



# La señalización post-receptor en el linfocito T. Claves para el entendimiento de la patogenia de las enfermedades autoinmunes

Martín A. Rodríguez<sup>1</sup>.

Samandy Cedeño Briceño<sup>2</sup>.

Ana M. Blasini

<sup>1</sup>[mrodrig@reacciun.ve](mailto:mrodrig@reacciun.ve)

<sup>2</sup>[samandhy\\_c@hotmail.com](mailto:samandhy_c@hotmail.com)

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

Los avances en el conocimiento del proceso de señalización en el linfocito T, así como la identificación y caracterización de las moléculas que intervienen en dicho proceso, han permitido comprender cómo el linfocito T decodifica señales en la membrana para responder como proliferación, apoptosis, producción de citocinas o con tolerancia a antígenos. Este conjunto de conocimientos ha creado una plataforma muy sólida para el estudio de la disfunción celular linfocitaria que subyace en diversos estados patológicos, como por ejemplo: la vigilancia

contra el cáncer, la susceptibilidad a infecciones, las inmunodeficiencias y la autoinmunidad.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años han habido grandes avances en el conocimiento del proceso de señalización en el linfocito T que se dispara luego del acoplamiento del antígeno al complejo TCR/CD3. La identificación y caracterización de diversas moléculas que intervienen de manera clave en las distintas fases de este proceso, ha aumentado nuestro entendimiento de cómo el linfocito T decodifica señales en la membrana para responder con proliferación, apoptosis, producción de citocinas o con tolerancia a antígenos. La manipulación de la expresión de moléculas de señalización nativas o mutadas, mediante técnicas de ingeniería genética, ha permitido identificar rutas bioquímicas críticas para el desarrollo ontogénico normal de la respuesta inmunitaria y para el mantenimiento de una respuesta regulada en el linfocito T maduro. Sabemos más acerca de las principales moléculas que interaccionan, a ambos lados, en la membrana del linfocito T y de la célula presentadora de antígeno, y de los diversos eslabones moleculares que se enlazan a nivel post-receptor para construir una vía de señalización bioquímica coordinada hasta el núcleo. Conocemos mejor la distribución topográfica en la membrana de este conjunto de moléculas y su enlace con proteínas del citoesqueleto, creando islas que incluyen, o excluyen, moléculas según la respuesta deseada. Finalmente, sabemos que la fosforilación y defosforilación en resíduos de tirosina, serina o treonina de diversos sustratos, es el lenguaje bioquímico que utiliza la célula para responder a comandos iniciales desde la membrana. Este conjunto de conocimientos ha creado una plataforma muy sólida para el estudio de la disfunción celular linfocitaria que subyace a estados patológicos diversos, como por ejemplo la vigilancia contra el cáncer, la susceptibilidad a infecciones, las inmunodeficiencias y la autoinmunidad.

## LA RUTA RAS/RAF7MAPK EN LA SEÑALIZACIÓN DEL LINFOCITO T

[Activación de Ras](#) | [Moléculas adaptadoras que intervienen en la activación de Ras](#) | [Shc](#) | [Grb2](#) | [LAT](#) | [Otros adaptadores](#) | [Otras moléculas que participan en la activación a través de la ruta Ras/Raf/MAPK](#) | [Topografía de las moléculas señalizadoras](#) | [MAPKs](#)

### Activación de Ras

Ras pertenece a una familia de proteínas G pequeñas con propiedad de GTPasas que interviene con un papel muy importante en el proceso de activación del linfocito T (1). Este grupo de enzimas, que comprende además GTPasas de la familia Rho (involucradas en los procesos de señalización a través de receptores de factores de crecimiento), se caracteriza por activar serina/treonina cinasas de la familia MAPK e interaccionar entre ellas en una "conversación" cruzada. Se pueden acoplar a múltiples efectores cuesta abajo en la cascada de señalización y ser responsables de múltiples salidas funcionales en la célula. Las proteínas inactivadoras de GTPasas (GAPs) inducen la hidrólisis de GTP, favoreciendo el acoplamiento de GDP (que determina una enzima inactiva). A su vez los intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) favorecen el desplazamiento de GDP por GTP, induciendo la activación de la enzima. Sos y Vav parecen ser los principales GEFs en las células T.

La activación de Ras inducida a través de receptores de reconocimiento inmunitario requiere la participación de proteína tirosina cinasas (PTKs). Los inhibidores de PTKs pueden prevenir la activación de Ras (2,3). La expresión de una forma disgregulada de Lck en líneas celulares de timoma conduce a una activación constitutiva de la vía Ras/Raf/MAPK (4). El otro mecanismo fundamental para la activación de Ras es el sistema de las proteínas cinasa C (PKC). Los activadores específicos de la PKC, como los ésteres del forbol, son capaces de activar directamente a Ras, posiblemente mediante la inhibición de Ras-GAP (5), efecto que no es sensible a los inhibidores de PTKs y que por lo tanto representa una vía directa de activación de esta molécula. Sin embargo, mediante experimentos expresando formas sobreactivadas de PKC, se ha podido demostrar que PKC no actúa por debajo de Ras en la inducción de NFAT y AP-1 (5). Además, en ausencia de estimulación del sistema PKC el ligado del complejo TCR es capaz de inducir directamente la activación de Ras, efecto que es suprimido en presencia de Herbimicina A, un inhibidor de PTKs (2). Estos datos sugieren que la activación de Ras vía TCR/CD3 ocurre a través de una ruta independiente de la PKC e involucra la participación de PTKs. Sin embargo, la posible interconexión de rutas PKC-dependientes y PKC-independientes en la activación de Ras, se pone de manifiesto en la observación experimental de una disminución en la activación de Ras inducida a través de la vía TCR/CD3, en experimentos de depleción sostenida de PKC (3).

#### Moléculas adaptadoras que intervienen en la activación de Ras

Los mecanismos que acoplan el ligado del complejo TCR/CD3 con la activación de Ras han venido siendo delineados en años recientes. Se han hecho grandes avances en el entendimiento de la activación de la célula T, con el descubrimiento de un grupo de moléculas adaptadoras cruciales en el ensamblaje de esta cascada de señalización (Figura 1).

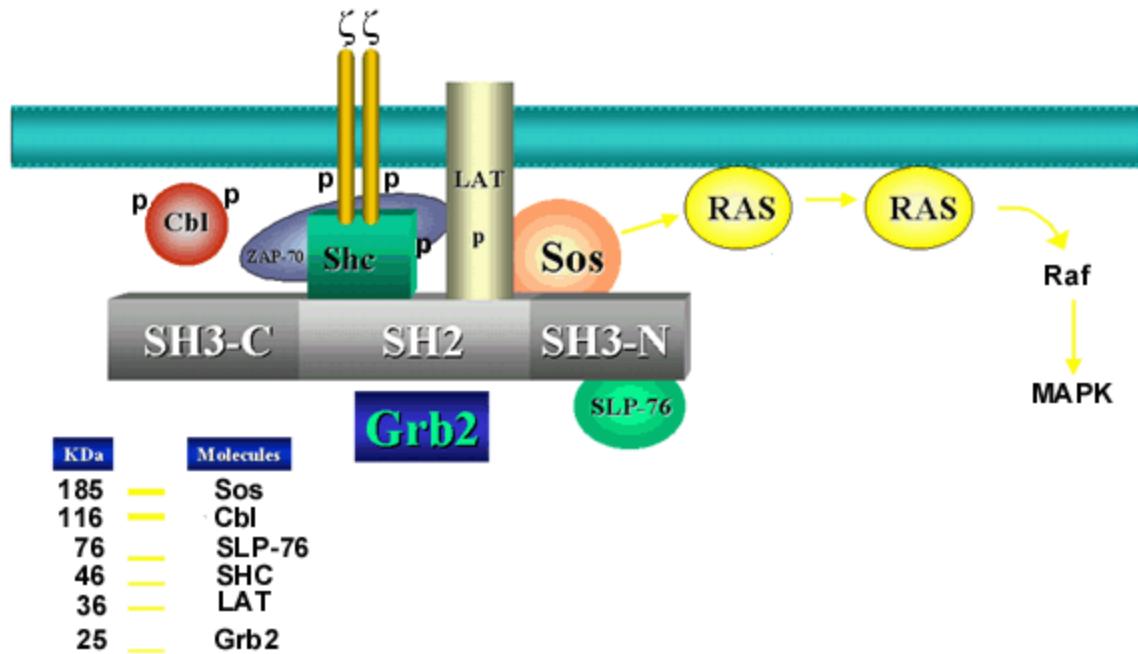


Figura 1. Moléculas que enlazan la señalización del complejo TCR/CD3 (acá sólo representado por el heterodímero zz) con p21 Ras y el módulo de las MPKs.

Shc (del inglés *SH2-containing domain*) es una proteína de 46-52-kDa, compuesta por un dominio fosfotirosina de acoplamiento en su porción aminoterminal, un dominio central de homología con el colágeno que contiene sitios que se fosforilan en tirosina luego del ligado del TCR y un dominio de homología src 2 (SH2) en su porción carboxiterminal, que le permite acoplarse con alta afinidad a proteínas fosforiladas en tirosina, como las cadenas z del complejo TCR. Luego del ligado del complejo TCR/CD3 se produce la fosforilación en tirosina de los dominios ITAM de las cadenas TCR z, lo cual permite el acoplamiento de Shc a través de su dominio SH2. A su vez Shc se acopla a dominios SH2 de Grb2 a través de los sitios fosforilados en tirosina Y239 y Y313 de su dominio central, lo cual permite el acercamiento del TCR z al complejo Shc:Grb2:Sos. Sos es una molécula intercambiadora de GDP por GTP, que interviene en la activación de Ras (7). De esta forma Shc es un eslabón clave en las primeras fases de la señalización vía TCR/CD3, al acoplar eventos de fosforilación en tirosina con activación de la ruta Ras/Raf/MAPK en linfocitos T. La ausencia de este acoplamiento en modelos experimentales mutantes de Shc (mutaciones en resíduos de tirosina por fenilalanina) impiden la activación de ERKs, la inducción de apoptosis y la producción de IL-2 en células T activadas a través de la vía TCR/CD3 (8).

## Grb2

Grb2 (del inglés *Growth factor receptor bound protein 2*) es una proteína citosólica de 25-kDa, formada por un dominio SH2 de aproximadamente 100 aminoácidos, y dos dominios SH3 cada uno de 60 aminoácidos que le permite interactuar con secuencias ricas en prolina (9). A través de su dominio SH3 Grb2 liga a Sos (del inglés *Son of Sevenless*) de manera constitutiva, ligado que aumenta una vez que Sos es fosforilada en serina/treonina. Como se mencionó anteriormente, Sos y Vav son las dos proteínas intercambiadoras de nucleótidos que intervienen en la activación de Ras en linfocitos T. En el momento en que el complejo Shc:Grb2:Sos se acerca a la membrana se activa Ras por intermedio de Sos. No está claro si la activación vía TCR/CD3 induce cambios en Sos que aceleran su actividad GEF (intercambiadora de nucleótidos) o simplemente que el acoplamiento a la membrana acerca a Sos a su blanco natural es decir, la proteína Ras.

## LAT

LAT (del inglés *Linker for activation of T cells*) es una proteína transmembrana de 36-38-kDa, sustrato de varias PTKs y que permite el acoplamiento de eslabones claves en la cadena de señalización tales como Grb2, Sos, PLCg 1 y fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K). La asociación de LAT con Grb2 ocurre a través del dominio SH2 de Grb2 (10). Esta asociación es más estable que la de Shc con Grb2, por lo cual ambas moléculas adaptadoras podrían competir por el acoplamiento del complejo Grb2:Sos. Luego de la activación a través del complejo TCR/CD3, LAT es fosforilada por ZAP-70. La mutación de dos resíduos en tirosina de LAT conduce a una disminución en la asociación con Grb2 y PI3-K, así como en el acoplamiento y activación de PLCg 1 (11). LAT también acopla a c-Cbl, el producto de un proto-oncogen que tiene funciones regulatorias negativas en la señalización vía TCR/CD3 (12). Deficiencias en la expresión de LAT determinan una hiperfosforilación de Cbl por Fyn, lo cual induce un acoplamiento más fuerte a una proteína adaptadora (Crkl) y a un factor intercambiador de nucleótidos, C3G, llevando a la activación de Rap-1. Esta proteína G secuestra Raf-1 e impide su participación cuesta abajo en la señalización a través de Ras (13). Por lo tanto, es posible que LAT cumpla una función clave en acoplar ZAP-70 activada con la estimulación de Ras, PLCg 1 y PI3-K en células T (1).

## Otros adaptadores

TRIM (del inglés *T cell receptor-interacting molecule*) es un homodímero transmembrana que se acopla a Grb2, la subunidad p85 de PI3-K y otras src cinasas. Al acoplarse a p85 posiblemente cumpla una función anti-apoptótica. SIT (del inglés *SHP2-interacting transmembrane protein*) es una proteína de 196-kDa que se acopla a Grb2 y a otras src cinasas (revisado en 13).

Otras moléculas que participan en la activación a través de la ruta Ras/Raf/MAPK

### SLP-76

SLP-76 (del inglés *SH2-domain-containing leukocyte protein of 76-kDa*) es una proteína de 76-kDa que se expresa sólo en células de origen hemopoyético, y que se acopla a dominios SH3 de Grb2 a través de su región central rica en prolina (14). SLP-76 juega un papel muy importante en el desarrollo ontogénico del linfocito T (15), en la activación de PLC $\gamma$  1 y la movilización de calcio intracelular (16) y en la inducción de la actividad de transcripción de NFAT y AP-1 (17,18). Estos últimos efectos sugieren que SLP-76 es necesaria para acoplar señales a través de la ruta Ras/Raf-1/MAPK. Más recientemente se ha demostrado también un papel para SLP-76 en la reorganización del citoesqueleto interactuando con Vav y la proteína adaptadora Nck (13).

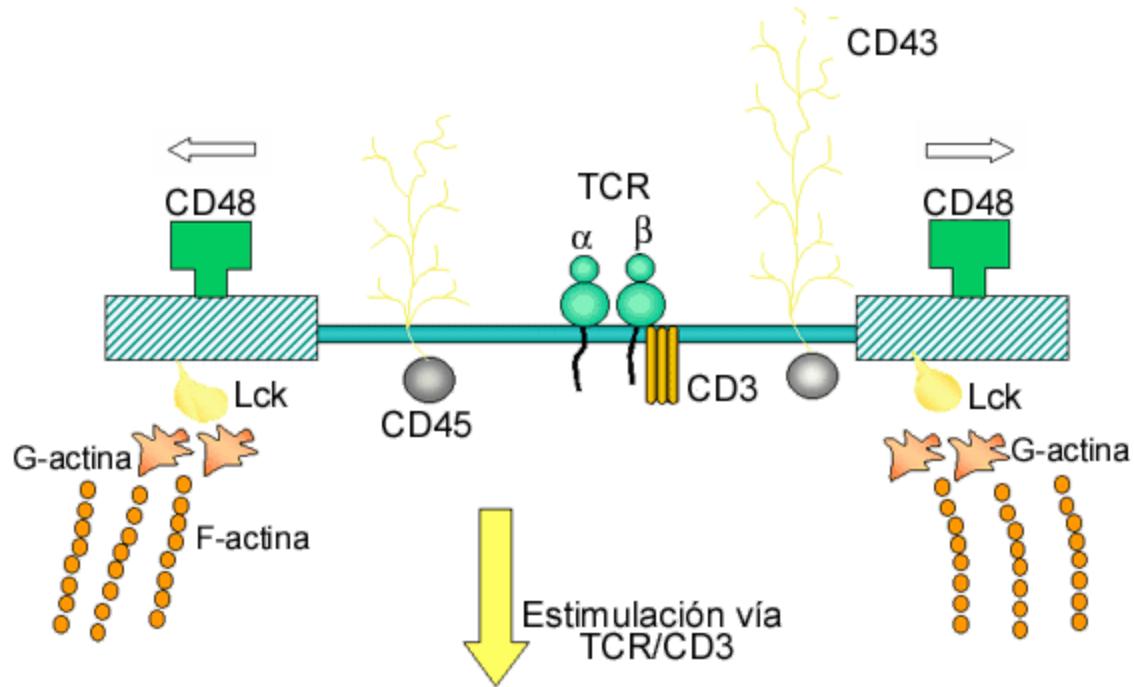
### Cbl

Cbl es una proteína de 120-kDa que se asocia al dominio SH3 de Grb2 y de las PTKs Fyn y Lck en células T (12). En las células T en reposo Cbl se asocia a Grb2, compitiendo potencialmente con Sos por el ligado a esa proteína. Luego de la activación por la vía TCR/CD3 se produce la fosforilación en tirosina de Cbl que conduce a un desacoplamiento de ambas moléculas, facilitando la transmisión de señales hacia la ruta Ras/Raf/MAPK (revisado en 19). Lupher *et al* demostraron que el dominio PTB (un dominio análogo al SH2) de Cbl reconocía una secuencia de ZAP-70 activada (20). Como se mencionó anteriormente esta molécula cumple un papel regulatorio negativo de la señalización a través de la vía TCR/CD3. La sobreexpresión de Cbl trae como consecuencia una inhibición de la actividad transcripcional de AP-1 en células activadas por la vía TCR/CD3 (17). Timocitos deficientes en su expresión de Cbl afectan la contraregulación negativa de ZAP-70, debido a una fosforilación mantenida de LAT y SLP-76 (21). Datos recientes sugieren que adicionalmente Cbl puede cumplir un papel regulatorio negativo en la señalización vía TCR/CD3 por inducir fenómenos de ubicuitinación de src cinasas (12).

## Topografía de las moléculas señalizadoras

En años recientes se ha podido demostrar que las moléculas antes señaladas asumen distribuciones compartimentales en regiones de la membrana y del citoesqueleto, y que este posicionamiento es fundamental para la transmisión de señales. Se ha demostrado la presencia de dominios enriquecidos en glicolípidos de membrana (GEMs, del inglés *Glycolipid-enriched membrane domains*) mediante técnicas de microscopía electrónica, microscopía confocal y manipulaciones con detergentes. Su estudio añade una nueva dimensión al entendimiento de los procesos de señalización postreceptor en el linfocito T. Diversas moléculas señalizadoras como las src cinasas Fyn y Lck, proteínas de la familia Ras y moléculas que participan en la movilización de calcio, se agrupan en estas "balsas" ricas en esfingolípidos y colesterol en la membrana del linfocito T. Por su parte, la molécula CD45, una tirosina fosfatasa de amplia distribución en la membrana del linfocito T queda excluida de las "balsas" luego del ligado del

TCR/CD3, mientras que las cadenas TCR  $\gamma$  fosforiladas en tirosina se acumulan en ellas (22). La estimulación vía TCR/CD3 permite la migración de esfingomielina y glicolípidos al sitio de acoplamiento del TCR/CD3 con las moléculas coestimuladoras, creando un plano membranal más rígido, con una mayor capacidad de asociación lateral y en general permitiendo la concentración de las moléculas de señalización en un área más restringida. Una consecuencia del establecimiento de estas balsas es el entrecruzamiento de filamentos de G y F actina en el citoesqueleto, lo cual contribuye a su vez al afianzamiento de esta zona de comunicación intermolecular (Figura 2). Además, luego del ligado del TCR/CD3, la molécula CD48 (una glicosilfosfatidilinositol proteína) se asocia a Fyn y Lck en las "balsas" y potencia la activación de ERK-2 (23). Por el contrario, las moléculas CD45 (con capacidad regulatoria dual de las src cinasas) quedan excluidas para permitir una señalización ininterrumpida (Figura 2).



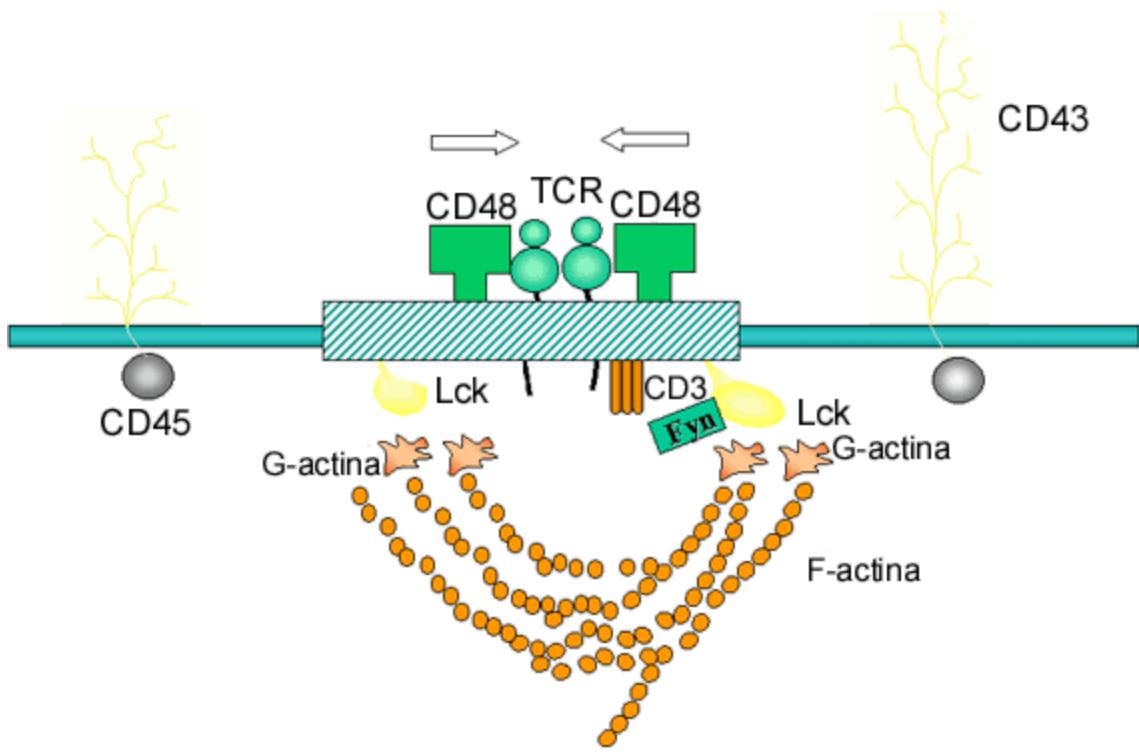


Figura 2. Se muestra la membrana de un linfocito T en reposo (a) y luego del ligado del antígeno (b). La activación del linfocito T, luego del ligado del antígeno, induce una reorganización a nivel de la membrana mediante la conformación de una zona físicamente más estable, rica en glicolípidos, donde las moléculas que se agrupan interaccionan de manera más directa. A su vez, estas "balsas" excluyen proteínas con capacidad inhibitoria de la respuesta, como la tirosina fosfatasa CD45 (b).

## MAPKs

Estudios recientes han aportado una información muy valiosa de cómo se enlaza la señalización desde el complejo TCR/CD3 hasta el sistema de las MAPK (del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases* (revisado en 24). Estas enzimas representan un sistema de serina-treonina proteína cinasas muy conservado filogenéticamente y de amplia expresión en distintos tipos celulares. Las señales transmitidas a través de esta ruta son indispensables para respuestas distales críticas en la biología de cualquier célula. Esta familia de cinasas comprende por lo menos tres grandes grupos, las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs, de *Extracellular signal-regulated kinases*), las relacionadas con el proto-oncogen c-Jun (JNK, de *c-Jun-related kinases*), y las p38 cinasas. La estimulación a través de la vía TCR/CD3 induce activación de las ERKs, por una ruta que involucra Ras/Raf, mientras que la activación de JNKs requiere la participación de la molécula coestimuladora CD28. La activación de las ERKs requiere la participación de la PKC, posiblemente por el potencial que tiene esta última de activar Raf directamente. Sin embargo, como se señaló anteriormente, una activación completa de Ras/Raf/MAPK solo es posible mediante la participación conjunta y coordinada de señales provenientes del complejo TCR/CD3 y de la activación de PKC. Aproximadamente a los 2-3 minutos de estimulación, Raf-1 se fosforila intensamente y luego se activa, siendo primero reclutada a la membrana mediante la unión a través de su porción amino-terminal a Ras (24). Es posible que PKC sea el principal sistema

enzimático encargado de fosforilar a Raf-1, aunque también se ha demostrado que Lck induce la fosforilación en tirosina de esa molécula (25).

Luego de activadas Ras y Raf en forma secuencial, se activan MEK1 y MEK2, dos cinasas responsables de la doble fosforilación en treonina-tirosina de ERK-1 y ERK-2 y que conduce a su subsecuente activación. Raf-1 induce fosforilación en los residuos de serina 218 y 222 de MEK-1 (26). MEK-1 y MEK-2 son altamente específicas para la activación cuesta abajo de ERK-1 y ERK-2. Las cinasas MEK fosforilan en forma secuencial la tirosina 185 y la treonina 183 en ERK-2 (27). Las ERKs son serina-treonina cinasas con propensión a fosforilar estos residuos cuando están vecinos a prolina. Dentro de los sustratos que son activados por ERKs están c-Jun, c-Fos (ambos constituyentes del heterodímero AP-1), c-Myc, c-Myb y Elk-1. En la Figura 3 se muestra un experimento representativo de la doble fosforilación de ERK-1 y ERK-2 en linfocitos T activados *in vitro* PMA.

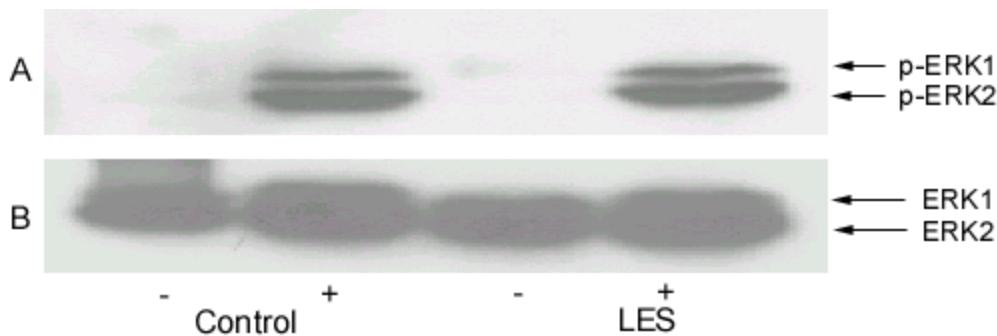


Figura 3. Fosforilación de MAPK ERK-1 y ERK-2 inducida por la estimulación con PMA. El panel A muestra las moléculas ERK-1 y ERK-2 doble fosforiladas en residuos de tirosina y treonina en el lisado de  $2.5 \times 10^6$  linfocitos T de un control sano y un paciente con LES estimulados con 10 ng/ml de PMA. El panel B muestra la cantidad total de proteína ERK-1 y ERK-2 en los mismos lisados.

El sistema MEK/ERK parece ser crítico para la selección positiva intratímica, como se ha podido demostrar en modelos transgénicos que sobreexpresan una forma catalíticamente inactiva de estas enzimas (28). La activación del módulo que comprende Ras/Raf/ERKs es necesaria para la translocación y activación de AP-1 (1), un factor trans-activador que interviene en la regulación de la expresión del gen para IL-2 y de otras citocinas. Igualmente esta vía interviene en la activación de los factores trans-activadores NFAT, AP-3 y NFkB. La activación de AP-1 a través de Ras/Raf es necesaria para la expresión del gen de la molécula CD69 (29), la cadena a del receptor para IL-2 (IL-2R) (30) y para la transcripción del gen de la cadena b del heterodímero TCR (31).

## SEÁOLIZACIÓN DEL LINFOCITO T EN EL LUPUS

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune de etiología multifactorial, que constituye un modelo inmunopatológico prototípico de enfermedad autoinmune sistémica, y que ocurre por un disturbio grave en los mecanismos que controlan la tolerancia a autoantígenos. La interacción de genes de susceptibilidad a la enfermedad con diversos factores ambientales endógenos y exógenos, rompe el delicado equilibrio que impide que numerosas clonas linfocitarias potencialmente autoreactivas, respondan a antígenos propios. El daño tisular y la falla de órganos ocurren como consecuencia del proceso inflamatorio crónico. El estudio inmunohistológico de los tejidos afectados ha permitido identificar las diversas subpoblaciones

linfocitarias que participan activamente en el proceso inflamatorio en el LES y otras enfermedades autoinmunes. Se pueden encontrar linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas, expresando marcadores de activación en sus membranas, en los infiltrados inflamatorios presentes en los tejidos afectados. La presencia de un número significativo de linfocitos T en piel (32) y riñón (33) de pacientes con LES sugieren un papel protagónico de esta subpoblación en el daño tisular en esta enfermedad. Igualmente, la producción de autoanticuerpos patogénicos, especialmente los anticuerpos anti-ADN de doble cadena, requiere la participación activa de células T cooperadoras específicas (34). Por otra parte manipulaciones terapeúticas experimentales, incluyendo la ablación selectiva de subpoblaciones linfocitarias, han demostrado la contribución central del linfocito T en el daño tisular en modelos murídos de la enfermedad. Por último, muchos procedimientos terapeúticos de uso en pacientes con LES están basados en el control de la actividad del linfocito T.

Diversos grupos, incluyendo el nuestro, han comenzado el estudio de la señalización del linfocito T en pacientes con LES luego del ligado del complejo TCR/CD3 (revisado en 39,40). Nuestra hipótesis central plantea que alteraciones en la señalización post-receptor del linfocito T son responsables de la ruptura del estado de anergia de las clonas autoreactivas sobrevivientes a la selección tímica. Alguna de las posibles consecuencias de una señalización anormal luego del ligado del complejo TCR/CD3 en el linfocito autoreactivo podrían ser: 1. Pérdida del estado de anergia al encontrar autoantígenos, 2. Pérdida de la capacidad de sufrir apoptosis al ligar autoantígenos. 3. Pérdida de la capacidad de respuestas balanceadas en intensidad y tiempo por parte de linfocitos regulatorios de las clonas autoreactivas y 4. Pérdida en el control de la expresión de citocinas, con desviaciones potencialmente patogénicas en los fenotipos Th1/Th2.

En la Tabla 1 se muestran algunos resultados de las investigaciones sobre señalización del linfocito T de pacientes con LES. El grupo pionero en estas investigaciones es el del Dr. Gary Kammer (Winston-Salem, NC, Estados Unidos), quien demostró anormalidades en la activación del sistema de las cinasas A, respondedoras a AMP cíclico, en linfocitos T de pacientes con LES (41). Nosotros (42) y Liossis *et al* (43) demostramos la presencia de patrones anormales de fosforilación en tirosina de diversos substratos. Este es el evento bioquímico más temprano que ocurre luego del ligado del complejo TCR/CD3 (44) y es crítico para la activación coordinada de diversos pasos bioquímicos adicionales cuesta abajo en la cascada, tales como la activación de la enzima PLCg 1, la movilización de calcio intracelular y la activación del sistema Ras/Raf/ERK.

Además, pudimos demostrar una activación aumentada de la enzima Fyn (45) (acoplada constitutivamente a las cadenas z del complejo TCR/CD3), que junto a Lck (acoplada constitutivamente a la molécula CD4) constituyen las dos src cinasas más importantes en los pasos tempranos de señalización luego del ligado del receptor en la membrana de la célula T. Por último, nuestro laboratorio (46) y otros grupos (43,47) han demostrado una disminución en la expresión de la cadena z del complejo TCR/CD3, la que podría ser responsable de alguna de las alteraciones arriba señaladas, toda vez que dichas cadenas son fundamentales para el anclaje de ciertas moléculas críticas en la regulación de las fases más tempranas de la señalización como son Fyn, ZAP-70, y Shc/Grb2, entre otras.

En base de los resultados arriba presentados podría concluirse que los linfocitos T de pacientes con LES muestran anormalidades en eventos tempranos de señalización posterior al ligado del complejo receptor TCR/CD3, especialmente en relación a eventos de fosforilación en tirosina y posiblemente de acoplamiento de otras moléculas que señalizan cuesta abajo. Dado que la

fosforilación en tirosina, inducida por PTKs de la familia src (Fyn y Lck) y de la familia syk (ZAP-70), resulta imprescindible para enlazar moléculas que permitan una señalización efectiva corriente abajo, es presumible que dichas alteraciones puedan a su vez interferir con el acoplamiento de señales hacia vías críticas más distales, como la activación de PLCg 1 y la activación de la vía Ras/Raf/MAPK. Estudios recientes señalan la importancia de esta última en el mantenimiento de la anergia en linfocitos T antígeno específicos (48,49). La tolerancia de las clonas autoreactivas es mantenida gracias a un bloqueo en la activación de la proteína Ras y a la consecuente deficiencia en la activación del factor de transcripción AP-1 (48,49). Se desprende entonces la importancia de examinar estas vías en linfocitos T de pacientes con enfermedades autoinmunes, para entender como podría ocurrir una pérdida en la capacidad de las clonas autoreactivas de mantener su estado tolerante a antígenos propios.

A pesar de la importancia de la ruta Ras/Raf/ERK en el mantenimiento de la anergia, hay muy poca información acerca del estado de esa ruta en linfocitos T de animales o pacientes con enfermedades autoinmunes. Anormalidades en los eventos proximales de señalización luego del ligado del complejo TCR/CD3 pueden alterar las rutas que conducen a la activación de Ras y de las MAPKs. En ratones no obesos con diabetes autoinmune se ha demostrado que luego de la activación a través del receptor TCR/CD3 hay un secuestro de mSos y de PLC-g 1 que impide su acoplamiento al complejo Grb2/LAT/ZAP-70 (50). En este estudio se demostró que defectos en eventos tempranos de fosforilación en tirosina y en el redireccionamiento del complejo Grb2/LAT/ZAP-70 a la membrana y al citoesqueleto, con exclusión de Sos de éste último, determinaban el bloqueo de la activación de Ras. El defecto en la activación del linfocito T en estos animales podría alterar la función de la subpoblación de células CD4<sup>+</sup> del fenotipo Th2, las cuales serían necesarias para regular la expansión y actividad de los linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1, responsables del daño autoinmune en este modelo (51). Liang *et al* mostraron defectos en la activación del sistema MAPK inducida por PMA y un ionóforo de calcio, en linfocitos T doble negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), procedentes de ratones lúpicos de la cepa MRL-*lpr/lpr* (52). Rapoport *et al* reportaron recientemente niveles normales de Ras y disminución en la expresión de Sos en células mononucleares de sangre periférica de diez pacientes con LES, cuya enfermedad estaba inactiva al momento del estudio (53). En ese estudio no se discriminó la cantidad de esta molécula en linfocitos T en particular, ni se examinó la capacidad de activación de Ras o del sistema MAPK. Hasta donde sabemos este es el único estudio en linfocitos de pacientes con LES, donde se han estudiado moléculas relevantes a la ruta Ras/Raf-1/MAPK, sin embargo, por lo arriba comentado sus resultados deben ser considerados preliminares. Nuestros datos sugieren una expresión normal de Grb2, Shc, SLP-76 y Sos en linfocitos T en reposo de pacientes con LES (54).

Nuestro laboratorio está estudiando la capacidad de respuesta del sistema Ras/Raf/ERK a la estimulación vía TCR/CD3 en linfocitos T de pacientes con LES y examinando la relevancia de las alteraciones en eventos más tempranos de señalización observadas en esta enfermedad. Un mayor entendimiento de las alteraciones que subyacen la pérdida de la capacidad de tolerancia en esta crítica subpoblación celular podría crear las bases para manipulaciones terapéuticas más selectivas y por tanto más eficaces y menos tóxicas que las disponibles en la actualidad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Altman A, Deckert M. The function of small GTPases in signaling by immune recognition and other leukocyte receptors. *Adv Immunol* 72: 1-101, 1999
2. Izquierdo M, Downward J, Graves JD, Cantrell DA. Role of protein kinase C in T cell antigen receptor regulation of p21<sup>ras</sup>. Evidence that two p21<sup>ras</sup> regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 12: 3305-3312, 1993
3. Ohtsuka T, Kaziro Y, Satoh T. Analysis of the T cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Acta* 1310: 223-232, 1996
4. Lin K, Abraham KM. Targets of p56Lck activity in immature thymoblasts: Stimulation of the Ras/Raf/MAPK pathway. *Intl Immunol* 9: 291-306, 1997
5. Downward J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346: 719-723, 1990
6. Williams DH, Woodrow M, Cantrell DA. Protein kinase C is not a downstream effector of p21ras in activated T cells. *Eur J Immunol* 25: 42-47, 1995
7. Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394: 337-343, 1998
8. Pratt JC, van den Brink MRM, Igras VE, Walk SF, Ravichandram KS, Burakoff SJ. Requirement for Shc in TCR-mediated activation of a T cell hybridoma. *J Immunol* 163: 2586-2591, 1999
9. Lowestain EJ, Daly RJ, Baltzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ulrich A, Skolnik EY, Bar Sagi D, Schlesinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to Ras signaling. *Cell* 70: 431-442, 1992
10. Koretzky GA. The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immunol Today* 18: 401-406, 1997
11. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Trible RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links the T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92: 83-92, 1998
12. Luper ML, Rao N, Eck MJ, Band H. The Cbl protooncoprotein: a negative regulator of immune receptor signal transduction. *Immunol Today* 20: 375-382, 1999
13. Schraven B, Cardine AM, Hubener C, Bruyns E, Ding I. Integration of receptor-mediated signals in T cells by transmembrane adaptor proteins. *Immunol Today* 20: 431-434, 1999
14. Jackman JK, Motto DG, Koretzky GA. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* 270: 7029-7032, 1995
15. Clements JL, Yang B, Ross-Barta SE, Eliason SL, Hrstka RF, Williamson RA, Koretzky GA. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 282: 416-420, 1998
16. Yablonski D, Kuhne MR, Kadlecak T, Weiss A. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC- $\gamma$  1 in a SLP-76-deficient T cell. *Science* 281: 413-416, 1998
17. Fang N, Motto DG, Ross SE, Koretzky GA. Tyrosines 113, 128, and 145 of SLP-76 are required for optimal augmentation of NFAT promoter activity. *J Immunol* 157: 3769-3773, 1996
18. Musci MA, Motto DG, Ross SE, Fang N, Koretzky GA. Three domains of SLP-76 are required for its optimal function in a T cell line. *J Immunol* 159: 1639-1647, 1997
19. Clements JL, Koretzky GA. Recent developments in lymphocyte activation: linking kinases to downstream signaling events. *J Clin Invest* 103: 925-929, 1999
20. Luper ML, Songyang Z, Shoelson SE, Cantley LC, Band H. The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D9N/DxpY motif and binds to the Tyr 292 negative regulatory phosphorylation site. *J Biol Chem* 272: 33140-33144, 1997

21. Thien CBF, Bowtell DDL, Lagndon WY. Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in Cbl-deficient thymocytes. *J Immunol* 162: 7133-7139, 1999
22. Moran M, Miceli MC. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: A role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9: 787-796, 1998
23. Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 17: 5334-5348, 1998
24. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735, 1995
25. Fabian JR, Daar IO, Morrison DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13: 7170-7179, 1993
26. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sathanandam G, Rapp U, Asworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74Raf-1. *EMBO J* 13: 1610-1619, 1994
27. Haystead TA, Dent P, Sturgill TW, Marshak DR. Ordered phosphorylation of p42 mapk by MAP kinase kinase. *FEBS lett* 13: 17-22, 1992
28. Alberola-Illa J, Forbusch KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373: 620-632, 1996
29. D'Ambrossio D, Cantrell DA, Frati L, Santoni A, Testi R. Involvement of p21 ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol* 24: 616-620, 1994
30. Sirinian MI, Marchetti A, Di Rocco G, Starace G, Jucker R, Nasi S. Ras oncogen transformation of human B lymphoblasts is associated with lymphocyte activation and with a block of differentiation. *Oncogene* 8: 157-163, 1993
31. Wotton D, Ways DK, Parker PJ, Owen MJ. Activity of both Raf and Ras is necessary for activation of transcription of the human T cell receptor b gene by protein kinase C, Ras plays multiple roles. *J Biol Chem* 268: 17975-17982, 1993
32. Synkowsky DR, Provost TT. Characterization of the inflammatory infiltrate in lupus erythematosus lesions using monoclonal antibodies. *J Rheumatol* 10: 920-924, 1983
33. Caligaris-Cappio F, Bergui L, Tesio L, Ziano R, Camussi G. HLA-DR<sup>+</sup> T cells of the Leu3 (helper) type infiltrate the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 59: 185-189, 1985
34. Shlomchick M, Mascelli M, Shan H, Radic MZ, Pisetsky D, Marshak-Rothstein A, Weigert M. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* 171: 265-297, 1990
35. Stekman IL, Blasini AM, Leon-Ponte M, Baroja ML, Abadi I, Rodriguez MA. Enhanced CD3-mediated T lymphocyte proliferation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 34:459-467, 1991
36. Blasini AM, Stekman IL, Gonzalez F, Tositti ML, Rodriguez MA. T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus show increased response to interleukin-2 after costimulation with OKT3 monoclonal antibody and phorbol esters. *Clin Immunol Immunopathol* 70: 66-72, 1994
37. Vassilopoulos D, Kovacs B, Tsokos GC. TCR/CD3 complex-mediated signal transduction in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 155: 2269-2281, 1995

38. Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 98: 826, 837, 1996
39. Tsokos GC, Liossis SNC. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* 20: 119-124, 1999
40. Zouali M. Signaling in human lupus T lymphocytes. *Lupus* 7: 499-502, 1998
41. Kammer GM, Khan IU, Malemud CJ. Deficient type I protein kinase A isoenzyme activity in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 94: 422-430, 1994
42. Blasini AM, Alonzo E, Chacon R, Riera R, Stekman IL, Rodriguez MA. Abnormal pattern of tyrosine phosphorylation in unstimulated peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7:515-523, 1998
43. Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosine phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the TCR z chain. *J Clin Invest* 101: 1448-1457, 1998
44. Chan AC, Desai DM, Weiss A. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Ann Rev Immunol* 12:555-592, 1994
45. Blasini AM, Brundula V, Paris M, Rivas L, Salazar S, Stekman IL, Rodriguez MA. Protein tyrosine kinase activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimm* 11: 387-394, 1998
46. Brundula V, Rivas L, Blasini AM, Paris M, Salazar S, Stekman IL, Rodríguez MA. Diminished levels of TCR z chain in peripheral blood (PB) T lymphocytes from patients with systemic lupus erithematosus (SLE). *Arthritis Rheum*, 42: 1908-1916, 1999
47. Tsuzaka K, Takeuchi T, Onoda N, Pang M, Abe T. Mutations in T cell receptor z chain mRNA of peripheral T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Autoimmun* 11: 381-386, 1998
48. Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4<sup>+</sup> T cells . *Science* 271: 1276-1278, 1996
49. Li W, Whaley C, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 271: 1272-1275, 1996
50. Salojin K, Zhang J, Cameron M, Gill B, Arreaza G, Ochi A, Delovitch TL. Impaired plasma membrane targeting of Grb2-murine son of sevenless (mSos) complex and differential activation of the Fyn-T cell receptor (TCR)-z -Cbl pathway mediate T cell hyporesponsiveness in autoimmune nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 186: 887-897, 1997
51. Salojin KV, Zhang J, Madrenas J, Delovitch TL. T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease. *Immunol Today* 19: 468-473, 1998
52. Liang K|HE, Hsueh YP, Wu CC, Han SH, Lai MZ. Atypical signaling defects prevent IL-2 gene expression in *lpr/lpr* CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells. *J Biomed Sci* 5: 297-304, 1998
53. Rapoport MJ, Amit M, Rosenberg R, Ramot Y, Mizrahi A, Wysenbeek AJ. Decreased expression of the p21ras stimulatory factor hSos in PBMC from inactive SLE patients. *Lupus* 8: 24-28, 1999
54. Cifarelli F. Papel de la proteína adaptadora Grb2 en la señalización intracelular vía TCR/CD3 en linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela 1999.

