

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73: 27-45

————— *Artículo original* —————

El cambio conformacional en el TCR detecta la fortaleza del ligando en células T maduras y en timocitos

Recibido el 2 de febrero de 2007

RUTH M. RISUEÑO * Y BALBINO ALARCÓN
*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC.
Universidad Autónoma de Madrid.
Cantoblanco, Madrid (España).*

RESUMEN

El receptor para el antígeno de células T (TCR) es el encargado de reconocer los péptidos antigénicos enmarcados en una molécula del complejo principal de histocompatibilidad propio (MHC). Una característica única del TCR es su habilidad para explorar los ligandos de MHCp estructuralmente similares y transmitir diferencialmente las señales bioquímicas dependiendo de la fortaleza del reconocimiento del ligando. Durante el desarrollo tímico, los ligandos fuertes inducen la selección negativa provocando la muerte por apoptosis de los clones autorreactivos. Sin embargo, son los ligandos débiles los que inducen la selección positiva y permiten al timocito sobrevivir y seguir madurando. En periferia, las células T maduras únicamente son activadas por ligandos fuertes. El proceso más temprano descrito en la activación de las células T vía TCR es un cambio conformacional en CD3ε dependiente de ligando. En este trabajo se ha comparado la respuesta a li-

* Ruth M. Risueño

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 - Cantoblanco. Madrid. España.

Teléfono: +34 91 497 50 74.

Fax: +34 91 497 47 99.

e-mail: rmrisueno@cbm.uam.es

Abreviaturas: TCR (receptor para el antígeno de células T), MHC (complejo principal de histocompatibilidad), PRS (secuencia de poliprolinas), GST (glutación-S-transferasa).

gandos con distinta afinidad por el TCR en células T maduras de periferia y timocitos inmaduros referidos a la inducción del cambio conformacional. Tanto la estimulación *in vitro* como *in vivo* de las células T maduras e inmaduras con ligandos de alta afinidad inducen el cambio conformacional en el TCR. Es decir, la respuesta de los timocitos y las células T maduras frente a agonistas fuertes es igual en sus primeras etapas de activación.

Palabras clave: TCR.—Cambio conformacional.—Desarrollo tímico.—Linfocito T.—Timocito.

ABSTRACT

A conformational change in the TCR senses the strength of the ligand in mature T cell and thymocytes.

The T-cell receptor (TCR) provides the T cell the capacity to respond to antigen peptides bound to the major histocompatibility complex (MHC). A unique feature of the TCR is its ability to scan similar MHCp ligands and transmit distinct biochemical signals depending on the strength of the ligand recognized. In developing thymocytes, strong agonists induce negative selection provoking the death by apoptosis in auto-reactive clones. Nevertheless, weak TCR ligands induce positive selection and allow thymocytes to survive and to continue developing. In periphery, only strong ligands activate mature T cells. The first event described upon TCR triggering is a conformational change in CD3 ϵ . In this study, we have compared the activation induced by different affinity TCR ligands in mature T cells in periphery and in immature thymocytes referred to the ability to induce the conformational change in the TCR. Not only *in vitro*, but also *in vivo*, the stimulation with strong agonists induces a conformational change in mature and immature T cells.

Key words: TCR.—Conformational change.—Thymic development.—T lymphocyte.—Thymocyte.

INTRODUCCIÓN

I. Estructura del TCR

El receptor para el antígeno (TCR) es el marcador más característico de los linfocitos T maduros. La mayoría de los linfocitos T en humanos presentan el TCR $\alpha\beta$. Éste está compuesto por las cadenas TCR α y TCR β encargadas del reconocimiento de las moléculas del

complejo principal de histocompatibilidad (MHC) unidos a un péptido antigénico (1), asociadas a las cadenas invariables CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ (CD247) (Figura 1). Los tallos citoplásmicos de las cadenas CD3 contienen unos motivos llamados de «inmunorreceptores basados en tirosinas» o ITAMs que son los lugares de reclutamiento de la maquinaria de transducción de señales tras la activación por el TCR (2). Las cadenas CD3 γ , δ y ϵ contienen un único motivo ITAM, mientras que CD3 ζ tiene tres. Además, la cadena CD3 ϵ presenta una secuencia de poliprolinas (PRS) situada por encima del ITAM (3).

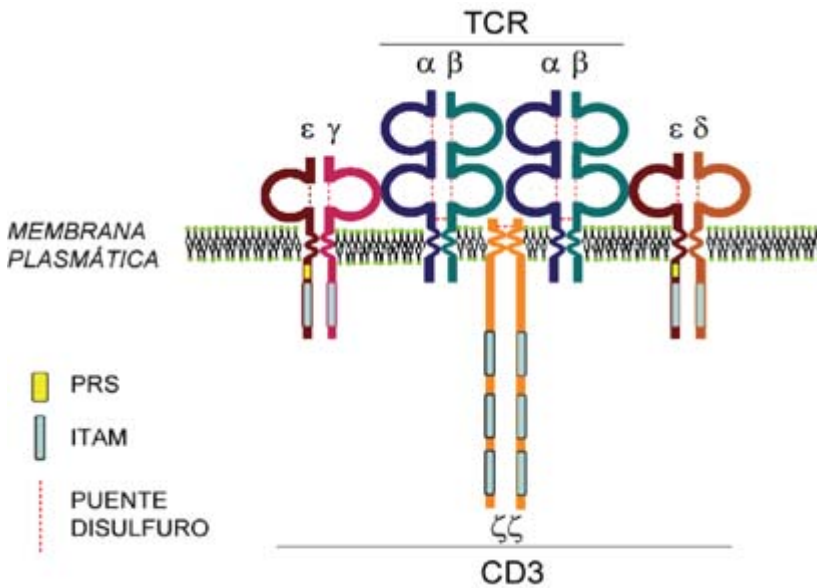


FIGURA 1. *Receptor para el antígeno de células T*. Representación esquemática de la estructura del TCR. Los ITAMs aparecen como rectángulos grises. El cuadrado gris representa la secuencia de poliprolinas (PRs) de CD3 ϵ .

II. Señalización por el TCR

Tras el reconocimiento productivo de un MHC-péptido por parte del TCR, se produce la activación de la quinasa de la familia Src Lck que fosforila los motivos ITAM de las cadenas del CD3. La fosfori-

lación de los ITAMs los convierte en sitios de reclutamiento de proteínas efectoras, principalmente de ZAP70. ZAP70 es una PTK citosólica que se activa cuando Lck la fosforila una vez reclutada a los ITAMs. Entre las moléculas que son fosforiladas por ZAP70 se encuentran α -tubulina, Vav-1, Gab2, LAT y SLP76. Cuando los adaptadores LAT y SLP76 se fosforilan también actúan como proteínas andamio que permiten el reclutamiento de una buena parte de la maquinaria necesaria para la activación de la célula T por el TCR. Se forma un macrocomplejo de señalización o señalosoma (4) (Figura 2) que producirá la activación completa de la célula T.

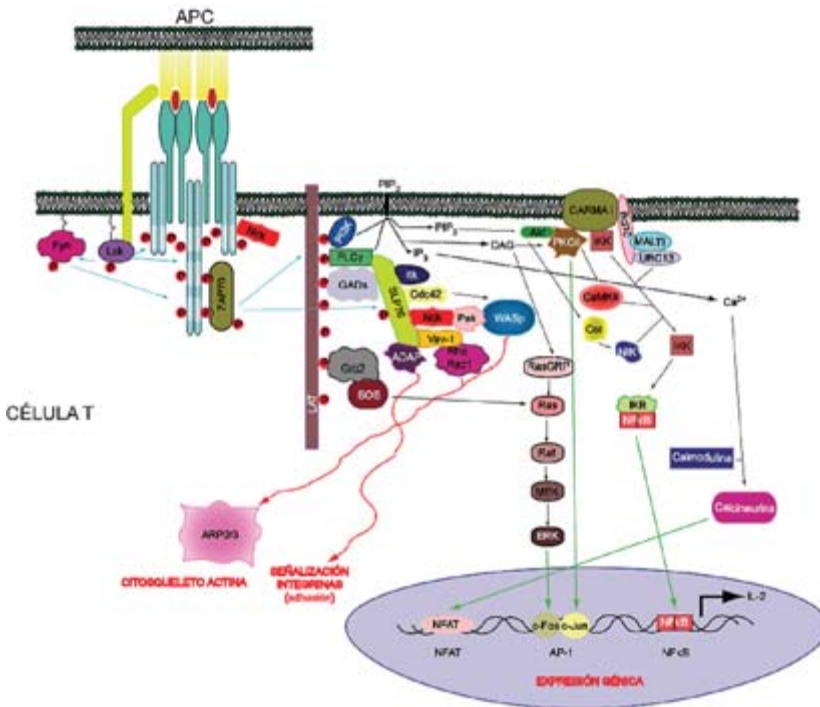


FIGURA 2. Esquema simplificado de la señalización a partir del TCR.

Aún cuando la fosforilación completa de los ITAMs se produce rápidamente tras el reconocimiento por parte del TCR del ligando, el primer hecho descrito tras la activación es un cambio conformacional en la cadena CD3ε que provoca la exposición de su secuencia

de poliprolinas (PRS) y permite la interacción con Nck. Dicha interacción se cree imprescindible para la activación completa de la célula (5).

III. Desarrollo de células T

El timo es un órgano encapsulado cuya función principal es la generación de células T. Los precursores más precoces existentes en el timo son denominados dobles negativos (DN) ya que no expresan CD4 ni CD8. En DN2 se inicia el reordenamiento del gen TCR β . El reordenamiento de la cadena TCR β se termina en la etapa DN3. En esta etapa, las células que no expresan un pre-TCR (compuesto por la cadena TCR β asociada a pT α) se mueren. Este proceso se denomina selección β y permite la selección de células con una única cadena de TCR β productiva. Una vez pasado el punto de control de la selección β , las células proliferan y comienzan a coexpresar los correceptores CD4 y CD8. A estos timocitos se les denomina DP. Los timocitos DP que expresen un receptor restringido para un MHC de clase I o II propio producen una señal que reprime los genes de la recombinasa (RAG), induce la supervivencia a largo plazo, e impulsa a la migración hacia la corteza y la diferenciación a células T madura (Figura 3). Todo este proceso se denomina selección positiva y se inicia en timocitos DP corticales (6). Los ligandos fuertes, que son estimuladores en células T maduras, provocan la delección clonal en el timo. Este proceso es el responsable de la eliminación de las células T autorreactivas y se denomina selección negativa. La selección negativa es imprescindible para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica central (7). El parámetro que controla el desarrollo de los timocitos es la afinidad del TCR por los ligandos MHC-péptidos, proponiéndose que el TCR interpreta la fuerza de la señal tras el contacto (8) (Figura 4).

Se ha propuesto que la distinción en la señalización entre selección negativa y positiva podría deberse a la distinta cinética de activación de ERK. Los ligandos que inducen selección positiva producen una activación suave y sostenida de ERK, mientras que los de selección negativa provocan una activación fuerte y transitoria de ERK (9). Sin embargo, la única ruta descrita específica de selección

negativa ha sido la de MINK (10). En condiciones de selección negativa, MINK es reclutada al TCR, probablemente vía Nck, y está implicada en la activación de JNK y BimEL, ambas moléculas necesarias en selección negativa. Recientemente, se ha descrito que el cambio conformacional, medido por la exposición del epítipo de APA1/1, únicamente ocurre en condiciones de selección negativa (11).

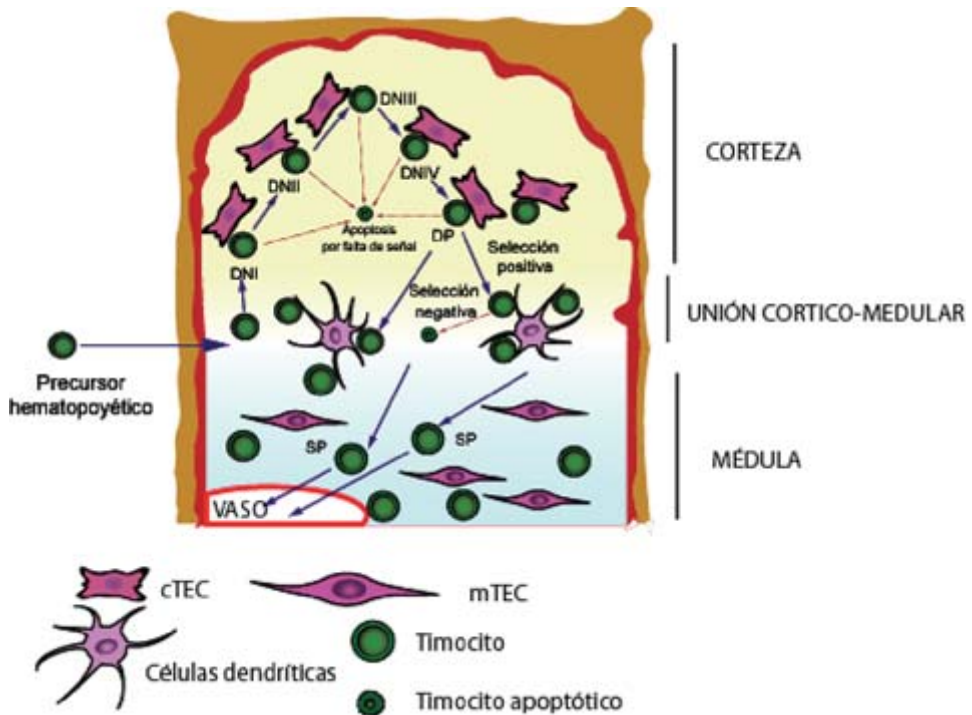


FIGURA 3. **Desarrollo tímico.** Los progenitores de médula ósea (DN1) entran en el timo adulto cerca de las uniones córtico-medulares. A medida que migran hacia la parte externa de la corteza, adquieren el fenotipo DN2 y DN3. En ese momento, se inicia el reordenamiento de la cadena TCR β . Al producirse el reordenamiento productivo de TCR β , se expresa el pre-TCR (DN4). Los timocitos DP inician el reordenamiento de TCR α y se expresa el TCR. Se inicia la migración hacia la médula y se producen los procesos que llevarán a la selección positiva y negativa. Las células que hayan sobrevivido a estos puntos de control, se dirigirán a la médula donde se terminará su maduración y saldrán a la periferia.

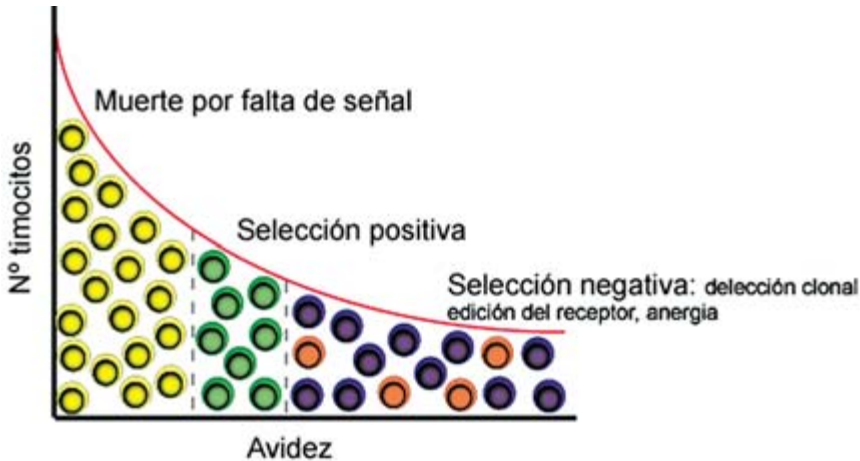


FIGURA 4. *Modelo de afinidad durante la selección positiva y negativa.*

La afinidad del TCR por los MHC-péptidos endógenos es un parámetro fundamental en la maduración de los timocitos. Aquellos timocitos que no reconozcan MHC-péptidos o lo hagan con muy baja afinidad mueren por falta de señal. Si el TCR presenta una afinidad baja por los complejos MHC-péptido endógeno, el timocito sobrevive y prolifera (selección positiva). Los timocitos con TCRs con alta afinidad por el MHC-péptido mueren por apoptosis durante la selección negativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

La cepa de ratón utilizada como silvestre fue la C57BL/6. Los ratones transgénicos OT-I expresan el TCR transgénicos OT-I (V α 2.1 V β 5.1) que reconoce el péptido SIINFEKL (derivado de OVA) enmarcado en una molécula de MHC de clase I H2-k^b (12). Todas las cepas de ratón son mantenidas en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM, Madrid) de acuerdo a la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio».

2. Reactivos

2a. Péptidos

Los péptidos OVAp (SIINFEKL), E1 (EIINFEKL) y HA₃₀₇₋₃₁₉ (péptido utilizado como irrelevante, PKYVKQNTLKLAT) fueron sintetizados por el método FMOC en los servicios de apoyo a la investigación del CBMSO (CSIC-UAM, Madrid).

2b. Anticuerpos

El anticuerpo anti-fosfotirosinas 4G10 fue adquirido a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), mientras que el hibridoma productor del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon\delta/\epsilon\gamma$ 145-2C11 es de ATCC (Rockville, MD). Los anticuerpos anti-CD4 biotinilado (L3T4), anti-CD69FITC (H1.2F3), anti-CD8 α biotinilado (53-6.7) y el anticuerpo anti-CD90.2 (53-2.1) proceden de BD-Pharmingen (San Diego, CA). Tanto el anticuerpo policlonal anti-CD3 ζ 448 (13) como el monoclonal anti-CD3 ϵ APA1/1 (14) son de producción propia. Actualmente, el anticuerpo monoclonal APA1/1 está siendo comercializado por Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) y BD Pharmingen (San Diego, CA). El anticuerpo anti-H2-k^b:OVAp 25D1.16 fue donado por la Doctora M. del Val (ISCIII, Madrid).

Los anticuerpos secundarios acoplados a la actividad peroxidasa son de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Los anticuerpos y estreptavidinas utilizadas acopladas a los fluoróforos FITC, PE y Cy5 proceden de Southern Biotech (Birmingham, AL), mientras que los acoplados a Alexa488, proceden de Molecular Probes (Eugene, OR).

2c. Purificación de las proteínas de fusión GST-SH3.1

El plásmido pGEX-4T1-GST-SH3.1 (cedidos por el Doctor R. Geha, Harvard Medical School, Boston) fue transformado en la cepa de *E. coli* XL1-blue. La purificación y acoplamiento a Glutation-sefarosa (Amersham, Piscataway, NJ) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3. Tinción de células por citometría

Se incubaron 2×10^5 células por tinción en presencia de 4 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo primario directamente marcado pertinente durante 20 min a 0°C . Se fijaron y permeabilizaron con el reactivo Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo APA1/1 biotinilado o con un anticuerpo biotinilado isotópico control. Posteriormente se incubó en presencia de una estreptavidina acoplada al fluoróforo correspondiente. Las células se lavaron y se resuspendieron en 300 μl de PBS 1x degasificado y se analizaron en un citómetro FCSCalibur usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

4. Experimentos funcionales

4a. *Estimulación de timocitos de ratones OT-I con los dímeros de H2k^b*

La estimulación de timocitos de ratones transgénicos OTI se realizó de acuerdo a lo ya publicado (15).

5. Ensayo de «pull-down»

Las fracciones postnucleares se sometieron al ensayo de pull-down siguiendo el protocolo ya publicado (5).

6. Inmunohistoquímica

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajo el timo y los ganglios linfáticos inguinales. La fijación, corte y tinción de los órganos, se realizó según las indicaciones ya publicadas (11).

RESULTADOS

I. El epítipo de APA1/1 se expone tras la estimulación con un anticuerpo anti-CD3 en timocitos

Previamente se había descrito que la estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la exposición del epítipo reconocido por APA1/1 en células T de ganglio de ratón C57BL/6 (silvestre) (15). Dicho epítipo es solapante con la región de poliprolinas de CD3 ϵ responsable del reclutamiento de la proteína adaptadora Nck. La exposición del epítipo de APA1/1 se produce por un cambio conformacional en la cadena CD3 ϵ . Para comprobar si dicho cambio conformacional, detectado por el anticuerpo APA1/1, también se producía en timocitos tras la estimulación, se extrajo el timo de un ratón C57BL/6. Los timocitos fueron estimulados durante diez minutos con un anticuerpo anti-CD3 y se detectó la fluorescencia del anticuerpo APA1/1 por citometría de flujo. Al igual que en las células T maduras (15), la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 provocaba un aumento de tinción con el anticuerpo APA1/1 (Figura 5B). Es decir, los timocitos DP exponían la secuencia de poliprolinas de CD3 ϵ (reconocida por APA1/1) al ser estimulados y, por lo tanto, se producía un cambio conformacional en el TCR. Para comprobar que dicho cambio conformacional también era detectado mediante el ensayo de *pull-down* con GST-Nck (método mediante el cual se describió el cambio conformacional que afecta a CD3 ϵ dependiente de ligando), se estimularon células T de ganglio y timocitos de los mismos ratones silvestres con el mismo anticuerpo anti-CD3 y se detectó el complejo TCR mediante *western blot* con un anticuerpo anti-CD3 ζ (CD3 ζ es la última cadena en ensamblarse al TCR maduro y, por lo tanto, sólo se detectan los TCR maduros unidos a GST-Nck). En ambos casos y en concordancia con las tinciones con APA1/1, la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 inducía la unión a GST-Nck del TCR, es decir, se inducía el cambio conformacional (Figura 5A).

II. En timocitos, la estimulación con un agonista fuerte induce el cambio conformacional en el TCR

En un contexto fisiológico, el ligando natural del TCR es un péptido enmarcado en una molécula de MHC propia. Por lo tanto, era importante confirmar que la inducción del cambio conformacional observado en células T maduras e inmaduras utilizando el anticuerpo APA1/1 también ocurría cuando se estimulaba con un MHC-péptido. Se utilizaron ratones transgénicos para el TCR OT-I (12). Este TCR está restringido para el MHC H2-k^b y sus ligandos tanto agonista (OVAp) como agonista parcial/antagonista (E1) están ampliamente descritos (12). Para mimetizar la presentación antigénica, se utilizaron dímeros de H2-k^b:Ig (Figura 6A).

Se aislaron células T de bazo de ratones OT-I y se estimularon durante 24 horas con los dímeros H2-k^b:Ig cargados con el péptido agonista OVAp o con el agonista parcial/antagonista E1 y adsorbidos a plástico. Posteriormente, se detectó la expresión del marcador de activación CD69 por citometría de flujo comprobándose que la estimulación con los dímeros H2-k^b:Ig cargados con OVAp inducían la expresión en superficie de CD69, mientras que la estimulación con los dímeros de H2-k^b sin péptido o cargados con el péptido agonista parcial/antagonista E1 no inducen la expresión de dicho marcador de activación (15). Se confirmó que en este sistema y a esas concentraciones, el péptido OVAp actúa como agonista y el E1 no. Utilizando el mismo conjunto de H2-k^b:Ig para estimular timocitos (Figura 6B) y células T de ganglio de ratones OT-I (15), se observó que la intensidad media de la fluorescencia para APA1/1 aumentaba tras la estimulación con los dímeros cargados con OVAp (Figura 6B, línea continua), comparado con los dímeros vacíos (Figura 6B, línea sombreada) o cargados con el péptido E1 (Figura 6B, línea discontinua). Estos resultados indican que el cambio conformacional detectado por la exposición del epítipo de APA1/1 en la cadena CD3ε se induce tras la estimulación con un agonista fuerte del TCR tanto en células T maduras como inmaduras.

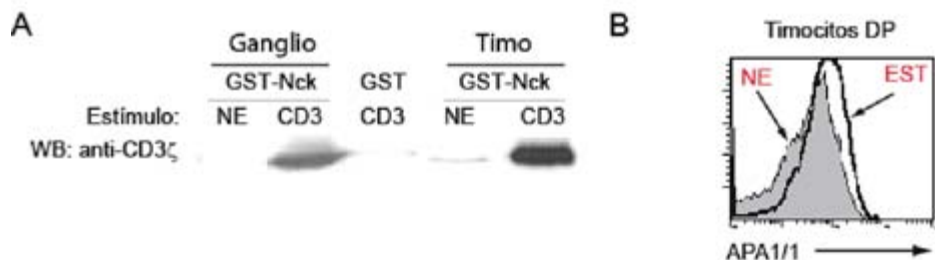


FIGURA 5. **La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la exposición del epítipo de APA1/1 en timocitos de ratón C57BL/6.** A. La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la unión del TCR a GST-Nck en células T de ganglio y timocitos de ratón. Los lisados de las células de ganglio y de timo de un ratón C57BL/6 estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 145-2C11 (NE, no estimulado; CD3, estimulado) fueron sometidas a un ensayo de pull-down con GST-SH3.1. Se detectó el TCR precipitado por western blot con el anticuerpo anti-CD3 ζ 448. Como control negativo, se realizó un preaclarado con GST.

B. La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 en timocitos DP induce la exposición del epítipo reconocido por APA1/1. Se estimularon los timocitos de un ratón C57BL/6 de igual forma que en A. Se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y APA1/1 y se analizaron por citometría de flujo. El histograma corresponde a la tinción de APA1/1 dentro de la población positiva para CD4 y CD8 y superpuesta las muestras estimulada (línea continua), no estimulada (línea discontinua) y el control isotípico (línea sombreada).

Para correlacionar estos datos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo APA1/1 con los ensayos de *pull-down*, las células T de ganglio y timocitos fueron estimuladas con este conjunto de dímeros de H2-k^b:Ig cargados con OVA_p, E1 o sin cargar. Posteriormente se realizó un ensayo de *pull-down* con la proteína de fusión GST-Nck. La unión del TCR a GST-Nck únicamente se inducía cuando el estímulo utilizado eran los dímeros de H2-k^b cargados con el agonista fuerte OVA_p tanto en timocitos como en células T maduras de ganglio de ratones OT-I (Figura 6C).

Para detectar la respuesta frente a agonistas fuertes (OVA_p) y débiles (E1) *in vivo* en células T maduras e inmaduras, se inyectaron por vía endovenosa ratones OT-I con los péptidos OVA_p y E1. Los ratones fueron sacrificados a las 3 horas y se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales y el timo. Las secciones tisulares de cada órgano fueron teñidas con el anticuerpo APA1/1 y con el anticuerpo 25D1.16 que reconoce el MHC H2-k^b unido a los péptidos OVA_p y

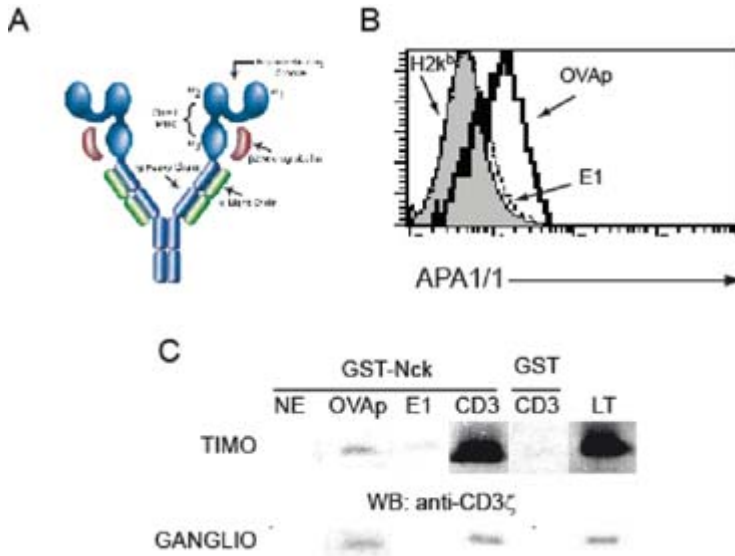


FIGURA 6. Únicamente la estimulación con un agonista fuerte induce la exposición del epítipo de APA1/1 en timocitos. **A.** Esquema del dímero H2-k^b:I γ . **B.** La estimulación con H2-k^b-OVAp induce la expresión del epítipo de APA1/1. Se estimularon durante 30 minutos timocitos de un ratón OT-I con los dímeros H2-k^b (línea sombreada), H2-k^b-E1 (E1, línea discontinua) y H2-k^b-OVAp (OVAp, línea continua). Se tiñó el dímero con un anticuerpo anti-ratón FITC. Se permeabilizaron y tiñeron con APA1/1. Se analizaron por citometría de flujo. Aparecen superpuestos los histogramas de las tres muestras para la tinción de APA1/1. **C.** La estimulación con H2-k^b:OVAp induce la unión del TCR a GST-SH3.1 tanto en células de ganglio como en timocitos. Las células de ganglio o timo de un ratón OT-I RAG2^{-/-} fueron estimuladas con 0,5 μ g/ml de dímero H2-k^b unido al péptido OVAp, E1 o sólo durante cinco minutos. Se lisaron las células y se sometieron a un ensayo de pull-down con GST-SH3.1. La presencia del TCR se detectó por western blot con el anticuerpo anti-CD3 ζ 448.

E1 (16). Se detectó un incremento en el número de células APA1/1 positivas en los ratones inyectados con OVAp y E1 comparado con el ratón inyectado con el péptido irrelevante (Figura 7). Sin embargo, en los ganglios las células T maduras sólo responden al péptido OVAp. Para obtener datos más cuantitativos, se estimó el número de células APA1/1 positivas en cada condición usando el programa ImageJ, se refirió al número total de células y se normalizó frente a la fluorescencia del anticuerpo 25D1.16 para equilibrar los niveles de expresión de ambos ligandos. El agonista fuerte OVAp fue

mejor inductor del cambio conformacional que el E1 tanto en timocitos (Figura 7) como en células T maduras. Por lo que para el TCR OT-I los ligandos que seleccionan positiva y negativamente en timo parecen inducir diferencialmente el cambio conformacional en los TCRs de los timocitos correlacionándose con lo observado en las células T maduras de periferia.

DISCUSIÓN

Los datos mostrados en este trabajo sugieren que el cambio conformacional en el TCR es provocado por un agonista total y no por un agonista parcial/antagonista. A nivel del reconocimiento del TCR de los distintos péptidos enmarcados en el MHC, los péptidos antagonistas se unen con menor afinidad y mayor constante de disociación que los péptidos agonistas (17). El cambio conformacional en el TCR podría representar una interpretación directa de la cinética de unión de los distintos ligandos. Este modelo explicaría que los dímeros H2-k^b-E1 se unan al TCR OT-I pero no se exponga el epítopo de APA1/1. A pesar de las diferencias encontradas en la inducción del cambio conformacional en el tallo intracelular de CD3ε entre agonistas y agonistas parciales/antagonistas, la estructura cristalográfica del TCR A6 unido al MHC cargado con el péptido agonista Tax y variantes de él que actúan como agonistas débiles/antagonistas (18) parecen ser similares.

Se ha publicado que tanto los ligandos débiles que inducen selección positiva como los ligandos con alta afinidad que inducen selección negativa provocan el cambio conformacional en el TCR de acuerdo con la precipitación con GST-Nck (19). La estimulación con MHC-péptidos nulos no inducía el cambio conformacional en el TCR. De acuerdo con esto, el cambio conformacional puede distinguir entre MHC-péptidos nulos y los señalizantes, pero no entre los péptidos que inducen selección positiva (baja afinidad) y selección negativa (alta afinidad). El cambio conformacional no sería un reflejo de la intensidad de señal sino que únicamente daría cuenta de la unión de un ligando. Las discrepancias observadas entre los resultados de los experimentos *in vitro* de cromatografía de afinidad con GST-Nck y las tinciones *in situ* de APA1/1 en secciones histológicas

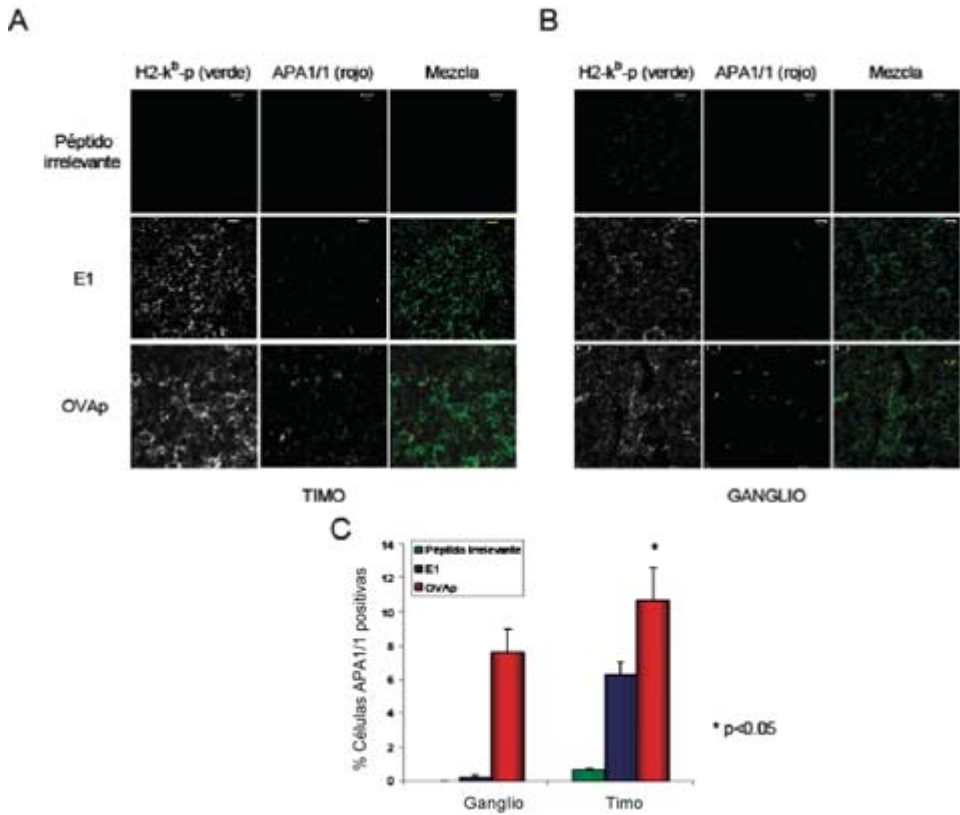


FIGURA 7. La sensibilidad del TCR a agonistas totales es igual en timo que en ganglios linfáticos. Se inyectó 0,4 mg del péptido OVAp, E1 o un péptido irrelevante por vía intravenosa en ratones transgénicos OT-I. A las tres horas se extrajeron los timos (A) y ganglios inguinales (B). Con las secciones de 10 μ m, se realizaron las tinciones con el anticuerpo 25D1.16 (verde) y APA1/1 (rojo). Las imágenes se analizaron en un microscopio confocal con un objetivo de 40x. La barra de escala corresponde a 20 μ m. Se representa el porcentaje de células APA1/1 positivas frente al número total de células (cuantificado por la tinción nuclear con ToPro) y normalizada a la fluorescencia del anticuerpo 25D1.16. La media y desviación estándar proceden del análisis de dos experimentos distintos y cuatro secciones de cada condición por experimento.

podrían explicarse por un escaso rango dinámico de la primera técnica o porque la precipitación con GST-Nck necesita de la previa ruptura de la célula, mientras que la tinción con APA1/1 se hace en células fijadas. De acuerdo con estos resultados, tanto en periferia como en el timo, las células T responden mejor al agonista total

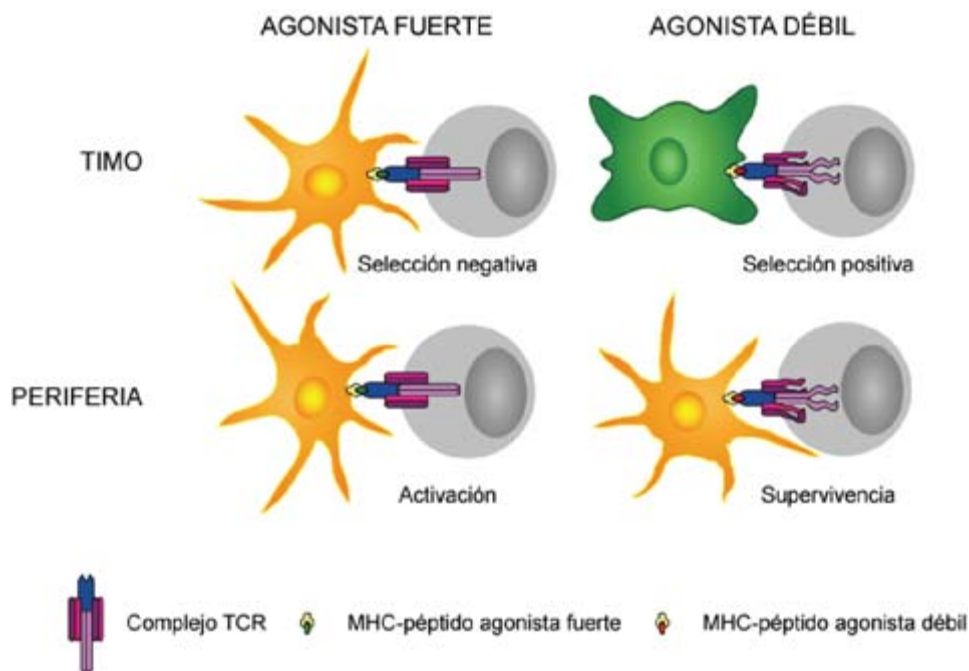


FIGURA 8. **Modelo de activación del TCR dependiente de la afinidad del ligando.** El reconocimiento de un MHC-peptido agonista fuerte, que produce selección negativa en el timo o la activación productiva de la célula T madura, induce un cambio conformacional en el TCR. Sin embargo, tanto en timocitos como en células T maduras de la periferia, la estimulación con un MHC-peptido agonista débil no induce el cambio conformacional en el TCR.

OVAp que induce selección negativa que al agonista parcial E1 (selección positiva) pero sólo en timo aparece respuesta frente a E1. De hecho, las diferencias en la respuesta de los timocitos y células T maduras a los agonistas débiles (que inducen selección positiva) se pueden explicar por una menor sensibilidad del TCR a los ligandos a medida que madura. Las células T maduras pierden la capacidad de responder a los ligandos de baja afinidad, aunque siguen respondiendo a los ligandos de alta afinidad.

¿Cómo puede discriminar el TCR entre los ligandos de MHC-peptido de distintas afinidades? Atendiendo a parámetros cinéticos y puesto que son los ligandos de alta afinidad los que provocan la selección negativa e inducen el reordenamiento del TCR, la unión sosteni-

da del ligando al TCR llevaría a una larga exposición del epítipo de APA1/1. De hecho, el cambio conformacional sostenido podría provocar la activación de una ruta específica de señalización que induciría la apoptosis del timocito. La razón por la cual las células T maduras utilizan una ruta de señalización distinta a los timocitos para regular la muerte celular no es conocida. Tampoco se han descrito las cascadas de señalización que pueden ser activadas como consecuencia directa de la exposición del epítipo. Sin embargo, el comportamiento de las células T ante estimulaciones débiles tanto en periferia como durante su desarrollo es parecido. En ninguno de los casos inducen el cambio conformacional (Figura 8). Los timocitos que se estimulan con los ligandos de baja afinidad son seleccionados positivamente, es decir, reciben señales de supervivencia (6). En células T, una estimulación de este tipo también aportaría señales de supervivencia que podrían ser importantes para el mantenimiento de la población de células T y células de memoria (20).

Se ha propuesto que la serín-treonín quinasa MINK conecta selectivamente el TCR con la ruta de señalización que media la selección negativa pero no positiva (10). Esta quinasa interacciona por su región de poliprolinas con uno de los dominios SH3 de Nck (21). Teniendo en cuenta que Nck es un ligando de la secuencia de poliprolinas de CD3 ϵ que se expone tras sufrir el cambio conformacional (5), Nck podría ser el enlace entre el TCR y MINK en la activación de la señalización que produce la eliminación de los timocitos autorreactivos. Además del reclutamiento de Nck al TCR, el cambio conformacional en el TCR podría tener consecuencias añadidas en la señalización. Por ejemplo, podría alterar el grado o el patrón de fosforilación de los ITAMs.

La selección negativa de timocitos provoca la muerte de aquellas células T que contengan un TCR autorreactivo y es un proceso clave en la adquisición de tolerancia inmunológica central que controla la salida a periferia de clones que puedan presentar reactividad frente a autoantígenos (6). Puesto que el cambio conformacional en el TCR, detectado por el anticuerpo APA1/1 y mediante ensayos de *pull-down*, ocurre tanto en la activación de células T maduras en periferia y en timocitos frente a ligandos fuertes permitiría el abordaje de posibles inhibidores de la transmisión de dicho cambio conformacional como posibles inmunomoduladores en respuestas autoinmunes.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer el valioso trabajo del equipo técnico del grupo. La investigación ha sido financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología SAF2005-00937 (B. A.), el programa de Formación de Profesorado Universitario (R. M. R.) y la Fundación Ramón Areces y el Banco Santander Central Hispano (CBMSO).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KUHNS, M. S.; DAVIS, M. M. and GARCÍA, K. C. (2006): Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* 24: 133-139.
- (2) KANE, L. P.; LIN, J. and WEISS, A. (2000): Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 242-249.
- (3) GIL, D.; GUTIÉRREZ, D. and ALARCON, B. (2001): Intracellular redistribution of nucleolin upon interaction with the CD3epsilon chain of the T cell receptor complex. *J. Biol. Chem.* 276: 11174-11179.
- (4) WERLEN, G. and PALMER, E. (2002): The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 299-305.
- (5) GIL, D.; SCHAMEL, W. W.; MONTOYA, M.; SÁNCHEZ-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.
- (6) STARR, T. K.; JAMESON, S. C. and HOGQUIST, K. A. (2003): Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 139-176.
- (7) HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A. and JAMESON, S. C. (2005): Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 772-782.
- (8) SIGGS, O. M.; MAKAROFF, L. E. and LISTON, A. (2006): The why and how of thymocyte negative selection. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 175-183.
- (9) WERLEN, G.; HAUSMANN, B. and PALMER, E. (2000): A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature.* 406: 422-426.
- (10) McCARTY, N.; PAUST, S.; IKIZAWA, K.; DAN, I.; LI, X. and CANTOR, H. (2005): Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat. Immunol.* 6: 65-72.
- (11) RISUEÑO, R. M.; VAN SANTEN, H. M. and ALARCON, B. (2006): A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 9625-9630.
- (12) HOGQUIST, K. A.; JAMESON, S. C.; HEATH, W. R.; HOWARD, J. L.; BEVAN, M. J. and CARBONE, F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell.* 76: 17-27.