bertotto, A., Crupi, S., Arcangeli, C., Marinelli, I., Spinozzi, F., Cernetti, C., Angelella, P., and Rambotti, P. (1989). Activation of cord T lymphocytes. I. Evidence for a defective T cell mitogenesis induced through the CD2 molecule. *J Immunol* 142, 2583-2589.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.

Gil, D., Schamel, W. W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109, 901-912.

Gilliland, L. K., Schieven, G. L., Norris, N. A., Kanner, S. B., Aruffo, A., and Ledbetter, J. A. (1992). Lymphocyte lineage-restricted tyrosine-phosphorylated proteins that bind PLC gamma 1 SH2 domains. *J Biol Chem* 267, 13610-13616.

Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R., and Turner, J. M. (1991). Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 64, 511-520.

Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., and *et al.* (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321, 1174-1178.

Golstein, P. (1997). Controlling cell death. *Science* 275, 1081-1082.

Gonzalez-Garcia, A., Merida, I., Martinez, A. C., and Carrera, A. C. (1997). Intermediate affinity interleukin-2 receptor mediates survival via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272, 10220-10226.

Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

BIBLIOGRAFIA

Greaves, M. F., Brown, J., Molgaard, H. V., Spurr, N. K., Robertson, D., Delia, D., and Sutherland, D. R. (1992). Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia 6 Suppl 1*, 31-36.

Greenwald, R. J., Latchman, Y. E., and Sharpe, A. H. (2002a). Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol 14*, 391-396.

Greenwald, R. J., Oosterwegel, M. A., van der Woude, D., Kubal, A., Mandelbrot, D. A., Boussiotis, V. A., and Sharpe, A. H. (2002b). CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol 32*, 366-373.

Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev 13*, 1899-1911.

Gross, J. A., St John, T., and Allison, J. P. (1990). The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol 144*, 3201-3210.

Gupta, S. (2001). Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci 69*, 2957-2964.

H

Hagihara, M., Chargui, J., Gansuud, B., Tsuchida, F., Sato, T., Hotta, T., and Kato, S. (1999). Umbilical cord blood T lymphocytes are induced to apoptosis after being allo-primed in vitro. *Bone Marrow Transplant 24*, 1229-1233.

Hall, S. R., Heffernan, B. M., Thompson, N. T., and Rowan, W. C. (1999). CD4⁺ CD45RA⁺ and CD4⁺ CD45RO⁺ T cells differ in their TCR-associated signaling responses. *Eur J Immunol 29*, 2098-2106.

Hampfl, J., Chien, Y. H., and Davis, M. M. (1997). CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands. *Immunity 7*, 379-385.

Han, P., and Hodge, G. (1999). Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: relevance to cord blood transplantation. *Br J Haematol 107*, 450-457.

Han, P., Hodge, G., Story, C., and Xu, X. (1995). Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol 89*, 733-740.

Hargreaves, M., and Bell, E. B. (1997). Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC⁺ 'revertant' memory and CD45RC⁺ naive CD4 T cells. *Immunology 91*, 323-330.

Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (1998). IkappaB kinases serve as a target of CD28 signaling. *J Biol Chem 273*, 25185-25190.

Harris, D. T., Schumacher, M. J., Locascio, J., Besencon, F. J., Olson, G. B., DeLuca, D., Shenker, L., Bard, J., and Boyse, E. A. (1992). Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A 89*, 10006-10010.

Hassan, J., O'Neill, S., O'Neill, L. A., Pattison, U., and Reen, D. J. (1995). Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes. *Clin Exp Immunol 102*, 192-198.

Hassan, J., and Reen, D. J. (1997). Cord blood CD4⁺ CD45RA⁺ T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology 90*, 397-401.

Hassan, J., and Reen, D. J. (1998). IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol 28*, 3057-3065.

Hassan, J., and Reen, D. J. (2001). Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. *J Immunol 167*, 1970-1976.

BIBLIOGRAFIA

- Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56lck: identification of novel intermolecular association. *Science* *252*, 1523-1528.
- Hawkins, P. T., Jackson, T. R., and Stephens, L. R. (1992). Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* *358*, 157-159.
- Hegner, S. P., Hofmann, T. G., Ushmorov, A., Dienz, O., Wing-Lan Leung, I., Lassam, N., Scheidereit, C., Droge, W., and Schmitz, M. L. (2000). Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol* *20*, 2556-2568.
- Hemmer, B., Stefanova, I., Vergelli, M., Germain, R. N., and Martin, R. (1998). Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* *160*, 5807-5814.
- Hennecke, J., and Wiley, D. C. (2001). T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* *104*, 1-4.
- Hermiston, M. L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: A critical regulator of signaling Thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 107-137.
- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Teague, T. K., Henson, P., Day, B. J., Kappler, J., and Marrack, P. C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* *10*, 735-744.
- Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* *16*, 759-767.
- Hoey, T., Sun, Y. L., Williamson, K., and Xu, X. (1995). Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* *2*, 461-472.
- Holdorf, A. D., Green, J. M., Levin, S. D., Denny, M. F., Straus, D. B., Link, V., Changelian, P. S., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (1999). Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)₃ domain of Lck are required for T cell costimulation. *J Exp Med* *190*, 375-384.
- Holdorf, A. D., Kanagawa, O., and Shaw, A. S. (2000). CD28 and T cell co-stimulation. *Rev Immunogenet* *2*, 175-184.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschoop, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* *1*, 489-495.
- Horak, I. D., Gress, R. E., Lucas, P. J., Horak, E. M., Waldmann, T. A., and Bolen, J. B. (1991). T-lymphocyte interleukin 2-dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 1996-2000.
- Hou, S., and Doherty, P. C. (1993). Partitioning of responder CD8⁺ T cells in lymph node and lung of mice with Sendai virus pneumonia by LECAM-1 and CD45RB phenotype. *J Immunol* *150*, 5494-5500.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547-549.
- Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* *273*, 10777-10783.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 17255-17257.
- Huang, D. C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* *103*, 839-842.

BIBLIOGRAFIA

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.

I

Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B., and Hoessli, D. C. (1999). Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell* 10, 891-905.

Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. (1990). Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 6, 197-206.

Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

Irving, B. A., and Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891-901.

Ise, W., Totsuka, M., Sogawa, Y., Ametani, A., Hachimura, S., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S. (2002). Naive CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol* 168, 3242-3250.

Itoh, Y., Hemmer, B., Martin, R., and Germain, R. N. (1999). Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events. *J Immunol* 162, 2073-2080.

Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J. D., and Cantrell, D. A. (1992). Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 12, 3305-3312.

J

Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., and Findell, P. R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* 270, 7029-7032.

Jain, J., McCaffrey, P. G., Valge-Archer, V. E., and Rao, A. (1992). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356, 801-804.

Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, 309-312.

Johannisson, A., and Festin, R. (1995). Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 19, 343-352.

Jones, R. G., Elford, A. R., Parsons, M. J., Wu, L., Krawczyk, C. M., Yeh, W. C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J. R., and Ohashi, P. S. (2002). CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med* 196, 335-348.

Jose, E. S., and Alarcon, B. (1999). Receptor engagement transiently diverts the T cell receptor heterodimer from a constitutive degradation pathway. *J Biol Chem* 274, 33740-33746.

Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B., and Pestell, R. G. (2001). NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 73-90.

BIBLIOGRAFIA

K

- Kadereit, S., Mohammad, S. F., Miller, R. E., Woods, K. D., Listrom, C. D., McKinnon, K., Alali, A., Bos, L. S., Iacobucci, M. L., Sramkoski, M. R., *et al.* (1999). Reduced NFAT1 protein expression in human umbilical cord blood T lymphocytes. *Blood* *94*, 3101-3107.
- Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. (2002). It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol* *23*, 413-420.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 240-246.
- Kasibhatla, S., Genestier, L., and Green, D. R. (1999). Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* *274*, 987-992.
- Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Arimura, Y., Mitomo, K., Okada, M., Clark, M. R., Mizuno, K., and Yakura, H. (1999). CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol* *163*, 1321-1326.
- Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* *10*, 640-648.
- Kato, T., and Nariuchi, H. (2000). Polarization of naive CD4+ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol* *164*, 3554-3562.
- Kawabe, Y., and Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* *349*, 245-248.
- Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., and Okada, M. (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* *404*, 999-1003.
- Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y., and Jenkins, M. K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* *1*, 327-339.
- Kennedy, M. K., Mohler, K. M., Shanebeck, K. D., Baum, P. R., Picha, K. S., Otten-Evans, C. A., Janeway, C. A., Jr., and Grabstein, K. H. (1994). Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. *Eur J Immunol* *24*, 116-123.
- Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R. C. (1999). Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* *190*, 1891-1896.
- Kersh, E. N., Kersh, G. J., and Allen, P. M. (1999). Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J Exp Med* *190*, 1627-1636.
- Khoshnan, A., Kempiak, S. J., Bennett, B. L., Bae, D., Xu, W., Manning, A. M., June, C. H., and Nel, A. E. (1999). Primary human CD4+ T cells contain heterogeneous I kappa B kinase complexes: role in activation of the IL-2 promoter. *J Immunol* *163*, 5444-5452.
- Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B., and Nel, A. E. (2000). The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol* *165*, 1743-1754.
- Kilpinen, S., Henttinen, T., Lahdenpohja, N., Hulkkonen, J., and Hurme, M. (1996). Signals leading to the activation of NF-kappa B transcription factor are stronger in neonatal than adult T lymphocytes. *Scand J Immunol* *44*, 85-88.
- Kirberg, J., Berns, A., and von Boehmer, H. (1997). Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* *186*, 1269-1275.

BIBLIOGRAFIA

Kirberg, J., and Brocker, T. (1996). CD45 up-regulation during lymphocyte maturation. *Int Immunol* *8*, 1743-1749.

Kirchhoff, S., Muller, W. W., Li-Weber, M., and Krammer, P. H. (2000). Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* *30*, 2765-2774.

Kirk, A. D., Harlan, D. M., Armstrong, N. N., Davis, T. A., Dong, Y., Gray, G. S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J. H., Jr., and Knechtle, S. J. (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 8789-8794.

Kishihara, K., Penninger, J., Wallace, V. A., Kundig, T. M., Kawai, K., Wakeham, A., Timms, E., Pfeffer, K., Ohashi, P. S., Thomas, M. L., and et al. (1993). Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* *74*, 143-156.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (1999). Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells. *J Immunol* *163*, 1817-1826.

Klaus, S. J., Sidorenko, S. P., and Clark, E. A. (1996). CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* *156*, 2743-2753.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* *275*, 1132-1136.

Knudtzon, S. (1974). In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* *43*, 357-361.

Koretzky, G. A., and Myung, P. S. (2001). Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* *1*, 95-107.

Kosugi, A., Saitoh, S., Noda, S., Yasuda, K., Hayashi, F., Ogata, M., and Hamaoka, T. (1999). Translocation of tyrosine-phosphorylated TCRzeta chain to glycolipid-enriched membrane domains upon T cell activation. *Int Immunol* *11*, 1395-1401.

Krangel, M. S. (1987). Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med* *165*, 1141-1159.

Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* *87*, 1-13.

Kumar, S. (1995). ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem Sci* *20*, 198-202.

Kurtzberg, J., Graham, M., Casey, J., Olson, J., Stevens, C. E., and Rubinstein, P. (1994). The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells* *20*, 275-283; discussion 284.

L

Laemli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Lantz, O., Grandjean, I., Matzinger, P., and Di Santo, J. P. (2000). Gamma chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat Immunol* *1*, 54-58.

Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* *96*, 1-4.

Larsen, C. P., Elwood, E. T., Alexander, D. Z., Ritchie, S. C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Cho, H. R., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P. S., et al. (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* *381*, 434-438.

BIBLIOGRAFIA

- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., *et al.* (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-268.
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., and Koretzky, G. A. (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 272, 31427-31434.
- Lazarovits, A. I., Poppema, S., Zhang, Z., Khandaker, M., Le Feuvre, C. E., Singhal, S. K., Garcia, B. M., Ogasa, N., Jevnikar, A. M., White, M. H., *et al.* (1996). Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380, 717-720.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., and Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169, 4882-4888.
- Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282, 2263-2266.
- Leitenberg, D., Boutin, Y., Lu, D. D., and Bottomly, K. (1999). Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10, 701-711.
- Leitenberg, D., Novak, T. J., Farber, D., Smith, B. R., and Bottomly, K. (1996). The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med* 183, 249-259.
- Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17, 221-253.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Leonard, W. J., Depper, J. M., Crabtree, G. R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R. J., Kronke, M., Svetlik, P. B., Peffer, N. J., Waldmann, T. A., and *et al.* (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 311, 626-631.
- Leonard, W. J., Kronke, M., Peffer, N. J., Depper, J. M., and Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6281-6285.
- Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1991). T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8905-8909.
- Lewin, B. (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64, 303-312.
- Lewis, C. M., Broussard, C., Czar, M. J., and Schwartzberg, P. L. (2001). Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. *Curr Opin Immunol* 13, 317-325.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lin, M. T., Tseng, L-H., Pei, J., Garcia, M., Barsouk, A., Akatsuka, Y., Hansen, J. (1997). Cell death among peripheral blood T cells following allogeneic marrow transplantation: correlation with markers of activation. *Blood* 90 (Suppl), 2410.
- Lin, X., Cunningham, E. T., Jr., Mu, Y., Geleziunas, R., and Greene, W. C. (1999). The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity* 10, 271-280.

BIBLIOGRAFIA

- Ling, V., Wu, P. W., Finnerty, H. F., Bean, K. M., Spaulding, V., Fouser, L. A., Leonard, J. P., Hunter, S. E., Zollner, R., Thomas, J. L., *et al.* (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* *164*, 1653-1657.
- Linsley, P. S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., and Ledbetter, J. A. (1993). CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* *150*, 3161-3169.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., and Vignali, D. A. (2000a). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* *13*, 665-675.
- Liu, K. Q., Bunnell, S. C., Gurniak, C. B., and Berg, L. J. (1998). T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells. *J Exp Med* *187*, 1721-1727.
- Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., and McGlade, C. J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* *9*, 67-75.
- Liu, S. K., Smith, C. A., Arnold, R., Kiefer, F., and McGlade, C. J. (2000b). The adaptor protein Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is implicated in coupling hemopoietic progenitor kinase-1 to the activated TCR. *J Immunol* *165*, 1417-1426.
- Lohman, B. L., Razvi, E. S., and Welsh, R. M. (1996). T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions. *J Virol* *70*, 8199-8203.
- London, C. A., Lodge, M. P., and Abbas, A. K. (2000). Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* *164*, 265-272.
- Los, M., Stroh, C., Janicke, R. U., Engels, I. H., and Schulze-Osthoff, K. (2001). Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* *22*, 31-34.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* *193*, 265-275.
- Lucivero, G., Dalla Mora, L., Bresciano, E., Loria, M. P., Pezone, L., and Mancino, D. (1996). Functional characteristics of cord blood T lymphocytes after lectin and anti-CD3 stimulation. Differences in the way T cells express activation molecules and proliferate. *Int J Clin Lab Res* *26*, 255-261.
- Ludwig, B., Henn, V., Schroder, J. M., Graf, D., and Kroccek, R. A. (1996). Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol* *26*, 3137-3143.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Lyons, D. S., Lieberman, S. A., Hampl, J., Boniface, J. J., Chien, Y., Berg, L. J., and Davis, M. M. (1996). A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* *5*, 53-61.

M

- Madrenas, J., Chau, L. A., Smith, J., Bluestone, J. A., and Germain, R. N. (1997). The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J Exp Med* *185*, 219-229.
- Madrenas, J., and Germain, R. N. (1996). Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Semin Immunol* *8*, 83-101.

BIBLIOGRAFIA

- Malek, T. R., Yu, A., Scibelli, P., Lichtenheld, M. G., and Codias, E. K. (2001). Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol* *166*, 1675-1683.
- Mallett, S., Fossum, S., and Barclay, A. N. (1990). Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *Embo J* *9*, 1063-1068.
- Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacio, J. S., and Klausner, R. D. (1991). Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *Embo J* *10*, 1643-1651.
- Marengere, L. E., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrucker, H. W., Feng, G. S., and Mak, T. W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* *272*, 1170-1173.
- Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T. (1999). Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* *189*, 521-530.
- Marsden, V. S., and Strasser, A. (2003). CONTROL OF APOPTOSIS IN THE IMMUNE SYSTEM: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu Rev Immunol* *21*, 71-105.
- Matthews, N. C., Wadhwa, M., Bird, C., Borrás, F. E., and Navarrete, C. V. (2000). Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. *J Immunol* *164*, 6206-6212.
- Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E., and Thomas, M. L. (1992). Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol* *12*, 2396-2405.
- Mazel, S., Burtrum, D., and Petrie, H. T. (1996). Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* *183*, 2219-2226.
- McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., *et al.* (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* *165*, 5035-5040.
- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* *409*, 102-105.
- Miceli, M. C., Moran, M., Chung, C. D., Patel, V. P., Low, T., and Zinnanti, W. (2001). Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes. *Semin Immunol* *13*, 115-128.
- Michel, F., Attal-Bonnefoy, G., Mangino, G., Mise-Omata, S., and Acuto, O. (2001). CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* *15*, 935-945.
- Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P. C. (1992). Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* *360*, 264-265.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A., and Saikumar, P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* *276*, 18361-18374.
- Miller, R. E., Fayen, J. D., Mohammad, S. F., Stein, K., Kadereit, S., Woods, K. D., Sramkoski, R. M., Jacobberger, J. W., Templeton, D., Shurin, S. B., and Laughlin, M. J. (2002). Reduced CTLA-4 protein and messenger RNA expression in umbilical cord blood T lymphocytes. *Exp Hematol* *30*, 738-744.

BIBLIOGRAFIA

- Mills, K. C., Gross, T. G., Varney, M. L., Heimann, D. G., Reed, E. C., Kessinger, A., and Talmadge, J. E. (1996). Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 18, 53-61.
- Minami, Y., Nakagawa, Y., Kawahara, A., Miyazaki, T., Sada, K., Yamamura, H., and Taniguchi, T. (1995). Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 2, 89-100.
- Miscia, S., Di Baldassarre, A., Sabatino, G., Bonvini, E., Rana, R. A., Vitale, M., Di Valerio, V., and Manzoli, F. A. (1999). Inefficient phospholipase C activation and reduced Lck expression characterize the signaling defect of umbilical cord T lymphocytes. *J Immunol* 163, 2416-2424.
- Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (1999). Bystander virus infection prolongs activated T cell survival. *J Immunol* 162, 4527-4535.
- Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z. J., Oishi, I., Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N., and et al. (1994). Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 266, 1045-1047.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17, 5334-5348.
- Mouzaki, A., Rungger, D., Tucci, A., Doucet, A., and Zubler, R. H. (1993). Occurrence of a silencer of the interleukin-2 gene in naive but not in memory resting T helper lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 1469-1474.
- Musci, M. A., Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, C. W., and Koretzky, G. A. (1997). Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 11674-11677.
- Myung, P. S., Boerthe, N. J., and Koretzky, G. A. (2000). Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 12, 256-266.

N

- Nagata, S. (1996). Apoptosis: telling cells their time is up. *Curr Biol* 6, 1241-1243.
- Nakayama, K., Dustin, L. B., and Loh, D. Y. (1995). T-B cell interaction inhibits spontaneous apoptosis of mature lymphocytes in Bcl-2-deficient mice. *J Exp Med* 182, 1101-1109.
- Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M. C., Fields, L. E., Lucas, P. J., Stewart, V., Alt, F. W., and et al. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 261, 1584-1588.
- Nambiar, M. P., Enyedy, E. J., Fisher, C. U., Krishnan, S., Warke, V. G., Gilliland, W. R., Oglesby, R. J., and Tsokos, G. C. (2002). Abnormal expression of various molecular forms and distribution of T cell receptor zeta chain in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46, 163-174.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H., and Youle, R. J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153, 1265-1276.
- Nel, A. E., Gupta, S., Lee, L., Ledbetter, J. A., and Kanner, S. B. (1995). Ligation of the T-cell antigen receptor (TCR) induces association of hSos1, ZAP-70, phospholipase C-gamma 1, and other phosphoproteins with Grb2 and the zeta-chain of the TCR. *J Biol Chem* 270, 18428-18436.

BIBLIOGRAFIA

Nghiem, P., Ollick, T., Gardner, P., and Schulman, H. (1994). Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* 371, 347-350.

Niedergang, F., San Jose, E., Rubin, B., Alarcon, B., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (1997). Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T-cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res Immunol* 148, 231-245.

Nonoyama, S., Penix, L. A., Edwards, C. P., Lewis, D. B., Ito, S., Aruffo, A., Wilson, C. B., and Ochs, H. D. (1995). Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 95, 66-75.

Northrop, J. P., Ho, S. N., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Nolan, G. P., Admon, A., and Crabtree, G. R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.

Nunes, J. A., Battifora, M., Woodgett, J. R., Truneh, A., Olive, D., and Cantrell, D. A. (1996). CD28 signal transduction pathways. A comparison of B7-1 and B7-2 regulation of the map kinases: ERK2 and Jun kinases. *Mol Immunol* 33, 63-70.

O

Ohshima, Y., Yang, L. P., Avice, M. N., Kurimoto, M., Nakajima, T., Sergerie, M., Demeure, C. E., Sarfati, M., and Delespesse, G. (1999). Naive human CD4⁺ T cells are a major source of lymphotoxin alpha. *J Immunol* 162, 3790-3794.

Ohshima, Y., Yang, L. P., Uchiyama, T., Tanaka, Y., Baum, P., Sergerie, M., Hermann, P., and Delespesse, G. (1998). OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92, 3338-3345.

Okkenhaug, K., and Rottapel, R. (1998). Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction. *J Biol Chem* 273, 21194-21202.

O'Neill, R. M., Hassan, J., and Reen, D. J. (2003). IL-7-Regulated Homeostatic Maintenance of Recent Thymic Emigrants in Association with Caspase-Mediated Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. *J Immunol* 170, 4524-4531.

Oren, M. (1994). Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 5, 221-227.

P

Paiva, A., Freitas, A., Loureiro, A., Couceiro, A., Martinho, A., Simoes, O., Santos, P., Tomaz, J., Pais, M. L., and Breda Coimbra, H. (1998). Functional aspects of cord blood lymphocytes response to polyclonal and allogeneic activation. *Bone Marrow Transplant* 22 Suppl 1, S31-34.

Palmer, E. M., Farrokh-Siar, L., Maguire van Seventer, J., and van Seventer, G. A. (2001). IL-12 decreases activation-induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. I. IL-12 alters caspase processing and inhibits enzyme function. *J Immunol* 167, 749-758.

Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, I., and Siminovitch, K. A. (1996). Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 184, 839-852.

Papadogiannakis, N., Johnsen, S. A., and Olding, L. B. (1986). Monocyte-regulated hyporesponsiveness of human cord blood lymphocytes to OKT3-monoclonal-antibody-induced mitogenesis. *Scand J Immunol* 23, 91-99.

Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., and Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771-782.

BIBLIOGRAFIA

Paulin, T. (1992). Importance of bone marrow cell dose in bone marrow transplantation. *Clin Transplant* 6, 48-54.

Penninger, J. M., and Crabtree, G. R. (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 96, 9-12.

Pilling, D., Akbar, A. N., Shamsadeen, N., Scheel-Toellner, D., Buckley, C., and Salmon, M. (2000). High cell density provides potent survival signals for resting T-cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 163-174.

Pirenne-Ansart, H., Paillard, F., De Groote, D., Eljaafari, A., Le Gac, S., Blot, P., Franchimont, P., Vaquero, C., and Sterkers, G. (1995). Defective cytokine expression but adult-type T-cell receptor, CD8, and p56lck modulation in CD3- or CD2-activated T cells from neonates. *Pediatr Res* 37, 64-69.

Plyte, S., Majolini, M. B., Pacini, S., Scarpini, F., Bianchini, C., Lanfrancone, L., Pelicci, P., and Baldari, C. T. (2000). Constitutive activation of the Ras/MAP kinase pathway and enhanced TCR signaling by targeting the Shc adaptor to membrane rafts. *Oncogene* 19, 1529-1537.

Polakis, P., and McCormick, F. (1993). Structural requirements for the interaction of p21ras with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J Biol Chem* 268, 9157-9160.

Porcu, P., Gaddy, J., and Broxmeyer, H. E. (1998). Alloantigen-induced unresponsiveness in cord blood T lymphocytes is associated with defective activation of Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4538-4543.

Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P. D., and Holt, P. G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 160, 4730-4737.

Proust, J. J., Quadri, R. A., Arbogast, A., and Phelouzat, M. A. (1996). [Molecular mechanisms of age-related lymphocyte dysfunction]. *Pathol Biol (Paris)* 44, 729-736.

Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287-296.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829-1832.

R

Rabian-Herzog, C., Lesage, S., and Gluckman, E. (1992). Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1, 64-67.

Radvanyi, L. G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G. B., and Miller, R. G. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 156, 1788-1798.

Rainsford, E., and Reen, D. J. (2002). Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 116, 702-709.

Ravichandran, K. S., Lorenz, U., Shoelson, S. E., and Burakoff, S. J. (1995). Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSOS. *Mol Cell Biol* 15, 593-600.

Razi-Wolf, Z., Hollander, G. A., and Reiser, H. (1996). Activation of CD4+ T lymphocytes from interleukin 2-deficient mice by costimulatory B7 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2903-2908.

BIBLIOGRAFIA

Reinherz, E. L., Tan, K., Tang, L., Kern, P., Liu, J., Xiong, Y., Hussey, R. E., Smolyar, A., Hare, B., Zhang, R., *et al.* (1999). The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* *286*, 1913-1921.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* *338*, 383-384.

Rhee, S. G., and Bae, Y. S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* *272*, 15045-15048.

Riley, J. L., Blair, P. J., Musser, J. T., Abe, R., Tezuka, K., Tsuji, T., and June, C. H. (2001). ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol* *166*, 4943-4948.

Risdon, G., Gaddy, J., and Broxmeyer, H. E. (1994). Allogeneic responses of human umbilical cord blood. *Blood Cells* *20*, 566-570; discussion 571-562.

Risdon, G., Gaddy, J., Horie, M., and Broxmeyer, H. E. (1995). Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2413-2417.

Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., and Robbins, K. C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* *15*, 5725-5731.

Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 180-186.

Rodriguez, I., Matsuura, K., Khatib, K., Reed, J. C., Nagata, S., and Vassalli, P. (1996). A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med* *183*, 1031-1036.

Rogers, P. R., Dubey, C., and Swain, S. L. (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* *164*, 2338-2346.

Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* *15*, 445-455.

Rohrschneider, L. R., Fuller, J. F., Wolf, I., Liu, Y., and Lucas, D. M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* *14*, 505-520.

Roncarolo, M. G., Bigler, M., Ciuti, E., Martino, S., and Tovo, P. A. (1994). Immune responses by cord blood cells. *Blood Cells* *20*, 573-585; discussion 585-576.

Rozdzial, M. M., Malissen, B., and Finkel, T. H. (1995). Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* *3*, 623-633.

Rudd, C. E., Martin, M., and Schneider, H. (2002). CTLA-4 negative signaling via lipid rafts: A new perspective. *Sci STKE* *2002*, PE18.

Ruggieri, L., Heimfeld, S., and Broxmeyer, H. E. (1994). Cytokine-dependent ex vivo expansion of early subsets of CD34⁺ cord blood myeloid progenitors is enhanced by cord blood plasma, but expansion of the more mature subsets of progenitors is favored. *Blood Cells* *20*, 436-454.

S

Salio, M., Valitutti, S., and Lanzavecchia, A. (1997). Agonist-induced T cell receptor down-regulation: molecular requirements and dissociation from T cell activation. *Eur J Immunol* *27*, 1769-1773.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* *29*, 2037-2045.

BIBLIOGRAFIA

- Salmon, M., Pilling, D., Borthwick, N. J., Viner, N., Janossy, G., Bacon, P. A., and Akbar, A. N. (1994). The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* *24*, 892-899.
- San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., and Alarcon, B. (2000). Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* *12*, 161-170.
- Sato, K., Nagayama, H., and Takahashi, T. A. (1999). Aberrant CD3- and CD28-mediated signaling events in cord blood T cells are associated with dysfunctional regulation of Fas ligand-mediated cytotoxicity. *J Immunol* *162*, 4464-4471.
- Schneider, H., Cai, Y. C., Prasad, K. V., Shoelson, S. E., and Rudd, C. E. (1995). T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* *25*, 1044-1050.
- Schwartz, R. H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?. *J Exp Med* *184*, 1-8.
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* *176*, 1091-1098.
- Shapiro, H.M. (1988). *Practical flow cytometry*. 2nd ed. p.129. Wiley-Liss. New York.
- Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* *2*, 116-126.
- Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M., and Rose, J. K. (1989). The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* *59*, 627-636.
- Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* *6*, 361-369.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* *46*, 659-667.
- Sheets, E. D., Holowka, D., and Baird, B. (1999). Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes. *J Cell Biol* *145*, 877-887.
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S., and Lublin, D. M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* *13*, 6385-6392.
- Shi, Y. F., Sahai, B. M., and Green, D. R. (1989). Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* *339*, 625-626.
- Sillett, H. K., Cruickshank, S. M., Southgate, J., and Trejdosiewicz, L. K. (2001). Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology* *102*, 310-316.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 31-39.
- Smith, D., Sieg, S., and Kaplan, D. (1998). Technical note: Aberrant detection of cell surface Fas ligand with anti-peptide antibodies. *J Immunol* *160*, 4159-4160.
- Smith, K. A., and Cantrell, D. A. (1985). Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 864-868.

BIBLIOGRAFIA

- Soares, M. V., Borthwick, N. J., Maini, M. K., Janossy, G., Salmon, M., and Akbar, A. N. (1998). IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA⁺ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J Immunol* *161*, 5909-5917.
- Splawski, J. B., Nishioka, J., Nishioka, Y., and Lipsky, P. E. (1996). CD40 ligand is expressed and functional on activated neonatal T cells. *J Immunol* *156*, 119-127.
- Sprent, J., and Tough, D. F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* *265*, 1395-1400.
- Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* *81*, 513-523.
- Storek, J., Dawson, M. A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D. G., Marr, K. A., Witherspoon, R. P., Bensinger, W., Flowers, M. E., Martin, P., Storb, R., Appelbaum, F. R., Boeckh, M. (2001). Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* *97*, 3380-3389.
- Stout, R. D., and Suttles, J. (1992). T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol* *141*, 433-443.
- Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J* *14*, 6136-6147.
- Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* *70*, 585-593.
- Stuber, E., Strober, W., and Neurath, M. (1996). Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* *183*, 693-698.
- Stulnig, T. M., Buhler, E., Bock, G., Kirchebner, C., Schonitzer, D., and Wick, G. (1995). Altered switch in lipid composition during T-cell blast transformation in the healthy elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* *50*, B383-390.
- Sturm, A., Mohr, S., and Fiocchi, C. (2002). Critical role of caspases in the regulation of apoptosis and proliferation of mucosal T cells. *Gastroenterology* *122*, 1334-1345.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* *77*, 727-736.
- Su, Y. W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., and Wienands, J. (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* *29*, 3702-3711.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H. G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* *186*, 25-37.
- Suzuki, A., Yamaguchi, M. T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., *et al.* (2001). T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* *14*, 523-534.
- Suzuki, I., and Fink, P. J. (2000). The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1707-1712.
- Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D., Duncan, D. D., Hedrick, S. M., Dutton, R. W., and Huston, G. (1991). Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* *123*, 115-144.

BIBLIOGRAFIA

Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

T

Tafuri, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S. K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L. M., Bouchard, D., Chan, V. S., Duncan, G., *et al.* (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409, 105-109.

Takahashi, N., Imanishi, K., Nishida, H., and Uchiyama, T. (1995). Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. *J Immunol* 155, 5213-5219.

Takeba, Y., Nagafuchi, H., Takeno, M., Kashiwakura, J., and Suzuki, N. (2002). Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol* 168, 2365-2370.

Tamura, H., Dong, H., Zhu, G., Sica, G. L., Flies, D. B., Tamada, K., and Chen, L. (2001). B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* 97, 1809-1816.

Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8732-8737.

Teague, T. K., Marrack, P., Kappler, J. W., and Vella, A. T. (1997). IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol* 158, 5791-5796.

Terhorst, G. (1996). Oxford IRL. Press. P 132.

Theilgaard-Monch, K., Raaschou-Jensen, K., Heilmann, C., Andersen, H., Bock, J., Russel, C. A., Vindelov, L., Jacobsen, N., and Dickmeiss, E. (1999). A comparative study of CD34+ cells, CD34+ subsets, colony forming cells and cobblestone area forming cells in cord blood and bone marrow allografts. *Eur J Haematol* 62, 174-183.

Thomas, M. L. (1995). Positive and negative regulation of leukocyte activation by protein tyrosine phosphatases. *Semin Immunol* 7, 279-288.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., and Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.

Toker, A., and Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673-676.

Tomlinson, M. G., Woods, D. B., McMahon, M., Wahl, M. I., Witte, O. N., Kurosaki, T., Bolen, J. B., and Johnston, J. A. (2001). A conditional form of Bruton's tyrosine kinase is sufficient to activate multiple downstream signaling pathways via PLC Gamma 2 in B cells. *BMC Immunol* 2, 4.

Tsatsanis, C., Patriotis, C., Bear, S. E., and Tsichlis, P. N. (1998). The Tpl-2 protooncogene protein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3827-3832.

Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-846.

BIBLIOGRAFIA

Tu, W., Cheung, P. T., and Lau, Y. L. (2000). Insulin-like growth factor 1 promotes cord blood T cell maturation and inhibits its spontaneous and phytohemagglutinin-induced apoptosis through different mechanisms. *J Immunol* *165*, 1331-1336.

Tuosto, L., Costanzo, A., Guido, F., Marinari, B., Vossio, S., Moretti, F., Levrero, M., and Piccolella, E. (2000). Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 regulates T cell receptor- and CD28-mediated signaling events which lead to NF-kappaB activation. *Eur J Immunol* *30*, 2445-2454.

Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., and Littman, D. R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* *60*, 755-765.

V

Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A. (1997). Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* *185*, 1859-1864.

van Oers, N. S., Killeen, N., and Weiss, A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* *183*, 1053-1062.

Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1996). Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* *8*, 355-361.

Van Parijs, L., Peterson, D. A., and Abbas, A. K. (1998). The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity* *8*, 265-274.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* *91*, 627-637.

Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* *75*, 229-240.

Vella, A., Teague, T. K., Ihle, J., Kappler, J., and Marrack, P. (1997). Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* *186*, 325-330.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* *102*, 43-53.

Veri, M. C., DeBell, K. E., Seminario, M. C., DiBaldassarre, A., Reischl, I., Rawat, R., Graham, L., Noviello, C., Rellahan, B. L., Miscia, S., *et al.* (2001). Membrane raft-dependent regulation of phospholipase Cgamma-1 activation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* *21*, 6939-6950.

Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.

Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* *283*, 680-682.

Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* *13*, 763-768.

von Haller, P. D., Donohoe, S., Goodlett, D. R., Aebersold, R., and Watts, J. D. (2001). Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* *1*, 1010-1021.

BIBLIOGRAFIA

W

- Wagner, J. E. (1994). Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells* 20, 227-233; discussion 233-224.
- Walker, L.S., McLeod, J.D., Boulougouris, G., Patel, Y.I., Hall, N.D., and Sansom DM. (1998). Down-regulation of CD28 via Fas (CD95): influence of CD28 on T-cell apoptosis. *Immunology* 94, 41-47.
- Wallace, D. L., and Beverley, P. C. (1990). Phenotypic changes associated with activation of CD45RA+ and CD45RO+ T cells. *Immunology* 69, 460-467.
- Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S., and Samelson, L. E. (1993). Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J Biol Chem* 268, 19797-19801.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy ,J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T.L., Russell, J.H., Allison, J.P., and Murphy, K.M. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature Immunology* 4, 670-679.
- Webb, L. M., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (1997). Interleukin-7 activates human naive CD4+ cells and primes for interleukin-4 production. *Eur J Immunol* 27, 633-640.
- Weber, J. R., Bell, G. M., Han, M. Y., Pawson, T., and Imboden, J. B. (1992). Association of the tyrosine kinase LCK with phospholipase C-gamma 1 after stimulation of the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 176, 373-379.
- Weintraub, B. C., Jun, J. E., Bishop, A. C., Shokat, K. M., Thomas, M. L., and Goodnow, C. C. (2000). Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med* 191, 1443-1448.
- Weiss. (1999). *Fundamental Immunology* 4th Edition. WE Paul Ed 411-447.
- Wen, R., Wang, D., McKay, C., Bunting, K. D., Marine, J. C., Vanin, E. F., Zambetti, G. P., Korsmeyer, S. J., Ihle, J. N., and Cleveland, J. L. (2001). Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol* 21, 678-689.
- Werlen, G., and Palmer, E. (2002). The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Opin Immunol* 14, 299-305.
- Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I., and Borst, J. (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem* 277, 22781-22788.
- Wesselborg, S., Janssen, O., and Kabelitz, D. (1993). Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 150, 4338-4345.
- Whisler, R. L., Chen, M., Liu, B., and Newhouse, Y. G. (1999). Age-related impairments in TCR/CD3 activation of ZAP-70 are associated with reduced tyrosine phosphorylations of zeta-chains and p59fyn/p56lck in human T cells. *Mech Ageing Dev* 111, 49-66.
- Whisler, R. L., Karanfilov, C. I., Newhouse, Y. G., Fox, C. C., Lakshmanan, R. R., and Liu, B. (1998). Phosphorylation and coupling of zeta-chains to activated T-cell receptor (TCR)/CD3 complexes from peripheral blood T-cells of elderly humans. *Mech Ageing Dev* 105, 115-135.
- White, G. P., Watt, P. M., Holt, B. J., and Holt, P. G. (2002). Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol* 168, 2820-2827.
- Whitmire, J. K., and Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 12, 448-455.

BIBLIOGRAFIA

Williams, M. S., and Henkart, P. A. (1994). Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* 153, 4247-4255.

Wulfig, C., and Davis, M. M. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282, 2266-2269.

X

Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8, 723-732.

Y

Yablonski, D., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (2001). Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol Cell Biol* 21, 4208-4218.

Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (1998). Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science* 281, 413-416.

Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2002). Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem* 277, 41604-41612.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Yang, L. P., Byun, D. G., Demeure, C. E., Vezzio, N., and Delespesse, G. (1995). Default development of cloned human naive CD4 T cells into interleukin-4- and interleukin-5- producing effector cells. *Eur J Immunol* 25, 3517-3520.

Yang, Y. C., Hsu, T. Y., Chen, J. Y., Yang, C. S., and Lin, R. H. (2001). Tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cord blood T lymphocytes: involvement of both tumour necrosis factor receptor types 1 and 2. *Br J Haematol* 115, 435-441.

Yankee, T. M., Draves, K. E., Ewings, M. K., Clark, E. A., and Graves, J. D. (2001). CD95/Fas induces cleavage of the GrpL/Gads adaptor and desensitization of antigen receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6789-6793.

Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W. C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Baron, R. (1999). Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J Biol Chem* 274, 31707-31712.

Young, J. L., Ramage, J. M., Gaston, J. S., and Beverley, P. C. (1997). In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol* 27, 2383-2390.

Young, M. A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., and Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105, 115-126.

Yurchak, L. K., and Sefton, B. M. (1995). Palmitoylation of either Cys-3 or Cys-5 is required for the biological activity of the Lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 15, 6914-6922.

Z

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183, 1533-1544.

BIBLIOGRAFIA

- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998a). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998b). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.
- Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zhou, S., Ou, R., Huang, L., and Moskophidis, D. (2002). Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J Virol* 76, 829-840.
- Zhu, M., Janssen, E., Leung, K., and Zhang, W. (2002). Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem* 277, 46151-46158.
- Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15, 1481-1486.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.