

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

N N

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DE RECEPTORES DE
QUIMIOQUINAS**

**ACTIVACION Y DESENSIBILIZACION DEL CCR2 Y SUS IMPLICACIONES
EN LA INFECCION POR HIV-1**

C C

TESIS DOCTORAL

JOSE MIGUEL RODRIGUEZ FRADE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Proctor: Sr. Dr. Jose M^e Culebras
Director: Sr. Dr. Isabel Fergat Ruano
Co-director: Sr. Dr. Eladio Montoya Melgar
Co-director: Sr. Dr. Federico Mayor Menéndez
Co-director: Sr. Dr. Jose Alcaus Perotejo
Co-director: Sr. Dr. Lisardo Busca Comar

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE RECEPTORES DE
QUIMIOQUINAS
ACTIVACION Y DESENSIBILIZACION DEL CCR2 Y SUS
IMPLICACIONES EN LA INFECCION POR HIV-1

TESIS DOCTORAL

JOSE MIGUEL RODRIGUEZ FRADE
1999

"Cuando emprendas tu viaje a Itaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras,
lleno de experiencias.
Pide que el camino sea largo.
Que sean muchas las mañanas de verano
en que llegues - ¡con qué placer y alegría! -
a puertos antes nunca vistos
y vayas a ciudades a aprender de sus sabios.
Ten siempre a Itaca en tu pensamiento.
Tu llegada allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguardar a que Itaca te enriquezca.
Itaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.
Aunque la halles pobre, Itaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Itacas."

Constantino P. Cavafis - Itaca (1911).

"¿Porqué se ha de considerar como decisivo el punto de vista del indiferente y no el del enamorado?. Tal vez la visión amorosa es más aguda que la del tibio. Tal vez hay en todo objeto calidades y valores que sólo se revelan en una mirada entusiasta."

Ortega y Gasset - Las Atlantidas

Para Almudena, Lucas y Miguel

Muchas personas han estado implicadas en que este trabajo llegue a buen puerto, algunas de ellas sin ni siquiera ser concientes de ello. En primer lugar tengo que dar las gracias a mi familia, por aguantarme y en especial a mis padres, por meterme el gusanillo de querer saber. También quiero dar las gracias a todos los compañeros del Instituto Llorente que me ayudaron cuando empecé en esto, hace ya unos cuantos años. Muchas gracias, Nines, Elena, Cayetano, Conchi, Amparo, Marivi, Cathy, Santos y Gloria. Juntos las hemos pasado de todos los colores y de todo, lo bueno y lo malo, podemos sacar provecho. A Leonor y Rafael, muchas gracias por darme el primer empujón.

Quiero agradecer a todas las personas del DIO, incluso antes de que fuera DIO, que han aportado su granito de arena o pedrusco a que esto salga adelante, no sólo a nivel científico sino también humano, y eso es mucho más importante. Sobre todo a Gustavo y Pili, a Mari Carmen e Irene, a Lucio. Es de destacar el trabajo de todos los que hacen día a día una labor oscura y pocas veces reconocida, pero sin el cual no sería posible llevar a cabo este trabajo: las personas del animalario, de la cocina, de secretaría y demás servicios generales.

También quiero dar las gracias a Paco Sanchez-Madrid, Marta Nieto, Miguel Vicente y demás personas del grupo del Dr. Sánchez-Madrid en el Hospital de la Princesa, con los que hemos pasado buenos ratos discutiendo y compartiendo resultados. A los Drs. Federico Mayor Jr. y Anna Aragay del Centro de Biología Molecular por el trabajo y las ideas que han aportado.

Al Dr. Carlos Martínez-A. , director del Departamento de Inmunología y Oncología, por confiar en nosotros y darnos la oportunidad de empezar con un tema de trabajo apasionante. Gracias también por conseguir los medios para que el trabajo se pueda sacar adelante en unas condiciones que deberían ser la envidia -SANA y no otras- de los que nos dedicamos a esto.

A Coral, que a pesar de hacernos esperar todos los días a la hora de comer, la seguimos esperando. Por algo será.

A Toni y a Ana. Es un gusto no sólo trabajar con vosotros sino también poder compartir un poco de vosotros fuera de lo que es el horario de trabajo. Que nos queden ganas de vernos en vacaciones está muy bien, porque imagino que no será para quedar bien, ¿o sí? Este trabajo ha salido adelante gracias a vosotros, es más, este trabajo es tan vuestro como mío.

Al Dr. Mario Mellado, como director de la tesis, por el esfuerzo derrochado para que el trabajo saliera adelante.

A Mario, como compañero de trabajo y como amigo. En este trabajo es fácil que aparezcan envidias, piques, mosqueos, y tantos follones, que es raro que después de unos cuantos años trabajando juntos, y por encima de todo, se valore lo que realmente es importante. Muchas gracias.

A Almudena; es la pieza clave para que todo esto haya encajado bien. A pesar de no tener ni idea de qué son las quimioquinas (ahora ya le suenan un poco) es la única persona que ha sido realmente imprescindible.

A Madrid que es mi pueblo.

A la música.

La vida es bella, relajate y disfruta.

José Miguel. Madrid 1999.

INDICE

| | |
|--|---------|
| INDICE | I - IV |
| Abreviaturas | V - VI |
| I. Introducción: Quimioquinas y Sistema Inmune | |
| 1. Las quimioquinas como factores quimiotácticos: Heterogeneidad | 1 - 4 |
| - Quimioquinas CXC. | 4 - 5 |
| - Quimioquinas CC. | 5 - 7 |
| 2. Consideraciones estructurales de las quimioquinas | 8 -10 |
| 3. Papel biológico de las quimioquinas | 10 |
| - Migración celular | 10 -11 |
| - Inflamación e infiltración tisular | 11 -12 |
| - Angiogénesis | 12 |
| - Hematopoiesis | 13 |
| - Efectos anti-tumorales de las quimioquinas | 13 |
| - Infección por el virus HIV-1 | 13 -14 |
| - Respuestas Th1/Th2 | 14 -16 |
| - Homeostásis | 16 -17 |
| - Transplante | 17 |
| 4. Receptores de quimioquinas: Estructura y función | 18 - 22 |
| 5. Activación de receptores de quimioquinas | 23 - 25 |
| - Activación de proteínas G | 25 - 28 |
| - GTPasas de bajo peso molecular | 28 - 29 |
| - Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) | 29 - 31 |
| - Fosforilación en serinas/treoninas | 31 - 32 |
| - MAP quinasas | 32 - 33 |
| - Actividad tirosin quinasa | 33 - 35 |

| | |
|---|---------|
| 6. Papel biológico de la proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1, y de su receptor CCR2 | 36 - 37 |
| II. Objetivos | 38 |
| III. Materiales y métodos | |
| 1. Líneas celulares empleadas | 40 |
| 2. Quimioquinas | 41 |
| 3. Obtención de péptidos sintéticos | 41 |
| 4. Obtención de anticuerpos monoclonales | 41 - 42 |
| 5. Enzimoimmunoensayo | 42 |
| 6. Marcaje de proteínas con biotina | 42 - 43 |
| 7. Tratamiento con inhibidores de proteínas G: PTX y CTX | 43 |
| 8. Tratamiento con inhibidores de tirosin quinasas: tirfostinas | 43 |
| 9. Citometría de flujo | 43 - 44 |
| 10. SDS-PAGE, western blot e Inmunoprecipitación | 44 - 45 |
| 11. Ensayos de movilización de calcio | 45 |
| 12. Ensayos de migración celular | 46 |
| 13. Inmunofluorescencia | 46 - 47 |
| 14. Determinación de la proteína p24 del HIV-1 | 47 |
| 15. Ensayo de la transcriptasa reversa | 47 - 48 |
| 16. RT-PCR | 48 |
| 17. Southern blot | 49 |
| 18. Transfección | 49 |
| 19. Mutagénesis dirigida. | 49 - 50 |
| 20. Análisis del ciclo celular | 50 |
| IV. Resultados. | |
| 1. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente al CCR2. | 52 |

| | |
|---|-----------|
| - Obtención de anticuerpos monoclonales | 53 - 55 |
| - Caracterización de los anticuerpos obtenidos | |
| - Especificidad | 55 - 57 |
| - Capacidad de reconocer al receptor CCR2 en ensayos de Western blot e inmunoprecipitación | 57 - 58 |
| - Reconocimiento del CCR2 en ensayos de inmunofluorescencia | 58 - 59 |
| - Efecto de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente al CCR2 sobre la actividad del MCP-1 | |
| - Antagonismo | 59 - 63 |
| - Agonismo | 63 - 67 |
| | |
| 2. Análisis de la expresión del CCR2 distintas poblaciones celulares | 68 - 73 |
| | |
| 3. Polarización celular y expresión de receptores de quimioquinas | 73 - 77 |
| | |
| 4. Papel biológico del receptor CCR2 durante la infección por HIV-1 | 77 - 81 |
| | |
| 5. Identificación de las señales tempranas implicadas en la señalización a través del receptor CCR2 | |
| - El CCR2 regula la movilización de calcio y se asocia a la proteína G α i. | 82 - 84 |
| - Fosforilación en tirosinas del CCR2 | 85 - 87 |
| - El MCP-1 induce la activación de la tirosin quinasa JAK-2 y su asociación al CCR2. | 87 - 93 |
| - La tirosina 139 del CCR2 es crítica para la señal inducida por MCP-1 | 93 - 100 |
| - Otras tirosin-quinazas activadas por el MCP-1: p125FAK y p72Syk | 100 - 102 |
| - El MCP-1 induce la activación de la fosfatasa Shp-1 | 103 - 104 |
| | |
| 6. Señales implicadas en la desensibilización e internalización del CCR2 | |
| - El MCP-1 induce la asociación de GRK2, Arrestina y CCR2 en un complejo multimolecular. | 104 - 109 |
| - El MCP-1 induce la asociación de arrestina al CCR2. | 109 - 111 |
| - Significación biológica de las GRKs en la señalización a través | |

| | |
|--|----------|
| del CCR2 | 112 -116 |
| - El MCP-1 provoca la rápida internalización del CCR2 en vesículas de clatrina | 117 -119 |
| - El MCP-1 induce la asociación de dinamina al CCR2 | 119 -120 |
| V. Discusión | 121 -152 |
| VI. Conclusiones | 153 -155 |
| VII. Bibliografía | 156 -182 |
| IX. Publicaciones | i - x |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| BSA | Albúmina sérica bovina (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin) |
| CTX | Toxina del cólera |
| CMV | Citomegalovirus |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Acido Etilendiamino tetraacético |
| EIA | Enzimoimmunoensayo |
| FCS | Suero bovino fetal (<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum) |
| FITC | Isotiociano de fluoresceína |
| GMCSF | Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony- <u>S</u> timulating <u>F</u> actor) |
| GPCR | Receptor acoplado a proteínas G (<u>G</u> - <u>P</u> rotein <u>C</u> oupled <u>R</u> eceptor) |
| GRK | Quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G (<u>G</u> - <u>P</u> rotein <u>R</u> eceptor <u>K</u> inase) |
| HSV | Herpesvirus saimiri |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IFN | Interferón |
| IL | Interleuquina |
| ITAN | |
| kbp | Kilo pares de bases |
| kDa | KiloDalton |
| KO | Knock-out |
| OPD | Orto-fenilén diamina |
| PAGE | Electroforésis en gel de poliacrilamida |
| PBS | Tampón fosfato-salino |
| PCR | Polimerase chain reaction |

| | |
|-------------|--|
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas(Platelet-derived growth factor) |
| PE | Ficoeritrina |
| PEG | Polietilenglicol |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| PMA | Forbol-12-miristato-13-acetato |
| PTX | Toxina de Pertussis |
| SAC | Staphilococcus Aureus, cepa Cowan A. |
| SDS | Sodium-dodecyl-sulfato |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SSC | Tampón citrato salino |
| TBS | Tampón tris-salino (<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline) |
| TM | Transmembrana |
| TNF | Factor de necrosis tumoral (<u>T</u> umour <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor) |

INTRODUCCION

Cualquier organismo se encuentra desde el principio de su vida en continuo contacto con otros organismos, muchos de los cuales pueden resultarle perjudiciales. Resulta evidente que en la mayoría de los casos las infecciones son de corta duración y dejan pocas secuelas, debido a que los vertebrados han evolucionado originando medidas protectoras conocidas de forma general como sistema inmune. El sistema inmune se divide funcionalmente en dos grandes grupos: el sistema inmune innato y el adquirido. El sistema inmune innato constituye de hecho la primera línea de defensa del organismo frente a los agentes patógenos y actúa antes de que éstos establezcan una infección. El sistema inmune adquirido origina una reacción específica frente al agente infeccioso que generalmente suele erradicarlo. Una de las particularidades más importantes del sistema inmune adquirido es que puede memorizar la respuesta frente al agente infeccioso evitando de ese modo que vuelva a causar infecciones en otro momento.

Ambos sistemas involucran una gran diversidad de moléculas y células distribuidas por todo el organismo. Para su correcto funcionamiento, se necesita de la acción coordinada de los diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmune y para ello estas células deben generarse, madurar, diferenciarse y poder llegar al lugar adecuado en el momento adecuado.

Además de la respuesta inmune, muchos otros procesos patológicos y fisiológicos están estrechamente relacionados con la presencia de un determinado tipo celular en un determinado tejido, de ahí el interés en definir las señales que dirigen con semejante grado de especificidad y control este proceso. La existencia de moléculas que cumplieran con este cometido se había sospechado desde hace mucho tiempo. Inicialmente se pensó en los quimioatrayentes clásicos, como la familia de formilpéptidos, C5a y LTB₄, pero carecen de la especificidad celular necesaria para ser los únicos responsables (**Baggiolini et al. 1994**). La identificación de la Interleuquina 8 como una proteína que dirige la migración de granulocitos pero no la de monocitos, fué el primer indicio de que era posible encontrar moléculas que dieran una señal de migración a un tipo celular específico, y sería la antesala de lo que ha venido a denominarse como citoquinas quimioatrayentes o quimioquinas (**Yoshimura et al. 1987**). Sin embargo, el verdadero punto de inflexión en la evolución del estudio de las quimioquinas lo marcó el descubrimiento del MCP-1, cuyo nombre (del inglés, Monocyte Chemoattractant Protein 1) hace precisamente referencia a su capacidad de atraer a los leucocitos mononucleares y no a los polimorfonucleares (**Yoshimura et**

al. 1989 ; Matsushima et al. 1989). Su identificación significó el principio de los esfuerzos para identificar otras proteínas que pudieran ser quimioatrayentes específicos de otros tipos celulares.

Las funciones asignadas hoy en día a las quimioquinas ha superado ampliamente el concepto de citoquina quimioatrayente, y de hecho algunas de sus funciones quedan fuera del ámbito inmunológico (**Rollins, 1997**). Se sabe que tanto las quimioquinas como sus receptores se expresan en una gran variedad de células no hematopoyéticas y que la función de las quimioquinas va más allá de su papel en la fisiología leucocitaria, aunque es en este último modelo donde más se han estudiado y donde se las ha relacionado con otras funciones diferentes a las de la quimioatracción (**Baggiolini, 1998**). Así, se ha descrito el papel que juegan las quimioquinas y sus receptores en la angiogénesis (**Moore et al. 1999**), en la estimulación de linfocitos T (**Bonecchi et al. 1998 ; Siveke y Hamann, 1998**) y en la infección por el virus del SIDA, VIH-1 (**D'Souza y Harden, 1996 ; Cairns y D'Souza, 1998**), etc. El avance en el estudio de las quimioquinas ha permitido conocer hoy la existencia de una relativamente alta promiscuidad en la unión de estas moléculas con sus receptores por lo que una misma quimioquina puede activar diferentes tipos celulares. Este hecho hace que el concepto de especificidad celular antes aludido debiera quizás ser replanteado, o como mínimo reconsiderado.

LAS QUIMIOQUINAS COMO FACTORES QUIMIOTACTIVOS

Las quimioquinas o citoquinas quimioatrayentes son una familia de proteínas de bajo peso molecular (7 a 12 kDa), con un alto grado de homología, y que presentan a lo largo de su secuencia 4 residuos de cisteína. En función de sus propiedades estructurales y de la localización cromosómica de sus respectivos genes se reconocen clásicamente dos grandes grupos, CXC o α -quimioquinas y CC o β -quimioquinas. El grupo de las CXC presentan un residuo aminoacídico cualquiera (X) intercalado entre las dos primeras cisteínas, mientras que en el grupo de las CC, estos dos primeros residuos de cisteína se encuentran adyacentes. Estas diferencias estructurales coinciden con una diferente localización cromosómica (cromosoma 4q13 para las CXC y 17q11 y 12 para las CC) y con una actividad diferencial (**Baggiolini *et al.* 1997a**). Aunque actualmente se ha descrito que tanto las quimioquinas de la familia CXC como las de la CC son capaces de actuar sobre tipos celulares muy variados, tanto dentro del sistema leucocitario como fuera de él, en un principio se afirmó que las quimioquinas CXC actuaban sobre los neutrófilos, mientras que las CC tenían como células diana los monocitos y los linfocitos T (**Flory *et al.* 1993 ; Rollins, 1997**).

Hay excepciones a estas reglas generales, por ejemplo la Linfotactina, que mantiene algunas de las características funcionales y estructurales de las quimioquinas, pero carece de dos de los cuatro residuos de cisteína. Esta quimioquina ejerce su papel principalmente sobre los linfocitos T. Como era de esperar su localización cromosómica (cromosoma 1q) también difiere de la de los dos grupos mayoritarios (**Kelner *et al.* 1994**). Aunque su existencia sugiere la existencia de toda una nueva familia de quimioquinas que podía denominarse C-quimioquinas, hasta el momento no se han descrito otros miembros diferentes a la mencionada linfotactina.

Otra excepción es la Fractalquina o Neurotactina. Se trata de una proteína de membrana, que presenta un dominio con estructura de quimioquina en su extremo amino terminal. Este dominio se diferencia de las quimioquinas tradicionales en la presencia de tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas, lo que permite abrir un nuevo grupo, el de las quimioquinas CX₃C que además posee también una localización cromosómica diferencial (cromosoma 1.6) (**Bazan *et al.* 1997**).

La razón de por qué han sido descubiertas quimioquinas de las familias C, CC, CXC ó CX₃C y no existen miembros de una hipotética familia CX₂C hay que buscarla en datos estructurales que indican que entre las dos primeras cisteínas de la secuencia de las quimioquinas solamente pueden acomodarse uno, tres ó ningún aminoácido (**Rollins, 1997**).

CXC QUIMOQUINAS.

La primera quimioquina descrita en el año 1961 fué PF4, un miembro de la familia CXC cuya secuencia fué determinada en 1997 (**Deuel et al. 1977**). Aun formando una familia estructuralmente bastante homogénea, sus propiedades difieren mucho de unos miembros a otros. A nivel estructural podemos diferenciar entre aquellas quimioquinas que presentan la secuencia de aminoácidos Glu, Leu, Arg, denominado motivo ELR, de aquellas que no lo presentan (**Rollins, 1997**).

Las quimioquinas CXC con ELR tienen una función muy uniforme. El exponente más estudiado de este grupo es Interleuquina 8, producida por una gran variedad de tipos celulares entre los que se incluyen los monocitos, neutrófilos, linfocitos T, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales (**Rollins, 1997**). Sus principales características, compartidas además por la mayoría de las quimioquinas ELR, son la quimioatracción de neutrófilos (**Huber et al. 1989**) y linfocitos T (**Qin et al. 1996**) y su actividad angiogénica (**Kock et al. 1992 ; Strieter et al. 1995a ; Strieter et al. 1995b**). Otros miembros de esta familia son GRO- α , con actividad mitogénica sobre líneas celulares de melanomas (**Richmond et al. 1988**), y ENA 78, que es un activador y quimioatrayente específico de neutrófilos (**Walz et al. 1991**).

Dentro de las quimioquinas CXC que carecen del motivo ELR se agrupan diferentes moléculas con una gran variedad de funciones. Así PF4, la primera quimioquina descrita, es producida por las plaquetas, atrae fibroblastos y tiene actividad angiostática (**Deuel et al. 1977 ; Maione et al. 1990**), IP-10, con poca actividad quimioatrayente, es capaz de activar específicamente neutrófilos (**Luster et al. 1985**), y MIG, que es quimioatrayente de linfocitos activados y de los linfocitos que infiltran tumores. Todas ellas son proteínas inducibles por interferon γ , expresadas por células mononucleares, queratinocitos, células endoteliales y linfocitos T (**Liao et al. 1995**). Mención especial requiere el SDF-1 α , quimioquina muy activa sobre los linfocitos T

(Bleul *et al.* 1996 ; Aiuti *et al.* 1997). Es el principal quimioatrayente de los progenitores hematopoyéticos CD34+ y juega un papel fundamental en el desarrollo normal de los linfocitos B y la organogénesis cardíaca (Nagasawa *et al.* 1996). Actualmente ha cobrado gran relevancia por su papel como inhibidor de la infección por determinadas cepas de VIH-1 (Bleul *et al.* 1996).

CC QUIMIOQUINAS.

Las quimioquinas CC forman una familia con una gran diversidad funcional. La primera descrita fue LD78. A ella la siguieron muchas otras, entre las que cabe destacar la subfamilia de proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP-1 a -5) cuyos miembros atraen a monocitos, aunque también tienen actividad sobre distintas poblaciones de linfocitos T, eosinófilos, basófilos, células NK y dendríticas (Rollins, 1997 ; Luster, 1998).

Los proteínas inflamatorias de macrófagos (MIPs), actúan sobre distintas poblaciones linfocitarias MIP-1 α , se caracteriza por su capacidad de inhibir la proliferación de células "stem" hematopoyéticas. Otros miembros de esta familia son eotaxina, RANTES, TCA3, I309, HCC1, TARC, CCF8, etc capaces de reclutar diferentes poblaciones leucocitarias y que tienen una gran relevancia en distintas patologías, como se señalará más adelante. (Baggiolini *et al.* 1997a ; Rollins, 1997; Baggiolini, 1998 ; Nelson y Krensky, 1998 ; Luster, 1998 ; Ward *et al.* 1998). También pertenecen a la familia CC las quimioquinas SLC, MIP-3 β , DC-CK1 y TECK que presentan especificidad por un único receptor y tienen funciones más ligadas a la homeostásis que a procesos inflamatorios.

Dentro de las múltiples funciones atribuidas a las quimioquinas CC, cabe destacar, además de su papel en la migración de diferentes poblaciones leucocitarias, los efectos anti-tumorales de quimioquinas como MCP-1 (Rollins y Sunday, 1991), la expresión diferencial de quimioquinas y receptores en las respuestas tipo Th1 y Th2 (Bonocchi *et al.* 1998 ; Siveke y Hamann, 1998 ; Ward *et al.* 1998) y sus funciones homeostáticas en tejidos linfoides. También dentro de ésta familia y al igual que ocurre con SDF-1 α , hay quimioquinas, como son RANTES, MIP-1 α y 1 β , que son inhibidores de la infección de determinadas cepas del HIV-1 (Cairns y D'Souza, 1998 ; Littman, 1998 ; Horuk, 1999).

Dada la gran variabilidad que existe en la asignación de nombres a las diferentes quimioquinas que se van identificando, denominaciones muchas veces sujetas a elecciones caprichosas y de dudosa utilidad, recientemente se ha sugerido una nomenclatura común para todas ellas (**TABLA I**), en función de la familia a la que pertenecen (C, CC, CXC o CX3C) y de la localización del locus génico correspondiente dentro del cromosoma (**Keystone Symposia on Chemokines and chemokines receptors. Keystone, Colorado. 1999**).

Tabla I. Nomenclatura de las quimioquinas. Unificación de nomenclatura para las distintas quimioquinas teniendo en cuenta la familia a la que pertenecen y la localización de su locus génico.

a. Quimioquinas CC.

| <i>CC</i> | <i>HUMANA</i> | <i>MURINA</i> |
|-----------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | I-309 | |
| 2 | MCP-1 | |
| 3 | MIP-1 α /LD78 α | |
| 4 | MIP-1 β | |
| 5 | RANTES | |
| 6 | | C10/MRP-1 |
| 7 | MCP-3 | |
| 8 | MCP-2 | |
| 9 | | MMRP2/CCF18/MIP1 γ |
| 10 | | |
| 11 | Eotaxina | |
| 12 | | MCP-5 |
| 13 | MCP-4 | |
| 14 | HCC-1 | |
| 15 | HCC-2 | |
| 16 | HCC4/LEC | |
| 17 | TARC | |
| 18 | DC-CK-1/PARC | |
| 19 | MIP-3 β /ELC/Exodus3 | |
| 20 | MIP-3 α /LARC/Exodus1 | |
| 21 | 6Ckine/SLC/Exodus2/TCA4 | |
| 22 | MDC/STCP-1 | |
| 23 | MPIF-1 | |
| 24 | MPIF-2 | |
| 25 | TECK | |

b. Quimioquinas CXC.

| <i>CXCL</i> | <i>HUMANA</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | GRO α |
| 2 | GRO β |
| 3 | GRO γ |
| 4 | PF4 |
| 5 | ENA-78 |
| 6 | GCP-2 |
| 7 | PBP |
| 8 | IL-8 |
| 9 | MIG |
| 10 | IP-10 |
| 11 | I-TAC |
| 12 | SDF-1/PBSF |
| 13 | BCA-1/BLC |

c. Quimioquinas XC.

| <i>XCL</i> | <i>HUMANA</i> |
|------------|---------------------------------------|
| 1 | Linfotactina α /SCM-1 α |
| 2 | Linfotactina β /SCM-1 β |

d. Quimioquinas CX3C.

| <i>CX3CL</i> | <i>HUMANA</i> |
|--------------|---------------------------|
| 1 | Fractalquina/Neurotactina |

CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES DE LAS QUIMIOQUINAS.

Las quimioquinas presentan un cierto grado de similitud en su secuencia aminoacídica. Basandose en esta similitud y como ya hemos comentado previamente, las quimioquinas han sido agrupadas en diferentes familias en función del motivo formado por las dos primeras cisteínas conservadas de su secuencia. Un examen de las estructuras primarias indica que aquellas quimioquinas que se unen a receptores diferentes presentan entre un 15% y un 50% de identidad, que afecta principalmente a zonas con residuos de cisteína y prolina, pero fuera de ellas hay poca identidad. Sin embargo, la comparación de las estructuras tridimensionales conocidas indican una similitud en el plegamiento del esqueleto proteico. De hecho, las quimioquinas son un ejemplo claro de como secuencias muy diversas pueden generar una estructura similar.

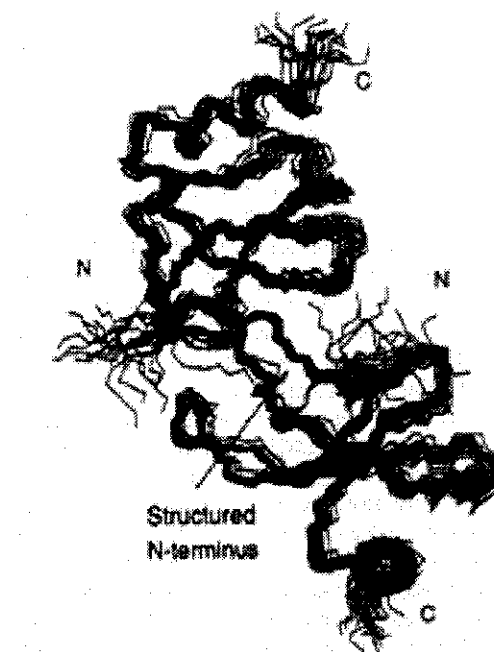


Figura 1. Estructura tridimensional de dímeros de RANTES. Superposición de las posibles estructuras simuladas sobre la estructura promedio (Crump *et al.* 1998).

Los datos existentes sobre la estructura terciaria de las quimioquinas revelan que todas ellas, salvo PF4 que es un tetrámero (St Charles *et al.* 1989), forman dímeros, siendo globulares los de la familia CXC y elongados los de la CC (Clore *et al.* 1990 ; Lodi *et al.* 1994; Clore *et al.* 1995 ; Crump *et al.* 1998 ; Crump *et al.* 1997). De forma general, se distingue la presencia de tres láminas beta y una alfa hélice en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). La dimerización se produce precisamente por esa zona C-terminal y es similar tanto en las quimioquinas que pertenecen a la familia CXC como a la CC (Figura 1).

La relevancia fisiológica de la dimerización, es sin embargo bastante controvertida. Por un lado, la concentración a la que las quimioquinas son biologicamente activas es mucho menor que la necesaria para su dimerización, lo que sugiere que su forma activa sería la monomérica. De hecho, construcciones de IL-8 que son incapaces de dimerizar mantienen por completo su actividad biológica. Por otro lado, algunos datos apuntan en otra dirección. Así, variantes del MCP-1 que no se unen eficientemente a su receptor, si que son potentes antagonistas cuando se añaden junto al MCP-1 nativo, sugiriendo la posibilidad de que le secuestren por formación de heterodímeros con el MCP-1 variante. La realidad es que la existencia de dímeros, activos o no, tiene su importancia, sobre todo en farmacología, ya que permite pensar en nuevas dianas para modificar la actividad de las quimioquinas (Paolini *et al.* 1994 ; Rollins, 1997).

Mención especial requieren los análisis estructurales para definir los motivos importantes para su actividad. Ya ha sido mencionada anteriormente la importancia de los residuos cisteína, residuos que han permitido la clasificación de las quimioquinas en diferentes familias. La presencia de estas cisteínas bien adyacentes o separadas por uno o más aminoácidos implica una actividad diferencial; este hecho estructural define, por lo tanto, la especificidad de las quimioquinas por una familia u otra de receptores. El extremo amino terminal de las quimioquinas es crucial para la actividad, aunque su alteración no modifica su capacidad de unión al receptor. Existen numerosas quimioquinas modificadas en su extremo N-terminal, modificación que las confiere actividad antagonista (Gong *et al.* 1995 ; Gong *et al.* 1996 ; Arenzana-Seisdedos *et al.* 1996. ; Simmons *et al.* 1997 ; Proost *et al.* 1998), aunque parece que modificaciones en esta región no afectan por igual a quimioquinas de la familia CC que a las CXC, por ejemplo, deleciones de este extremo de la quimioquina CXC GCP-2, no afectan a su actividad (Proost *et al.* 1998). Como ya hemos comentado antes, la

presencia o no del motivo ELR en las quimioquinas CXC origina cambios drásticos en su actividad (Clark-Lewis *et al.* 1991. ; Hebert *et al.* 1991). Se ha demostrado que al introducir éste motivo en PF4, esta molécula puede unirse a los receptores de Interleuquina 8, lo que implica por lo tanto un cambio en su actividad (Clark-Lewis *et al.* 1993). El extremo carboxilo-terminal juega también un papel importante ya que está implicado en la unión a moléculas presentadoras, como es el caso de los glicosaminoglicanos.

PAPEL BIOLOGICO DE LAS QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas fueron descritas en un principio como mediadores inducibles de la atracción de leucocitos en los procesos inflamatorios, de ahí que se las conociera como citoquinas proinflamatorias, y de hecho son producidas por células de diversos tejidos y por los mismos leucocitos que los infiltran en condiciones patológicas. Sin embargo más tarde se han identificado una serie de quimioquinas expresadas de forma constitutiva que están implicadas en el tráfico normal y en el “*homing*” de linfocitos, es decir que cumplen funciones homeostáticas. Así quimioquinas como TARC, ELC, SLC y DC-CK1 se expresan de forma constitutiva y en altas concentraciones en el timo, los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides y atraen a aquellos linfocitos T y B que expresan los receptores adecuados en su superficie

Las quimioquinas están implicadas en una gran variedad de actividades, algunas de las cuales son comunes a las diferentes familias, mientras otras son específicas de un determinado grupo. Además de sus funciones reguladoras de la migración, estas proteínas también ejercen otras funciones de gran importancia. Así la delección del gen del receptor CXCR4 es letal en el ratón, observándose en ellos una serie de defectos graves en el desarrollo no sólo del sistema inmune sino también del sistema circulatorio y del sistema nervioso central (Tachibana *et al.* 1998 ; Zou *et al.* 1998). Lo mismo ocurre con ratones que carecen de SDF-1 α , el ligando del CXCR4, animales que mueren *in utero* con graves alteraciones en el desarrollo del sistema circulatorio y del sistema inmune (Nagasawa *et al.* 1996.). Dentro de las múltiples acciones en las que las quimioquinas juegan un papel relevante deben ser destacadas:

1. **Migración celular.** La migración de células desde el torrente circulatorio hasta un tejido determinado es un proceso que requiere de una serie de eventos secuenciales

coordinados, que implican cambios morfológicos en las células, lo que las permite adherirse a la superficie endotelial de los vasos, romper el endotelio y transmigrar a través de la pared vascular. Este proceso, dada su complejidad, supone un importante cambio estructural en la célula migratoria e involucra a numerosas moléculas como son las selectinas, encargadas del rodamiento de los linfocitos por la pared vascular, las moléculas de adhesión que interaccionan de forma reversible con la matriz extracelular lo que permite el movimiento celular y las quimioquinas que permiten a la célula detectar cambios en las señales de su microentorno, dirigiendo por tanto el movimiento celular (**Butcher, 1991 ; Springer, 1994; Downey, 1994**). Sin embargo, en el proceso de migración las quimioquinas además, son capaces de inducir cambios en el citoesqueleto, tales como reorganización de filamentos de actina, que permiten la polarización de las células. Así mismo, una vez extravasados los leucocitos se dirigen al tejido diana siguiendo un gradiente de quimioquinas. Por último, estas proteínas también son capaces de regular la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos, monocitos, eosinófilos y linfocitos, moléculas que juegan un papel clave en el proceso de trans migración (**Carr et al. 1996; Nieto et al. 1998 ; Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999**).

El proceso de migración dirigida por quimioquinas no ocurre solamente en la infiltración por leucocitos de los lugares de inflamación, sino que es un proceso más general, y ocurre siempre que hay un movimiento celular dirigido, como es la migración de linfocitos T desde la médula osea y el timo hasta el bazo y ganglios linfáticos o en movimientos microambientales tales como la migración de células B desde las zonas del manto a los centros germinales.

2. Inflamación e infiltración tisular. Es relativamente sencillo extender el modelo de migración de linfocitos a la infiltración leucocitaria en procesos inflamatorios. En este caso, las quimioquinas producidas en el foco inflamatorio serían responsables de la inducción de interacciones entre los leucocitos y el endotelio, lo que provoca la atracción de las células al lugar de inflamación siguiendo el gradiente quimiotáctico.

La evidencia para este modelo es básicamente indirecta, derivada de experimentos en los que unicamente se documenta la sobreexpresión de quimioquinas en los focos de inflamación (**Schluger y Rom, 1997**). Así se ha visto expresión de MCP-1 en las paredes de la aorta en primates sometidos a dietas altas en colesterol y en las placas ateromatosas. Así mismo la presencia de células inflamatorias en las

articulaciones de pacientes con artritis reumatoide coincide con la presencia de IL-8 y MCP- en el líquido sinovial. La expresión de quimioquinas también se ha descrito en otros procesos inflamatorios como son la glomerulonefritis, el asma y en el rechazo alógeno. La demostración de que las quimioquinas son responsables directa de estos procesos es compleja. En modelos animales que intentan mimetizar enfermedades humanas como es el caso de la encefalitis autoinmune que mimetiza a la esclerosis múltiple (**Godiska et al. 1995**) o la inflamación pulmonar que mimetiza al asma se ha visto una correlación directa entre la aparición secuencial de células infiltrando el sistema nervioso central (caso de la encefalitis autoinmune) o el pulmón (caso de la inflamación pulmonar) con la expresión previa y de manera coordinada de determinadas quimioquinas(**Gonzalo et al. 1996**). El uso de anticuerpos frente a algunas de estas quimioquinas disminuye la aparición de los síntomas, indicando que las quimioquinas realmente juegan un papel clave en estos procesos (**Sekido et al. 1993; Lloyd et al. 1997 ; Gonzalo et al 1998**).

3. Angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso en el que se pueden diferenciar tres etapas: vasculogénesis, que implica la maduración de células precursoras mesodérmicas en hemangioblastos; angiogénesis, proceso en el cual estas células desarrollan una red de capilares y por último, la remodelación necesaria para formar una red circulatoria funcional. Se ha descrito que parte de este proceso es deficiente en el tracto intestinal de ratones que carecen del gen del SDF-1 α o de su receptor, el CXCR4 (**Tachibana et al. 1998 ; Zou et al. 1998**). Ya se conocía que las quimioquinas que pertenecen a la familia CXC tienen efectos sobre la angiogénesis in vivo y sobre las células endoteliales in vitro. Dentro de esta familia los miembros que contienen el motivo ELR, son quimiotácticas para las células endoteliales y son angiogénicas en ensayos de vascularización en cornea de rata. Este es el caso de IL-8, ENA-78, GCP2, GRO- α , GRO- β y GRO- γ (**Kock et al. 1992**). Por el contrario, aquellas quimioquinas CXC que carecen de ELR, como son PF4, IP-10 y MIG, no sólo no presentan actividad angiogénica o quimioatrayente, sino que inhiben la angiogénesis inducida por las ELR-quimioquinas, es decir, se comportan como angiostáticos (**Strieter et al. 1995a ; Strieter et al. 1995b; Angiolillo et al. 1995**). Los datos obtenidos en ratones en los que se han delecionado genes de quimioquinas o sus receptores refuerzan la importancia de las quimioquinas en este proceso, más aún si cabe dado el hecho de que el papel del CXCR4 parece ser específico de determinados órganos. Sin embargo, la relevancia fisiológica de las propiedades angiogénicas de las quimioquinas todavía es poco claro, ya que hay ejemplos que apuntan en la dirección

contraria, como es el caso de los ratones que carecen del receptor para la IL-8 y en los cuales el desarrollo de la vasculatura no parece estar afectado (**Moore et al. 1999**).

4. Hematopoiesis. El papel de las quimioquinas en el desarrollo del sistema hematopoyético varía según el grado de madurez de los progenitores estudiados. De hecho han sido descritas quimioquinas activadoras e inhibidoras de la proliferación de estos progenitores (**Reid et al. 1999 ; Verfaillie, 1996 ; Cook, 1996**). Estas diferentes actividades son independientes de la pertenencia a una determinada familia de quimioquinas y de la presencia o no del motivo ELR. Si parece estar claro el papel que SDF-1 α juega en el desarrollo de las células stem (**Aiuti et al. 1997 ; D'Apuzzo et al. 1997**). De hecho los ratones con el gen del SDF-1 α delecionado, presentan deficiencias en el normal desarrollo del sistema hematopoyético (**Nagasawa et al. 1996**).

5. Efectos anti-tumorales de las quimioquinas. A raíz de la implicación de las quimioquinas en la angiogenesis y el papel de algunas de ellas en la inhibición de la proliferación de células hematopoyéticas y células endoteliales stem, se pensó que las quimioquinas podían tener un papel inhibitorio directo sobre células tumorales. De hecho, el MCP-1 fue descrito en un principio como agente anti-tumoral y también se conoce la capacidad de la IL-8 para inhibir directamente el crecimiento de líneas tumorales de pulmón *in vitro* (**Rollins y Sunday, 1991 ; Wang et al. 1996**). Es más conocido, sin embargo, el papel de las quimioquinas para aumentar la respuesta antitumoral dependiente de células T. De hecho cuando células tumorales son transfectadas con genes de diversas quimioquinas, como son MCP-1, IP-10, TCA3 o linfotactina, y por lo tanto capaces de expresarlas, no dan origen al crecimiento de tumores al ser inyectadas en ratones, lo que asigna un papel anti-tumoral a estas quimioquinas (**Rollins y Sunday, 1991 ; Cao et al. 1995 ; Laning et al. 1994 ; Dilloo et al. 1996**).

6. Efectos sobre la infección por HIV-1. El virus que causa el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) penetra en las células diana mediante su interacción con diversos receptores presentes en la superficie celular. Esta infección presenta una especificidad, existiendo cepas capaces de infectar linfocitos T (cepas T-tropicas), cepas que infectan fundamentalmente a monocitos (cepas M-tropicas) y cepas que pueden infectar ambos tipos celulares. La presencia de CD4, molécula descrita

como receptor para éste virus, en la superficie de estas células explicaba la infección por HIV-1, pero no explicaba el tropismo de las diferentes cepas.

La primera relación entre las quimioquinas y el HIV viene de la descripción de MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES como agentes capaces de inhibir la infección por cepas M-trópicas (Cocchi *et al.* 1995), lo que llevó a diferentes grupos al estudio de las interacciones entre este virus y el receptor para estas quimioquinas, el CCR5 (Alkhatib *et al.* 1996 ; Deng *et al.* 1996). Actualmente está aceptado el hecho de que tanto el CCR5, como otros receptores de las familias CC (CCR2, CCR3, CCR8) y CXC (CXCR4) son, junto al CD4, co-receptores para diferentes cepas de HIV (Doranz *et al.* 1996). La expresión selectiva de estos receptores en diferentes tipos celulares explica el diferente tropismo de las cepas de HIV-1. El CD4 actuaría como concentrador de virus en la membrana celular provocando en él los cambios conformacionales necesarios que le permiten interactuar con los receptores de quimioquinas. Así mismo se han descrito diversos casos de infección por HIV-1 independiente de CD4, pero en todos los casos si que es necesaria la presencia de receptores de quimioquinas (Edinger *et al.* 1997). En la actualidad a las diferentes cepas del HIV-1 se las clasifica en función del receptor de quimioquinas con el que interactúan, denominándose cepas X4 a aquellas que interactúan fundamentalmente con el CXCR4, y cepas R5, a las que interactúan con el CCR5 (Berger *et al.* 1998). Este descubrimiento convierte a estos receptores en nuevas dianas para la búsqueda de una terapia anti-HIV-1 efectiva. Este interés aumenta más si cabe por el hecho de que mutaciones que afectan a la expresión de estos receptores disminuyen considerablemente la posibilidad de infección. De hecho individuos homocigotos para una mutación del CCR5 que origina una delección de 32 pares de bases en el CCR5, no se infectan con el HIV-1 a pesar de pertenecer a poblaciones de alto riesgo, debido a la falta de expresión en la membrana celular de éste receptor (Dean *et al.* 1996).

7. Respuestas Th1/Th2. Un punto importante en el conocimiento de la naturaleza de la respuesta inmune es la divergencia de los linfocitos T helper (Th) en células Th1 y Th2. Las células Th1 producen γ -interferón (IFN- γ) e IL-2, mientras que las Th2 producen principalmente IL-4, IL-5 e IL-10. La acumulación de linfocitos de uno u otro subtipo, influye en el curso de la respuesta inmune local. Parece factible que como parte de sus diferentes funciones efectoras, las células Th1 y Th2 puedan adquirir la

capacidad de migrar a diferentes tejidos. Pues bien, se ha visto que las células Th1 y Th2 difieren en cuanto a la expresión de receptores de quimioquinas (**Bonecchi et al. 1998 ; Sallusto et al. 1998a ; Zingoni et al. 1998**). Así las células Th1 expresan preferentemente CCR5 y CXCR3, mientras que CCR3, CCR4 y CCR8 parecen ser característicos de linfocitos Th2. Otros receptores como el CCR2 y CXCR4 se expresan tanto en las células Th1 como en las Th2, mientras que CCR7 y CXCR4 también se expresan en células Th0. Estos datos de expresión de receptores correlaciona perfectamente con la atracción específica que inducen las quimioquinas correspondientes sobre estas poblaciones (**Qin et al. 1998**).

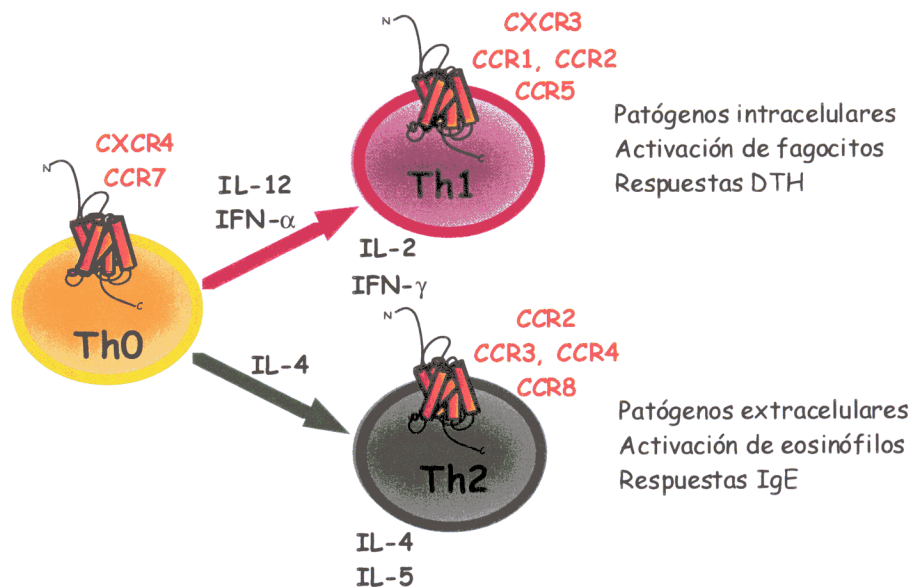


Figura 2. Las quimioquinas en las respuestas Th1 y Th2. Esquema de la expresión de receptores de quimioquinas durante la diferenciación de linfocitos T "helper". (F. Sallusto et al, 1998).

Por otro lado se conoce que citoquinas implicadas en una u otra respuesta también afectan a la expresión de receptores de quimioquinas. Por ejemplo, tanto TGF β , que promueve respuestas de tipo Th2, como IFN γ , que promueve respuestas de tipo Th1, regulan positivamente la expresión de CXCR4. Estos datos indican que la diferenciación de las células T puede requerir de la capacidad migratoria así como de la producción diferencial de citoquinas. Además las quimioquinas pueden formar parte de mecanismos efectores y de amplificación de las respuestas tipo Th1 y Th2, como

indica el hecho de que quimioquinas de la familia CC como MCP-1, RANTES y MIP-1 α sean capaces de inducir la activación y/o diferenciación de linfocitos (**Sallusto et al. 1998b**). Recientemente se ha descrito que las células Th1 y Th2 además de distinguirse por el patrón de citoquinas que producen y los receptores de quimioquinas que expresan en su superficie, también se diferencian entre sí por la expresión de determinadas quimioquinas tanto in vitro como in vivo (**Bradley et al. 1999**). La producción de quimioquinas coincide con la expresión de los receptores correspondientes, hecho que sugiere una regulación auto y/o paracrina del reclutamiento de linfocitos T por parte de las quimioquinas (**Figura 2**).

8. Funciones homeostáticas en tejidos linfoides. Durante el desarrollo y la diferenciación, los linfocitos, tanto B como T, se mueven entre diferentes compartimentos. Aunque conocemos algunos de los elementos que intervienen en este tráfico, como es el caso del papel asignado a algunas quimioquinas y moléculas de adhesión en el reconocimiento de los lugares de homing, es difícil desenmarañar la regulación de este tráfico celular. De especial interés son un grupo de nuevas quimioquinas entre las que destacan TARC, MIP-3 β , SLC, MIP-3 α y DC-CK1, que se expresan en altos niveles, de forma constitutiva, en timo, ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides (**Adema et al. 1997 ; Vicari et al. 1997 ; Yoshida et al. 1998**) . Todas ellas son capaces de atraer linfocitos T y la mayoría también atraen a los linfocitos B. De hecho se han descrito receptores específicos, como son CCR4 para TARC, CCR6 para MIP-3 α y CCR7 para MIP-3 β en células B. La producción de todas estas quimioquinas en regiones muy concretas junto a su aparente selectividad por receptores que se expresan en linfocitos, sugiere que están implicadas en la regulación del tráfico de linfocitos en condiciones fisiológicas y durante el desarrollo. Un ejemplo de estas funciones, es el caso del CXCR5 y su ligando BCA-1/BCL (**Förster et al. 1996 ; Legler et al. 1998**); los ratones que carecen de este receptor tienen pérdida de ganglios linfáticos inguinales y un desarrollo defectuoso de los folículos primarios, de los centros germinales del bazo y de las placas de Peyer.

Así mismo, recientes trabajos con ratones a los que se les ha delecionado el gen del CXCR4 o de su ligando (SDF-1 α), indican la importancia de esta quimioquina y de su receptor en el desarrollo embrionario. La deleción de uno de estos genes es letal, pudiendo apreciarse diversos defectos tanto a nivel hematopoyético como en el

desarrollo del cerebro (Nagasawa *et al.* 1994 ; Nagasawa *et al.* 1996 Zou *et al.* 1998).

A la importancia de las quimioquinas en funciones homeostáticas se añade el papel, recientemente descrito, que juegan quimioquinas como SLC/6Ckine y MIP-3 β /ELC en la migración de las células dendríticas a las regiones de células T de los órganos linfoides (Dieu *et al.* 1998 ; Cyster, 1999). Así se ha visto que la quimioquina SLC/6Ckine y su receptor, CCR7, participan en la migración de las células dendríticas maduras desde la piel hasta los ganglios linfáticos (Saeki *et al.* 1999) y que ratones que carecen de la expresión de esta quimioquina presentan defectos en la localización de las células dendríticas (Gunn *et al.* 1999). Seguramente es esta función una de las que hoy en día más atrae a los diferentes grupos de investigación. Tanto es así que las últimas tendencias sugieren clasificar a las quimioquinas en base al papel que juegan en situaciones inflamatorias o constitutivas.

9. Transplante. Como consecuencia del transplante se suelen producir procesos inflamatorios que están caracterizados por una infiltración de células mononucleares, fundamentalmente macrófagos, linfocitos T y de forma ocasional, eosinófilos (Gröne, 1996). El reclutamiento de estos leucocitos desde la circulación periférica hasta el órgano transplantado requiere la participación de una serie de moléculas que se expresan en la superficie del endotelio y en los leucocitos. Las características de este fenómeno sugieren que las quimioquinas jueguen un papel importante y así se ha implicado a las quimioquinas IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β en la patogénesis del rechazo agudo (Pattison *et al.* 1994 ; Grandaliano *et al.* 1997). Los diferentes estudios realizados hasta el momento sugieren que terapias basadas en el bloqueo de quimioquinas y sus receptores pueden tener un efecto favorable en la supervivencia de los transplantes (Gröne, 1999).

RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS: ESTRUCTURA Y FUNCION.

Las quimioquinas ejercen su actividad mediante la interacción con receptores presentes en la membrana de las células diana. Estos receptores se caracterizan por presentar sus aminoácidos hidrofóbicos organizados en segmentos que atraviesan la membrana siete veces por lo que se les agrupa dentro de la generalidad de receptores denominados receptores 7TM o GPCR (G Protein Coupled Receptor) (**Figura 3**) (**Amatruda et al. 1993**). Esta superfamilia de receptores se encuentran en una gran variedad de organismos y están implicados en la transmisión de señales al interior de las células mediante la interacción con proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Son capaces de responder a una gran variedad de agentes como son hormonas, neurotransmisores, quimioquinas, análogos lipídicos, pequeños péptidos, proteínas y estímulos sensoriales tales como la luz, el gusto y el olor. Estas proteínas constan de una secuencia de aproximadamente 350 amino ácidos y un peso molecular de unos 40 kDa. En general la organización espacial que adoptan es en forma de tonel lo que define una serie de dominios extra y otros intracelulares según queden a un lado u otro de la membrana celular. De hecho el extremo amino terminal junto a los bucles extracelulares actuarían conjuntamente en la unión del ligando, mientras que las regiones intracelulares, incluyendo el extremo carboxilo terminal, intervienen en la traducción de las señales activadas tras la unión del ligando (**Ahuja, et al. 1996 ; Monteclaro y Charo, 1996 : Monteclaro y Charo, 1997**). En los dominios extracelulares también se localizan lugares susceptibles de glicosilación así como diversas cisteínas, que mediante la formación de puentes disulfuro contribuyen a la topología de estos receptores, dando lugar a estructuras implicadas en la interacción con el ligando (**Baldwin, 1994**). En los bucles intracelulares se localizan las regiones de interacción con moléculas de señalización como las proteínas G así como aminoácidos que son diana para la actuación de serin/treonin quinasas específicas de estos receptores denominadas GRKs (G-protein Receptor Kinase), imprescindibles para la desensibilización e internalización de estos receptores (**Hamm y Gilchrist, 1996 ; Pitcher et al. 1998**). Dentro de la similitud que tienen con el resto de la familia de GPCR, los receptores de quimioquinas presentan algunas características estructurales propias, como es la secuencia de aminoácidos DRYLAIV, presente en el segundo bucle intracelular, lo que ha facilitado, por ejemplo, el clonaje de muchos de ellos aún antes de conocer un ligando o una función para los mismos (**Murphy, 1994**). Una representación esquemática de estos receptores se muestra en la **Figura 3**. A pesar de las diferentes familias de GPCRs y sus distintas funciones, todos ellos

mantienen una estructura central muy conservada, que es la formada por las regiones transmembrana y cuya modificación conformacional está relacionada con la activación del receptor.

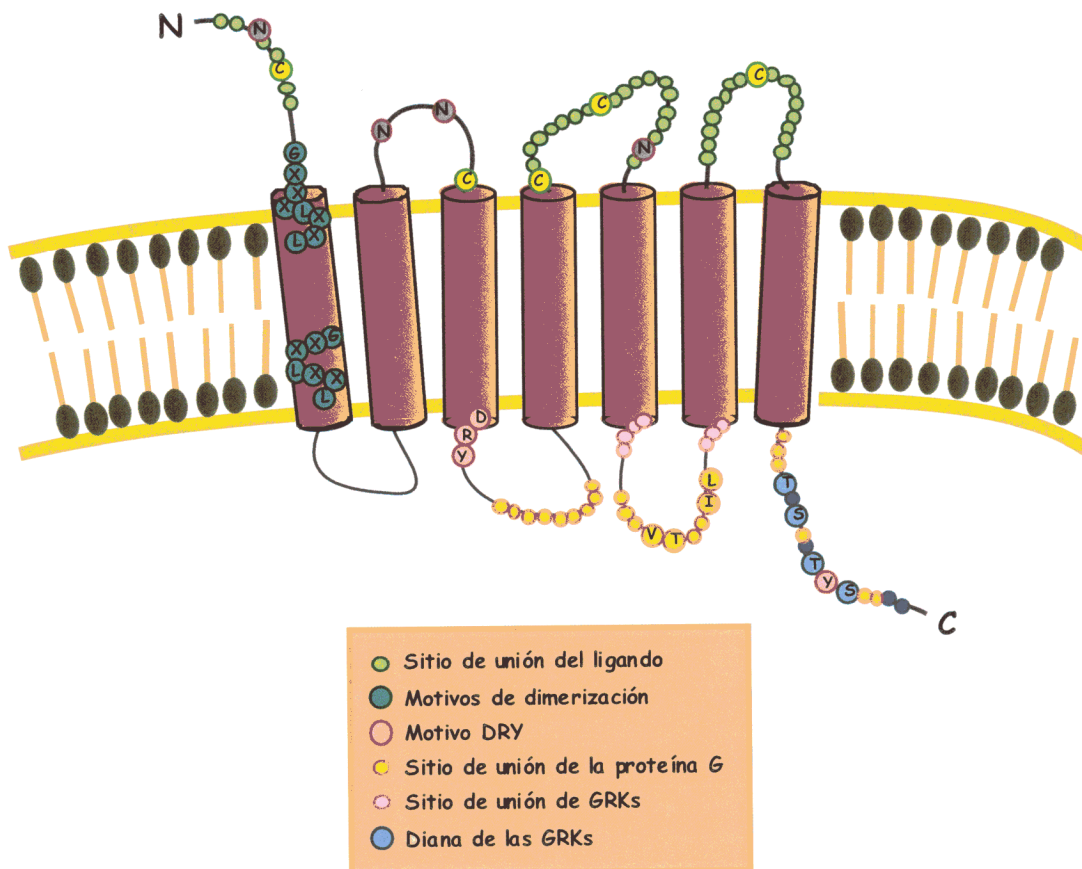


Figura 3. Representación esquemática de los receptores de quimioquinas y de aquellas regiones de interés funcional.

Como ocurre en el caso de las quimioquinas, los receptores también pueden agruparse en dos grandes familias, CCR y CXCR, que interactúan con quimioquinas de la familia CC y CXC respectivamente. Un resumen de los receptores conocidos, junto a sus ligandos y las células que los expresan se muestra en la tabla II. Uno de los grandes problemas en el estudio de las quimioquinas y de sus receptores es que una misma quimioquina puede unirse a diferentes receptores y que un mismo receptor es capaz de activarse por la unión de diferentes quimioquinas. No está claro como las

quimioquinas pueden conseguir tan alta diversidad funcional, unas veces altamente específica y otras veces redundante, mediante su unión a un número aparentemente limitado de receptores (Devalaraja y Richmond, 1999). Un determinado receptor se puede expresar en una gran variedad de poblaciones celulares y una misma población celular puede expresar una amplia variedad de receptores diferentes (Baggiolini, 1998 ; Luster, 1998).

Tabla II. Receptores de quimioquinas: Ligandos y tipos celulares que los expresan.

| FAMILIA | RECEPTOR | QUIMIOQUINA | TIPO CELULAR |
|---------|-------------|--|-----------------------|
| CXC | CXCR1 | IL-8, GCP-2 | Ne |
| | CXCR2 | IL-8, ENA-78, GCP-2, NAP-2, GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ | Ne |
| | CXCR3 | IP-10, MIG | NK, T* |
| | CXCR4 | SDF-1 | Mo, Tr, DC, B |
| | CXCR5 | BCA-1 | B |
| CC | CCR1 | RANTES, MCP-2/3, MIP-1 α | Eos, Mo, T*, DC |
| | CCR2 | MCP-1/2/3/4 | Ba, Mo, T*, DC, NK, B |
| | CCR3 | Eotaxina, MCP-2/3/4, RANTES | Eos, Ba, DC |
| | CCR4 | TARC | T*, DC |
| | CCR5 | MIP-1 α/β , RANTES | Mo, T*, DC, NK |
| | CCR6 | MIP-3 α | DC |
| | CCR7 | MIP-3 β | T* |
| | CCR8 | I-309 | Mo |
| | CCR9 | TECK | |
| | CCR10 | MCP-1/3 | |
| CX3C | CX3CR1 | Fractalquina | NK/T |
| C | desconocido | Linfotactina | T |

T: linfocitos T (T*=activadas; Tr=resting)

B: Linfocitos B

NK: células asesinas naturales

DC: células dendríticas.

Mo: Monocitos.

Ba: Basófilos.

Ne: Neutrófilos.

Eos: eosinófilos.

Hasta ahora se han descrito 5 receptores para las quimioquinas CXC y 10 para las CC., que se detallan en la **tabla II**. Como se puede observar, la casi totalidad de estos receptores son capaces de unir más de una quimioquina distinta, y una misma quimioquina puede interactuar con más de un receptor, aunque se mantiene la

dicotomía CC/CXC. Así RANTES se puede unir a los receptores CCR1, CCR3 y CCR5, MCP-3 al CCR1, CCR2 y CCR3, etc. Existen unas pocas excepciones, como es el caso de eotaxina, cuyo único receptor conocido hasta el momento es el CCR3. Otras quimioquinas de la familia CC que también parecen presentar especificidad por un único receptor son TARC, MIP-3 α , MIP-3 β , I-309 y TECK que presentan especificidad por CCR4, CCR6, CCR7, CCR8 y CCR9 respectivamente. El hecho de que tanto estas quimioquinas como sus receptores sean los últimos en haber sido caracterizados, sugiere que estos datos puedan verse modificados en un futuro próximo, apareciendo nuevas quimioquinas capaces de interactuar con ellos y nuevos receptores a las que se puedan unir estas quimioquinas (**Nelson y Krensky, 1998** ; **Ward et al. 1998**)

La promiscuidad que presentan los receptores para las quimioquinas de la familia CC, no se mantiene en la familia CXC. En este caso se da una mayor especificidad. Así el SDF-1 α se une exclusivamente a CXCR4, siendo por lo tanto su único ligando conocido. Las quimioquinas ENA-78, NAP2 y las de la familia GRO, sólo se unen al CXCR2. IP10, I-TAC y MIG sólo se unen al CXCR3 y el denominado CXCR5 (BRL1) también presenta una alta especificidad por la quimioquina BCA-1. En esta familia de receptores, la excepción viene dada por la IL-8, que junto al GCP-2, es capaz de unirse tanto al CXCR-1 como al CXCR-2, aunque la interacción con ambos receptores es completamente distinta en cuanto a la afinidad de la misma y a las regiones implicadas en la unión.

A Fractalquina, representante único del nuevo grupo de quimioquinas CX₃C, le corresponde también un receptor único, el CX₃CR-1. Existen numerosas quimioquinas cuyo receptor aún no ha sido caracterizado, como es el caso de MDC, HCC-1, MIP-3 β , linfotactina, etc. Así mismo existen también candidatos para ser receptores de quimioquinas, cuyo ligando todavía no se conoce (**Rollins, 1997**), y por lo tanto, no están incluidos en las listas de receptores con nombre oficial aceptado.

Un grupo aparte dentro de la familia de receptores de quimioquinas lo forman los receptores de quimioquinas promiscuos y los codificados por virus. Los receptores promiscuos, son capaces de unir quimioquinas tanto CC como CXC, y el único ejemplo de este tipo de receptores es el receptor eritrocitario de quimioquinas (DARC). DARC se corresponde con el antígeno Duffy de los eritrocitos y se ha visto que posibilita la

entrada en la célula del *Plasmodium Vivax*. Al no ser capaz de señalizar en respuesta a quimioquinas, se sugiere que puede tener un papel en la regulación de los niveles circulatorios de quimioquinas. Se conocen también algunos virus capaces de codificar receptores de quimioquinas, como es el caso del US28 del *Citomegalovirus* o el ECRF3 del *Herpes virus saimiri*, sin embargo, su relevancia es todavía una incógnita (Chee *et al.* 1990; Ahuja *et al.* 1994).

ACTIVACION DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Los conocimientos actuales sobre señalización inducida por quimioquinas nos vienen dados por las observaciones realizadas en diversas líneas celulares, bajo diferentes condiciones experimentales. Estos hechos, junto a la falta de reactivos específicos adecuados ha impedido una caracterización detallada de las vías bioquímicas asociadas a la respuesta mediada por quimioquinas. Además gran parte de la información de la que disponemos actualmente está basada en los conocimientos disponibles de señalización mediada por otros GPCR (**Bokoch, 1995**). Un gran número de hormonas, neurotransmisores, mediadores locales y estímulos sensoriales, además de las quimioquinas, ejercen sus efectos en las células uniéndose a receptores acoplados a proteínas G, proteínas que unen nucleótidos de guanina. Las proteínas G son heterotrímeros formados por tres subunidades denominadas α , β y γ . Existen diferentes subunidades α , lo que da lugar a la existencia de distintas proteínas G, que se asocian con un número más limitado de subunidades β y γ . La activación inducida por el ligando provoca la unión de GTP a la subunidad α y la disociación del heterotrímero inactivo en α libre y subunidades $\beta\gamma$ que se mantienen asociadas en forma de dímeros (**Hamm y Gilchrist, 1996 ; Hamm, 1998**).

Hasta hace poco se pensaba que la subunidad α era la única responsable de la señalización, mientras que se reservaba un mero papel estructural a los dímeros $\beta\gamma$, siendo, se decía, los encargados del anclaje de la proteína G a la membrana celular. Hoy se sabe que efectivamente los dímeros $\beta\gamma$ una vez liberados del trímero, juegan un papel activo en la señalización, activando a su vez a otras proteínas. $G_{\beta\gamma}$ tiene efectos muy definidos sobre algunas isoformas de los clásicos segundos mensajeros PLC β 2 y β 3 y sobre adenilil ciclasa. También son capaces de reclutar quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) a la membrana, donde fosforilan a los receptores en residuos de serina y treonina. Otras acciones relacionadas con la presencia de dímeros $\beta\gamma$ incluyen la activación de algunos canales de calcio y potasio así como la activación de Cdc42 y la unión a miembros de la familia de Rho, como son Rho y Rac (**Gutkind, 1998**). Recientemente ha sido clonada y caracterizada una isoforma de PI3K específicamente relacionada con receptores acoplados a proteínas G y que parece ser activada por $\beta\gamma$, así como lo serían también otras quinasas como son Raf1, Tsk, etc (**Stoyanov et al. 1995**).

La subunidad α tiene actividad GTPásica intrínseca, por lo que es capaz de hidrolizar un fosfato y transformar GTP en GDP; ello hace que el heterotrímero se vuelva a reunir y la proteína G pase a su estado inactivo. Parece por lo tanto que la actividad GTPásica controla la actividad de la proteína G y de hecho se han descrito recientemente mecanismos que a ese nivel modulan la activación de las proteínas G. Este es el caso de las proteínas RGS que, actuando como catalizadores, aceleran la actividad GTPásica de $G\alpha$ (Berman y Gilman, 1998 ; Kehrl, 1998)(Figura 4).

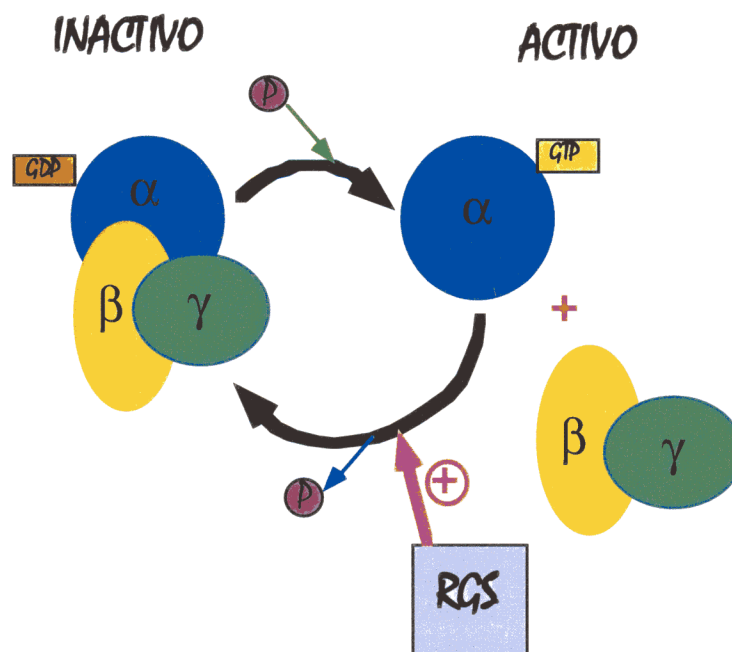


Figura 4. Representación esquemática del ciclo activación/desactivación de las proteínas G.

La activación de las proteínas G ha sido relacionada con un número limitado de efectores, entre ellos, la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$), distintas isoformas de la adenilato ciclasa y la cGMP retinal. Sin embargo el tipo de activación y las consecuencias de esa activación varía según la subfamilia de proteína G que esté implicada. Así los miembros de la subfamilia G_{α_s} estimulan la adenilato ciclasa, que catalizan la conversión de ATP en AMPcíclico, cAMP, que a su vez activa la protein quinasa dependiente de cAMP (PKA). Todos los miembros de las G_q pueden activar las distintas isoformas de la PLC. Aunque los mecanismos moleculares no están caracterizados, algunos GPCRs

pueden activar las MAP kinasas através de un proceso que depende de la estimulación por G_q de la protein quinasa C (**Bourne, 1997**).

Los miembros de la subfamilia $G_{\alpha i}$, a los cuales se acoplan la mayoría de los receptores de quimioquinas, inhiben la adenilato ciclasa, disminuyendo por lo tanto los niveles de cAMP. También se ha descrito la activación de PLC β y de la PI3K γ así como la modulación de algunos canales de calcio y potasio. Las proteínas G son sensibles a la acción de algunas toxinas; así la G_s se inactiva por efecto de la toxina del cólera y la G_i por el tratamiento con toxina de pertussis. En ambos casos se trata de inhibiciones irreversibles que inician diferentes procesos en la célula, según que el tratamiento efectuado sea con una u otra toxina, pero finalizan con la muerte celular (**Bokoch, 1995 ; Kehrl, 1998**).

A través de la unión del ligando a GPCRs acoplados a proteínas G sensibles a toxina de pertussis, se estimula Ras, un miembro de la familia de las GTPasas de bajo peso molecular. Esta activación requiere de tirosin quinastas, y así se ha visto que $G_{\beta\gamma}$ pueden activar a la familia de las Src quinastas, lo que llevaría a la fosforilación de proteínas adaptadoras y de miembros de las quinastas de adhesión focal (FAK). Así se ha descrito la fosforilación de Pyk2 y su asociación con Src activada, en respuesta a ligandos de GPCRs, fosforilación, que junto a la activación de PI3K γ podría ser necesaria para la activación de la vía de las MAP quinastas (Mitogen Activated Protein Kinases) (**Gutkind, 1998 ; Della Rocca et al. 1999**).

Las quimioquinas estimulan la activación de proteínas G

La mayoría de las respuestas activadas tras la unión de la quimioquina a su receptor son inhibibles mediante el tratamiento con toxina de pertussis (PTX) de las células, lo que indica que las moléculas señalizadoras asociadas con estos receptores son proteínas G de la familia G_i (**Murphy, 1994**). Así estudios de señalización realizados en células HEK-293 transfectadas con receptores de quimioquinas indican una potente inhibición, dependiente de ligando, de la adenilato ciclasa, consistente con la asociación de estos receptores a proteínas $G_{\alpha i}$ (**Myers et al. 1995**). Sin embargo en estos estudios, la movilización de calcio no siempre se bloqueaba por completo al tratar las células con PTX, sugiriendo que los receptores de quimioquinas pueden acoplarse a

otras proteínas G diferentes de G_i , y por lo tanto insensibles a este tratamiento, como son G_q o G_{16} . Diferentes estudios sugieren que el acoplamiento a una u otra proteína G depende tanto del receptor estudiado como de la disponibilidad de proteínas G en la línea celular objeto del estudio, (Arai y Charo, 1996 ; Al-Aoukaty *et al.* 1996).

Tras la activación del receptor, la proteína G_i heterotrimérica se disocia en el complejo $\beta\gamma$ y en la subunidad α_i unida a GTP, que permanece asociada al receptor, posiblemente mediante su interacción con una o más regiones de los bucles intracelulares del receptor de quimioquina (Arai y Charo, 1996). En este momento se ha iniciado la cascada de señalización que poco a poco va involucrando a otras moléculas en lo que supone la amplificación de señales que dará lugar a los efectos finales.

Se ha descrito activación de la PLC de manera sensible al tratamiento con PTX, a través del complejo $\beta\gamma$ (Jiang *et al.* 1996), aunque en un principio, la activación de PLC principalmente se produce por proteínas G insensibles a PTX como es la G_q (Wu *et al.* 1993). La activación de PLC origina la hidrólisis de fosfoinositido bisfosfato (PIP2) para formar inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 interacciona con receptores específicos en el retículo endoplasmático y moviliza el calcio de sus almacenes intracelulares, pero además es metabolizado por una protein quinasa que le fosforila en posición 3, originándose inositol tetrafosfato (IP4), molécula que actúa como un segundo mensajero implicado en el control de la movilización de calcio a través de canales específicos de membrana. El calcio y el DAG activan diversas isoformas de protein quinasa C (PKC) que a su vez puede activar diversas cascadas de señalización, tanto citoplasmáticas como nucleares (Wilcox *et al.* 1993).

Se conoce que las quimioquinas de la familia CC inducen la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) y liberación de ácido araquidónico en monocitos (Locati *et al.* 1994 ; Dennis, 1994). El ácido araquidónico parece estar implicado en la respuesta quimiotáctica; de hecho inhibidores de PLA₂ disminuyen la migración de monocitos en respuesta a quimioquinas de una manera dosis-dependiente (Locati *et al.* 1996). Además la fosfolipasa D (PLD) también ha sido implicada en el tráfico de vesículas y en transformación celular en respuesta a quimioquinas (Billah y Anthes, 1990). Aunque no está claro como las quimioquinas activan PLD, parece que las proteínas G

de bajo peso molecular (LMWG) como RhoA podrían jugar un papel relevante (**Kuribara et al. 1995**).

Por otro lado, el complejo $\beta\gamma$ liberado tras la unión de la quimioquina al receptor, regula las isoformas 2 y 3 de la PLC β , mientras que las PLC- γ 1 y δ 1 son insensibles, al menos en leucocitos (**Katz et al. 1992**). El dímero $\beta\gamma$ también actúa activando la asociación de las quinasas asociadas a receptores de proteínas G (GRK) (**Wu et al. 1998**). De hecho se sabe que en el caso de otros GPCR, como son los receptores muscarínicos M2 y M3, la asociación de $\beta\gamma$ con el receptor activado permite la formación de un complejo ternario con la GRK2, que es necesario para la fosforilación efectiva del receptor.

Uno de los efectos biológicos fundamentales mediados por las quimioquinas como es la quimiotaxis o migración celular dirigida es inhibible por el tratamiento con PTX. Aunque las respuestas a quimioquinas en diferentes poblaciones leucocitarias requiere la activación de G_i , estas células expresan otros receptores acoplados a G_i que no son capaces de inducir quimiotaxis (**Carolan y Casale, 1993**). Parece por lo tanto que la activación de G_i es necesaria pero no suficiente para que la quimiotaxis tenga lugar. Aunque no es posible excluir un posible papel de la $G_{\alpha i}$ en este proceso, el secuestro de subunidades $\beta\gamma$ es capaz de bloquear la quimiotaxis (**Arai et al. 1997a ; Neptune y Bourne, 1997 ; Lin et al. 1998**), aunque los mecanismos finales mediante los cuales $\beta\gamma$ induce estos efectos son desconocidos. Ha sido descrito que inhibidores tanto de las MAPKs p42/p44 como de PI3K no afectan a la quimiotaxis, aunque en este último caso los datos bibliográficos son controvertidos y de hecho también se ha descrito que la preincubación con Worthmanina, un inhibidor de PI3K, bloquea la migración en algunas líneas celulares (**Turner et al. 1995**). Otras vías, como es el caso de la PLC- β , tampoco parecen estar implicadas en este fenómeno ya que neutrófilos derivados de ratones KO de PLC- β son capaces de migrar. La desensibilización de receptores de quimioquinas tampoco es necesaria para la quimiotaxis (**Arai et al. 1997b**), de hecho un mutante del CCR2 en el cual las serinas y treoninas del carboxilo terminal han sido reemplazadas por alaninas, y que por lo tanto tiene disminuida su capacidad de internalización, es capaz de mediar la migración inducida por el MCP-1 (**Arai et al. 1997b**). Sin embargo, experimentos empleando variantes de delección del extremo carboxilo terminal de este mismo receptor, indican la importancia de los amino

ácidos 316-328 tanto para la quimiotaxis como para la internalización. Finalmente, el uso de un derivado químico de la quimioquina RANTES, el AOP-RANTES, que induce movilización de calcio pero no quimiotaxis, sugiere la disociación entre la internalización y la quimiotaxis, ya que el AOP-RANTES induce internalización del CCR5 incluso más eficientemente que el ligando natural, RANTES, a pesar de su incapacidad de inducir quimiotaxis (**Mack et al. 1998**).

El fin de la activación de la proteína G lo marca la actividad GTPásica de la subunidad α . La hidrólisis de GTP a GDP que permanece unido a la proteína, promueve la disociación de la subunidad α de los efectores y reasociación con el complejo $\beta\gamma$. La baja actividad hidrolítica intrínseca de GTP que poseen las proteínas $G\alpha$ está regulada por la interacción con proteínas denominadas GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPásica). Las GAPs fueron identificadas inicialmente como reguladoras de factores de síntesis proteica y de GTPasas de bajo peso molecular como Rho. Recientemente ha sido descrita una familia de GAPs para las proteínas $G\alpha$, conocidas como Reguladores de la Señalización por proteínas G o proteínas RGS, que actúan como reguladores negativos de las proteínas G mediante la interacción directa con $G\alpha$ de modo que esta subunidad no puede interactuar con los efectores correspondientes o con el complejo $\beta\gamma$ (**Berman y Gilman, 1998**). Todavía se desconoce como están reguladas estas RGS *in vivo*, y tampoco ha sido demostrado su papel en la señalización mediada por quimioquinas.

Quimioquinas y GTPasas de bajo peso molecular (LMWG)

La quimiotaxis requiere de respuestas altamente especializadas que implican cambios en la forma celular, polimerización/despolimerización de actina, y adhesiones celulares mediadas por la interacción de integrinas con sus ligandos (**Laudanna et al. 1996 ; Machesky y Hall, 1997**). Estos procesos están modulados por nucleótidos de guanina y posiblemente estén regulados por miembros de la familia de proteínas capaces de unir GTP, más concretamente las de bajo peso molecular (LMWG). De acuerdo con el papel que juegan en la regulación de actividades similares en otros tipos celulares, no es sorprendente que los leucocitos expresen una gran variedad de LMWG relacionadas con Ras, entre las que se encuentran el propio Ras, Rho, Rac, Cdc42 y Arf (**Bokoch, 1991 ; Bokoch y Der, 1993 ; Hall, 1993**).

Es factible que Rho y Rac jueguen un papel importante en diversas funciones leucocitarias por su capacidad de modular el montaje-engarze de los filamentos de actina (**Ridley, 1995**). Por ejemplo, la estimulación con IL-8 origina la activación de Rho, Rac y Cdc42, que están implicadas en la regulación de fenómenos de adhesión focal, lamelipodios y filopodios, respectivamente. Rho también es necesario para la respuesta motriz de los fibroblastos Swiss 3T3 (**Takaishi K. 1993 = 52B**). El tratamiento de neutrófilos con la ADP ribosiltransferasa de *Clostridium botulinum* C3, desorganiza la red de microfilamentos de actina, inhibiendo la movilidad inducida por quimioatrayentes de estas células (**Stasia et al. 1991**). La vía mediante la cual los receptores de quimioquinas se conectan con las LMWG, todavía no se conoce, aunque podría involucrar al complejo $\beta\gamma$. De hecho se ha descrito que el complejo $\beta\gamma$ puede inhibir la unión del GTP[γ s] a Rac y Rho, pero no a Cdc42 (**Harhammer et al. 1996**). El secuestro de $\beta\gamma$ libre puede entonces promover la acumulación de formas de Rac y Rho unidas a GTP, que podrían inhibir la endocitosis. Más aún, publicaciones recientes sugieren la interacción entre proteínas de la familia de Rho con subunidades de las proteínas G (**Fromm et al. 1997 ; Buhl et al. 1995**), así como la demostración de vías de señalización que conectan los GPCR con la quinasa c-jun, en las que estaría implicada la acción de $\beta\gamma$ sobre una vía dependiente de Ras y Rac-1 (**Coso et al. 1996**).

La importancia de la relación entre los receptores de quimioquinas y estas LMWG reside en la capacidad de las quimioquinas de activar funciones tanto migratorias como de adhesión en los leucocitos (**Campbell et al. 1998**). Los cambios inducidos por Rho en la adhesión focal, pueden implicar también a la quinasa PI3K y al PtdIns(5)P (**Chong et al. 1994**), ambos importantes para la fosforilación de actina, como ocurre en el caso de las integrinas que regulan las proteínas que unen actina (**Theriot y Mitchison, 1993**).

Las quimioquinas activan la Fosfatidilinositol 3-quinasa.

La enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) cataliza la entrada de un grupo fosfato en la posición D3 de lípidos tipo fosfatidilinositol; estos productos lipídicos han sido involucrados en las vías de señalización implicadas en crecimiento celular y en el ensamblaje del citoesqueleto (Cantley *et al.* 1991 ; Rodriguez-Viciana *et al.* 1994). Las PI3 quinasa son una compleja familia de proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica y otra reguladora. Todas forman complejos con proteínas adaptadoras que acoplan la actividad a diferentes vías de señalización (Vanhaesebroeck *et al.* 1997). Algunas de ellas, como es el caso de p110 α , β y δ , interaccionan con subunidades adaptadoras que contienen dominios SH2 (dominios de homología con src tipo 2). Otras son estimuladas por el dímero $\beta\gamma$ liberado tras la activación de la proteína G y no interaccionan con moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2; entre estas, la p110 γ (Stoyanov *et al.* 1995) que contiene un dominio de unión a Ras en el extremo amino terminal, una región quinasa y un dominio catalítico. Está ampliamente descrita la estimulación de la actividad PI3 quinasa por quimioatrayentes (Turner *et al.* 1995 ; Stephens *et al.* 1991 ; Knall *et al.* 1997). Tras la unión a su receptor, la quimioquina activa un heterodímero de PI3K capaz de fosforilar PtdIns, PtdIns(4)P y PtdIns(4,5)P₂ e interaccionar con Ras activo, esto es, unido a GTP. (Rodriguez-Viciana *et al.* 1994 ; Marte *et al.* 1997).

Sin embargo el papel que juega la activación de esta quinasa en la señalización por quimioquinas, no está tan claro ya que se han descrito diferentes efectos dependiendo de la línea celular empleada. En algunos casos se ha descrito que inhibidores de la PI3K no afectan a la quimiotaxis (Arai *et al.* 1997b ; Thelen *et al.* 1995). De hecho, el principal efecto de la inhibición de PI3K en neutrófilos parece ser el bloqueo de la actividad NADPH oxidasa (Arcaro y Wymann, 1993 ; Vlahos *et al.* 1995). Sin embargo, también se la ha relacionado con los cambios en el citoesqueleto necesarios para la polarización y la quimiotaxis (Turner *et al.* 1995 ; Stephens *et al.* 1991), así se sugiere que el dominio SH2 de la subunidad p85 es necesario para su asociación con proteínas relacionadas con el citoesqueleto, como es el caso de la p125^{FAK} (Chen and Guan, 1994). La PI3K activada a través de la estimulación del GPCR origina la formación de lípidos fosforilados en 3 que actúan como segundos mensajeros para efectores tales como PKC y AKT así como para las vías de transducción relacionadas con Ras (Shimizu y Hunt III, 1996). Sin embargo, otros

estudios relacionan la PI3K con fenómenos de adhesión mediados por integrinas, migración y polarización (Tanaka *et al.* 1998). Así, la quimioquina MIP-1 β induce la activación de integrinas y la polimerización de actina, que pueden regularse por diversas vías como son las proteínas G, tirosin quinasas, PKC, AMP cíclico y PI3 quinasa. Tanto la Worthmanina como la PTX disminuyen la polimerización de F-actina y la expresión de LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen-1) activado, e inhiben la adhesión mediada por integrinas; esta adhesión no es bloqueada por inhibidores de PKC o de tirosin quinasas. También se ha demostrado que la activación de AKT por IL-8, GRO α y RANTES, es bloqueada por el tratamiento de las células con PTX (Tilton *et al.* 1997), indicando la conexión entre G $_i$ y PI3K. La activación de la PI3K dependiente de GPCR por RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8 está implicada en la adhesión mediada por integrinas de células T y neutrófilos. El bloqueo con anticuerpos anti-quimioquinas o con oligonucleótidos anti-sentido específicos de PI3K, disminuyen la activación de LFA-1 y la adhesión mediada por integrinas, como ocurre en el caso del tratamiento con PTX. Todo esto indica la importancia del papel que juega la PI3K dependiente de los receptores de quimioquinas en la activación de integrinas necesaria para la polarización y la migración (Tanaka *et al.* 1998).

Las Quimioquinas inducen la fosforilación en serinas/treoninas de los receptores de quimioquinas.

De los datos de la literatura se puede concluir que el tráfico de las poblaciones leucocitarias es un complejo proceso controlado por un gran número de moléculas, integradas en vías de señalización muy diversas. Las células que están migrando deben ser capaces de detectar de forma continuada los cambios en el gradiente de quimioatrayentes por lo que se necesita un control muy preciso; ello se consigue con un mecanismo de encendido/apagado, en el cual la desensibilización de los receptores de quimioquinas juega un papel importante. Se sabe poco sobre los mecanismos que regulan la respuesta celular a quimioquinas, así como del papel de la desensibilización en la migración linfocitaria. Para un gran número de receptores acoplados a proteínas G, la rápida desensibilización implica la fosforilación del receptor por quinasas acopladas a GPCR (GRK) cuya actividad es inducida por el ligando (Lefkowitz, 1993). La fosforilación en residuos serina/treonina presentes en el extremo carboxilo terminal y/o en los bucles intracelulares del receptor aumenta la afinidad del mismo por proteínas del tipo de la arrestina, cuya unión impide que el receptor pueda volverse a

acoplar a la proteína G (**Bohm et al. 1997**). Diferentes artículos han demostrado que tras la estimulación con quimioquinas los receptores correspondientes, tanto de la familia CC como de la CXC, son fosforilados en serinas por GRK (**Tardif et al. 1993 ; Ali et al. 1993 ; Prossnitz et al. 1995 ; Franci et al. 1996 ; Oppermann et al. 1999**). Esta fosforilación es crítica para la funcionalidad del receptor, ya que juega un papel decisivo en su desensibilización y su internalización.

Experimentos empleando receptores de quimioquinas mutantes que carecen de los residuos Ser/Thr del extremo carboxilo terminal indican la importancia de la fosforilación de estos residuos, ya que las señales inducidas por las quimioquinas tras su unión a los mismos, no son inhibibles por la co-expresión con GRK2 (**Franci et al. 1996**). Un reciente trabajo ha demostrado que la desensibilización del CCR5 inducida por RANTES, implica directamente la fosforilación de los residuos Ser 336, 337, 342 y 349, residuos que están altamente conservados en diferentes receptores de las quimioquinas CC. Esta fosforilación puede ser realizada por distintos miembros de la familia GRK, el hecho de que sea una u otra parece más ser cuestión del modelo celular usado y de la disponibilidad de ellas (**Oppermann et al, 1999**). Así mismo, se ha observado que la respuesta a un segundo estímulo con quimioquinas no se ve desensibilizada cuando se emplean receptores de la familia CXCR en los cuales los residuos Ser/Thr del extremo carboxilo terminal han sido mutados o cuando esta porción del receptor ha sido eliminada (**Mueller et al. 1997**).

Las Quimioquinas activan la via de las MAP quinasas

Las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), también denominadas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), son activadas por la fosforilación en residuos de tirosina y treonina (**Rossomando et al. 1991; Nel et al. 1990**) y su actividad se regula por diversas proteínas que incluyen protein quinasas y factores de transcripción oncogénicos. En particular, la activación de PLA2 (**Nemenoff et al. 1993**) y de elementos del citoesqueleto (**Gotoh et al. 1991**) por MAPK sugiere que estas quinasas pueden jugar un papel importante en las respuestas celulares inducidas por quimioquinas. Así, la activación de neutrófilos con f-MLP (formil-metionil-leucinil-fenilalanina), activa Ras (**Coffer et al. 1998**), que inicia la casacada de las MAPK mediante la unión a la Ser/Thr quinasa Raf. Ras provoca la translocación de Raf desde el citoplasma a la membrana plasmática (**Leevers et al. 1994**), donde es activado mediante interacciones con miembros de la familia de proteínas 14-3-3 (**Freed**

et al. 1994 ; *Irie et al.* 1994). Tanto Raf como miembros de MEKK, otra familia de las MAP quinasas, fosforilan y activan MAPK; sin embargo todavía no ha sido descrita la activación de MEKK quinasas en respuesta a quimioatrayentes. La activación de MAPK se ha descrito tras la unión de IL-8 a los receptores CXCR1 o CXCR2 transfectados en células Jurkat (*Jones et al.* 1995).

La activación de la vía de las MAPK por quimioquinas es bloqueada en neutrófilos por el tratamiento con PTX, indicando que es una vía que está mediada por una proteína Gi. Usando células COS-7 transfectadas y co-expresión transitoria de MAPK con GPCR, las subunidades $G_{\alpha i}$ activadas son incapaces de mimetizar la estimulación inducida por el receptor de la actividad MAPK, evidencia del papel activo que juegan los dímeros $\beta\gamma$ en esta vía de señalización. Bajo diferentes condiciones experimentales, se ha demostrado que la activación de MAPK por las subunidades $\beta\gamma$ no requiere de la activación de PLC- β ni de PKC, pero si que es bloqueada por mutantes de Ras (*Koch et al.* 1994 ; *Crespo et al.* 1994) y también que las subunidades $\beta\gamma$ pueden inducir la acumulación de Ras unido a GTP, es decir, en su forma activa.

La activación de MAP quinasas mediante quimioquinas tiene diversas consecuencias funcionales. Como las MAPK pueden fosforilar y activar factores de transcripción (*Hill y Treisman, 1995*), las quimioquinas pueden estar implicadas en la regulación de la expresión de genes a través de esta vía. Más aun, la MAPK fosforila y activa PLA2 citoplasmático, lo que conduce a la liberación de ácido araquidónico (*Durstin et al.* 1994). La producción de leucotrienos inducida por ácido araquidónico es esencial para la polimerización de actina (*Peppelenbosch et al.* 1993). Todos estos datos indican una vía inducida por quimioquinas, en la que están implicadas tanto MAPK como cPLA2 que pueden regular los cambios en el citoesqueleto necesarios para la migración celular. En cualquier caso, este papel no parece ser crítico ya que SK&F 86003, un inhibidor de la MAPK p38, no tiene un efecto significativo sobre la quimiotaxis o sobre la quimioquinesis inducida por quimioquinas (*Knall et al.* 1997).

Las quimioquinas inducen actividad tirosin-quinasa.

Las quimioquinas inducen un aumento de la actividad tirosin quinasa de la célula. Se ha descrito un aumento en la activación de lyn, una tirosin quinasa relacionada con src,

en neutrófilos, inducida por quimioquinas de la familia CXC, así como un aumento en la actividad autofosforilante en tirosinas de esta quinasa, inducida por IL-8, GRO- α y NAP-2 (**Gaudry et al. 1995**). Otras tirosin quinasas activadas por quimioquinas están relacionadas directamente con los cambios en el citoesqueleto necesarios para la quimiotaxis. Así se ha visto que RANTES activa la generación de adhesiones focales en células T y la consiguiente activación celular a través de complejos moleculares formados por la quinasa p^{125FAK} y la tirosin-quinasa asociada a la cadena zeta del receptor de células T, ZAP-70 (**Bacon et al. 1996**). A través de sus dominios SH2, ZAP-70 se une a fosfotirosinas en los dominios ITAM del TCR, en un proceso catalizado por las quinasas p56lck y p59fyn (**Irving et al. 1993**). Recientemente ha sido descrito que la señalización via el receptor CCR5 induce la fosforilación y activación de la proteína quinasa Pyk2 (también conocida como RAFTK o CAK- β), perteneciente a la familia de FAK (**Ganju et al. 1998**). Esta activación origina la modulación del sistema JNK/SAPK.

Por lo que conocemos hasta el momento, las quimioquinas se unen a sus respectivos receptores y activan una amplia cascada de señales que se origina a partir de la activación de una proteína G y se amplifica mediante la intervención de otros segundos mensajeros. Sin embargo, sorprende que a pesar de los múltiples y variados efectos que están mediados por las quimioquinas, exista un conocimiento mínimo de la señalización que desencadenan. De hecho la implicación de diferentes vías en señalización mediada por quimioquinas, se debe a observaciones aisladas de señales que han sido demostradas para otros receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. La importancia de procesos en los que están implicadas las quimioquinas tales como asma, angiogénesis, desarrollo, arterioesclerosis, SIDA, etc., no sólo a nivel científico sino también económico y social, hace que el conocimiento de las vías de señalización activadas por estas moléculas sea una cuestión de máxima importancia.

Un resumen de las vías de señalización activadas por las quimioquinas se muestran en la **figura 5**.

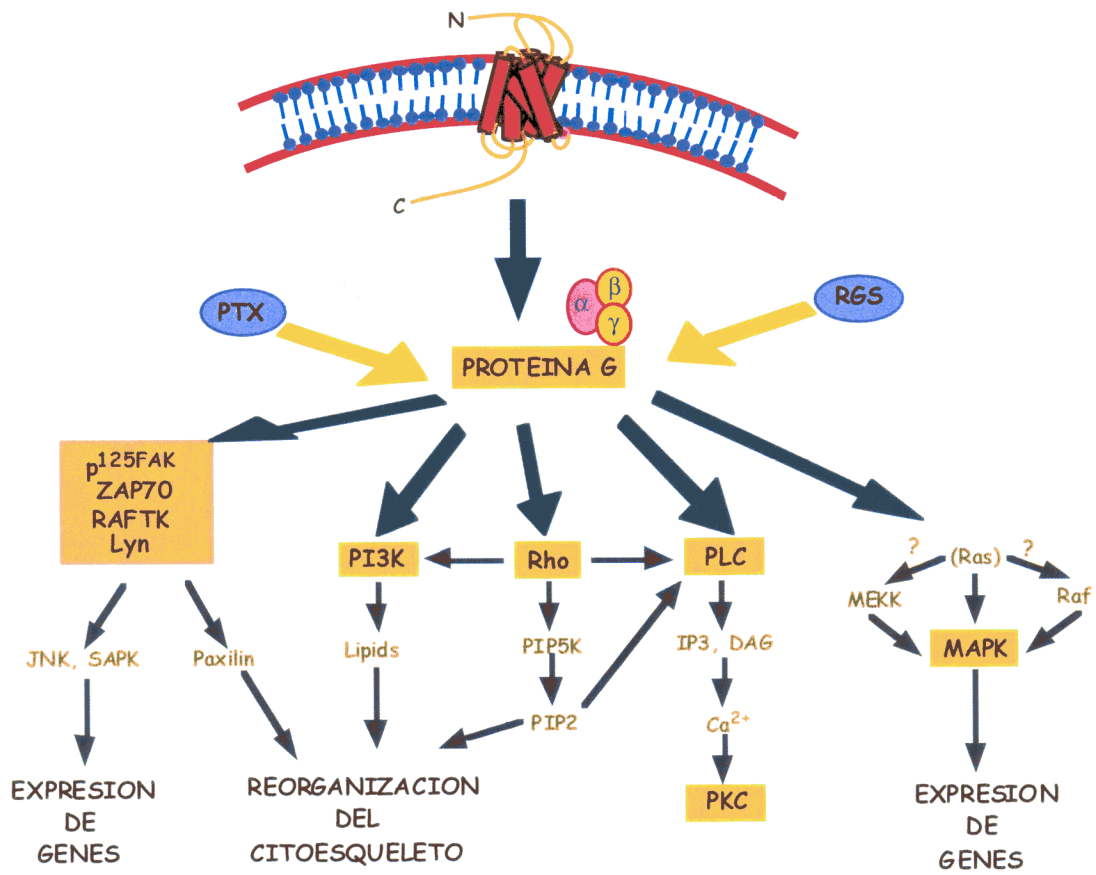


Figura 5. Resumen de las principales vías de señalización activadas tras la unión de las quimioquinas a su receptor, con atención a los segundos mensajeros implicados y a las consecuencias funcionales a las que estas vías conducen.

Papel biológico de la proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1, y de su receptor, CCR2

La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) fué una de las primeras quimioquinas de la familia CC en ser caracterizadas (**Matsushima *et al.* 1989 ; Yoshimura *et al.* 1989**). Como ocurre con la mayoría de quimioquinas, recibió diferentes denominaciones en función del tipo celular en el que fué caracterizado. Así, al MCP-1 también se le conoció como MCAF (Monocyte Chemotactic and Activating Factor), LDCF (Lymphocyte-Derived Chemotactic Factor), GDCF (Glioma-Derived Chemotactic Factor), TDCF (Tumor-Derived Chemotactic Factor) o SMC-CF (Smooth-Muscle Cell-Derived Factor). Todas estas denominaciones ya nos dan idea de los diferentes tipos celulares capaces de producirla, entre los que destacan fibroblastos, monocitos, macrófagos, linfocitos de bazo, células endoteliales y epiteliales, osteoblastos, melanocitos, astrocitos, células del cuerpo lúteo y células tumorales entre otras (**VanDamme *et al.* 1994 ; Schall, 1994**). Esta producción está regulada por diferentes estímulos, como el PDGF, IFN γ , IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-4, LPS, PMA, PHA, ConA, esteroides, dexametasona y situaciones patológicas como son la hipoxia, la formación de complejos inmunes y la infección por bacterias o virus. Se trata de una quimioquina de las conocidas como proinflamatorias y está implicada en diferentes enfermedades como son la hepatitis fulminante, artritis reumatoide, aterosclerosis, glomerulonefritis (**Lloyd *et al.* 1997**), colitis ulcerosa, rinitis alérgica, fibrosis pulmonar (**Huffnagle *et al.* 1995**), asma, sepsis (**Bossink *et al.* 1995**) e incluso procesos tumorales (**Rollins *et al.* 1991 ; Baggiolini y Dahinden, 1994 ; Hedrick y Zlotnik, 1996 ; Kunkel *et al.* 1995 ; Premack y Schall, 1996**). El MCP-1 induce la migración de distintos tipos celulares, entre los que cabe destacar a los linfocitos T (**Carr *et al.* 1994 ; Qin *et al.* 1996**), las células NK (**Allavena *et al.* 1994**), monocitos y macrófagos (**Fuentes *et al.* 1995; Horuk, 1994 ; Howard *et al.* 1996 ; Schall y Bacon, 1994**). De hecho, el uso de anticuerpos neutralizantes e incluso la obtención de ratones con el gen del MCP-1 delecionado ha demostrado su importancia en el reclutamiento de monocitos y macrófagos en modelos animales de glomerulonefritis y artritis (**Boring *et al.* 1998**).

El MCP-1 es capaz de interactuar con varios receptores, como ya ha sido indicado previamente, como son CCR2 y CCR10 (**Tabla II**). El receptor más estudiado ha sido el CCR2. Desde su descripción en 1994 (**Charo *et al.* 1994**), numerosos estudios han sido llevados a cabo demostrando las principales

el CCR2 presenta el motivo DRYLAIV en el segundo bucle intracelular. Así mismo, mediante el uso de receptores truncados en su extremo carboxilo terminal, se ha podido determinar la importancia que también esta región tiene en la desensibilización e internalización del receptor. El uso de receptores quimeras entre el CCR2 y CCR5, que presentan un alto grado de homología entre ellos, ha permitido definir la importancia del extremo amino-terminal del mismo en la especificidad por un determinado ligando, dándose el caso que receptores CCR2 con el extremo amino del CCR5 pasan a ser activados por ligandos de éste último como son el RANTES o el MIP-1 β (Monteclaro y Charo, 1996). Existen dos variantes naturales del CCR2, CCR2B y CCR2A, generadas por “*splicing*” alternativo, y que se diferencian en el extremo carboxilo terminal. La contribución de cada una de estas formas del receptor a los efectos mediados por el MCP-1 se desconoce en la actualidad.

OBJETIVOS

1. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente al CCR2 humano, con la atención puesta en obtener herramientas altamente específicas que permitan hacer un seguimiento de este receptor tanto en su forma nativo como desnaturalizada.
2. Caracterización de la expresión del CCR2 en poblaciones linfocitarias en diferentes estadios de activación.
3. Distribución del CCR2 en la superficie celular. Estudio de su localización en células con fenotipo migratorio.
4. Estudio de la implicación que el CCR2 tiene en la infección por HIV-1. Análisis de las zonas del receptor implicadas en la unión al virus.
5. Análisis de las vías de señalización activadas como consecuencia de la unión al CCR2 de la quimioquina MCP-1, con atención en aquellas vías que conducen a la activación celular y en los mecanismos implicados en la desensibilización y posterior internalización del receptor.

MATERIALES Y METODOS

1. Líneas celulares empleadas

Las células Mono Mac 1 (DSM ACC252), fueron obtenidas de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Alemania).

Las células THP1 (ATCC TIB202), Jurkat (ATCC TIB152), IM-9 (ATCC CCL-159), P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) y HEK-293 (TIB202) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EEUU). Las células endoteliales de cerebro de ratón nos fueron cedidas gentilmente por el Dr. José Carlos Gutiérrez-Ramos (Millenium Corp., Boston, EEUU).

Los linfocitos de sangre periférica o de amígdala fueron obtenidos de donantes sanos y purificados por centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (5,7 g/L, Pharmacia, Suecia). Los linfocitos así obtenidos fueron estimulados con fitohemaglutinina M (PHA, 0.5%, Difco, EEUU), ionomicina (1 μ M, Sigma Chemical Co. EEUU) o con la cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus* (SAC, 1/1000, Sigma), durante 48 a 96 horas a 37°C con 5% CO₂, en medio RPMI (Biowhittaker, EEUU), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) y antibióticos en presencia de 50 IU/ml de Interleuquina 2 humana recombinante (rhIL-2, Hoffmann-LaRoche, EEUU).

Las células B, CD19⁺, fueron purificadas a partir de linfocitos de sangre periférica o de amígdala por adhesión a bolas magnéticas (magnetic cell sorting, MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Alemania), usando anticuerpos de ratón específicos de CD19 humano acoplados a microesferas. La pureza de las células seleccionadas se determinó por citometría de flujo usando anticuerpos específicos.

Las diferentes líneas empleadas fueron crecidas en medio RPMI 1640, que contenía 10 % de suero de ternera fetal y aminoácidos no esenciales. Las células HEK-293 crecieron en DMEM (Biowhittaker, EEUU), suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS, GIBCO) y aminoácidos no esenciales. Al ser adherentes, se usó tripsina/EDTA para los pases, mientras que un tratamiento más suave, EDTA al 0.02% en PBS, fue usado cuando las células iban a ser empleadas en experimentos de señalización.

2. Quimioquinas

Las quimioquinas humanas de origen recombinante empleadas, MCP-1, MCP-3, RANTES, SDF-1 α , MIP-1 α y MIP-1 β , fueron obtenidas de Peprotech, Inglaterra.

3. Obtención de péptidos sintéticos.

Los péptidos sintéticos se obtuvieron mediante síntesis en sintetizador múltiple automático (AMS422 Abimed, Germany).

4. Obtención de anticuerpos monoclonales

Se sintetizaron péptidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos 6-20, 12-26, 24-38 y 273-293 del CCR2. Los péptidos fueron acoplados a hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH, Calbiochem, EEUU) y empleados para inmunizar ratones de la cepa Balb/c (Harlow y Lane, 1988). El protocolo de inmunización consistió de un primer pinchazo subcutáneo con el péptido acoplado a KLH (40 μ g/150 μ l de PBS) emulsionado con adyuvante completo de Freund. Esta inmunización primaria fue seguida, a los 30 y 60 días, por dosis de recuerdo con el péptido acoplado a KLH (40 μ g/150 μ l de PBS) emulsionado con adyuvante incompleto de Freund, también vía subcutánea. Los días 4 y 3 previos a la fusión, los ratones recibieron una última dosis con el péptido acoplado a KLH (40 μ g/150 μ l de PBS) vía intravenosa. Las células provenientes de los bazo o ganglios linfáticos de los animales inmunizados en cuyo suero se encontró una respuesta específica frente al péptido inmunizante y frente al CCR2, fueron fusionadas con el mieloma P3X63-Ag8.653 utilizando polietilenglicol (PEG) y protocolos previamente descritos (Harlow y Lane, 1988).

Siempre que se realizó una fusión se tuvo la precaución de plaquear solamente una parte de la misma, siendo congelado el resto, lo que nos permite trabajar con un menor número de híbridos y poder así analizarlos con más detalle. Al tener el resto de la fusión congelada, siempre se puede volver a plaquear nuevas alicuotas de fusiones de interés.

Se analizó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos frente a los péptidos inmunizantes en los sobrenadantes de cultivo de los híbridos que crecieron, mediante

técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) y los híbridos positivos se clonaron por dilución límite. La subclase de los anticuerpos se determinó por EIA usando anticuerpos específicos marcados con peroxidasa (Southern Biotechnology, EEUU). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados por precipitación con sulfato de amonio (Harlow y Lane, 1988) y por cromatografía de afinidad sobre proteína A inmovilizada en Sepharosa (Pharmacia).

5. Enzimoimmunoensayo (EIA).

Los EIAs se realizaron siguiendo protocolos anteriormente descritos. Brevemente, los péptidos sintéticos (3µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo) se adsorbieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (MaxiSorb, Nunc, Dinamarca) durante 12 horas a 4°C. Después de eliminar el péptido no unido mediante lavados con agua destilada, se bloquearon los sitios libres mediante incubación con albúmina bovina (BSA, 0.5% en PBS), durante 60 minutos a 37 °C. Los anticuerpos (diluidos o no en PBS, 0.5%BSA) se incubaron durante 90 min a 37°C seguido por lavados con agua destilada e incubación con un antisuero de cabra frente a inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa (Tago, EEUU, 1:2000 en PBS/BSA, 60 min, 37 °C). La reacción se finaliza con la adición de un substrato de la peroxidasa (orto-fenilen diamina, OPD) y lectura de la absorbancia a 492 nm (Mellado *et al.* 1997a).

Para la determinación de la subclase de los anticuerpos se empleó el mismo tipo de EIA, usando antisueros específicos para cada subclase de inmunoglobulina de ratón marcados con peroxidasa (Southern Biotechnologies).

6. Marcaje de proteínas con biotína.

Las proteínas a biotinilar se dializan frente a tampón de biotinilar (NaHCO₃ 100 mM, NaCl 150 mM, pH 9.0) y se ajusta la concentración a 1 mg/ml. Por cada mg de proteína, se añaden 100 µl de N-hidroxi-succinimidil biotina (Sigma) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mg/ml y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las proteínas marcadas se dializan frente a PBS, para eliminar la biotina no acoplada. El almacenamiento posterior se realiza a -20°C en 50% de

glicerol o a 4°C, añadiendo en éste último caso azida sódica al 0.05% como conservante.

7. Tratamiento de las células con inhibidores de proteínas G (toxina de pertussis, toxina del cólera).

Cuando fué necesario las células Mono Mac 1 o HEK-293 transfectadas con receptores de quimioquinas fueron tratadas con inhibidores de la señalización mediada por proteínas G. Las células crecidas en medio completo se incubaron con toxina de pertusiss (0.1 µg/ml, Sigma) o del cólera (0.4 µg/ml, Sigma) durante 16 horas a 37 °C. Las toxinas se mantuvieron en el medio de cultivo mientras duró el experimento (migración o movilización de calcio). La viabilidad de las células tras el tratamiento se determinó por incorporación de yoduro de propidio en citometría de flujo.

8. Tratamiento de las células con inhibidores de tirosin quinasas (tirfostinas A1 y AG490).

Como en el caso anterior, las células crecidas en medio completo se preincubaron con tirfostina AG490 o A1 (25 µM, Calbiochem) durante 12 horas a 37 °C, manteniendolas mientras duró el experimento. La viabilidad se determinó como en el caso anterior.

9. Citometría de flujo

Las células (2.5×10^5 células/pocillo) se centrifugan en placas de 96 pocillos de fondo en V y se incuban con los anticuerpos diluidos en PBS que contiene 2% BSA, 2% de suero de ternera fetal y 0.05% de azida sódica (PBS de "staining") durante 30 min a 4 °C. Después de lavarlas con PBS de staining,, son incubadas con antisueros anti-immunoglobulinas de ratón marcados con isotiocianato de fluoresceina (FITC) o ficoeritrina (PE) (40 µl/pocillo en PBS de "satining"), a diluciones que previamente se ha comprobado que presentan una unión óptima. La fluorescencia que permanece unida a las células después de lavarlas se determina en un citómetro de flujo (EPICS XL, Coulter, EEUU).

En los casos en que se necesitó una doble tinción celular, se emplearon los anticuerpos anti-CCR2 marcados con biotina (40 μ l/pocillo en PBS de "staining"), seguidos por avidina-FITC o -PE (20 μ l/pocillo en PBS de "staining"), y anticuerpos comerciales frente a los antígenos celulares de interés marcados directamente con PE o FITC (20 μ l/pocillo en PBS de staining). En estos casos, las células se incubaron primero con los anticuerpos biotinilados, seguido por la avidina y los anticuerpos comerciales marcados. La fluorescencia unida se determinó, como en el caso anterior, en un citómetro de flujo. Todos los anticuerpos empleados en estos ensayos fueron titulados previamente para determinar la dilución idónea a emplear. Como controles negativos se usaron anticuerpos monoclonales del mismo isotipo dirigidos frente a antígenos no relacionados.

10. Inmunoprecipitación, SDS/PAGE y western blot.

Para las inmunoprecipitaciones, las células HEK-293 transfectadas establemente con el CCR2 o las células Mono Mac1 convenientemente estimuladas (20 millones/punto), fueron lisadas en un tampón con detergentes (20 mM trietanolamina, pH 8,0/ 300 mM NaCl/ 2mM EDTA/ 20% (vol/vol) glicerol/ 1% digitonina, con inhibidores de proteasas) durante 30 minutos a 4°C con agitación continua, seguido por centrifugación durante 15 minutos a 15,000 X g. Los extractos así obtenidos fueron pre-tratados con 20 μ g de Agarosa anti IgG de ratón (Sigma) o Sepharosa proteína-A (Pharmacia) durante 60 minutos a 4°C, y centrifugados (15,000 x g, 1 minuto), para eliminar las posibles uniones inespecíficas a los lisados de los reactivos que se van a emplear en la inmunoprecipitación. El sobrenadante procedente de esta centrifugación, se incubó con el anticuerpo, monoclonal o policlonal, adecuado (5 μ g/punto de los mAb anti-CCR2, o la cantidad indicada por el fabricante en los anticuerpos comerciales, durante 120 minutos a 4°C). Para inmunoprecipitar los complejos con los anticuerpos monoclonales de ratón (anti-CCR2 o comerciales), se usó agarosa anti-IgG de ratón, mientras que se empleó agarosa anti-Ig de conejo o Proteína-A Sepharosa para los complejos con anticuerpos policlonales de conejo. Los complejos inmunoprecipitados se separaron en geles de SDS/PAGE, con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida entre el 7 y el 12,5 %, en función del peso molecular de la proteína a analizar. Las diferentes proteínas así separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en TBS o 2% BSA en TBS si se trataba de evaluar proteínas fosforiladas, durante 60 min. a temperatura ambiente e incubadas luego con los correspondientes anticuerpos diluidos en TBS/BSA o TBS/leche (2h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C). Después de lavar (con TBS, 0.1% Tween-20) se incubaba con los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón o conejo correspondientes, marcados con peroxidasa. Los blots se revelan finalmente por quimioluminiscencia (ECL, Pierce).

En los casos en los que fué necesario, se eliminaron los anticuerpos unidos a la membrana (Stripping), mediante la incubación de las mismas durante 60 min. a 60 °C en tampón Tris-HCl 62.5 mM, pH 7.8, que contiene 2% SDS y 0.5% de β-mercaptoetanol. Después de lavar extensamente, se bloquea la membrana como se ha indicado anteriormente quedando la misma preparada para probar nuevos anticuerpos.

La cantidad de proteína cargada en los diferentes casos se controla mediante un kit de detección de proteínas (Pierce, Rockford, Ill) y probando la membrana con el mismo anticuerpo empleado en la inmunoprecipitación, cuando fue posible..

11. Ensayos de movilización de calcio

Los cambios en la movilización de calcio se determinaron usando la sonda fluorescente Fluo-3 AM (Calbiochem). Las células ($2,5 \times 10^6$ células/ml) se resuspendieron en RPMI conteniendo 10% FCS y se incubaron con 10 µl de Fluo-3 AM (300 µM en DMSO) durante 20 minutos a 37 °C con agitación continua. Las células se lavan por centrifugación y se resuspenden en el mismo medio que contiene 2mM Cl_2Ca . Las células se mantienen a 4 °C y previamente a la adición del ligando, se atemperan a 37 °C . La liberación de calcio en respuesta a las quimioquinas o a los anticuerpos se determina en citómetro de flujo a 525 nm. Para determinar la actividad antagonista de los anticuerpos, se preincubaron las células con el anticuerpo (0.1 a 100 µg/ml en RPMI/FCS) durante 30 min a 4 °C, o bien se añadieron secuencialmente a las células cargadas.

12. Ensayos de migración celular

Para los experimentos de quimiotaxis se emplearon cámaras de transmigración de 24 pocillos (Costar, EEUU), con distinto tamaño de poro, en función del tipo celular empleado (3 micras para linfocitos, 5 micras para Mono Mac-1 y THP-1 y 8 micras para HEK-293), tapizadas con células endoteliales de cerebro de ratón (5×10^4 células/pocillo), durante 48 horas o con fibronectina ($5 \mu\text{g/ml}$) durante 2h a 37°C . Las células a migrar, se ponen en la parte superior de la cámara de migración (250,000 células en $100 \mu\text{l}$ de RPMI con FCS) y las quimioquinas o anticuerpos (0.1 a 100 nM, en $0,6 \text{ ml}$ de RPMI con 0.25% BSA) en la parte inferior. Se incubó durante 60 a 240 minutos a 37°C con 5% CO_2 , se retiran los insertos y se cuentan las células que han migrado a la parte inferior de la cámara.

Para bloquear la migración inducida por MCP-1, se añadió anticuerpo purificado (1-1000 nM) al pocillo superior, junto con las células. La migración en respuesta a las quimioquinas se siguió como se ha indicado previamente.

El índice de migración fue calculado como una relación entre las células migradas en respuesta a los diferentes estímulos con respecto a las que migraron frente a los controles negativos correspondientes.

13. Microscopía de inmunofluorescencia y confocal.

Para los experimentos de inmunofluorescencia, se incubaron los linfoblastos T (2×10^6 células/ $0,5 \text{ ml}$ de medio completo) sobre cubreobjetos, previamente tapizados con diferentes fibronectina y vitronectina ($5 \mu\text{g/ml}$ en PBS de cada una de ellas, 2h a 37°C), en placas de 24 pocillos (Costar Corp., Cambridge, MA. USA). Cuando fué necesario, se añadieron las citoquinas y quimioquinas (10 ng/ml) y se incubaron con las células a 37°C en presencia de 5% CO_2 . Después de la incubación, las células se fijaron con p-formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con anticuerpos específicos y anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcados con rodamina (Pierce Chem. Co. Rockford, IL, EEUU). En los ensayos de

doble tinción, las células se incubaron con el anticuerpo HP2/19, seguido de anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcados con rodamina (Pierce Chem. Co.). Las muestras se lavaron, se bloquearon con suero de ratón al 10% y fueron incubadas con el anticuerpo CCR2-03 biotinilado (1:50), seguido por lavados y marcaje con avidina-FITC (Vector Labs. Inc. Burlingame, CA, EEUU).

Para los estudios de microscopía confocal, las células adheridas a fibronectina (20 µg/ml) se estimularon con 10 nM de MCP-1 y fueron luego marcadas con el anticuerpo CCR2-03 seguido de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con Cy2 (Amersham, Pittsburgh, PA). Para los dobles marcajes se usaron anticuerpos biotinilados, seguidos de avidina Cy3.

14. Infección de linfocitos de sangre periférica: determinación de p24.

Las células mononucleares humanas de sangre periférica se activaron con PHA, como ya se ha indicado. Después de lavarlas, se incubaron con stocks virales de la cepa NL4-3 (2 ng/ml 10^6 células, por ensayo, a 37°C durante 2 horas). Las células se lavan con PBS y se cultivan en RPMI completo que contiene rhIL-2 (10ng/ml) en presencia o no de anticuerpos monoclonales frente al CCR2 o anticuerpos control del mismo isotipo (10 µg/ml). Cada dos días después de la infección, se añade medio fresco que contiene rhIL-2 y anticuerpos a la misma concentración. Los sobrenadentes se probaron usando un kit de ELISA comercial (Coulter, Hialeah, USA) para detectar la presencia de antígeno p24 del HIV-1 a los días 2 hasta 8 después de la infección.

15. Infección de macrófagos derivados de monocitos: ensayo de transcriptasa reversa para HIV-1.

Los monocitos fueron aislados de "buffy coats" procedentes de donantes sanos seronegativos mediante gradientes de Ficoll-Hypaque y Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La pureza ($\geq 90\%$), fué determinada por citometría de flujo analizando la expresión de CD14, con anticuerpos específicos (Caltag, Burlingame, CA) seguido por anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcados con FITC (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, EEUU). Los monocitos se plaquearon a 2×10^5 cells/ml/pocillo en placas de 24 pocillos (Falcon, Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ) en DMEM (BioWhittaker, Verviers, Belgium) suplementado con 10% FCS y 5% de

suero humano. A los cinco días, los macrófagos derivados de monocitos (MDM) fueron preincubados durante 2 h con CCR2-01 o IgG murina como control control, a distintas concentraciones e infectados con la cepa R5 de HIV-1, BaL, a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0.1. Después de incubar durante 16 horas, se reemplazó el medio por medio fresco conteniendo los anticuerpo. A los 5-9 días de la infección, la mitad del medio se reemplazó por medio fresco con anticuerpos. Esta operación se repitió dos veces por semana sin añadir más anticuerpo. La replicación de HIV, fué seguida por la actividad RT dependiente de Mg^{2+} liberada a los sobrenadantes y que fue medida siguiendo protocolos previamente descritos. (Vicenzi *et al.* 1997).

16. Síntesis de DNA complementario con transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR).

El RNA Poly(A)⁺ procedente de las células Jurkatt o de PBMC humanas se preparó usando el Kit de purificación Quick-Prep mRNA (Pharmacia Biotech, Suecia), se trató con DNAsa libre de RNAsa (Boehringer-Mannheim, Alemania) se sintetizó la primera cadena de DNA complementario con oligo-dT usando el First-strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó usando la polimerasa Taq en un termociclador (9600; Perkin-Elmer Corp).

Los siguientes pares de cebadores 5' y 3' (5'/3') fueron empleados para amplificar los fragmentos indicados):

CCR1:

ATGGAAACTCCAAACACCACAGAGGACTATG//AGGAAAGTGAAGGC
TGCAGGTGTGGTGAGTG

CCR2: ATGCTGTCCACATCTCGTTC//TCTATCGATTGTCAGGAGGA

CCR3: GTGTCATCACCAGCATCGTC//CAGATGGCCATAACGAGCAG

CCR4: CATGGTCAGTGGCTGTGTTC//TCACCGCCTTGTTCTTCTTC

CCR5: CCATACAGTCAGTATCAATTC//CCAACCTGTTAGAGCTACTG

CXCR4:

GTCCACGCCACCAACAGTC//CAGGCAAAGAAAGCTAGGATGAGGAT

17. Southern Bblot.

Las muestras (fragmentos de DNA de los productos de PCR) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, según protocolos previamente descritos (**Maniatis *et al.* 1982**). Se preparó una sonda marcada con [α - 32 P]-ATP mediante cebado al azar a partir de un fragmento de restricción HindIII de 1,1 Kbp correspondiente al cDNA del CCR2B clonado en pUC18. La hibridación se hizo usando ExpressHyb (Clontech, Palo Alto) a 60°C durante 1 hora. La membrana se lavó varias veces con SSC 2x y SDS al 0.05% a temperatura ambiente durante 30 minutos y dos veces más con SSC 0.1x y SDS al 0.1% a 50 °C durante 40 minutos. La presencia de bandas específicas se detectó mediante autoradiografía.

18. Transfecciones.

Las células HEK-293 o HEK-293 EBNA se crecieron en DMEM conteniendo 10% FCS. Para las transfecciones, se usó Lipofectamina, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (Pierce Chem. Co. EEUU). Las células ($1,5 \times 10^6$ por placa de 60 mm) se plaquearon el día anterior a la transfección y se transfectaron con 5 μ g de DNA plasmídico de las distintas construcciones y 25 μ l de lipofectamina por placa. En las transfecciones transitorias, se analizó la expresión de las diferentes proteínas a las 24 y a las 48h por citometría de flujo o western blot y los experimentos fueron realizados en el momento de máxima expresión. Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron con 1 mg/ml de G-418 y la expresión de las diferentes construcciones de receptores de quimioquinas se determinó por citometría de flujo con anticuerpos anti-CCR2 apropiados. También se determinó la funcionalidad de dichos receptores mediante experimentos de movilización de calcio.

19. Mutagenesis dirigida.

Se sustituyó la tirosina del residuo 139 del CCR2 por fenilalanina mediante extensión de fragmentos solapantes. Por amplificación del gen clonado en pUC18 mediante PCR, se generaron dos fragmentos de DNA con extremos solapantes. Uno de los fragmentos comprende las posiciones 1-429 y el otro 405-1080 y ambos incluyen

el codon Tyr (TAC) de la posición 417 sustituido por Phe (TTC). Estos fragmentos fueron purificados de gel de agarosa, tratados con Klenow para eliminar las bases 3' protuberantes y mezclados en una segunda reacción de PCR en la que se incluyeron oligonucleotidos que contienen las dianas de restricción para BamHI y XhoI. Después de 25 ciclos de amplificación, el fragmento generado (1080bp) que ya contiene la mutación Tyr 139 fue purificado de gel de agarosa y digerido con BamHI y XhoI para ser clonado en pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). La presencia de la mutación Tyr 139 fue confirmada por secuenciación de DNA.

La línea celular HEK293 de riñón embrionario humano se transfectó, por el método de precipitación con fosfato cálcico, con cDNA de CCR2B y CCR2BY139F clonados en pcDNA3. Se seleccionaron transfectantes estables resistentes a G-418 (Gibco, Grand Island, NY) y se testó la expresión de CCR2 en la superficie celular por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CCR2.

20. Análisis del ciclo celular.

Las células fueron permeabilizadas con 100 ml de DNA-Prep LPR (Coulter), tratadas con 1 ml de yoduro de propidio (DNA-Prep Stain, Coulter) e incubadas durante 30 minutos a 37°C. El ciclo fue analizado en un citometro de flujo.

RESULTADOS

1.- Obtención y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales frente al CCR2.

Una de las razones que explican la falta de atención que se ha prestado a la señalización mediada por las quimioquinas es probablemente la falta de reactivos que permitan identificar de forma específica los diferentes receptores y sus ligandos, así como los eventos que siguen a la interacción entre ellos. Esta falta de reactivos específicos, que es fundamental en el estudio de la señalización a través de cualquier receptor, toma aún mayor relevancia en el caso de las quimioquinas debido a la homología que presentan los diferentes receptores y al hecho de que una misma quimioquina puede interactuar con diferentes receptores y que un receptor puede ser activado por más de una quimioquina. Los anticuerpos monoclonales representan las herramientas idóneas para este tipo de estudios, tanto por su especificidad como por la posibilidad de ser seleccionados con capacidad de reconocer una proteína bajo las diferentes condiciones experimentales requeridas en una investigación de este tipo. Es por ello que la obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales supone un paso vital del presente trabajo, ya que si bien requiere de un gran esfuerzo su aprovechamiento posterior resulta altamente gratificante.

La elección de obtener anticuerpos frente a los receptores y no contra las quimioquinas responde al interés en asignar señales de activación a un determinado receptor y no a un ligando. Dada la promiscuidad existente entre quimioquinas y sus receptores, a un determinado ligando se le pueden asignar hipotéticamente diferentes señales dependiendo del receptor activado en cada caso. En este trabajo, se ha elegido como modelo uno de los primeros receptores de quimioquinas caracterizados, el CCR2, receptor que señala en respuesta a diferentes quimioquinas, de las cuales la principal es el MCP-1. Esta quimioquina presenta una cierta especificidad por este receptor, aunque existen datos en la literatura que indican que el MCP-1 puede interactuar además con el CCR4 y con el CCR10 (Rollins, 1997). Así mismo, los diferentes estudios realizados se llevaron a cabo en la línea monocítica humana Mono Mac 1, línea a partir de la cual se clonó por primera vez el CCR2 (Charo *et al.* 1994). El empleo de una línea celular que expresa el receptor y que responde a la estimulación con MCP-1 supone una gran ventaja ya que evita el uso de células purificadas a partir de donantes, en las cuales existe una gran variabilidad en la expresión de receptores de quimioquinas dependiendo tanto del donante como de la activación de las células, añadiendo un grado más de dificultad en la reproducibilidad de los experimentos.

1.1. Obtención de anticuerpos monoclonales frente al CCR2.

Los anticuerpos monoclonales frente al CCR2 fueron obtenidos a partir de ratones inmunizados con péptidos sintéticos, acoplados a KLH, que corresponden a diferentes secuencias de dicho receptor. Tres de las secuencias escogidas correspondían al dominio amino terminal extracelular (amino ácidos 1-4, 6-20 y 24-38) y una al tercer bucle extracelular (amino ácidos 273-292). Estas regiones fueron seleccionadas por su posible implicación en la unión del ligando. De hecho existían datos en la literatura en los que se implicaba al extremo amino y al tercer bucle extracelular del receptor la IL-8 en la unión del ligando (**Chuntharapai et al. 1994 ; Ahuja et al. 1996**); actualmente diversos autores han demostrado la importancia de estas regiones en el reconocimiento por el ligando de receptores de quimioquinas tanto de la familia CC como CXC así como en la activación del mismo (**Gayle III et al. 1993 ; Samson et al. 1997; Monteclaro y Charo, 1996**). Estas regiones han sido también implicadas en el reconocimiento del receptor por parte del virus del SIDA (**Atchison et al. 1996, Wu et al. 1997b**). A pesar de la homología existente entre los diferentes receptores de quimioquinas conocidos, el extremo amino terminal varía mucho de un receptor a otro, haciendo de esta región un candidato idóneo para la obtención de anticuerpos específicos. Remarcamos aquí este hecho porque otro de los criterios tenidos en consideración para la elección de las secuencias a emplear como dianas de los anticuerpos monoclonales, fué precisamente la de obtener anticuerpos específicos frente al CCR2, por las razones antes aludidas.

La inmunización de los ratones se hizo empleando los péptidos sintéticos acoplados a KLH, estrategia empleada para aumentar la inmunogenicidad de los mismos. Después de las diferentes dosis de inmunización, como se detalla en materiales y métodos, se obtuvieron sueros de los diferentes ratones. El suero de los ratones inmunizados se analizó por EIA frente al péptido inmunizante, para determinar la efectividad del péptido para generar una respuesta inmune, así como por citometría de flujo y western blot empleando células Mono Mac 1, que expresan CCR2, como ensayos que nos permitieran determinar que los anticuerpos presentes en el suero podrían reconocer al péptido inmunizante en el contexto de la proteína nativa.

Todos los sueros procedentes de ratones inmunizados con los diferentes péptidos reconocieron al péptido en ELISA, es decir, todos los péptidos seleccionados eran capaces de generar una respuesta en el ratón. Sin embargo no todos los

inmunógenos empleados fueron igual de eficientes a la hora de inducir anticuerpos capaces de reconocer al péptido en el contexto de la proteína nativa. Solamente los anticuerpos presentes en los sueros de aquellos ratones inmunizados con los péptidos CCR2(273-292), (6-20) y (24-38) fueron capaces de reconocer al receptor presente en las células Mono Mac 1 en citometría de flujo o en western blot. Aquellos ratones, cuyo suero presentaba un mayor título frente al receptor, fueron seleccionados para experimentos de fusión celular, con el objeto de inmortalizar aquellas células productoras de los anticuerpos de interés.

Los sobrenadantes correspondientes a los híbridos procedentes de estas fusiones celulares, fueron analizados por ELISA frente al péptido inmunizante sin acoplar, para detectar la presencia de anticuerpos específicos. Esta primera etapa de selección nos permite analizar un alto número de híbridos y descartar de forma rápida a aquellas células que o bien no producen anticuerpos o producen anticuerpos frente a la proteína empleada como “**carrier**”, KLH. Como segunda etapa de selección los sobrenadantes de los híbridos seleccionados por ELISA, se sometieron a ensayos para determinar si eran capaces de reconocer la secuencia en el contexto del receptor intacto, es decir, tal y como se expresa en las células Mono Mac 1.

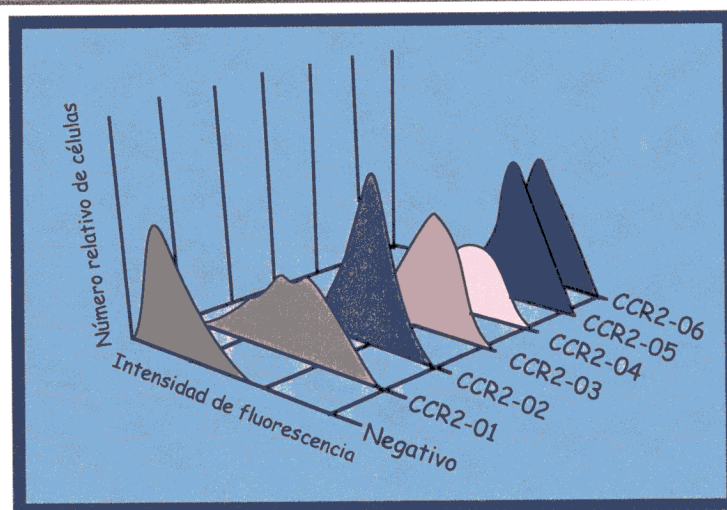


Figura 6. Reconocimiento del CCR2 humano en células Mono Mac 1, analizada por citometría de flujo. Las células fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales CCR2-01 a CCR2-06 biotinilados, y su unión desarrollada con estreptavidina-FITC. La figura muestra la unión de los anticuerpos comparada con la de los anticuerpos usados como control negativo.

Como ya hemos comentado estos ensayos se realizaron por citometría de flujo utilizando las células intactas, lo que nos permite detectar al receptor nativo, y por western blot utilizando lisados celulares, lo que nos permite detectar anticuerpos que reconocen al receptor nativo, si bien desnaturalizado y reducido por la presencia de SDS y DTT en los ensayos. Un total de 4 híbridos que producían anticuerpos frente al tercer bucle extracelular (aa 273-292) y 2 frente al extremo amino (aa 24-38) fueron finalmente elegidos para su estabilización y caracterización ya que eran capaces de reconocer al CCR2 en alguno de estos dos ensayos. Estos híbridos fueron clonados por dilución límite hasta garantizar su monoclonalidad y estabilidad.

Los ensayos para determinar la subclase de inmunoglobulina a la que pertenecen estos anticuerpos se realizó mediante EIA empleando antiseros específicos de cada subclase. Todos los anticuerpos seleccionados son IgG, uno de ellos IgG1 (CCR2-03), cuatro IgG2a (CCR2-01, -02, -04 y -06) y uno IgG2b (CCR2-05).

1.2. Caracterización de los anticuerpos obtenidos frente al CCR2.

1.2.a. ESPECIFICIDAD.

Aunque los seis mAb reconocen el CCR2 presente en las células Mono Mac en citometría de flujo (**Figura 6**), debíamos demostrar su especificidad, para lo cual se debía descartar que los anticuerpos reconocieran otros receptores de quimioquinas con secuencias homólogas.

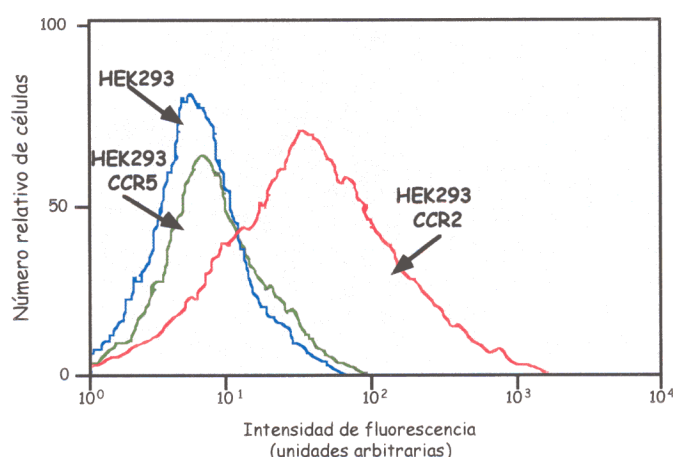


Figura 7. El anticuerpo CCR2-05, como ejemplo de los anticuerpos obtenidos, reconoce específicamente a las células HEK-293 que expresan el CCR2 (—), pero no aquellas que expresan el CCR5 (—) o las que fueron transfectadas con el vector vacío (—). Las células fueron incubadas con el CCR2-05 marcado con biotina, y su unión desarrollada con estreptavidina-FITC .

Dentro de los receptores conocidos, el que presenta una mayor homología con el CCR2 es el CCR5, sobre todo en la región 273-292, correspondiente al tercer bucle extracelular, región prácticamente idéntica entre ambos receptores. Ninguno de los otros receptores de quimioquinas presentan homología de secuencia en las regiones del CCR2 reconocidas por nuestros anticuerpos (aa 24-38 y 273-292), e incluso el CCR5 difiere sustancialmente del CCR2 en la secuencia del extremo amino terminal. Los análisis de especificidad se llevaron a cabo mediante citometría de flujo empleando células HEK-293 transfectadas con los receptores de quimioquinas CCR2 o CCR5 (Figura 7) y líneas celulares, como las Jurkat, que expresan los receptores CCR4, CCR5 y CXCR4 (Figura 8A).

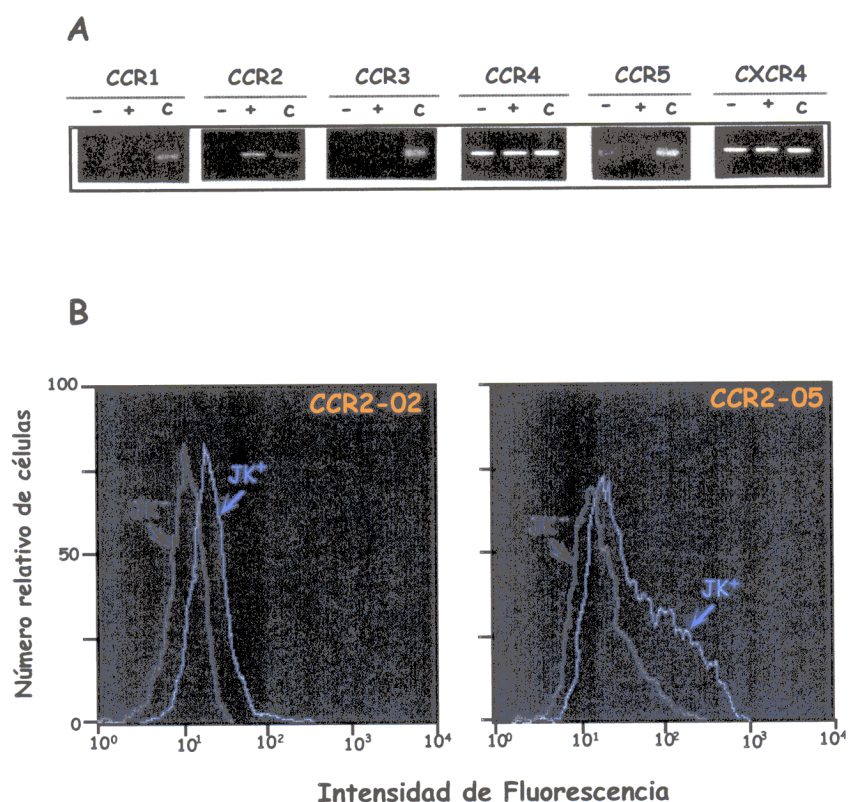


Figura 8. Especificidad de los anticuerpos frente al CCR2. (A) Amplificación de los fragmentos génicos correspondientes a los receptores de quimioquinas CCR1 (564 bp), CCR2 (417 bp), CCR3 (205 bp), CCR4 (243 bp), CCR5 (280 bp) y CXCR4 (338 bp) con cebadores específicos. La RT-PCR se realizó con cDNA obtenido de células JK transfectadas con pcDNA3 (-) o pcDNA3-CCR2 (+). Como control se empleó cDNA obtenido de células mononucleares de sangre periférica (c). (B) Células JK transfectadas con pcDNA3-CCR2 (JK⁺) o con pcDNA3 (JK⁻) se incubaron con los anticuerpos CCR2-02 y CCR2-05 marcados con biotina, seguidos por streptavidina-PE. La figura muestra la unión a las células JK⁺ comparada con la obtenida sobre células JK⁻.

El análisis final reveló que ninguno de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente al CCR2 reconoce al CCR5 en células transfectadas con este receptor (**Figura 7**) como tampoco presentan unión a las células JK, salvo cuando dichas células son transfectadas de forma transitoria con el CCR2 (**Figura 8B**), indicando por tanto la especificidad de todos ellos por el CCR2.

1.2.b. RECONOCIMIENTO DEL CCR2 EN WESTERN BLOT Y CAPACIDAD DE LOS ANTICUERPOS PARA INMUNOPRECIPITAR AL CCR2.

Una vez demostrada la especificidad de los anticuerpos y su capacidad para reconocer al CCR2 en células intactas, debíamos continuar la caracterización analizando el comportamiento de los anticuerpos obtenidos en otras técnicas, que nos serían imprescindibles más adelante. Este es el caso de los ensayos de western blot. A partir de lisados células Mono Mac 1 sometidos a electroforesis y transferidos a membranas de nitrocelulosa, se probaron los seis anticuerpos obtenidos. Sólo uno de ellos, el CCR2-05, dirigido frente al tercer bucle extracelular, reconoce una banda específica de 38 kDa, tanto en estos lisados de Mono Mac 1 como en lisados de células HEK-293 transfectadas con el CCR2 y en lisados de linfocitos procedentes de sangre periférica o amígdala.

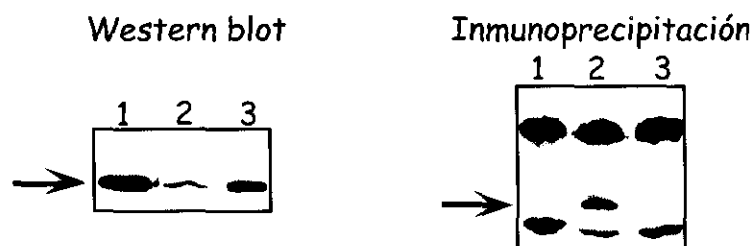


Figura 9. Reconocimiento del CCR2 en ensayos de western blot e inmunoprecipitación. En ensayos de western blot, el CCR2-05 reconoce al receptor en lisados de células Mono Mac 1 (carril 1). Esta unión es desplazada por la incubación con el péptido inmunizante CCR2(273-292) (carril 2), pero no por un péptido irrelevante, CCR2 (24-38), (carril 3). El CCR2 es inmunoprecipitado por el anticuerpo CCR-03 (carril 2) en lisados de células Mono Mac 1, pero no por los anticuerpos CCR2-02 (carril 1) o CCR2-05 (carril 3). La banda correspondiente al CCR2 está señalada por una flecha. Las bandas superior (50 kDa) e inferior (28 kDa) se corresponden con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo usado en la inmunoprecipitación.

Esta banda no aparece en lisados de células HEK-293 transfectadas con el vector vacío o con el CCR5. Así mismo la unión del CCR2-05 a ésta banda es

desplazable cuando este anticuerpo es preincubado con el péptido inmunizante (CCR2 273-292), pero no con péptidos correspondientes a otras regiones del mismo receptor (**Figura 9, panel izquierdo**). Todos estos datos en conjunto demuestran que este anticuerpo es capaz de reconocer específicamente al CCR2 en western blot, es decir en condiciones en las que el receptor está desnaturalizado. El resto de los anticuerpos que también reconocían al anticuerpo intacto sobre la superficie celular, eran incapaces de reconocerlo cuando éste era sometido a condiciones desnaturalizantes.

La posibilidad de disponer de anticuerpos que reconozcan de forma específica al receptor en western blot supone una gran ventaja a la hora de abordar estudios de señalización. Otra de las características que hacen a un anticuerpo ser una herramienta cotizada en estos estudios es su capacidad de inmunoprecipitar el receptor. Por lo tanto, el siguiente paso en la caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos fué ver si alguno de ellos era capaz de inmunoprecipitar el CCR2. Para ello, lisados de células Mono Mac 1 fueron sometidos a inmunoprecipitación con cada uno de los mAb seleccionados. Tras electroforésis y transferencia a membranas de nitrocelulosa, los western blot se revelaron usando el anticuerpo CCR2-05. Sólo uno de los seis mAb, el CCR2-03, fué capaz de inmunoprecipitar la misma proteína de 33 kDa que reconoce el CCR2-05. La unión del CCR2-03 a esta proteína también era desplazada por el péptido CCR2(273-292) y no por otros péptidos, indicando la especificidad de dicha unión. No se observó ninguna proteína inmunoprecipitada al emplear los otros anticuerpos anti-CCR2 (**Figura 9, panel derecho**)

1.2.c. INMUNOFLUORESCENCIA.

Una vez establecida la capacidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos de reconocer al receptor CCR2 de forma específica en aquellas técnicas experimentales de mayor utilidad para los estudios de señalización, como son el western blot y la inmunoprecipitación, se evaluó su comportamiento en otro tipo de ensayos. Así se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre células Mono Mac 1 y HEK-293 transfectadas con el CCR2. Los anticuerpos CCR2-03 y CCR2-05 eran capaces de reconocer al CCR2 en las condiciones de fijación y permeabilización empleadas (**Figura 10**). Su empleo en este tipo de técnicas y el análisis de las imágenes obtenidas en microscopía confocal mediante reconstrucción tridimensional revelaron un patrón típico en forma de parches distribuidos de forma no homogénea, patrón que se corresponde con los de un receptor de membrana.

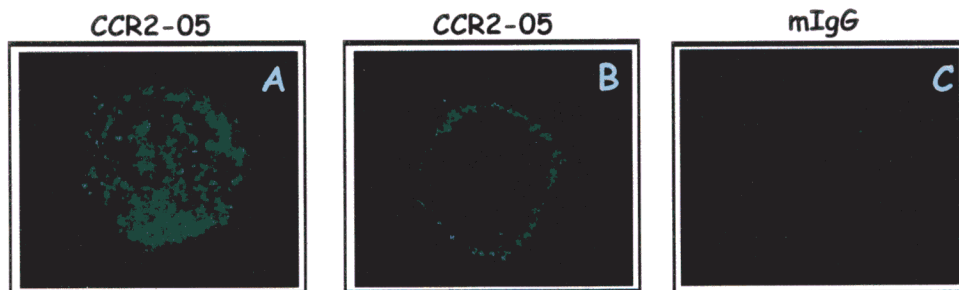


Figura 10. El anticuerpo CCR2-05 reconoce al CCR2 en ensayos de inmunofluorescencia. Células Mono Mac 1 fueron incubadas con el anticuerpo CCR2-05 (A y B) o con un anticuerpo control (mIgG, panel C), y un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con Cy2. La fluorescencia se analizó en un microscopio confocal. La figura muestra la reconstrucción tridimensional de la unión del anticuerpo CCR2-05 (panel A) y una sección representativa usando el mismo anticuerpo (panel B).

No se observó ninguna tinción en células que no expresan el CCR2 de forma natural o bien en células HEK-293 transfectadas con otros receptores de quimioquinas, como es el caso de las HEK-293 transfectadas con el CCR5, lo que indica otra vez la alta especificidad de estos anticuerpos.

2. Efecto de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente al CCR2 sobre la actividad del MCP-1: anticuerpos antagonistas y agonistas.

2.1. ANTAGONISMO.

La caracterización de los anticuerpos monoclonales incluyó también un análisis funcional. La cuestión era ver si los anticuerpos anti-CCR2 poseían algún efecto biológico *per se* o si al menos eran capaces de modificar aquellos promovidos por el ligando natural. Dentro de los diversos efectos biológicos de las quimioquinas, elegimos para este estudio el análisis de la movilización de calcio y la quimiotaxis, efectos ampliamente estudiados en la literatura y en cierto modo, clásicamente relacionados con estas moléculas. Dada la redundancia que existe entre las quimioquinas y los diferentes receptores es difícil asignar la actividad de una determinada quimioquina a la interacción con uno u otro receptor, por lo que encontrar anticuerpos que son específicos contra un receptor concreto y tienen alguna actividad, agonista o antagonista, permite asignar el efecto a un receptor concreto. Así mismo y

dado que los anticuerpos han sido generados frente a regiones pre-seleccionadas del receptor, la capacidad de los mismos de bloquear la actividad del MCP-1 o mimetizarla, sería de gran utilidad en la identificación de aquellas regiones del CCR2 que interaccionan con el ligando y de regiones de importancia para la activación del receptor.

Las células Mono Mac 1 responden con una rápida movilización del calcio intracelular al estímulo con MCP-1, respuesta característica de los receptores de quimioquinas (**Figura 11**). Para ver si los anticuerpos eran capaces de bloquear esa movilización, las células fueron preincubadas durante 30 minutos con distintas concentraciones de los anticuerpos monoclonales antes de ser estimuladas con MCP-1.

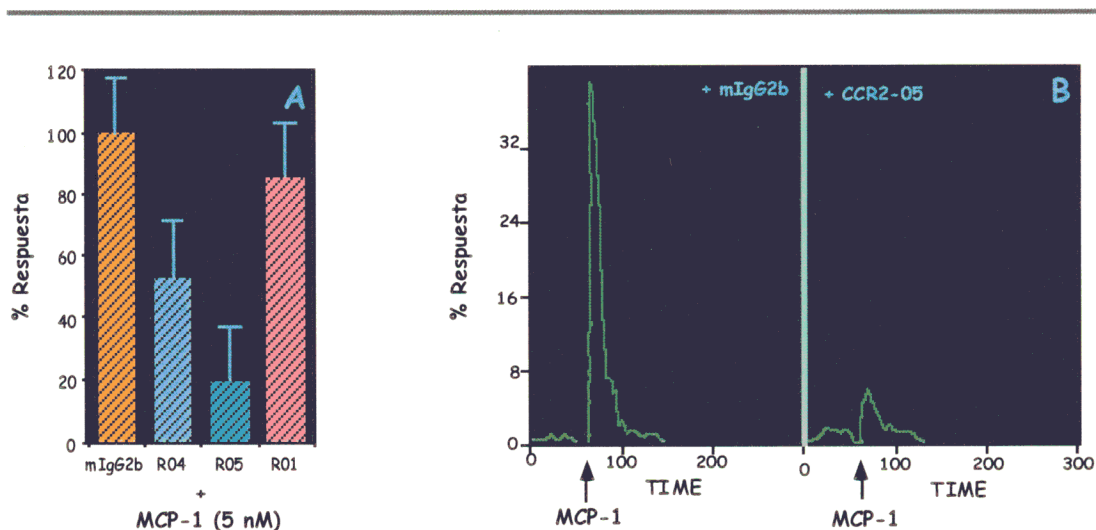


Figura 11. Anticuerpos específicos del CCR2 bloquean la movilización de calcio en las células Mono Mac 1, inducida por MCP-1. (A) La movilización de calcio inducida por 5 nM de MCP-1 en células Mono Mac 1 pretratadas con los diferentes anticuerpos anti-CCR2 o con el hGH-14 (mIgG2b) usado como control. La movilización se determinó usando la sonda fluorescente Fluo-3-AM en citometría de flujo a una longitud de onda de excitación de 525 nm. Los datos se muestran como porcentaje de la máxima respuesta obtenida con MCP-1 en ausencia de anticuerpos. La figura muestra la media de 4 determinaciones con la desviación estándar indicada. (B) Ejemplo de un ensayo de movilización de calcio en respuesta a MCP-1 en células Mono Mac 1 pretratadas con los anticuerpos hGH14 (mIgG2b) y CCR2-05 y analizadas como en (A).

Los anticuerpos CCR2-02, -04 y -05 bloquearon por completo el flujo de calcio inducido por el MCP-1, mientras que el CCR2-01, -03 y -06 al igual que anticuerpos monoclonales, frente a antígenos no relacionados usados como control de isotipo, no

tuvieron ningún efecto, al menos a las concentraciones empleadas (hasta 1000 nM) para los ensayos (**Figura 11**).

Como ya hemos indicado la movilización de calcio en respuesta a quimioquinas es un fenómeno que sucede de forma inmediata a la estimulación con el ligando. El siguiente paso en la caracterización funcional fué evaluar si los anticuerpos también eran capaces de afectar aquellos fenómenos que se producen más a largo plazo, como es la migración inducida por quimioquinas.

Para estos ensayos se emplearon cámaras de migración que constan de una pocillo superior, donde se colocan las células diana, separada de otro inferior por una membrana con poros que permiten el paso de células entre ambos. En el pocillo inferior se colocan quimioquinas que difunden formando un gradiente quimiotáctico que puede atraer a las células diana y hacerlas migrar hacia el pocillo inferior. En estos ensayos usamos células Mono Mac 1 incubadas con los anticuerpos frente al CCR2 de la misma manera que en el ensayo de movilización de calcio y evaluamos su efecto sobre la migración inducida por MCP-1.

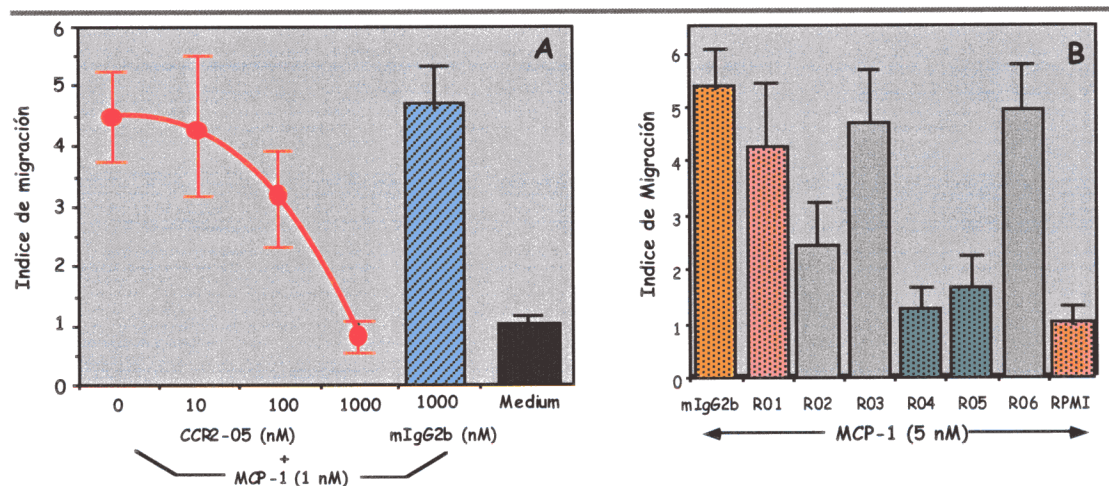


Figura 12. El anticuerpo CCR2-05 bloquea la migración inducida por el MCP-1 en células Mono Mac 1. La migración se determinó en cámaras de migración tapizadas con células endoteliales. (A) Las células Mono Mac 1 se incubaron con 100 nM de los anticuerpos indicados en el pocillo superior y 5 nM de MCP-1 en el inferior. Las células que migraron al pocillo inferior fueron contadas y expresadas como un índice de migración, calculado como el aumento de células migradas comparado con el control negativo (medio de cultivo, RPMI). La figura muestra la media de determinaciones por triplicado con la desviación estandar indicada. (B) Efecto que tienen sobre la migración diferentes concentraciones del CCR2-05, comparada con el efecto del anticuerpo control hGH-14 (mIgG2b).

De nuevo observamos que esta migración era bloqueada cuando las células eran preincubadas con los anticuerpos CCR2-02, -04 y -05 mientras el resto de los anticuerpos así como los controles de isotipo usados no modificaron en modo alguno el índice de migración (**Figura 12**). Los resultados obtenidos indican que los anticuerpos CCR2-02, 04 y 05 son capaces de bloquear la respuesta inducida por MCP-1 en células Mono Mac 1, tanto a tiempos cortos, como indica la respuesta de calcio, como a tiempos largos, tal y como reflejan los ensayos de quimiotaxis.

Para determinar la especificidad y demostrar que los efectos bloqueados son consecuencia de la unión del MCP-1 al CCR2 y no a otro receptor, estudiamos el efecto de la preincubación con los anticuerpos sobre la movilización de calcio y la migración inducidas por MCP-3, ligando que también se une al CCR2. De nuevo los efectos fueron completamente anulados (**Figura 13**). Es decir, que algunos de los anticuerpos generados eran capaces de bloquear específicamente la respuesta que diferentes ligandos inducen a través del CCR2.

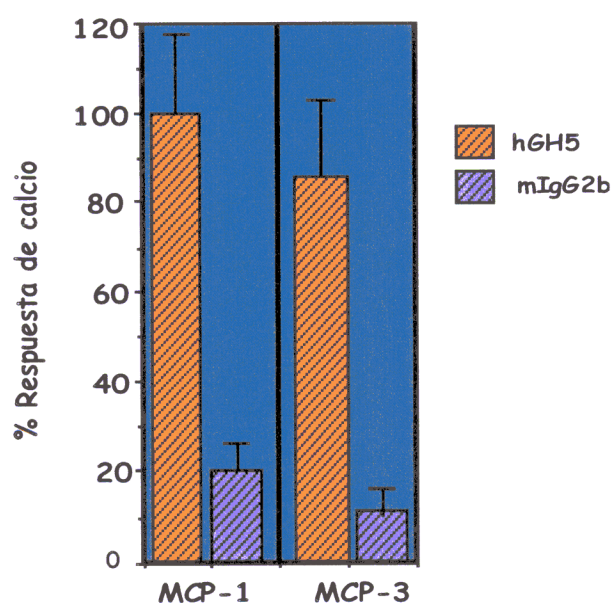


Figura 13. El anticuerpo CCR2-05 bloquea la movilización de calcio inducida por quimioquinas que interaccionan con el CCR2. La movilización de calcio inducida por 5 nM de MCP-1 y MCP-3 en células Mono Mac 1 incubadas con el CCR2-05 o el hGH5 (mIgG2b), como control de isotipo, se determinó como se ha indicado previamente. La figura muestra la media de determinaciones por triplicado de un experimento representativo con las desviaciones estandar indicadas.

Sin embargo ninguno de estos dos efectos promovidos en células Jurkat por otras quimioquinas a través de otros receptores diferentes del CCR2 como, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , que usan principalmente CCR5, o SDF-1 α , que utiliza CXCR4 (**Tabla I**), se ven afectados al preincubar las células con cualquiera de los anticuerpos anti-CCR2 (**Figura 14**).

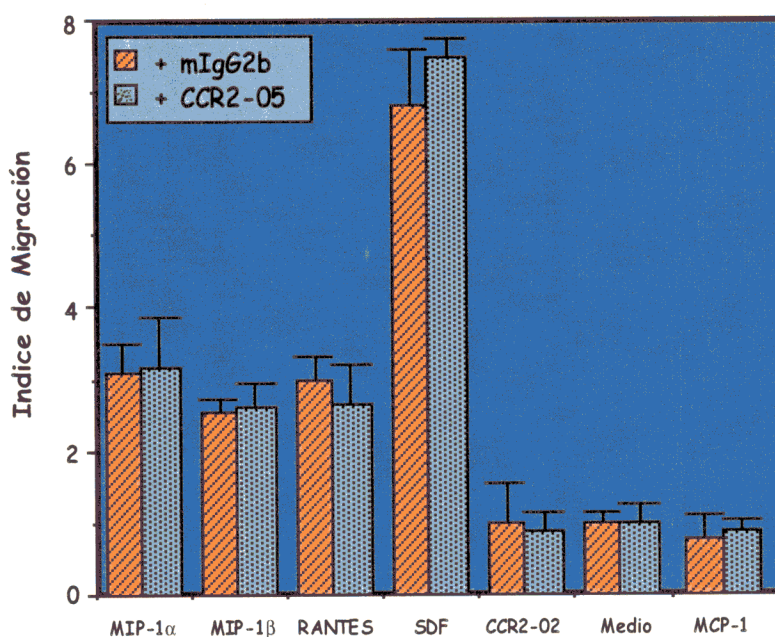


Figura 14. El anticuerpo CCR2-05 no bloquea la quimiotaxis mediada por receptores distintos del CCR2. La quimiotaxis se analizó como ya se ha descrito previamente. La figura muestra la migración de células Jurkat preincubadas con el mAb CCR2-05 (1 μ M) o con un anticuerpo control del mismo isotipo (hGH5, IgG2b), en respuesta al estímulo con 5 nM de las diferentes quimioquinas. Los datos representan la media de determinaciones por triplicado de un experimento representativo con la desviación estandar indicada.

2.2. AGONISMO.

Concluir de los ensayos realizados hasta este momento que nos encontramos ante anticuerpos antagonistas puede resultar prematuro. Por el tipo de evaluación realizada, podemos estar ante anticuerpos antagonistas del CCR2 o bien ante anticuerpos que mimetizan la acción del ligando. Así un anticuerpo agonista inhibiría la movilización de calcio en respuesta a MCP-1 mediante desensibilización del receptor,

tal y como hace el propio MCP-1. Así mismo, el MCP-1 preincubado con las células en el pocillo superior de la cámara de migración, rompería el gradiente quimiotáctico, resultando en una inhibición de la migración. Este mismo efecto sería observado al emplear un anticuerpo agonista. En un intento de discernir entre ambas posibilidades, analizamos la capacidad de éstos anticuerpos para inducir respuestas mediante su interacción con el CCR2.

Los mAb CCR2-04 y -05, dirigidos frente al tercer bucle extracelular, no son capaces de inducir ningún efecto en las células Mono Mac 1 en los ensayos de movilización de calcio, indicando que su efecto antagonista se debe al bloqueo de la unión del MCP-1 y no a fenómenos de desensibilización.

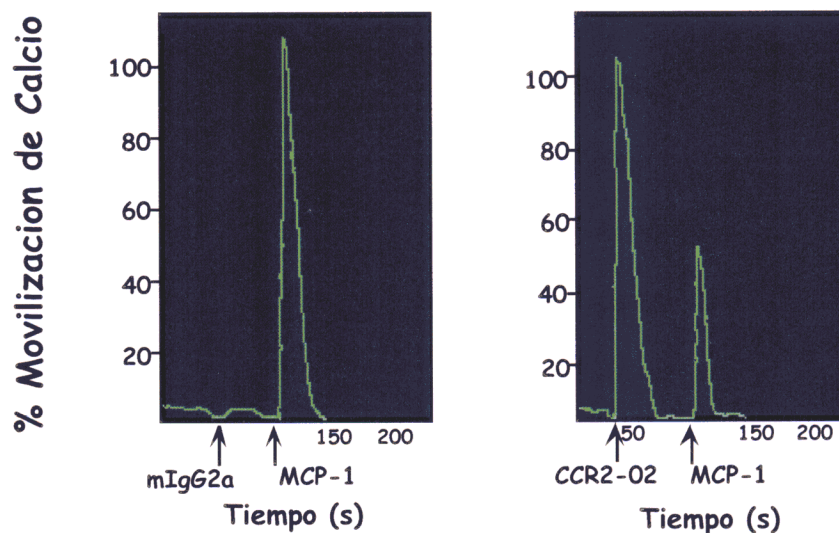


Figura 15. El anticuerpo CCR2-02 induce movilización de calcio en las células Mono Mac 1. La capacidad del CCR2-02 de inducir movilización de calcio se analizó en células Mono Mac 1 cargadas con Fluo-3, como se ha descrito anteriormente. En este caso, las células fueron estimuladas con 2nM del CCR2-02 o de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (hGH30, IgG2a), previa a la estimulación con 5 nM de MCP-1. La movilización de calcio se representa como porcentaje de la máxima respuesta obtenida estimulando las células con dicha concentración de MCP-1. La figura muestra un experimento representativo de los muchos llevados a cabo.

Sin embargo, la estimulación con concentraciones nM (0.5 a 20 nM) del CCR2-02, induce un aumento transitorio en la concentración de calcio y desensibiliza al receptor para estímulos posteriores tanto de MCP-1 como de sí mismo, lo que explica la inhibición observada en el experimento antes referido. Este anticuerpo actúa por

lo tanto como un agonista y de hecho la movilización de calcio inducida por este anticuerpo desaparece cuando las células son previamente estimuladas con MCP-1 y por tanto cuando el CCR2 queda desensibilizado a posteriores estímulos (**Figura 15**).

Similares resultados se obtuvieron en ensayos de trans migración, en los cuales los anticuerpos CCR2-04 y -05 no inducen ningún efecto sobre las células Mono Mac-1, mientras que el CCR2-02, produce una migración similar a la que induce el MCP-1 (**Figura 16**). Al igual que ocurre con el MCP-1 y las demás quimioquinas, la migración sigue un curva dosis:respuesta con forma de campana; la migración de células aumenta en función de una creciente concentración de quimioquinas para alcanzar un máximo y luego disminuir hasta niveles basales. Este tipo de curvas han sido explicadas por fenómenos de desensibilización e internalización de estos receptores, aunque también cabe la posibilidad de que altas concentraciones de ligando destruya rápidamente el gradiente quimiotáctico impidiendo entonces la migración. Pues bien al anticuerpo CCR2-02 también induce migración siguiendo curvas de respuesta con forma de campana, lo que indica que este anticuerpo mimetiza por completo la actividad del MCP-1.

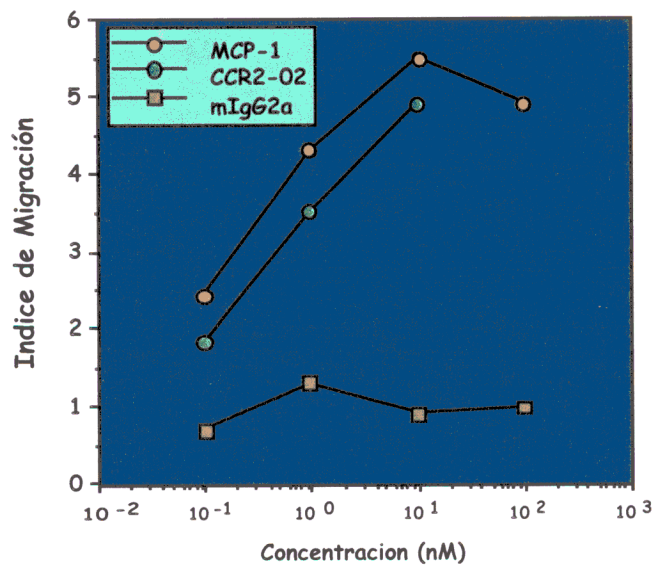


Figura 16. El anticuerpo CCR2-02 induce la migración de las células Mono Mac-1. La migración de las células en respuesta a los diferentes estímulos se analizó como se ha descrito anteriormente. En este caso tanto el MCP-1 como los anticuerpos CCR2-02 y hGH-30 (mIgG2a), usado como control, fueron incubados en el pocillo inferior de la cámara de migración. Las células migradas se representan como índice de migración calculado como ya se ha indicado previamente.

El hecho de que otros anticuerpos dirigidos contra el extremo amino del receptor (CCR2-01) o el tercer loop extracelular (CCR2-03 y 06) no tengan efectos sobre la actividad del MCP-1, sugiere la complejidad de la interacción entre estas dos regiones del receptor así como la necesidad de residuos altamente específicos en ambas zonas para la correcta inducción de la actividad biológica. Un resumen de las principales características de los anticuerpos se muestra en la **tabla III**.

Tabla III. Resumen de las principales características de los anticuerpos anti-CCR2 seleccionados

| mAb | Especificidad ^a | Isotipo | W. blot ^b | FACs ^c | Quimiotaxis ^d | | Movilización de Calcio ^e | |
|---------|----------------------------|---------|----------------------|-------------------|--------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| | | | | | Agonista | Antagonista | Agonista | Antagonista |
| CCR2-01 | (24-38) | IgG2a | NO | SI | NO | NO | NO | NO |
| CCR2-02 | (24-38) | IgG2a | NO | SI | SI | NO | SI | NO |
| CCR2-03 | (273-292) | IgG1 | NO | SI | NO | NO | NO | NO |
| CCR2-04 | (273-292) | IgG2a | NO | SI | NO | SI | NO | SI |
| CCR2-05 | (273-292) | IgG2b | SI | SI | NO | SI | NO | SI |
| CCR2-06 | (273-292) | IgG2a | NO | SI | NO | NO | NO | NO |

^a Secuencia de aminoácidos del CCR2 reconocida por el anticuerpo.

^b Reconocimiento del CCR2 en ensayos de western blot de lisados de células Mono Mac 1.

^c Reconocimiento del CCR2 en citometría de flujo de células Mono Mac 1.

^d Efecto del mAb sobre la migración de células Mono Mac 1.

^e Efecto del mAb sobre la movilización en células Mono Mac 1.

Las características funcionales de estos anticuerpos se ven reflejadas en ensayos de citometría de flujo empleando células Mono Mac 1. La unión al CCR2 de aquellos anticuerpos dirigidos contra el tercer bucle extracelular y que no presentan actividad biológica (CCR2-03 y 06), no se ve afectada por la presencia del ligando. Sin embargo la presencia de MCP-1 disminuye de forma notable la unión de los anticuerpos antagonistas (CCR2-04 y 05), hecho consecuente con la competición de ligando y anticuerpos por la unión al receptor. Estos experimentos fueron realizados en condiciones de temperatura (4°C), que impiden la internalización del receptor inducida por el ligando (**Figura 17**). Curiosamente, en presencia de MCP-1, el anticuerpo CCR2-01, dirigido contra el extremo amino terminal del receptor, aumenta su unión al

receptor, hecho que sugiere que este anticuerpo reconoce con mayor afinidad al receptor estimulado, es decir la conformación activa del receptor.

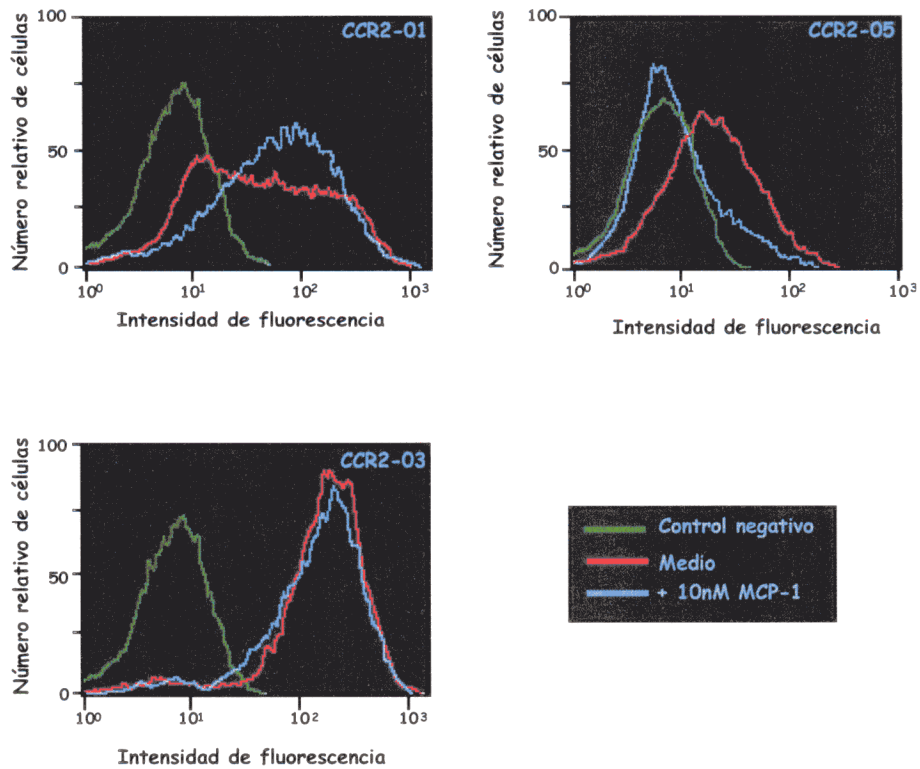


Figura 17. Efecto del MCP-1 sobre la unión de los anticuerpos al CCR2. Las células Mono Mac 1 fueron incubadas a 37°C con 10 nM de MCP-1 durante 60 seg. A continuación, y sin lavar las células, se añadieron los anticuerpos indicados marcados con biotina y se incubaron 30' a 4°C, seguidos por estreptavidina-FITC. La figura muestra la unión de los anticuerpos en presencia o ausencia de MCP-1 comparada con la unión de un anticuerpo control.

3. Expresión del CCR2 en linfocitos derivados de sangre periférica y amígdala.

Como ya hemos referido anteriormente, una de las características de las quimioquinas es su capacidad de inducir específicamente la migración de diferentes poblaciones leucocitarias, hecho que supuso el principal foco de interés de esta familia de citoquinas quimioatrayentes. Sin embargo, poco se conoce sobre los receptores de quimioquinas que se expresan en estas poblaciones leucocitarias, hecho que dada la redundancia existente entre las quimioquinas y sus receptores cobra un gran interés. La especificidad de los anticuerpos obtenidos nos permitió estudiar la presencia del CCR2 en las diferentes poblaciones linfocitarias y definir en diferentes condiciones de activación que células expresan este receptor.

Los ensayos se llevaron a cabo por citometría de flujo con leucocitos obtenidos a partir de sangre periférica de donantes sanos activados o no con fitohemaglutinina (PHA, 0.5%), ionóforo (ionomicina, 1 μ M) o con la cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus* (SAC, 1/1000), agentes capaces de inducir la activación de poblaciones leucocitarias. Usando técnicas de doble tinción, con los anticuerpos anti-CCR2 marcados con biotina y anticuerpos frente a marcadores específicos de las distintas poblaciones leucocitarias (monocitos/macrófagos, células B y linfocitos T), se detectó la presencia del CCR2 en ensayos de citometría de flujo.

. Linfocitos de sangre periférica. En células sin activar, los anticuerpos anti-CCR2 reconocen al 100% de las células positivas para CD11b, CD13 y CD14, en la población correspondiente a monocitos/macrófagos, en base a los análisis de tamaño y complejidad. También se unen a un 80% de las células CD19⁺ y CD20⁺ lo que indica expresión del CCR2 en monocitos y células B, sin embargo cuando el análisis se realiza en la población de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, no se detecta unión de nuestros anticuerpos. La situación es diferente cuando los linfocitos T son activados con PHA o ionóforo durante cuatro días, entonces se observa expresión del receptor tanto en un porcentaje de las células positivas para CD4 (30-45%) como en las positivas para CD8 (20-40%) (**Figura 18**).

En ese tiempo de activación no se produce ninguna modificación de la expresión en células B. La primera conclusión que puede sacarse de estos datos es por lo tanto, que la expresión del CCR2 en células T es dependiente de la activación y

constitutiva en monocitos y células B donde no se ve afectada por la activación. Sin embargo hemos observado un alto grado de variación en la expresión de este receptor dependiendo del donante y del tiempo de activación, así hemos observado para el CCR2 el máximo nivel de expresión entre los días 4 y 10 de activación, fenómeno no exclusivo del CCR2 y detectado para otros receptores de quimioquinas como ha sido reflejado abundantemente en la bibliografía (**Figura 11**).

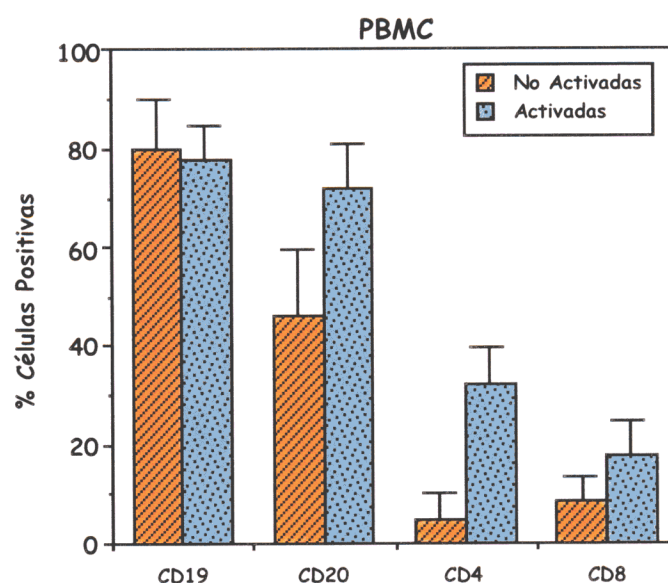


Figura 18. Expresión del CCR2 en linfocitos humanos de sangre periférica. La expresión del CCR2 en linfocitos activados o no con PHA se determinó en citometría de flujo usando doble marcaje con el anticuerpo CCR2-05 y anticuerpos frente a marcadores específicos de células T (CD4 y CD8) o células B (CD19, CD20). La figura representa el porcentaje de células que expresan el CCR2 con respecto al número total de células que expresan el marcador indicado.

. Linfocitos derivados de Amígdala.

Dado su origen y las condiciones que suelen llevar a su extracción, los linfocitos procedentes de amígdalas presentan siempre un cierto grado de activación. Cuando evaluamos la expresión del CCR2 en esos linfocitos encontramos que al igual que sucedía en el caso de las células derivadas de sangre periférica, se observa que las células CD19⁺ y CD20⁺ expresan de forma constitutiva el CCR2. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ sin activar, sin embargo, expresan bajos niveles de CCR2 (10-20%), que aumentan tras la activación hasta un 40-50%. La expresión de CCR2 en células T

previa a su activación *in vitro*, se debe, por las razones antes expuestas, a la presencia en amígdala de células activadas, como se confirma empleando marcadores específicos de activación, descartando entonces la existencia de un hecho diferencial con la expresión en células de sangre periférica.

Para evitar que las conclusiones obtenidas en la caracterización de las poblaciones linfocitaria pudiesen deberse al hecho de usar un único anticuerpo, los ensayos fueron realizados con tres anticuerpos diferentes; uno de ellos, el CCR2-01, que reconoce el extremo amino terminal del receptor y los otros dos, el CCR2-05 y el CCR2-06, que reconocen el tercer bucle extracelular. En todos los casos, los resultados fueron similares.

Un resumen de la expresión de CCR2 en estas poblaciones, se muestra en la **Figura 19**. Este análisis confirma un dato conocido como es que los monocitos y las células T activadas expresan el CCR2 pero añade un observación importante como es la expresión de este receptor en células B, independientemente de su estado de activación.

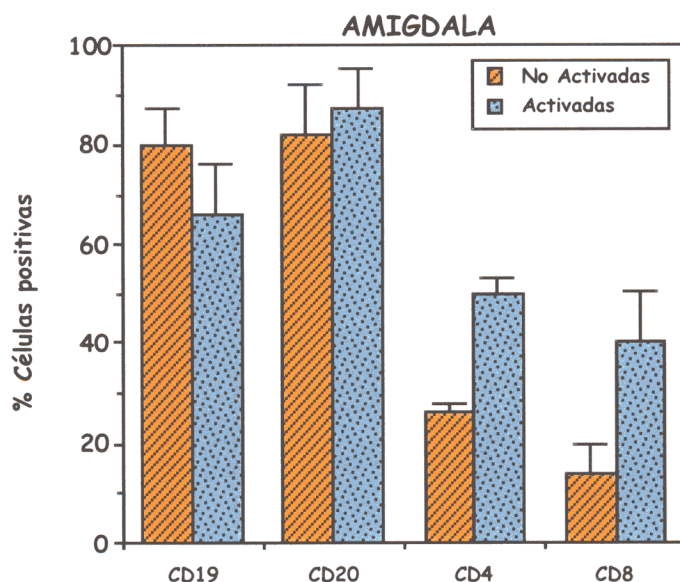


Figura 19. Expresión del CCR2 en linfocitos procedentes de amígdala. La expresión de CCR2 en linfocitos derivados de amígdalas humanas se determinó como se indica en la figura anterior. La figura muestra la media de las determinaciones realizadas de 7 extracciones diferentes.

El resultado obtenido por citometría fue confirmado por RT-PCR y Southern Blot utilizando células CD19⁺ purificadas a partir de amígdalas y una línea de células B humanas, IM-9 (**Figura 20A**), detectandose bandas del tamaño apropiado que hibridaron con sondas específicas para el CCR2. La presencia del CCR2 en estas células también se determinó por citometría de flujo empleando el anticuerpo CCR2-05, indicando la expresión en la membrana celular de dicho receptor (**Figura 20B**).

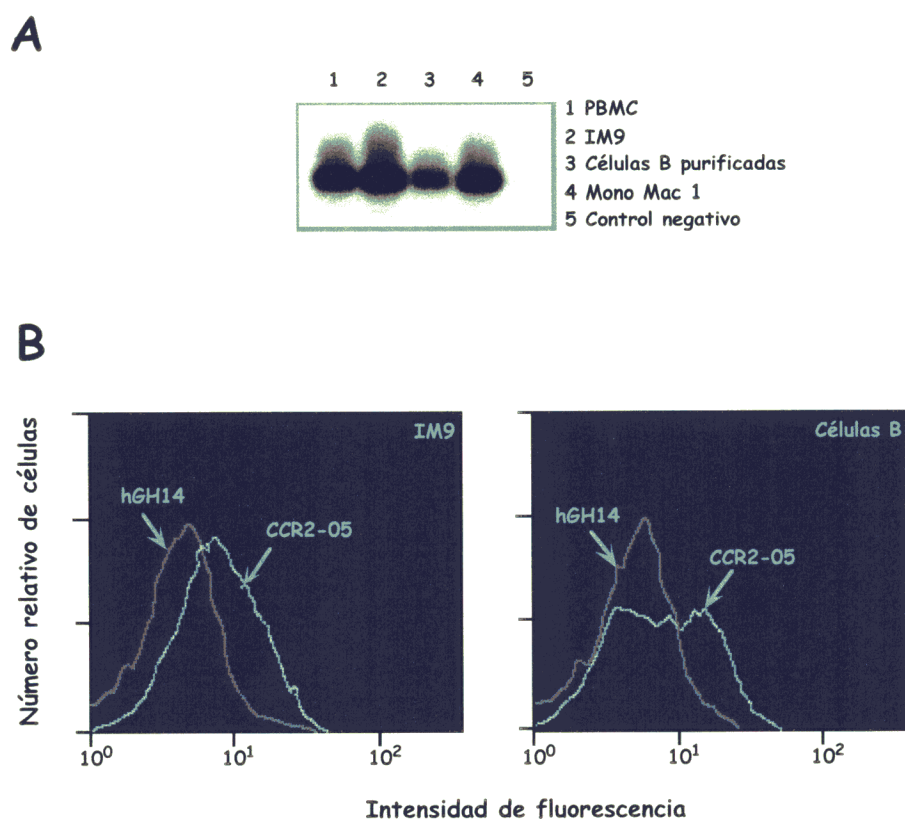


Figura 20. Expresión del CCR2 en células B. (A) La expresión del mRNA del receptor CCR2 en los tipos celulares indicados se analizó por RT-PCR y análisis de southern blot, como se indica en materiales y métodos. (B) La expresión del CCR2 en la línea humana de células B, IM9, y en células B purificadas de linfocitos de sangre periférica (CD19⁺ > 98%, CD3⁺ < 0.5%, CD14⁺ < 0.5%, panel superior) analizada por citometría de flujo empleando el anticuerpo CCR2-05, comparada con la de un anticuerpo control (hGH14).

Para evaluar la funcionalidad del CCR2 presente en células B, empleamos de nuevo linfocitos B purificados de sangre periférica y de amígdalas así como la línea celular IM-9. Estas células migran en respuesta a MCP-1, aunque bien es verdad que lo hacen con unos índices de migración mucho menor a los observados en líneas

monocíticas humanas. Como control positivo de migración utilizamos SDF-1 α , quimioquina cuyo receptor, CXCR4, está presente de forma funcional en las células B (D'Apuzzo *et al.* 1997 ; Vicente-Manzanares *et al.* 1998). La migración inducida por MCP-1 fué bloqueada por los anticuerpos monoclonales antagonistas frente al CCR2, mientras que esos mismos anticuerpos no afectaron a la migración inducida por SDF-1 α , indicando por lo tanto que los efectos del MCP-1 están mediados por el CCR2 y no por otros receptores relacionados (Figura 21).

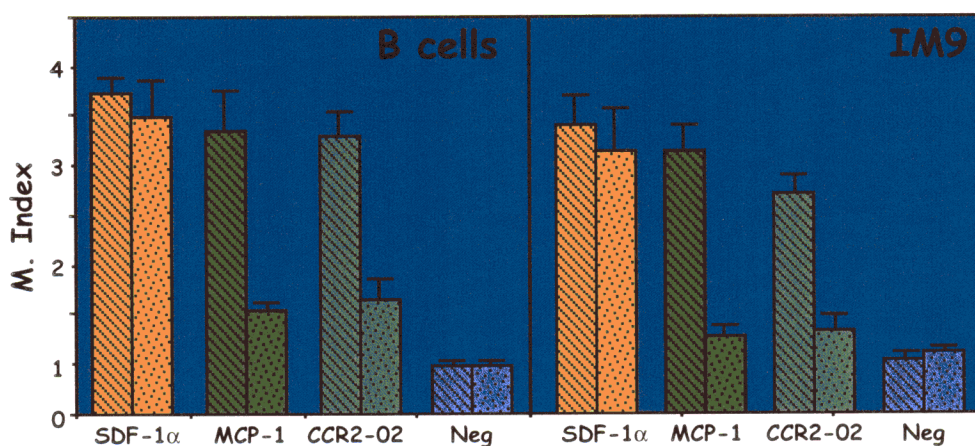


Figura 20. Las células B migran en respuesta a diferentes quimioquinas. La migración de células B purificadas a partir de amígdala y de la línea celular B humana IM9, tratadas (▨) o no (▩) con el anticuerpo neutralizante CCR2-05 (10 μ M), se analizó en pocillos de trans migración en respuesta a 50 nM de las quimioquinas y de los anticuerpos indicados durante 4 horas a 37°C. Los datos muestran la media de determinaciones por triplicado, con la desviación estandar indicada.

La migración de las células B inducida por MCP-1 a través de CCR2 es sensible al tratamiento con PTX. El bloqueo con esta toxina indica la participación de una proteína Gi en el fenómeno (Figura 22), dato que está de acuerdo con la bibliografía, que describe la participación de una proteína Gi en los efectos mediados por quimioquinas.

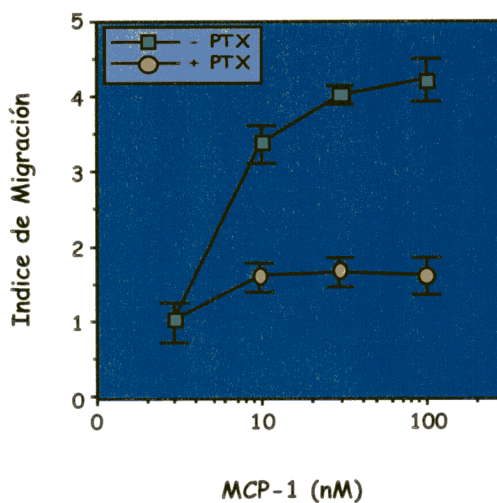


Figura 22. La migración de las células B inducida por MCP-1 es bloqueada por PTX. Las células IM9 se trataron durante 16 horas con toxina pertúsica (0.1 $\mu\text{g/ml}$) y se estimularon con concentraciones crecientes de MCP-1. La migración se analizó como en la figura anterior.

4. Polarización celular y expresión de receptores de quimioquinas

La migración celular juega un papel clave en un gran número de fenómenos biológicos. Este proceso es particularmente importante para la función de los leucocitos y para la respuesta inflamatoria. Algunos aspectos del mecanismo que posibilita la quimiotaxis han sido ya estudiados empleando para ello varios tipos celulares y sistemas experimentales. De hecho, es claro que la movilidad celular implica una polarización con la formación de extensiones citoplasmáticas denominadas *lamellipodia* en el frente de avance donde ocurren sin lugar a dudas fenómenos de exocitosis. Durante el movimiento celular se producen por lo tanto cambios morfológicos que además implican la redistribución de moléculas específicas. Así la F-actina pasa de tener una distribución radial a concentrarse en una región determinada originando un cambio en la forma celular que pasa de una forma esférica a una polarizada. Diferentes receptores se concentran en el frente de avance, como es el caso de la integrina $\alpha\beta_3$, mientras que otros se localizan en el urópodo, como son moléculas de adhesión (ICAMs), CD43, CD4 y PSGL-1. Dado el papel que las quimioquinas juegan en la migración celular, nos hemos planteado estudiar la localización de sus receptores en la célula polarizada.

Para estos estudios hemos empleado linfocitos T obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica provenientes de donantes sanos, activados con PHA (0.5%) y mantenidos en cultivo durante 7 días en presencia de IL-2 (50 UI/ml). La expresión de los receptores de quimioquinas está finamente regulada a nivel de RNA mensajero. Como ya hemos comentado previamente, algunos de estos receptores se expresan de forma constitutiva en linfocitos T, mientras que en otros casos la expresión varía en función de la activación celular. El seguimiento de los receptores de quimioquinas se realizó por inmunofluorescencia empleando el anticuerpo CCR2-03. En células sin estimular, que presentan una morfología redondeada, el CCR2 se distribuye de forma homogénea en la membrana de linfoblastos T adheridos a sustratos de integrinas como se demuestra por la tinción verde, correspondiente al anticuerpo marcado con FITC. Tras la incubación de los linfocitos con MCP-1 (10 ng/ml), estos adoptan una forma polarizada y el CCR2 se redistribuye al frente de avance de las células, mientras que el ICAM3 se localiza en el urópodo (**Figura 23**).

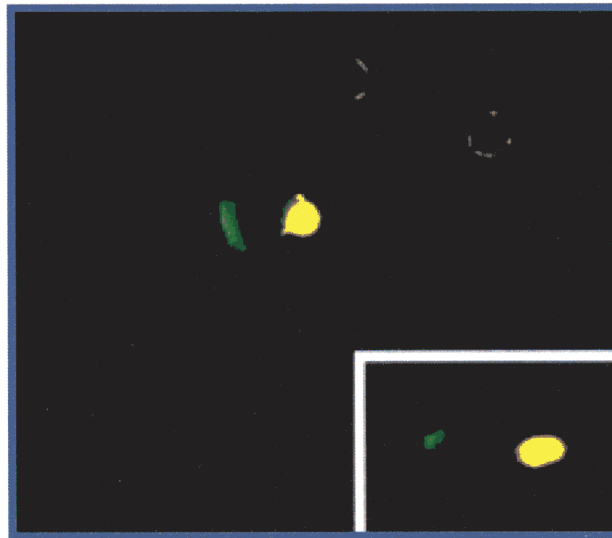


Figura 23. Distribución polarizada del CCR2 e ICAM-3 en las células T que están migrando. Las células adheridas a FN-80 se tiñeron con el anticuerpo anti-ICAM-3 HP2/19 (fluorescencia amarilla) y el CCR2-03 (fluorescencia verde). En el recuadro se muestra otra célula T de la misma muestra, a la misma ampliación. Ampliación original: X1,200. Bar, 10 μ m.

Por lo tanto, ante un estímulo migratorio como es el caso del MCP-1, el CCR2 se localiza en el frente de avance de la célula migratoria. Este fenómeno no es una característica exclusiva del CCR2 ante el estímulo con su ligando. Similares experimentos fueron llevados a cabo estimulando las células con otras quimioquinas

como son RANTES (10 ng/ml) o IL-8 así como con las citoquinas IL-2 e IL-15, observándose la misma redistribución del CCR2 al frente de avance. La redistribución afecta también a otros receptores de quimioquinas como es el caso del CCR5, detectado con anticuerpos monoclonales específicos (**Figure 24D**). Sin embargo la citoquina proinflamatoria TNF-alfa, no induce ni polarización celular ni redistribución de receptores de quimioquinas. Otros agentes capaces de inducir polarización, tales como anticuerpos monoclonales frente a ICAM-3 y CD43, también inducen la redistribución de CCR2. Cuando se analizó la distribución de otros receptores tales como IL-2R α , IL-2R β , TNFRI y TGF- β tipo II, se observó que ninguno de estos receptores sufría redistribución o clustering durante la migración de los linfoblastos T (**figura**). Todos estos datos indican que ante un estímulo migratorio, las células adquieren un fenotipo polarizado con redistribución de proteínas a regiones especializadas.

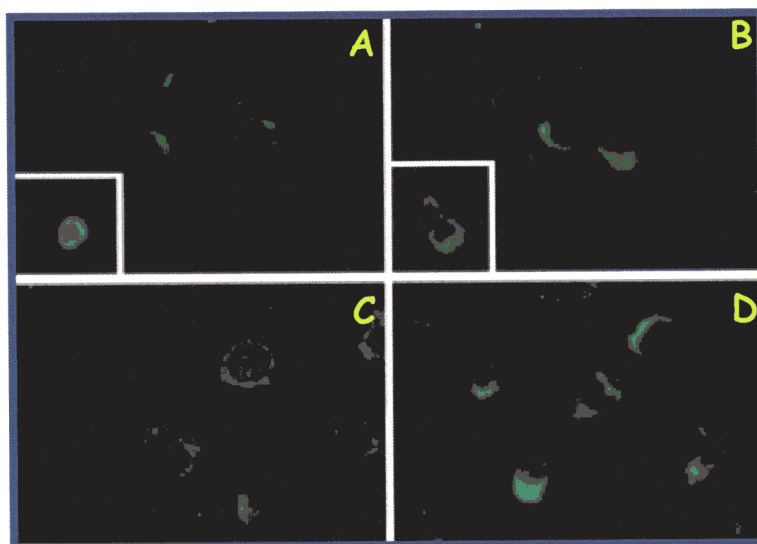


Figura 24. Los receptores CCR2 y el CCR5 se redistribuyen al frente de avance de los linfocitos T polarizados. Los linfocitos T activados con PHA, no tratados (A y C) o tratados con 10 ng/ml de MCP-1 (B) o RANTES (D), se adherieron a cubreobjetos tratados con 20 μ g/ml de FN-80 (A y B) o 10 μ g/ml de rsICAM-1-Fc (C y D) y se fijaron y tiñeron con el anticuerpo CCR2-03 (A y B) o CCR5-02 (C y D). En los recuadros pequeños se muestra la localización del IL-2R α , por tinción con el anticuerpo TP1/6, en linfocitos sin activar (A) o polarizados (B).

Para analizar de forma más detallada la localización de los receptores de quimioquinas en la célula polarizada, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal, empleando anticuerpos anti-CCR2 y anti-ICAM-3 que nos permiten localizar el urópodo y el frente de avance de la célula polarizada. Como se observa en la **figura**

25, el CCR2 se localiza en la zona de contacto de la célula con el sustrato, mientras que el ICAM-3 se localiza en la parte opuesta, es decir lejana al sustrato.

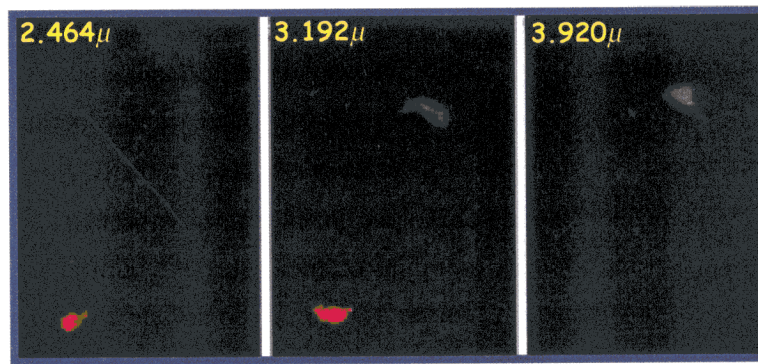


Figura 25. El receptor CCR2 se sitúa en la zona de contacto con el sustrato del frente de avance celular. La figura muestra tres cortes representativos de los ocho obtenidos, que se corresponden con el nivel superior (2.464μ) que muestra la tinción de ICAM-3 (fluorescencia roja) en el urópodo, hasta la zona de contacto con el sustrato (3.92μ) donde se localiza el CCR2 (fluorescencia verde) en el frente de avance.

Estos datos indican una distribución lógica de las diferentes moléculas que parece implicar una redistribución por funciones, donde las moléculas de adhesión irían a la parte trasera, mientras que las encargadas del movimiento celular así como de la dirección del mismo estarían localizadas en las zonas de contacto con el sustrato. Estudios de videomicroscopía llevados en paralelo demostraron que las células que presentan una morfología polarizada se correspondía con las células que estaban migrando, indicando que la polarización del CCR2 en leucocitos está correlacionada con la adquisición del fenotipo migratorio y que es independiente del estímulo quimioatrayente (**Figura 26**). Además, la célula se orientaba en dirección al foco quimiotrayente, indicando que el receptor de quimioquina se comporta como un auténtico sensor celular que dirige el movimiento celular a favor del gradiente quimiotáctico.

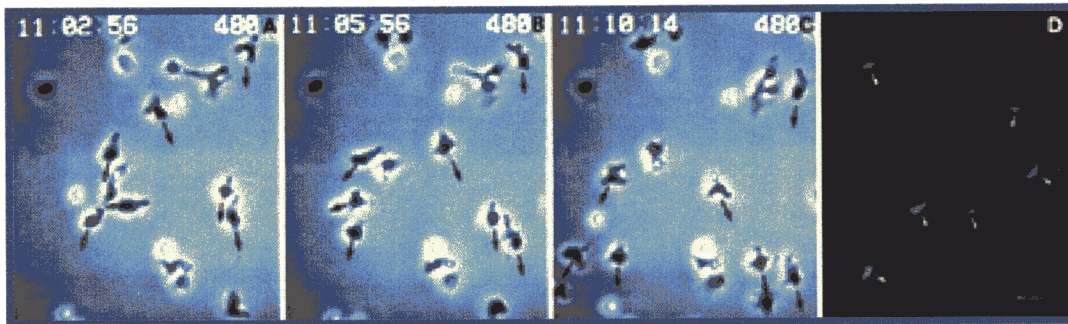


Figura 26. Los linfocitos T que están migrando redistribuyen el CCR2 hacia el gradiente quimiotáctico. Ensayos de videomicroscopía (A-C) de linfocitos T adheridos a rsICAM-1 en respuesta a MCP-1, a los tiempos indicados. En (D) se muestra la distribución del CCR2 en las células que están migrando, visto por estudios de inmunofluorescencia llevados en paralelo. Las flechas indican la dirección de las células hacia el foco quimiotáctico.

5. Papel del receptor CCR2 durante la infección por HIV-1

La descripción de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4 como coreceptores del virus responsable del síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida, HIV-1 y de las quimioquinas RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β y SDF-1 α como agentes neutralizantes de esa infección, asignó a estas moléculas un papel crítico en la patogénia de esta enfermedad. En vista de la relevancia de estos receptores en un proceso patológico de tanta importancia, nos propusimos evaluar si otros receptores distintos de los referidos, en concreto el CCR2, eran capaces de actuar también como co-receptores para distintas cepas del HIV-1. Así mismo nos propusimos determinar la posible actividad supresora que sobre este virus podría tener tanto el MCP-1 como los anticuerpos generados frente al CCR2. Dado que los anticuerpos reconocen diferentes regiones conocidas del receptor y que algunos de ellos presentan actividad agonista o antagonista, de su posible actividad supresora del HIV-1 podríamos sacar conclusiones sobre las regiones del receptor implicadas en la unión del virus.

La mayor parte de los ensayos encaminados a determinar la capacidad de un receptor de quimioquinas para actuar como co-receptor del HIV-1 se realizan con células que no expresan de forma natural estos receptores, sino que se trata de células que se transfectan con receptores de quimioquinas determinados. En nuestro caso hemos preferido emplear linfocitos de sangre periférica activados (PBMC), así como

macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM), que expresan de forma natural tanto CD4 como receptores de quimioquinas, y hemos analizado la actividad supresora de la infección del MCP-1 así como la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CCR2 para interferir con la replicación del HIV-1.

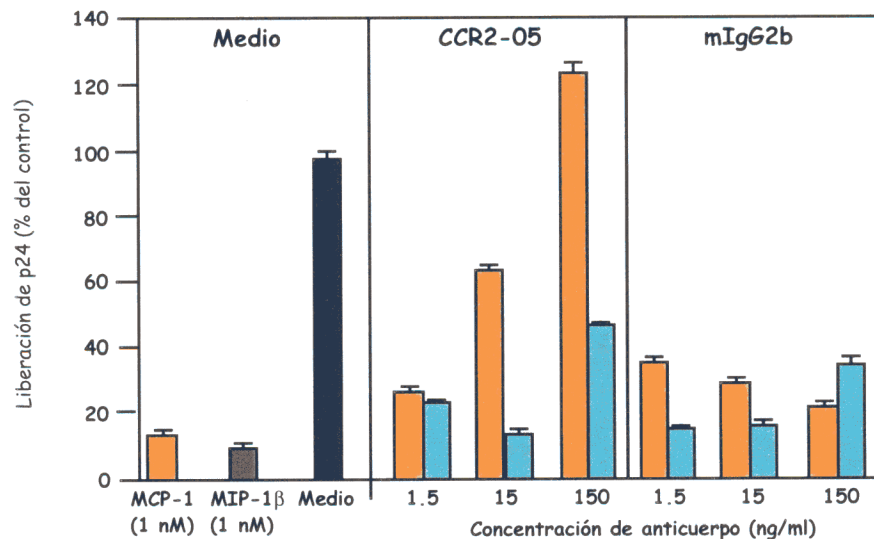


Figura 27. El MCP-1 tiene actividad supresora del HIV-1, actividad que es bloqueada por anticuerpos antagonistas del CCR2. Diversas concentraciones de MCP-1 y MIP-1β (0,01-10 nM) fueron analizadas en ensayos de supresión del HIV-1. Aquella concentración de MCP-1 (■) y MIP-1β (■) con máxima actividad inhibitoria (1 nM) se seleccionó, usando medio de cultivo sin tratar como control (■). Esta actividad supresora es bloqueada por la presencia de las concentraciones indicadas del anticuerpo CCR2-05, pero no por el hGH14 (mIgG2b), usado como control, comparada con medio de cultivo sin anticuerpo (■). La figura muestra las determinaciones por triplicado de un experimento representativo, con la desviación estandar indicada.

La infección por parte del virus en una célula conlleva su entrada y replicación lo que provoca la liberación al medio de una proteína de la cápsula vírica, la p24. Por la detección de esa proteína puede definirse el grado de infección y replicación viral.

Células mononucleares de sangre periférica activadas con PHA (10 µg/ml, 48h, 37°C, 5% CO₂), fueron incubadas durante 60 min con los anticuerpos o quimioquinas y luego se infectaron con la cepa X4 del HIV-1, NL4-3 (2 ng p24/10⁶ células por ensayo, 2h, 37°C). Las células se cultivaron en presencia de IL2 y de los anticuerpos o quimioquinas. El MCP-1 inhibió en esas condiciones la replicación viral de la cepa R5 BAL, del mismo modo que lo hace un ligando del CCR5 como es el MIP-1β. El efecto es específico del CCR2 pues anticuerpos antagonistas de este receptor como es el

CCR2-05 revertieron la neutralización promovida por el MCP-1 pero no por el MIP-1 β (Figura 27).

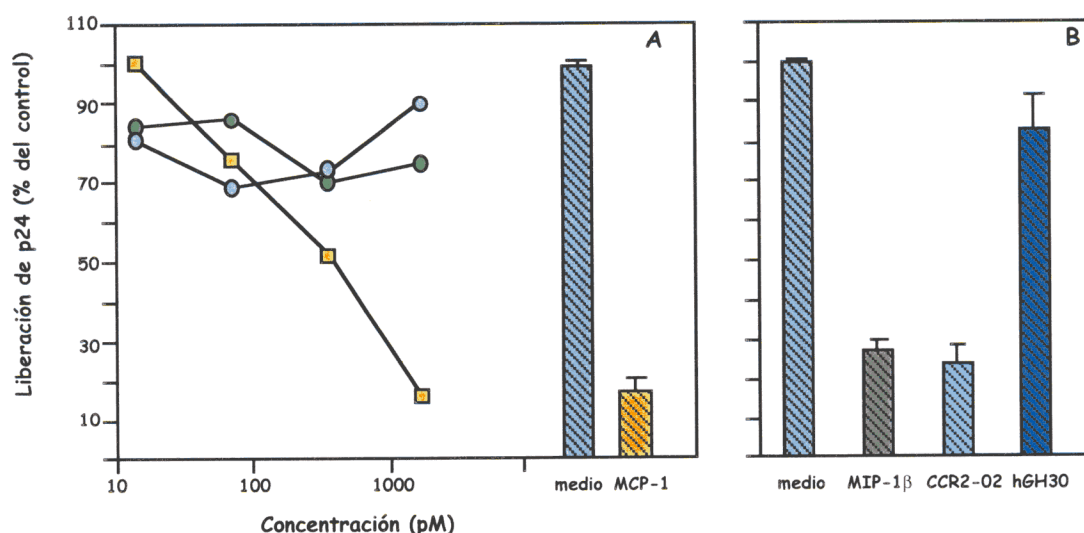


Figura 28. El anticuerpo agonista CCR2-02 presenta actividad supresora del HIV-1. (A) La actividad supresora del anticuerpo CCR2-02 (■) se determinó por la liberación de p24, como se indica en materiales y métodos, usando como control a los anticuerpos CCR2-05 (●) y hGH30 (IgG2a) (○) y la cepa NL4-3 y PBL como diana. (B) La actividad supresora del CCR2-02 (200 pM) también se analizó sobre la cepa BaL, usando como controles de supresión al MCP-1 (1 nM) y MIP-1 β (1nM) y como controles negativos al anticuerpo hGH30 y al medio de cultivo sin tratar. La figura muestra la media de determinaciones por triplicado con la desviación estandar indicada de un experimento representativo.

Así mismo, y como ya estaba descrito, tanto RANTES como MIP-1 β inhiben de forma dosis-dependiente la liberación al medio del antígeno p24 del HIV-1 de cepas R5 mientras que el SDF-1 α lo hace sobre cepas X4. Los datos de inhibición obtenidos con el MCP-1 concuerdan con los datos de otras quimioquinas, para las cuales la concentración a las que son capaces de inhibir al HIV-1 se correlaciona con aquella necesaria para inducir respuestas biológicas (0.01-10 nM) como movilización de calcio o inducción de quimiotaxis (Figura 28). Descartamos además que el efecto inhibitorio se deba a un efecto inhibitorio del MCP-1 sobre la proliferación celular, ya que no afecta a la respuesta proliferativa de los PBLs inducida por PHA.

Pero es que además en los cultivos de células tratadas con los anticuerpos CCR2-01 y 02, observamos una inhibición en la presencia de p24 en el sobrenadante, con respecto a los controles, con una ED₅₀ de 1-10 nM. El efecto no fué observado cuando las preincubaciones se realizaron con el resto de anticuerpos anti-CCR2 ni con

los correspondientes controles de isotipo empleados (**Figura 29A**). Similares datos se obtuvieron en ensayos empleando MDM y la cepa R5 BAL; tanto el MCP-1 como el anticuerpo CCR2-01 inhibieron la infección, en este caso determinada por la actividad transcriptasa reversa (**Figura 29B**). Si conviene dejar claro que existe una alta variabilidad en los niveles de inhibición, dependiente de donante.

Estos datos indican la capacidad del CCR2 de actuar como co-receptor de algunas cepas del virus y la capacidad del MCP-1 y de anticuerpos dirigidos frente al extremo amino terminal del CCR2 de neutralizar la infección por HIV-1.

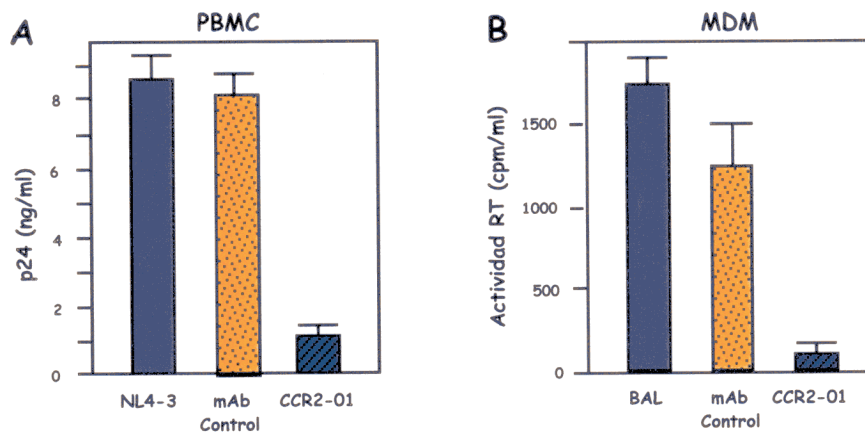


Figura 29. El anticuerpo CCR2-01 previene la infección por HIV-1 en PBMC y MDM. (A) El CCR2-01 (10 μ g/ml) y un anticuerpo control del mismo isotipo fueron ensayados para ver su actividad supresora del HIV-1 usando la cepa X4 NL4-3 y PBMC activados como células diana. Sobrenadantes de cultivo no tratados (NL4-3) fueron usados como control. La replicación viral se determinó cuantificando los niveles de antígeno gag p24 (ng/ml) a los 7 días de la infección. Los datos representan la media del análisis por triplicado con la desviación estandar indicada. (B) La actividad supresora del CCR2-01 (200 nM) y de un anticuerpo control del mismo isotipo (200 nM), se probó frente a la cepa R5 HIV-1 BaL in MDM de 5 días. Sobrenadantes sin tratar fueron usados de control (BaL). La replicación viral se determinó a los 25 días de la infección por medida de la actividad transcriptasa reversa y expresada en cpm/ μ l. Los datos representan la media de determinaciones por triplicado con la desviación estandar indicada.

La conclusión más interesante es que el CCR2 es capaz de actuar como co-receptor de esta cepa del HIV-1 y que el MCP-1 inhibe la infección con igual efectividad que otras quimioquinas, aunque seguramente su actividad se reduzca a unas pocas cepas del virus. En cuanto a los anticuerpos dirigidos frente al extremo N-

terminal del CCR2, ambos tienen actividad neutralizante, hecho que no resulta extraño para el CCR2-01 ya que mimetiza al ligando en todos los ensayos analizados. El CCR2-01, que no activa al receptor por sí mismo ni modifica la actividad del MCP-1, también tienen actividad neutralizante, hecho que asigna una gran importancia a la región N-terminal del CCR2 en la infección por HIV-1.

El hecho de que anticuerpos dirigidos contra el tercer bucle extracelular del CCR2 (CCR2-04 y 05) sean capaces de revertir los efectos del MCP-1 sin poseer actividad neutralizante *per se*, sugieren la importancia de esta región en la interacción entre el ligando y el receptor, región que sin embargo no parece estar relacionada con la interacción entre el receptor y el HIV-1. Del mismo modo, la actividad supresora sobre el HIV-1 de los anticuerpos dirigidos contra el extremo amino del CCR2, indica el papel que juegan estos aminoácidos en la interacción entre el HIV-1-CD4 y receptores de quimioquinas.

4.- IDENTIFICACION DE LAS SEÑALES TEMPRANAS IMPLICADAS EN LA SEÑALIZACIÓN A TRAVES DEL RECEPTOR CCR2

4.1. El receptor CCR2 regula la movilización de calcio y se asocia a la proteína G α i.

Hasta este momento hemos venido usando para nuestros experimentos tanto linfocitos humanos purificados como diferentes líneas celulares que expresan receptores de quimioquinas. Llegado el momento de implicarnos en el estudio de la señalización y para evitar las variaciones debidas a la obtención de células procedentes de donantes, decidimos usar como modelo para estudiar la señalización activada por MCP-1 al unirse al CCR2, una línea celular que expresara este receptor y que fuera completamente funcional. La línea celular Mono Mac 1 es una línea monocítica humana que responde a estas características, ya que expresa el CCR2 así como otros receptores de quimioquinas (CXCR4), y marcadores de superficie de monocitos (CD13, CD14 y CD68). Estas células no sólo expresan el CCR2 sino que también son capaces de responder al estímulo con MCP-1. Como ya hemos indicado previamente, éstas células al ser estimuladas con diferentes concentraciones de MCP-1 (desde 0.1 hasta 100 nM) son capaces de movilizar calcio. Esta movilización es detectable por citometría de flujo usando la sonda fluorescente Fluo-3. Así mismo, cuando las células se ponen en una cámara de migración y se las enfrenta con un gradiente de MCP-1, las células son capaces de migrar através de una membrana de 5 micras de tamaño de poro. Al objeto de mimetizar un poco más la situación fisiológica, la membrana se tapiza con células endoteliales y así la migración depende tanto del tamaño de poro como de las interacciones entre los distintos tipos celulares. En estos casos, las células Mono Mac 1 también son capaces de migrar en respuesta a MCP-1. La migración inducida por quimioquinas aumenta en función de la concentración del estímulo hasta llegar a un máximo a partir del cual el número de células que migran disminuye al aumentar la concentración de quimioquinas, de tal modo que las representaciones del índice de migración frente a concentración de quimioquina tienen forma de campana. Este fenómeno ha sido explicado por la desensibilización e internalización de receptores, ya que no hay que olvidar que los fenómenos de migración son observados a tiempos largos (1 a 4 horas), pero también podrían tener que ver con el hecho de que altas concentraciones de quimioquina rompan el gradiente quimiotáctico necesario para que la migración se produzca.

Cuando las células Mono Mac 1 se trataron durante 16 horas con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de toxina de pertussis, tanto la movilización de calcio como la migración inducida por MCP-1 fueron completamente bloqueadas. Experimentos llevados a cabo en paralelo en células tratadas con 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de toxina del cólera durante 16 horas no modificaron la respuesta a MCP-1 en ninguno de estos ensayos (**Figura 30**). Estos datos, conocidos para otros sistemas celulares y quimioquinas, indican que al menos algunas de las señales intracelulares inducidas por MCP-1 y por otras quimioquinas, tanto en monocitos como en líneas celulares T, son mediadas por proteínas G sensibles a PTX, del tipo Gi.

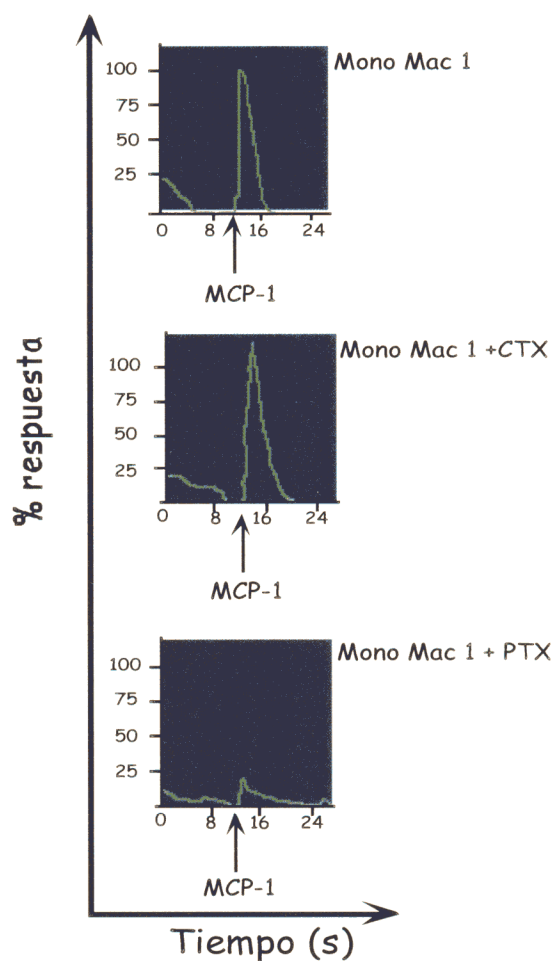


Figura 30. La movilización de calcio inducida por MCP-1 en células Mono Mac 1 es sensible a PTX. La movilización de calcio en respuesta a 5 nM de MCP-1 en células sin tratar o tratadas con PTX o CTX se determinó por citometría de flujo a 525 nm, según el protocolo anteriormente descrito. La figura muestra un experimento representativo. Los resultados se expresan como porcentaje de la máxima respuesta obtenida al estimular con MCP-1.

Usando los anticuerpos monoclonales específicos del CCR2, hemos tratado de analizar si la activación de Gi por MCP-1 era mediada por la asociación física entre el CCR2 y la subunidad G α de la proteína Gi heterotrimérica. Una proteína G α i asociada al CCR2 es inmunoprecipitada por anticuerpos anti-CCR2 y detectada en western blot usando anticuerpos específicos frente a ella. La asociación es iniciada en los primeros 30 segundos después de la activación con MCP-1 y persiste al menos durante 5 minutos después de la unión de la quimioquina al receptor (**Figura 31, panel superior**), disminuyendo después.

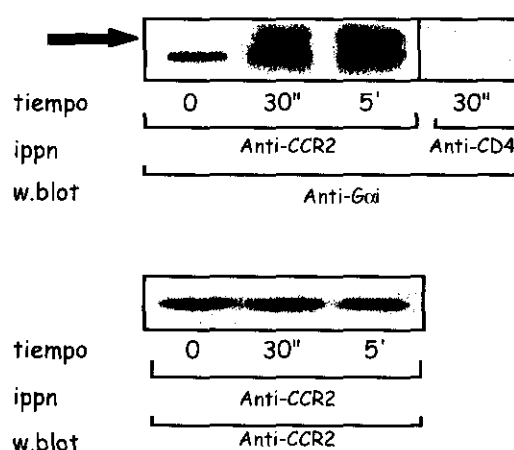


Figura 31. El MCP-1 induce la asociación de G α i al CCR2. Lisados de células Mono Mac 1 estimuladas con 5 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con el mAb CCR2-03 o con el anticuerpo HP2.6 (anti-CD4), como control, y el western blot desarrollado con anticuerpos anti-G α i. Se controló que la cantidad de CCR2 era similar en los diferentes carriles, re-incubando la membrana con anticuerpos anti-CCR2. La flecha indica la posición de G α i.

Cuando el mismo experimento se realizó buscando una proteína Gs, sensible a CTX, los resultados fueron negativos, a pesar de que estas proteínas se expresan en las células Mono Mac 1 en niveles similares a las proteínas Gi. En todos los casos, los blots fueron rehibridados con anticuerpos anti-CCR2 para descartar que las diferencias observadas fuesen debidas a diferentes cantidades de receptor inmunoprecipitado en cada carril (**Figura 31, panel inferior**).

4.2. Fosforilación en tirosinas del CCR2.

En las células Mono Mac 1 y en respuesta a MCP-1, se produce un incremento de la fosforilación en tirosinas de distintas proteínas, como se observa en experimentos de inmunoprecipitación y western blot de células estimuladas, empleando anticuerpos específicos anti-Ptyr (**Figura 32**).

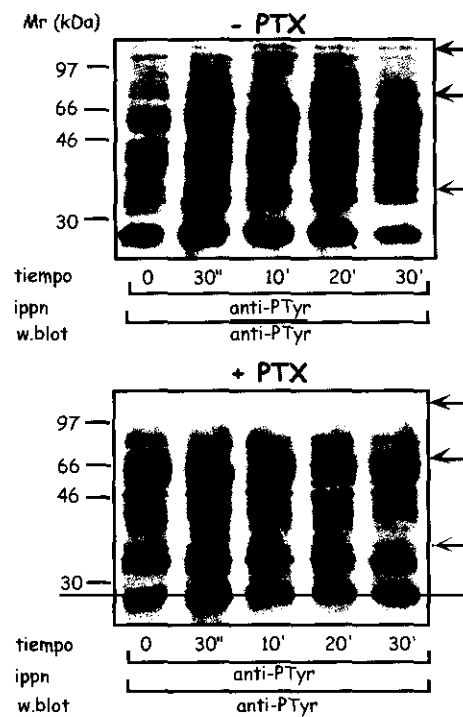


Figura 32. Fosforilación de proteínas en respuesta a MCP-1; efecto de la PTX. Lisados de células Mono Mac 1 preincubadas o no con PTX (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 16 h) y estimuladas con 5 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-PTyr y el western blot desarrollado con anticuerpos anti-PTyr. Las flecha indican la posición de aquellas bandas cuyo nivel de fosforilación se ve afectado por la estimulación con MCP-1.

Interesantemente, no todas las proteínas fosforiladas en respuesta al ligando se mantienen cuando se efectúa un pretratamiento de las células con PTX, anterior al estímulo con ligando. Entre las que se mantienen destacamos una de 38 kDa de peso molecular que es fosforilada rápidamente, 30 segundos tras el estímulo con la quimioquina. Precisamente ese es el peso molecular al que aparece en western blot el CCR2, por eso y para confirmar que realmente se corresponde con el receptor, lisados

de células Mono Mac 1 estimuladas previamente con MCP-1 durante diferentes tiempos, fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Ptyr y los western blot fueron desarrollados con un anticuerpo monoclonal anti-CCR2 (**Figura 33**).

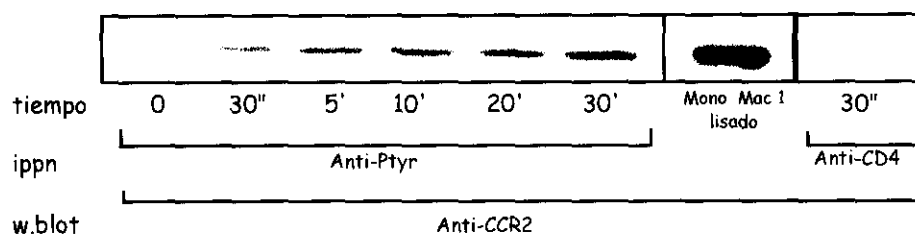


Figura 33. El MCP-1 induce la fosforilación en residuos de tirosina del CCR2. Lisados de células Mono Mac 1 estimuladas con 5 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-PTyr PY20 y el western blot desarrollado con el mAb CCR2-05. Como control los mismos lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD4 y desarrollados con el CCR2-05.

Se puede observar que el CCR2 se fosforila en residuos de tirosina a los 30'' de la estimulación con 5 nM de MCP-1. Curiosamente, se puede detectar presencia de unos niveles basales de receptor activado en ausencia de estímulo ($t=0$); la relevancia de este dato se analizará más adelante. Como control de especificidad los mismos lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos específicos de otras proteínas de membrana y revelados con anticuerpos anti-CCR2. Efectivamente el CCR2 era inmunoprecipitado por anticuerpos anti PTyr tras el estímulo con MCP-1. Por la relevancia que el dato posee, el experimento se llevó a cabo también en sentido inverso, esto es, inmunoprecipitando lisados de células tratadas con MCP-1 a diferentes tiempos con anticuerpos anti-CCR2 y revelando los western blot con anticuerpos anti-Ptyr. Nuevamente se demostró que el receptor CCR2 es fosforilado en tirosina rápidamente tras estimulación con su ligando, el MCP-1; el efecto no se debe a que se haya inmunoprecipitado diferente cantidad de proteína en cada carril como se demuestra cuando la misma membrana es revelada usando anticuerpos anti-CCR2 (**Figura 34**). Estamos pues hablando de una fosforilación que ocurre muy rápidamente tras el estímulo con ligando, fosforilación que tiene lugar aún en células tratadas con PTX (**Figura 32, panel inferior**), indicando por lo tanto que el efecto es independiente de la proteína G. Hasta este momento la señalización a través de proteína G era considerada como la más temprana activada por las quimioquinas. El hecho de que existan vías independientes de señalización y que estas ocurran a tiempos muy

tempranos, similares al menos a los tiempos en los que se detecta activación de la proteína G, nos indujo a profundizar en el estudio de las posibles quinasas implicadas en esta fosforilación.

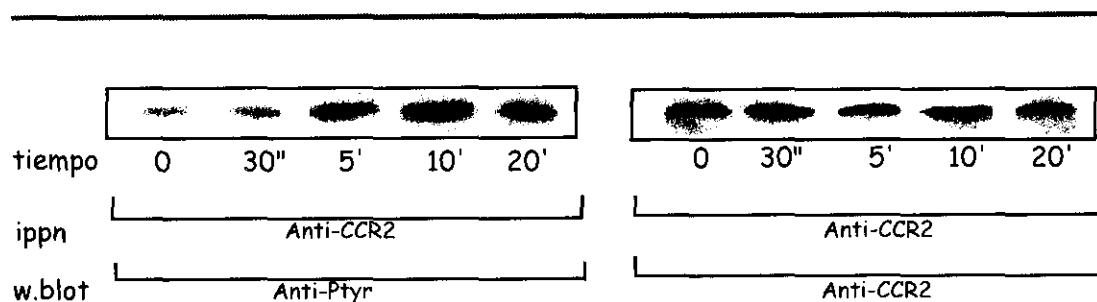


Figura 34. El MCP-1 induce la fosforilación en residuos de tirosina del CCR2. Lisados de células Mono Mac 1 estimuladas con 5 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo CCR2-03 y el western blot desarrollado con el anticuerpo anti-PTyr 4G10. Se controló que las cantidades de CCR2 en cada carril eran equiparables, analizando la misma membrana con el anticuerpo CCR2-05.

4.3 La quimioquina MCP-1 induce la activación de JAK-2 y su asociación al CCR2 de manera independiente de la vía de la proteína Gi.

Para intentar averiguar cual es la quinasa responsable de la rápida fosforilación del CCR2, las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 10 nM de MCP-1 y los lisados celulares inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2. En esas condiciones y usando anticuerpos específicos anti-JAK2 se demuestra que esta quinasa y no otra de su familia, ni JAK1 ni JAK3, se asocia rápidamente, 30 segundos, al receptor en respuesta al ligando. Pequeñas cantidades de JAK2 asociado se pueden observar en ausencia de estímulo, lo que es consistente con el hecho de encontrar receptor fosforilado en tirosinas en esas mismas condiciones (**Figura 35A**).

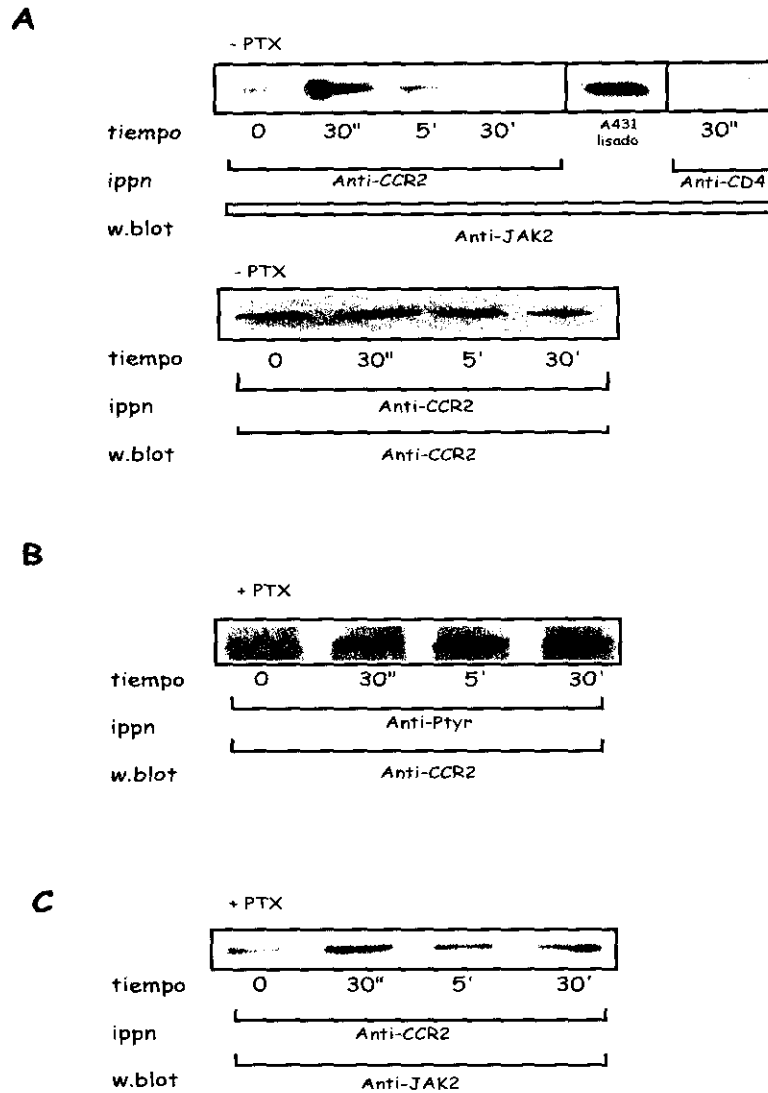


Figura 35. El MCP-1 induce la asociación de JAK2 al CCR2. Efecto de la PTX. (A) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1 y los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado el western blot con anticuerpos anti-JAK2. Como control, los mismos lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD4 y y analizado el western blot con anticuerpos anti-JAK2. Lisados de células A431 fueron analizados en western blot con anticuerpos anti-JAK2, como control positivo. (B) Las células Mono Mac 1, pre-tratadas con PTX (0.1 µg/ml, 16h a 37°C) fueron estimuladas con MCP-1 como en (A) y los lisados inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Ptyr (PY20) y analizados en western blot con anticuerpos anti-CCR2. (C) Las células pre-tratadas con PTX igual que en (B), fueron estimuladas, lisadas, inmunoprecipitadas y analizadas en western blot como en (A).

La inmunoprecipitación de los lisados de células estimuladas con MCP-1 con anticuerpos monoclonales del mismo isotipo dirigidos contra proteínas de membrana (anti-CD4 o anti-MHC, clase I) presentes en las células Mono Mac 1, no indican presencia de JAK2 asociada a estas proteínas (**Figura 35A**), confirmando que no existen asociaciones inespecíficas de JAK2 a otros componentes de la membrana en nuestras condiciones experimentales. La rápida asociación de JAK2 al receptor y la coincidencia en el tiempo con la fosforilación en tirosina del receptor sugiere un papel para esta quinasa en éste fenómeno. En todos los casos se descartó que los efectos vistos se debieran a diferentes cantidades de proteína inmunoprecipitada, revelando las mismas membranas con el anticuerpo CCR2-05.

Cuando las células son tratadas con 0.1 µg/ml de PTX durante 16 horas, el ligando sigue provocando la fosforilación en tirosinas del receptor como se demuestra al detectar su presencia en inmunoprecipitados de lisados de células Mono Mac 1 tratadas con MCP-1 (**Figura 35B**). Al realizar los mismos experimentos anteriores empleando células tratadas previamente con 0.1 µg/ml de PTX durante 16 horas, estimular con 5nM de MCP-1 e inmunoprecipitar el CCR2, observamos la asociación de una proteína que se revela con anticuerpos anti-JAK2 a los 30", lo que implica que la asociación de esta quinasa al receptor no depende de una proteína G sensible al tratamiento con esa toxina (**Figura 35C**). Esto puede sin duda explicar el por qué vemos una fosforilación en residuos tirosina del CCR2 estimulado por MCP-1 en células pretratadas con PTX. Hay que resaltar el hecho de que si bien vemos que la asociación de JAK2 al receptor no necesita de la activación de la Gi, no ocurre lo mismo con la disociación. Como se puede observar en la **figura 35A**, en células no tratadas con PTX, JAK2 se disocia del receptor y a los 15 min del estímulo, la quinasa no aparece asociada al CCR2. Por el contrario, en las células tratadas con PTX y que por tanto tiene inactivada a la proteína Gi, JAK2 permanece asociada al receptor, hecho que sugiere la participación de una proteína Gi activa en la disociación de JAK2 (**Figura 35C**). Más adelante abordaremos que señales dependientes de Gi están implicadas en estos eventos.

De manera análoga a otros sistemas, la activación de un miembro de la familia de las JANUS quinasas requiere que la propia quinasa esté fosforilada en tirosina. Para confirmar este hecho, se diseñaron experimentos de western blot para detectar la presencia de JAK2 fosforilado tras la activación de las células con MCP-1. En lisados de células Mono Mac 1 estimuladas a distintos tiempos con 5 nM de MCP-1 e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-JAK2, se revela mediante anticuerpos anti-

PTyr la presencia de esta quinasa fosforilada. Efectivamente, tras 30" de activación aparece una proteína inmunoprecipitada por anticuerpos anti-JAK2, que se corresponde con su peso molecular y que está fosforilada en residuos de tirosina (**Figura 36A**). Esta fosforilación se mantiene durante 5 minutos desapareciendo posteriormente. Como control, la misma membrana fue hibridada con anticuerpos anti-JAK2, demostrando que la banda fosforilada en tirosinas era JAK2 y que los efectos observados no eran debidos a diferencias en la cantidad de JAK2 inmunoprecipitada (**Figura 36A, panel derecho**). Para confirmar que efectivamente la banda se correspondía con JAK2, el mismo experimento se realizó también en sentido contrario usando anticuerpos anti-PTyr para inmunoprecipitar lisados de células Mono Mac 1 estimulados a los tiempos indicados con 5 nM de MCP-1. Del mismo modo que en el experimento anterior, JAK2 apareció en los inmunoprecipitados de anticuerpos anti-fosfotirosina en respuesta al estímulo con MCP-1.

En el modelo de las citoquinas, donde la presencia de JAK ha sido más estudiado, la activación de estas quinasas promueve la asociación, fosforilación y por lo tanto activación de una serie de factores de transcripción de la familia STAT (Factores transductores de señal y activadores de transcripción). Nosotros nos propusimos ver si en el caso de las quimioquinas la activación de JAK era acompañada de la activación de algún miembro de la familia STAT. Para ello, las células Mono Mac 1 fueron tratadas a diferentes tiempos con 5 nM de MCP-1. Tras lisar, los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 y sometidos a western blot con anticuerpos específicos que reconocen a diferentes miembros de la familia STAT. De este modo vimos que STAT3, pero no STAT5 se asocia al receptor con un máximo a los 5 minutos, que coincide con los tiempos de asociación y activación de Jak2 tras la activación con MCP-1 (**Figura 36A y B**). El STAT3 no sólo se asocia al CCR2, sino que también está activado, es decir, fosforilado en tirosinas, como se observa al inmunoprecipitar con anticuerpos anti-fosfotirosina extractos celulares de Mono Mac 1 tratadas con 10 nM de MCP-1 y desarrollar los western blot con anticuerpos anti-STAT3(**Figura 36A y C**). El tiempo de máxima fosforilación, 5 minutos, coincide con el de máxima asociación al receptor.

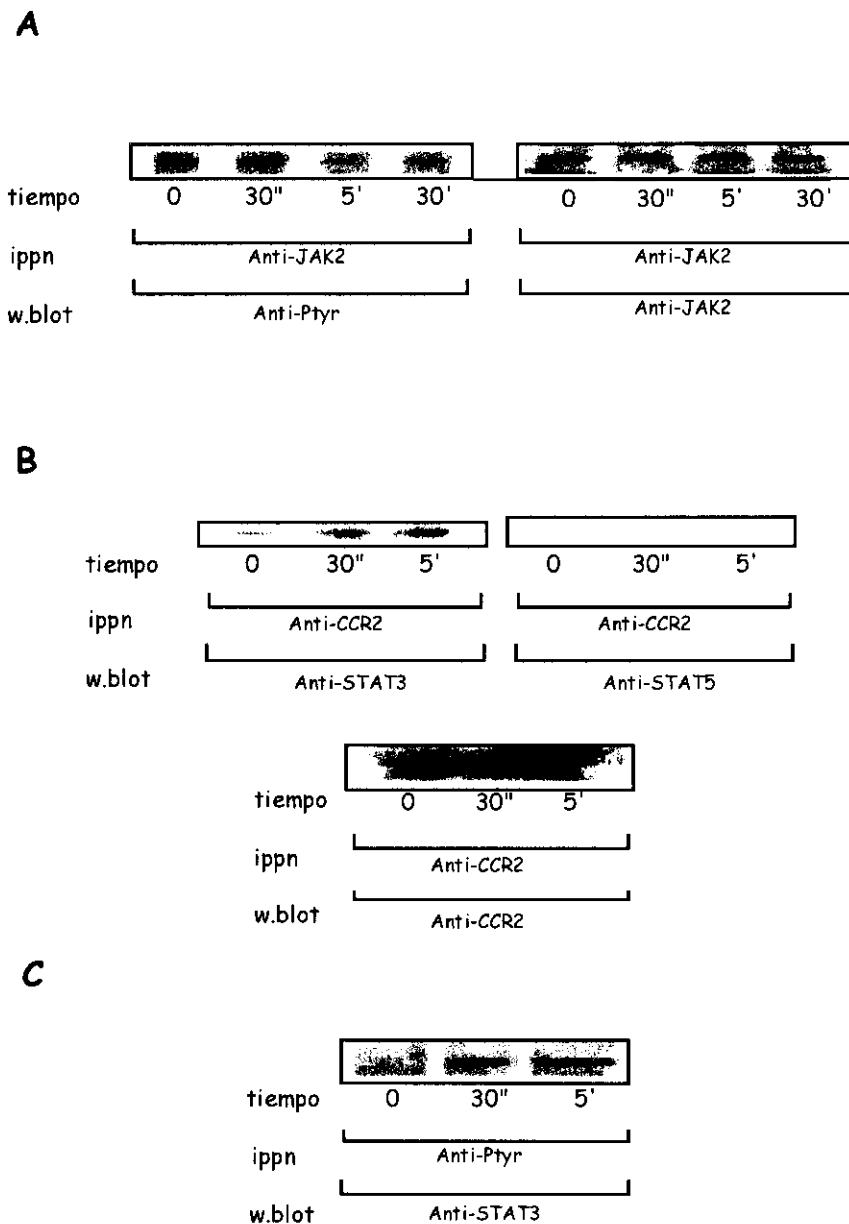


Figura 36. El MCP-1 activa la vía JAK/STAT. (A) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-JAK2 y analizada la membrana con anticuerpos anti-PTyr. La cantidad de JAK2 cargada en cada carril se determinó analizando la misma membrana con anticuerpos anti-JAK2. (B) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas como en (A) y los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 y analizados por western blot con anticuerpos anti-STAT3 o -STAT5. La cantidad de CCR2 cargada en cada carril se determinó rehibridando la misma membrana con el mAb CCR2-05. (C) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas como en (A) y los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-PTyr y analizado la membrana por western blot con anticuerpos anti-STAT3.

Por lo tanto la activación del CCR2 inducida por MCP-1 no sólo activa vías de señalización relacionadas con la proteína G_i , sino que además también dispara vías de señalización ligadas a JAK/STAT. ¿Existe alguna relación entre una y otra?. Como hemos visto anteriormente, parece evidente que la activación de la vía de JAK/STAT es independiente de G_i , pero queda por ver si la activación de ambas vías de señalización ocurre de forma simultánea o si una precede a la otra, dato que no puede inferirse de las cinéticas de activación realizadas, ya que en ambos casos se observa a tiempos muy cortos (30") y no pueden diferenciarse con las técnicas de inmunoprecipitación y western blot empleadas.

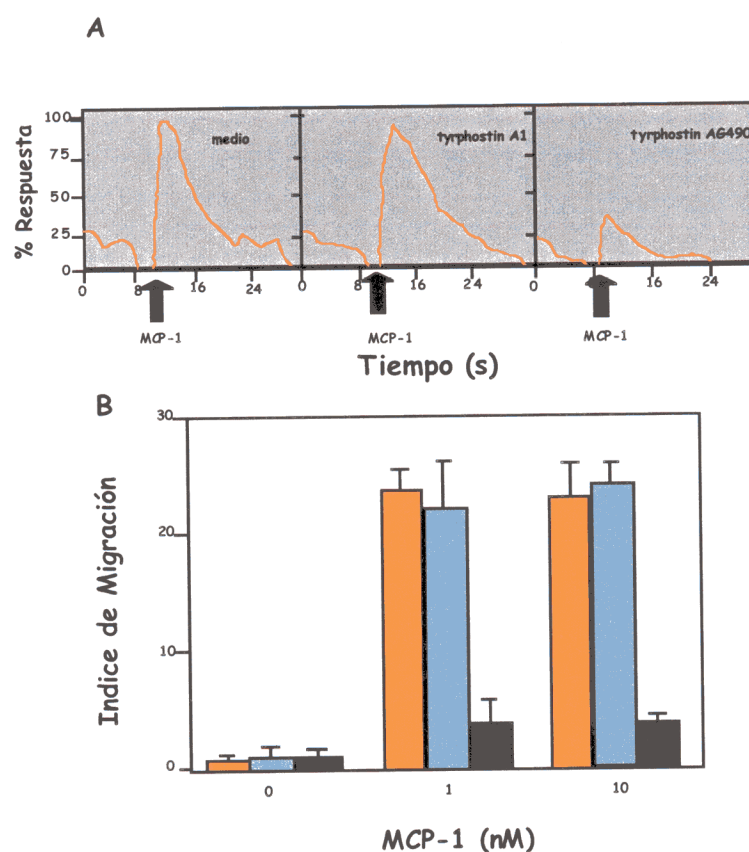


Figura 37. La tirfostina AG490, inhibidor específico de la tirosin-quinasa JAK2, bloquea las respuestas inducidas por MCP-1. **(A)** Movilización de calcio inducida por 5 nM de MCP-1 en células Mono Mac 1 cargadas con Fluo-3-AM, sin tratar o tratadas con las tirfostinas A1 y AG490 (25 μ M, 16h a 37°C), y evaluada a 525 nm por citometría de flujo. La figura muestra el resultado de un experimento representativo. El % de respuesta se determinó como en ocasiones anteriores. **(B)** Las células Mono Mac 1 sin tratar (■) o tratadas con 25 μ M de las tirfostinas AG490 (■) ó A1 (■) durante 16 h se probaron en ensayos de migración inducida con 10 nM de MCP-1. Las células migradas al pocillo inferior se contaron y se expresan como índice de migración, calculado como ya se ha indicado previamente. Los datos muestran la media de determinaciones por triplicado con la desviación estandar indicada.

En un intento de discernir el proceso, las células fueron tratadas con inhibidores específicos de JAK (Meydan *et al*, 1996), como es la tirfostina B42 (AG 490) y se analizó su efecto sobre la movilización de calcio y migración inducida por MCP-1 (Figura 37 A y B). La preincubación durante 16 horas a 37°C en medio de cultivo completo con 25 μ M del inhibidor de JAK bloquea por completo ambos efectos inducidos por 10 nM de MCP-1, mientras que células tratadas con el análogo tirfostina A1, usado como control, no afecta a ninguno de los dos procesos (Figura 37). Parece evidente por lo tanto que al bloquear la vía de señalización JAK/STAT inhibimos eventos necesarios para la inducción de movilización de calcio y para la quimiotaxis. Teniendo en cuenta que ambos efectos son mediados por la activación de la proteína Gi, nos propusimos determinar cuales eran las consecuencias que tenían estos inhibidores sobre la asociación de G α i al CCR2, indicativo de la activación de esta vía. Pues bien, el tratamiento con la tirfostina B42 y no con la A1, inhibe la asociación de G α i al CCR2 (Figura 38). Dado que la vía JAK/STAT juega un papel muy importante en la señalización mediada por quimioquinas y factores de crecimiento y para descartar que los efectos observados se debieran a fenómenos no directamente ligados al receptor de quimioquinas, controlamos que el tratamiento con ambas tirfostinas (A1 y B42) no resultaba tóxico para las células Mono Mac 1, al menos en las condiciones empleadas, como se demuestra por análisis del ciclo celular mediante ensayos de incorporación de yoduro de propidio (Figura 39).

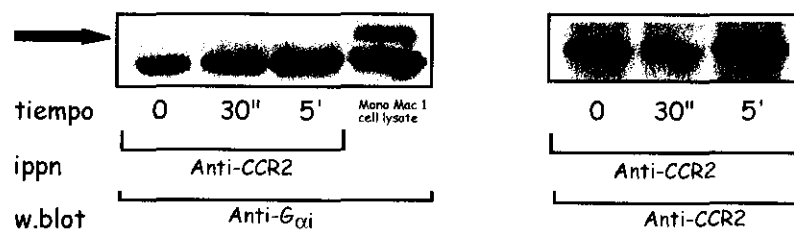


Figura 38. La tirfostina AG490 inhibe la asociación de G α i al CCR2. Las células Mono Mac1 tratadas con AG490, como se indica en la figura 29, fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 y el western blot analizado con anticuerpos anti-G α i. La cantidad de CCR2 en cada carril se determinó analizando la misma membrana con el mAb CCR2-05. La flecha muestra la posición de G α i.

Si bien parece que la activación de JAK es imprescindible para la asociación de G α i, también resulta evidente que la activación de la proteína G es necesaria para el

control de la vía JAK/STAT, como se puede concluir de las cinéticas de asociación/disociación de JAK2 al CCR2 en presencia de PTX. La dependencia existente entre la actividad de JAK y su estado de fosforilación, sugiere la existencia de fosfatasa dependientes de la proteína G, regulando esta vía de señalización.

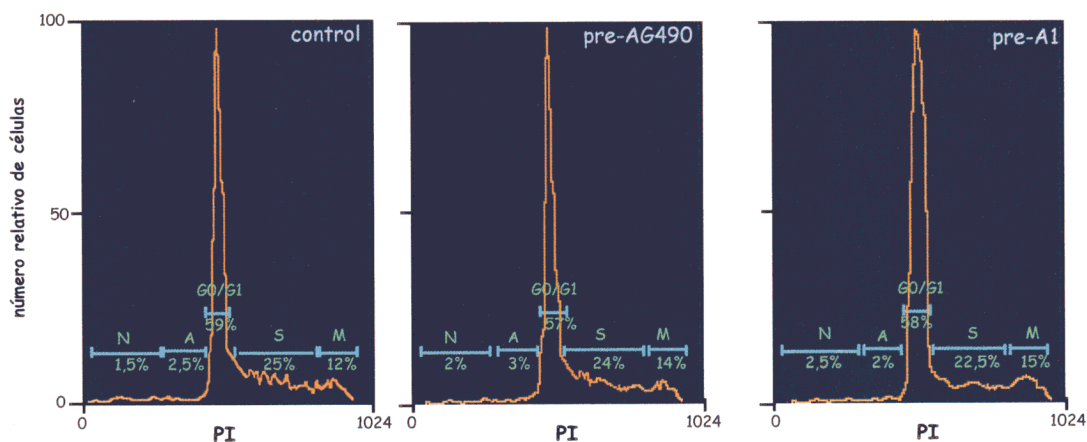


Figura 39. El tratamiento de las células Mono Mac 1 con las tirfostinas AG490 y A1 no afecta a su viabilidad. Las células Mono Mac 1 fueron tratadas con las tirfostinas AG490 y A1 (25 μ M, 16h a 37°C) y su viabilidad analizada por ensayos de incorporación de yoduro de propidio y análisis de ciclo celular por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de células que se encuentran en necrosis (N), apoptosis (A), G0/G1, síntesis (S) y mitosis (M). Como control, células sin tratar (medio) se analizaron del mismo modo.

4.4. La tirosina 139 del CCR2 es crítica para la señalización inducida por MCP-1.

Dado que la fosforilación del CCR2 mediada por JAK2 juega un papel primordial en la activación de los receptores de quimioquinas, nos planteamos determinar cuál o cuáles son los residuos fosforilables por JAK en el CCR2. En la naturaleza, el receptor CCR2 existe en dos formas CCR2A y CCR2B, generadas por “splicing” alternativo que da lugar a dos receptores con secuencias idénticas, salvo en los extremos carboxilo terminales. Ambas formas de receptor son capaces de unir MCP-1 y de señalizar en respuesta a la unión del ligando. Sin embargo el “splicing” provoca que existan tres residuos de tirosina intracelulares en el CCR2B, mientras que el CCR2A sólo posee uno de estos residuos, localizado en la posición 139 y formando parte del motivo DRY, motivo que está altamente conservado en toda la familia de

receptores acoplados a proteínas G y que es esencial para la activación de estos receptores. Dado que este residuo es el único presente en ambas formas del CCR2, pensamos en él como primer candidato a estar implicado en la unión de JAK2 por lo que construimos un receptor CCR2B mutante en el cual se sustituyó la Tyr139 por fenilalanina, Phe (CCR2BY139F) y lo expresamos en una línea celular de embrión humano, las HEK-293. Tanto el receptor nativo como el mutante, CCR2BY139F, se expresan de igual forma en la membrana de las células HEK-293, como demuestran los experimentos de citometría de flujo empleando los anticuerpos anti-CCR2 (**Figura 40**). Así mismo, ambos receptores unen MCP-1 con constantes de afinidad similares, determinado por ensayos de unión con ligando marcado con yodo radioactivo (I^{125}).

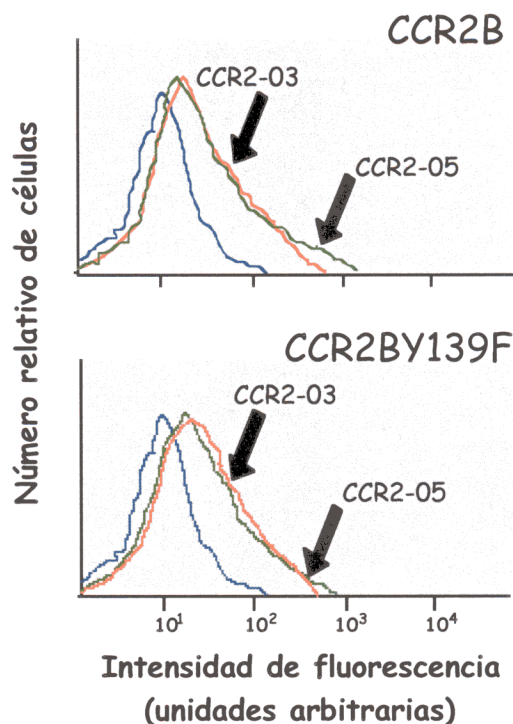


Figura 40. Expresión del CCR2 y del CCR2Y139F en células HEK-293. Las células HEK-293 fueron transfectadas de forma estable con el CCR2 y el receptor mutante CCR2Y139F. La figura muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de ambos receptores, nativo y mutante, en la membrana de células transfectadas, usando dos anticuerpos anti-CCR2, el CCR2-03 (—) y el CCR2-05 (—) y comparando la unión de estos mAb con la de un anticuerpo control (—).

Cuando analizamos la respuesta funcional de los transfectantes, nos encontramos que el MCP-1 es capaz de inducir movilización de calcio en aquellas células que expresan el CCR2B nativo, pero no en las células que expresan el

CCR2BY139F ni tampoco en aquellas células transfectadas con el vector vacío y usadas como control negativo(**Figura 41**). En todos los casos las células transfectadas tenían similares niveles de carga con la sonda fluorescente Fluo3, carga determinada por la capacidad que presentaban los transfectantes de movilizar calcio en respuesta a un agente inespecífico, como es la ionomicina, ionóforo empleado a 5 $\mu\text{g/ml}$.

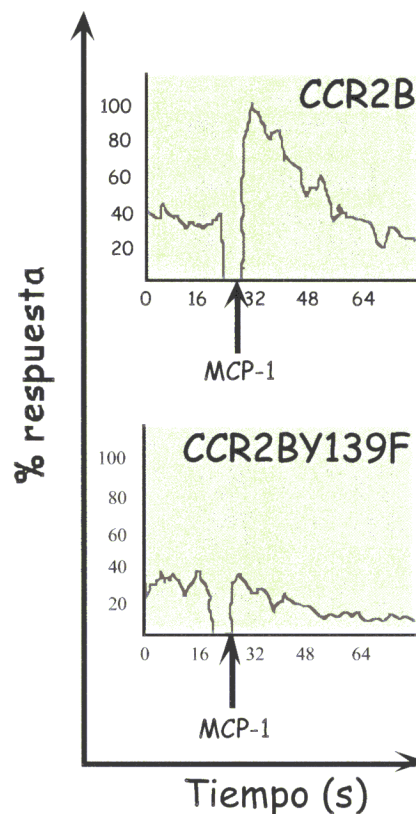


Figura 41. Funcionalidad de los receptores CCR2 y CCR2Y139F expresados en células HEK-293. Movilización de calcio en células HEK-293 transfectadas con los citados receptores en respuesta a 10 nM de MCP-1 y determinada por citometría de flujo a 525 nm. La figura muestra un experimento representativo. El % de respuesta se ha calculado como en ocasiones anteriores.

Parece por lo tanto que la Y139 es un residuo crítico para la funcionalidad del CCR2B y nos propusimos por lo tanto, determinar si la unión del MCP-1 a este receptor mutante era capaz de disparar alguno de los eventos de señalización temprana observados en el receptor nativo, como es la fosforilación del receptor, la asociación de JAK2 y la activación de la proteína Gi. Pues bien, cuando las células HEK-293

transfectadas con el receptor nativo o con el CCR2Y139F fueron activadas con 10 nM de MCP-1 durante 30"y lisadas sólo se observa la presencia de CCR2 en inmunoprecipitados con anticuerpos anti-fosfotirosina, mientras que en ningún caso fué posible detectar la presencia de CCR2Y139F fosforilado en residuos de tirosina (**Figura 42**).

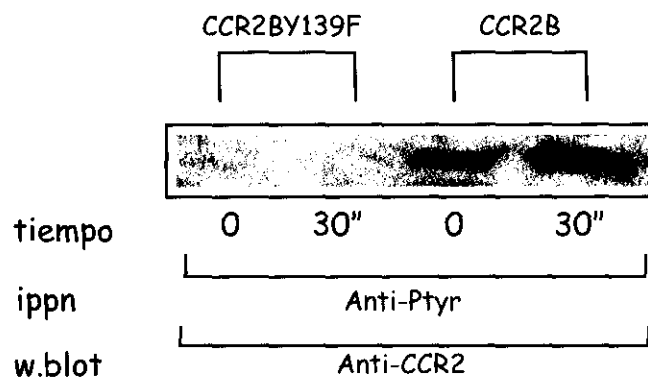


Figura 42. El receptor CCR2Y139F no se fosforila por acción del ligando. Las células HEK-293 transfectadas con los receptores indicados fueron estimulados con 10 nM de MCP-1 durante 30 seg, lisados e inmunoprecipitados con anticuerpos anti-PTyr y analizados en ensayos de western blot con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-05).

De la misma manera se analizó la asociación de JAK2 al CCR2 en células transfectadas con el receptor nativo y el mutante. Tras estimular durante 30" con 10 nM de MCP-1, inmunoprecipitar los lisados celulares con anticuerpos anti-CCR2 y analizar los western blot con anticuerpos anti-JAK2, se puede observar la asociación de JAK2 al receptor nativo a tiempos similares a los observados en las células Mono Mac 1 (máxima a los 30"), mientras que no se detectó la presencia de JAK2 asociado al receptor mutante CCR2Y139F (**Figura 43, panel superior**). Como control, las mismas membranas fueron hibridadas con anticuerpos anti-CCR2 para demostrar la presencia de misma cantidad de receptor inmunoprecipitado y que el reconocimiento de los anticuerpos no estaba afectado por la mutación introducida en el CCR2 (**Figura 43, panel inferior**).

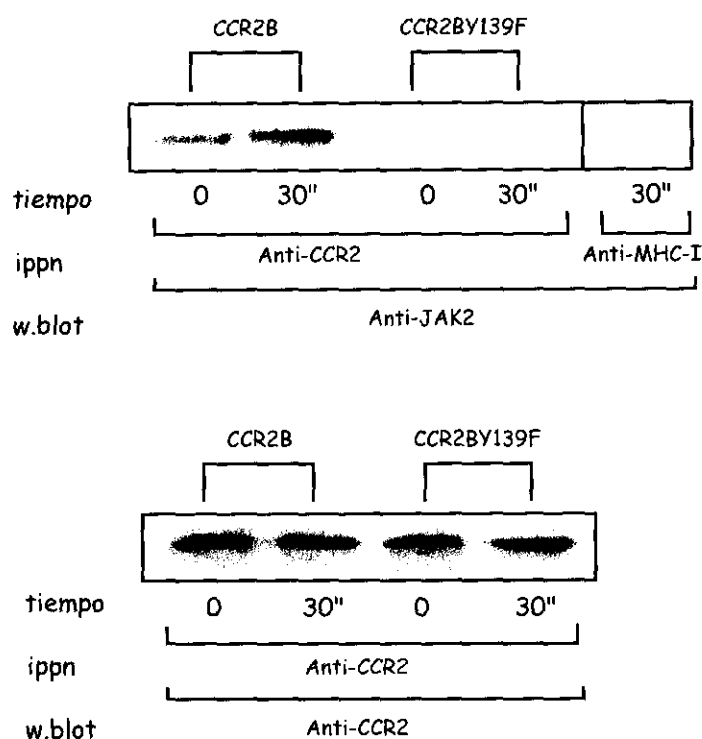


Figura 43. La asociación de JAK2 al receptor CCR2 no se produce en el receptor mutante CCR2Y139F. Las células HEK-293 transfectadas con los receptores indicados fueron estimuladas con 10 nM de MCP-1 durante 30 seg, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizadas en ensayos de western blot con anticuerpos anti-JAK2. La cantidad de CCR2 en cada carril se determinó analizando la misma membrana con el mAb CCR2-05.

Por último se determinó si la asociación de la proteína $G_{\alpha i}$, se veía afectada por la mutación de la tirosina 139 del CCR2, ya que sabíamos que la inhibición de JAK2 con inhibidores específicos, como la tirfostina B42, bloqueaba los efectos mediados por la activación de G_s , como por ejemplo la movilización de calcio. La estimulación con 10 nM MCP-1 de las células HEK-293 transfectadas con el CCR2B nativo, induce la asociación de $G_{\alpha i}$ al receptor, asociación que aumenta hasta ser máxima a los 5 minutos de estimulación. Esta asociación se determinó mediante la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-CCR2 de extractos celulares y western blot con anticuerpos anti- $G_{\alpha i}$. Empleando las mismas condiciones con células transfectadas con el CCR2Y139F, no se observó asociación de $G_{\alpha i}$ al receptor (**Figura 44, panel superior**). En ambos casos, la misma membrana se probó con anticuerpos anti-CCR2, demostrando la existencia de misma cantidad de receptor inmunoprecipitado en todos los carriles, independientemente de que fuera receptor nativo o mutante (**Figura 44, panel**

inferior). Estos datos indican la imposibilidad de asociación de $G_{\alpha i}$ al CCR2 cuando carece de la tirosina 139, hecho que concuerda con la falta de respuestas ligadas a la activación de esta proteína.

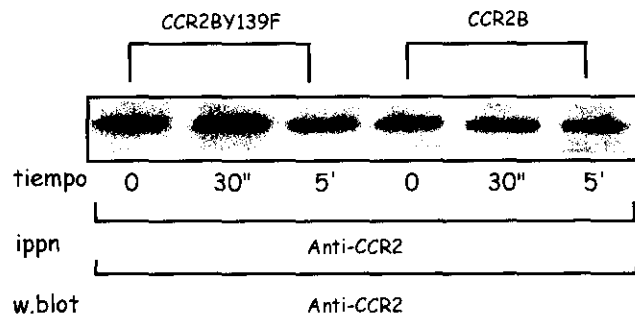
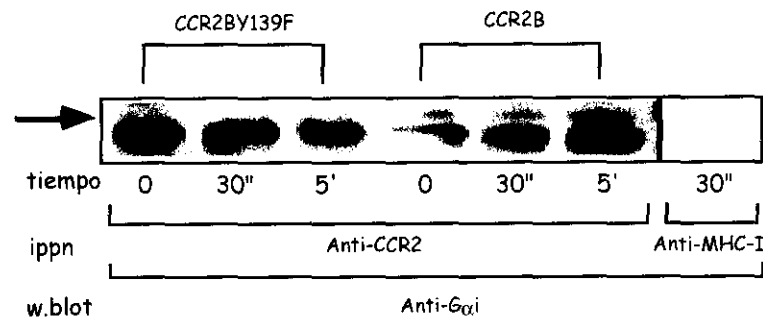


Figura 44. La mutación del residuo Y139 del CCR2 bloquea la unión de $G_{\alpha i}$. Las células HEK-293 transfectadas de forma estable con los receptores indicados fueron estimulados con 10 nM de MCP-1 durante los tiempos indicados, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizadas en ensayos de western blot con anticuerpos anti- $G_{\alpha i}$. La cantidad de CCR2 en cada carril se determinó analizando la misma membrana con el mAb CCR2-05. La flecha indica la posición de la $G_{\alpha i}$.

Es interesante resaltar aquí el hecho de que el receptor mutante CCR2bY139F mantiene intactas el resto de las tirosinas, lo que nos permite concluir que la Y139, residuo altamente conservado en la casi totalidad de receptores de quimioquinas, está directamente implicado en la unión de JAK2 y que la asociación de esta quinasa al receptor es responsable de los eventos de señalización posteriores que originan la respuesta funcional que sigue al estímulo con el ligando. De hecho el receptor mutante, al contrario de lo que ocurre con el nativo, no es fosforilado en residuos de tirosina en

respuesta al MCP-1 (**Figura 42**), como tampoco se observa asociación ni activación, mediada por su fosforilación de la quinasa JAK2 (**Figura 43**).

4.5. Otras tirosin quinasas implicadas en la señalización a través del CCR2: p125^{FAK} and p72^{Syk}.

A pesar de la rápida fosforilación de CCR2 inducida por JAK2, se puede observar que el receptor sigue fosforilado a tiempos en los que JAK2 ya no está asociada al receptor. Esta fosforilación a diferencia de la inducida por JAK2, se ve afectada por el tratamiento con PTX (**Figura 32**), indicando que existen otras tirosin quinasas activadas posteriormente, como ya ha sido descrito para el CCR5 en células T activadas por RANTES.

La activación de linfocitos por quimioquinas induce, como ya hemos indicado, la polarización celular y la redistribución de receptores a regiones celulares especializadas, fenómenos que muy posiblemente estén regulados por la fosforilación en residuos tirosina de los complejos de adhesión focal intracelular (**Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999**). Ya hemos indicado previamente que una vez que la quinasa JAK2 se disocia del receptor, se observa que el receptor permanece fosforilado en residuos tirosina. Además es un hecho conocido que en células T, la estimulación con RANTES provoca la activación de dos tirosin quinasas, la p125^{FAK} y la ZAP-70, esta última específica de este tipo celular. De hecho ya hemos descrito que al estimular células Mono Mac 1 con MCP-1, se podían observar, además del propio CCR2, otras dos bandas fosforiladas en residuos tirosina, una de 125 y otra de 72 kDa. La cinética de fosforilación de estas dos proteínas era algo más prolongada que la del propio receptor, alcanzando un máximo a los 15-30 minutos de estimulación (**Figura 32**). Cuando el mismo experimento se realizó en células pretratadas con PTX, los anticuerpos anti-fosfotirosina no eran capaces de inmunoprecipitar ninguna de estas proteínas, indicando que su activación es dependiente de la activación de G_i.

Una vez determinado el hecho de que la fosforilación en tirosina de las proteínas de 125 kDa y 72 kDa era dependiente de la activación de G_i y dado que coincidía el peso molecular con el de p125^{FAK} y ZAP-70, tirosin quinasas previamente involucradas en la señalización a través de otros receptores de quimioquinas, se intentó identificar si estas quinasas eran las que estábamos activando con el MCP-1.

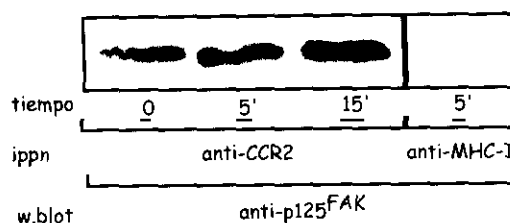


Figura 45. El MCP-1 induce la asociación de p125^{FAK} al CCR2. Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 y analizada la membrana con anticuerpos anti-p125^{FAK}. Como control, células estimuladas con MCP-1 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo irrelevante (anti-MHC-I) y analizadas en western blot con el mismo anticuerpo anti-p125^{FAK}.

Así, células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1 durante diferentes tiempos y tras lisarlas se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-CCR2. Tras el análisis del western blot con anticuerpos anti-p125^{FAK}, se observó que esta quinasa se asociaba al CCR2, con un máximo a los 15 minutos de la activación (**Figura 45**). Cuando en experimentos similares se intentó localizar la quinasa ZAP-70, no se detectó esta quinasa, ya que no está presente en monocitos, sin embargo, si apareció la proteína homóloga, p72Syk, que se asocia al CCR2 con un máximo a los 30 minutos después de la activación (**Figura 46A**). En ambos casos se determinó que la cantidad de CCR2 inmunoprecipitado era la misma en todos los tiempos rehibridando el western blot con anticuerpos anti-CCR2. Los tiempos de máxima asociación coinciden con los tiempos de fosforilación de dichas quinasas (**Figura 46B**). Coincidiendo con estos datos, cuando las células son tratadas con PTX (0.1 ug/ml durante 16 horas) antes de estimularlas con MCP-1, no se detecta asociación de ninguna de las dos quinasas, ni p125^{FAK} ni Syk.

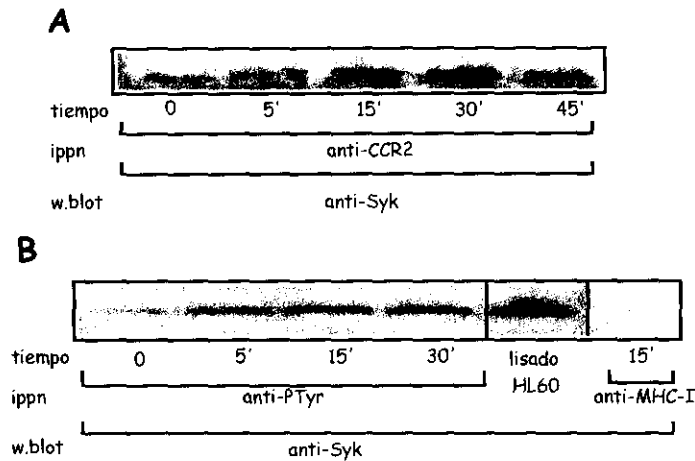


Figura 46. El MCP-1 induce la de asociación p72Syk al CCR2 y su fosforilación en tirosinas. (A) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 y analizada la membrana con anticuerpos anti-72Syk. Como control, células estimuladas con MCP-1 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo irrelevante (anti-MHC-I) y analizadas en western blot con el mismo anticuerpo anti-p72Syk. (B) Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 5 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-P-Tyr y analizada la membrana con anticuerpos anti-p72Syk.

La activación de estas quinasas depende por lo tanto de la vía de señalización acoplada a proteínas Gi. En cuanto a su función es probable que puedan estar implicadas en los fenómenos de reorganización de citoesqueleto necesarios para la polarización celular y redistribución de receptores de quimioquinas, hechos que juegan un papel muy importante en la migración celular.

4.6 La quimioquina MCP-1 induce la activación de la proteína-fosfatasa Shp-1.

Las fosfatasa juegan un papel crítico en la regulación de las vías de señalización mediadas por fosforilación en residuos de tirosina. El hecho de que la asociación/disociación de JAK2 al CCR2 en respuesta a la estimulación con MCP-1 se vea afectada por el tratamiento con toxina de pertussis, sugiere la existencia de señales de regulación mediadas por la proteína Gi.

Usando lisados de células Mono Mac 1 estimuladas con MCP-1 (10 nM) a diferentes tiempos, hemos observado que Shp-1, una tirosin-fosfatasa citoplásmica, se trasloca a la membrana, se asocia al CCR2 y se activa. El experimento se realizó inmunoprecipitando los lisados de células, previamente estimuladas con MCP-1, con el anticuerpo CCR2-03 y revelando los western blot con anticuerpos anti-Shp-1 (**Figura 47, panel superior**).

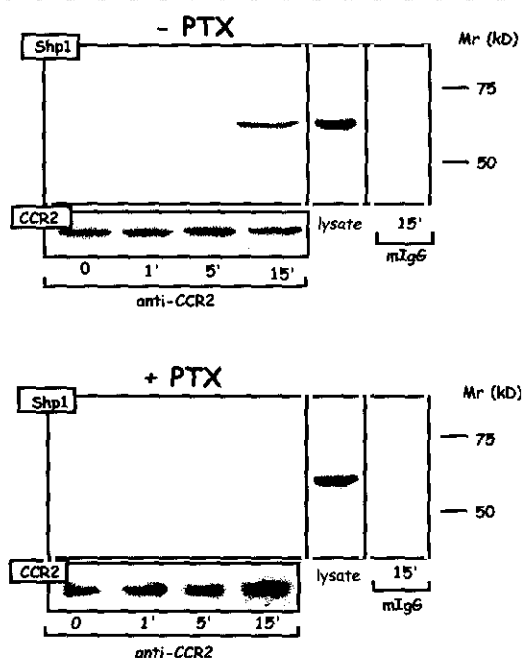


Figura 47. El MCP-1 induce la asociación de Shp1 al CCR2 de forma dependiente de la activación de $G_{\alpha i}$. Células Mono Mac 1, tratadas o no con PTX (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 16h), fueron estimuladas con 10 nM de MCP-1, lisadas e inmunoprecipitadas con el mAb CCR2-03 o un anticuerpo control (mIgG) y analizadas en western blot con anticuerpos anti-Shp1. Como control positivo se incluyen lisados de las mismas células sin inmunoprecipitar analizados en western blot con el mismo anticuerpo anti-Shp1. Las mismas membranas fueron analizadas con el anticuerpo CCR2-05, como control de la cantidad de proteína cargada.

Se observa que Shp-1 se asocia al receptor a los 5 minutos de la estimulación con MCP-1 y alcanza un máximo a los 15 minutos. La inmunoprecipitación de lisados celulares estimulados con MCP-1 con anticuerpos control frente a β 2-microglobulina y otras proteínas de membrana y revelados los western blots con anti-Shp-1, no identifican la presencia de esta fosfatasa, indicando que la asociación del Shp-1 al CCR2 no se debe a asociaciones inespecíficas con proteínas de membrana que se dieran en las condiciones experimentales empleadas. La asociación de Shp-1 al CCR2 inducida por MCP-1, no se observa cuando las células son tratadas con toxina de pertussis antes del estímulo (**Figura 47, panel inferior**), indicando que la asociación entre Shp-1 y el receptor requiere de la activación de G α i.

La activación de esta tirosin fosfatasa mediada por MCP-1 y de forma dependiente de la proteína G, sugiere que esta fosfatasa esté implicada en la disociación de JAK2 al CCR2.

5. SEÑALIZACION: DESENSIBILIZACION.

5.1.- La quimioquina MCP-1 induce la asociación de GRK2, Arrestina y CCR2 en un complejo multimolecular.

Ya hemos descrito como las células Mono Mac 1 responden al estímulo con MCP-1 con una movilización de calcio. Así mismo hemos descrito que éstas células expresan otros receptores de quimioquinas, como es el caso del CXCR4, y también responden con movilización de calcio al estímulo con el ligando de este receptor, el SDF-1 α . Sin embargo, si una vez que se induce la movilización con un primer estímulo de MCP-1, se añade un segundo estímulo, la célula no responde, mientras que si se observa movilización si el segundo estímulo se efectúa con SDF-1 α . Los receptores de quimioquinas por lo tanto, sufren un proceso denominado desensibilización homóloga, por el cual dejan de estar funcionales a un segundo estímulo, mientras que la célula sigue siendo susceptible a la estimulación a través de otros receptores. (**Figura 48**). Este fenómeno ha sido ampliamente descrito para receptores de quimioquinas y para otros receptores acoplados a proteínas G (**Wang et al. 1993**).

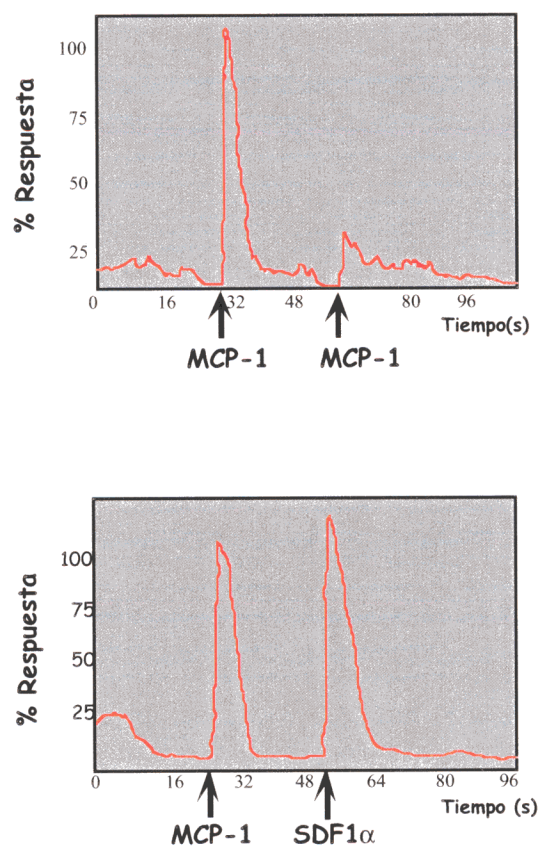


Figura 48. Desensibilización del CCR2 inducida por MCP-1. Movilización de calcio en células Mono Mac 1 cargadas con Fluo-3-AM en respuesta a 10 nM de MCP-1 y determinada por citometría de flujo a 525 nm ; un segundo estímulo con 10 nM de MCP-1 no induce movilización de calcio (panel superior). Como control, las células estimuladas con MCP-1 fueron a continuación estimuladas con 10 nM de SDF-1 α (panel inferior). La figura muestra un experimento representativo. El % de respuesta se ha calculado como en ocasiones anteriores.

Usando un esquema experimental similar al empleado hasta ahora, nos propusimos estudiar que eventos están implicados en la desensibilización del CCR2 inducida por su ligando, el MCP-1.

Para muchos receptores acoplados a proteínas G en esta rápida desensibilización está implicada la fosforilación en residuos serina/treonina del receptor tras la unión del ligando por un grupo de quinasas denominado GRK, por ser quinasas de receptores acoplados a proteínas G (G Protein Receptor Kinase). De hecho las

GRK tras fosforilar al receptor en residuos de serina o treonina incrementan la afinidad para proteínas del tipo de la arrestina cuya unión previene posteriores acoplamientos de las proteínas G y por lo tanto la funcionalidad ligada al receptor. Luego los receptores desacoplados son retirados de la superficie celular en un proceso conocido como internalización. Hay seis GRK clasificadas por homología de secuencia en tres familias. El análisis del extremo carboxilo terminal del CCR2 indica la presencia de residuos serina/treonina susceptibles de ser fosforilados por esta familia de quinasas. El primer paso fue demostrar que el tratamiento con 10 nM de MCP-1 de las células Mono Mac induce la fosforilación del CCR2 en residuos Ser/thr. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos con MCP-1, se lisaron y los extractos correspondientes fueron inmunoprecipitados con anticuerpos específicos anti-CCR2. El análisis por western blot de los inmunoprecipitados con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-fosfoserina/treonina, demuestran la presencia de una proteína fosforilada de 38kDa que se corresponde con el CCR2 (**Figura 49**). Existe una fosforilación basal, en ausencia de estímulo, que aumenta rápidamente (5 min.) después del estímulo con MCP-1, llegando a un máximo de fosforilación a los 15-30 minutos y disminuyendo a partir de entonces. La cantidad total de CCR2 inmunoprecipitada en los diferentes tiempos es idéntica, como se demuestra al revelar la misma membrana con anticuerpos anti-CCR2 (**figura 49**).

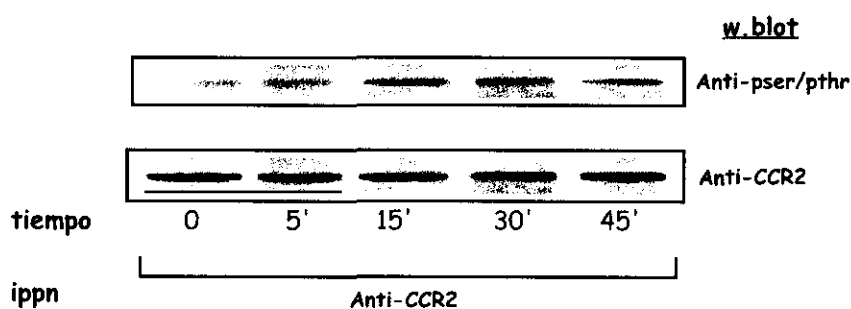


Figura 49. Fosforilación de residuos serina/treonina del CCR2 en respuesta a MCP-1. Lisados de células Mono Mac 1 estimulados con 10 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado el western blot con una mezcla de anticuerpos anti-fosfoserina/treonina. Como control de la cantidad de proteína en cada carril, la misma membrana fue analizada con el anticuerpo CCR2-05.

Dados los altos niveles de expresión de GRK2 en leucocitos de sangre periférica así como en líneas celulares mieloides y linfoides, pensamos que esta quinasa

podía ser la implicada en nuestro modelo celular en la fosforilación del CCR2 tras la activación con MCP-1. Ensayos de western blot de lisados de células Mono Mac 1 y células HEK 293 transfectadas con diferentes GRKs empleando anticuerpos anti-GRK2 indican una elevada expresión de esta quinasa en las células Mono Mac 1 (**Figura 50, panel izquierdo**). El anticuerpo empleado presenta una ligera reacción cruzada con la GRK3, pero esta quinasa migra a un peso molecular ligeramente diferente al de la GRK2. Análisis de lisados celulares con un anticuerpo anti-GRK3, que también presenta reacción cruzada con GRK2, indican que la quinasa GRK3 no se expresa, al menos en niveles significativos, en las células objeto de nuestro estudio, Mono Mac 1 (**Figura 50, panel derecho**).

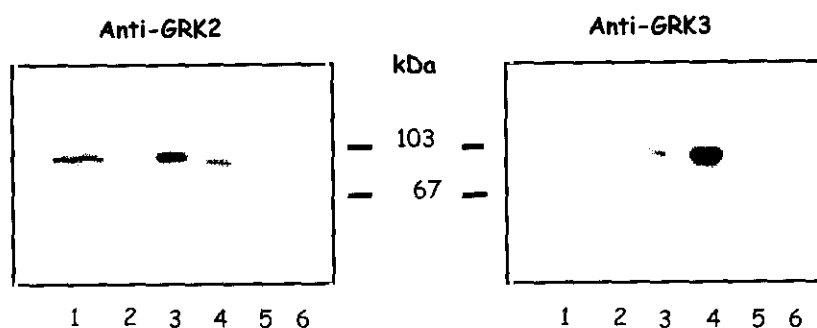


Figura 50. Presencia de GRK en las células Mono Mac1. Análisis mediante ensayos de western blot de extractos de células Mono Mac 1 (carril 1). Como control el mismo análisis fue llevado a cabo en células HEK-293 transfectadas con el vector pcDNA3 vacío o conteniendo GRK2, GRK3, GRK5 o GRK6 (carriles 2 al 6, respectivamente). Los western blot fueron analizados con anticuerpos anti-GRK2 (AB9, panel izquierdo) y anti-GRK3 (panel derecho). La masa molecular de la GRK2 y GRK3 es de 80 kDa y 78 kDa, respectivamente.

Dado que se conoce que GRK2 es una proteína citosólica que se trasloca a la membrana celular después de la activación con ligando (Ruiz-Gómez y Mayor, 1997), para así fosforilar al receptor, analizamos la distribución de esta quinasa en diferentes fracciones celulares antes y después de la estimulación con MCP-1. La adición de 10 nM de MCP-1 promueve una elevación transitoria de los niveles de GRK2 en la fracción particulada, que alcanza un máximo a los 15 minutos de la estimulación (**Figura 51**). Estos datos son consistentes con la cinética de fosforilación del CCR2 y son similares a los encontrados para otros GPCRs. Los ligeros cambios observados en la distribución subcelular de GRK2 pueden reflejar el hecho de que sólo una pequeña

fracción de la GRK2 citoplasmática se trasloca y asocia con el receptor activado así como la rápida dinámica intracelular de esta quinasa. Hay que indicar también que una cantidad significativa de la GRK2 está asociada con la fracción particulada en ausencia de estimulación. Este hecho se puede deber tanto a su asociación a membranas microsomales como a su unión a la membrana plasmática como consecuencia de una actividad basal de los receptores que puede contribuir a la rápida regulación de los mismos observada tras la unión de sus respectivos agonistas.

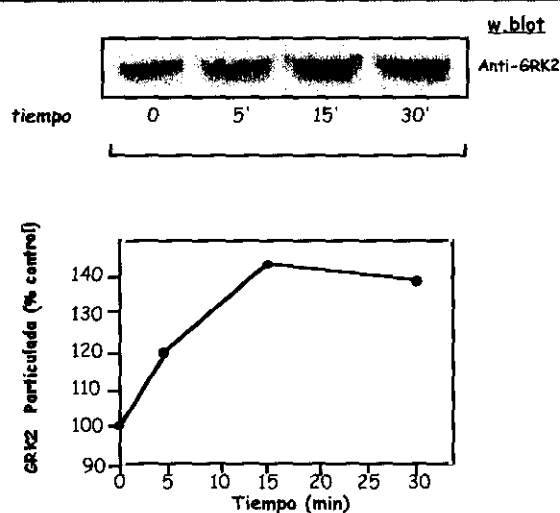


Figura 51. Traslocación de la serin/treonin quinasa GRK2 en respuesta a MCP-1. Las células Mono Mac 1 se estimularon con 10 nM de MCP-1 a los tiempos indicados y se obtuvieron las fracciones particuladas (Ruiz-Gómez y Mayor, 1997). Las mismas cantidades de proteína fueron cargadas y resueltas en geles de SDS-PAGE, transferidas a membranas y analizadas con anticuerpos anti-GRK2 (AB9, panel superior). Los datos fueron cuantificados por densitometría y representados como el porcentaje de GRK2 en la fracción particulada, tomando como basal la existente antes de la estimulación (100%) (panel inferior).

Para demostrar la relación funcional existente entre la GRK2 y este receptor de quimioquinas, intentamos averiguar si la GRK2 podía encontrarse asociada con el CCR2 en las células Mono Mac 1. La inmunoprecipitación de extractos provenientes de células estimuladas con 10 nM de MCP-1 con anticuerpos anti-CCR2 y tratados los western blots correspondientes con anticuerpos anti-GRK2 indican la presencia de esta quinasa asociada al CCR2 de manera dependiente del ligando, asociación que es máxima entre 15 y 30 minutos después del estímulo (**Figura 52**).

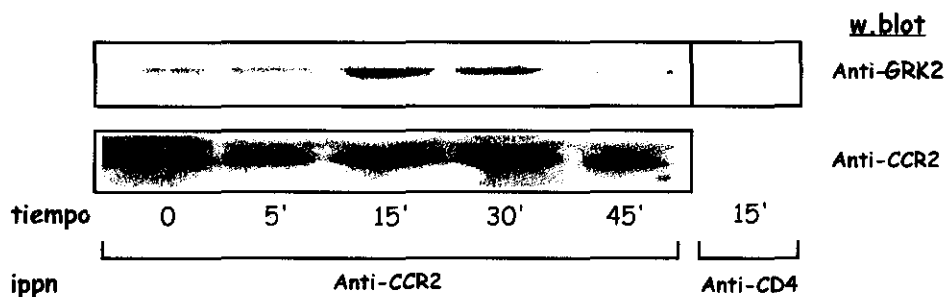


Figura 52. Asociación de GRK2 al CCR2 en respuesta a MCP-1. Lisados de células Mono Mac 1 previamente estimuladas con 10 nM de MCP-1 a los tiempos indicados, fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizadas en ensayos de western blot con el anticuerpo AB9 anti-GRK2. Como control la misma membrana fue analizada con el anticuerpo CCR2-05. Como control negativo lisados de células estimulados con MCP-1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD4 y la membrana fue analizada con el mismo anticuerpo anti-GRK2.

La especificidad del ensayo se demuestra mediante la inmunoprecipitación de estos mismos extractos con anticuerpos no relacionados (anti-CD4). Los cambios en las cantidades de GRK2 asociada al CCR2 no son consecuencia de variaciones en los niveles de receptor inmunoprecipitado, ya que el análisis por western blot de la misma membrana, tratada con el anticuerpo monoclonal anti-CCR2, CCR2-05, indica que estos niveles no varían (**Figura 52, panel inferior**). Ensayos de inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-GRK2 y western blot con anticuerpos anti-CCR2 dan resultados comparables. Estos datos demuestran que tras la unión del MCP-1 al CCR2 y como consecuencia de ello, la GRK2 se trasloca de citosol a membrana y se asocia al receptor fosforilándolo en los residuos serina/treonina, probablemente en la región carboxilo terminal.

5.2. El MCP-1 induce la asociación de β -arrestina1 al CCR2.

Ya hemos referido antes que en otros receptores acoplados a proteínas G la fosforilación por las GRK provoca la asociación al receptor de proteínas del tipo arrestina. El siguiente paso en el estudio que llevamos a cabo, fue por lo tanto detectar la presencia de proteínas de la familia de la arrestina en las células Mono Mac 1. Para ello, células HEK 293 transfectadas con β -arrestina1 y células Mono Mac 1 fueron

lisadas y analizadas por western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-arrestina o un suero policlonal específico de β -arrestina1 (**Figura 53A**).

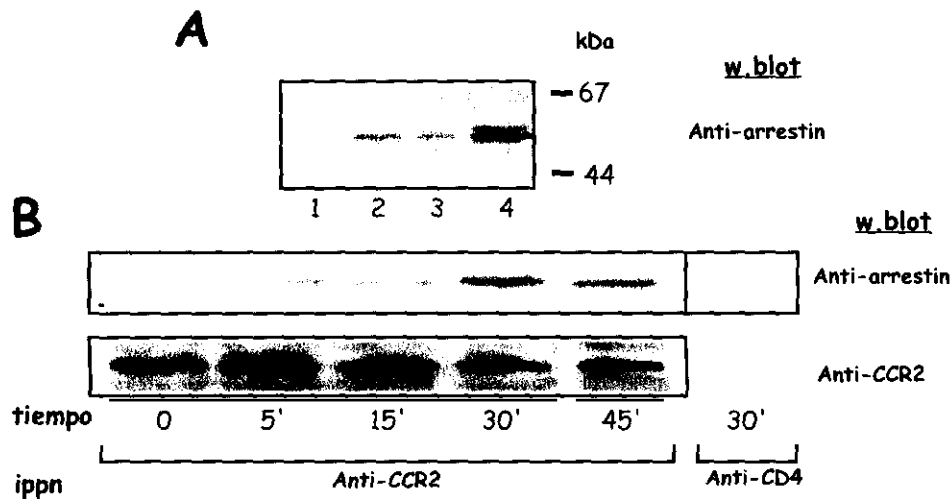


Figura 53. Asociación de β -arrestina al CCR2 en respuesta a MCP-1. (A) Lisados de células HEK-293 transfectadas con β -arrestina 1 (carril 2) o sin transfectar (carril 1) así como las fracciones particulada (carril3) y citosólica (carril 4) de células Mono Mac 1 fueron analizados en ensayos de western blot con anticuerpos anti- β -arrestina. (B) Lisados de células Mono Mac 1 estimulados con 10 nM de MCP-1 a los tiempos indicados, fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado en ensayos de western blot con anticuerpos anti- β -arrestina. Como control de la cantidad de proteína inmunoprecipitada, la misma membrana fue analizada con el anticuerpo CCR2-05. Así mismo y como control negativo lisados de células estimulados con MCP-1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CD4 y la membrana fue analizada con el mismo anticuerpo anti-arrestina.

Los resultados indican la presencia de una proteína predominantemente citosólica, de unos 50 kDa de peso molecular, que se corresponde con β -arrestina1 en lisados de células Mono Mac 1 (**Figura 53A**). A continuación extractos celulares de Mono Mac 1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 y analizados por western blot con el anticuerpo policlonal anti- β -arrestina 1 (**Figura 53B**). Una proteína reconocida por éste anticuerpo coimmunoprecipita con el CCR2 activado; esta asociación alcanza un máximo a los 30 minutos de estimulación con 10 nM de MCP-1

disminuyendo ligeramente a los 45 minutos. La cantidad de proteína cargada en los diferentes carriles del gel se determinó analizando la misma membrana con anticuerpos anti-CCR2 (**Figura 53B**), indicando que no existen diferencias en los niveles de receptor inmunoprecipitado a los diferentes tiempos de estimulación. Así mismo, la especificidad de la interacción entre la β -arrestina y el CCR2 se confirmó empleando anticuerpos frente a otras proteínas de membrana (anti-CD4). La cinética de asociación de la arrestina con el receptor de quimioquinas está un poco retrasada con respecto a la de la GRK2, consistente con la necesidad de que el receptor esté fosforilado para que la β -arrestina se asocie con alta afinidad.

Ya que tanto la GRK2 como la arrestina pueden encontrarse acopladas al CCR2, se contempló la posibilidad de que β -arrestina forme parte de un complejo macromolecular con el receptor y la quinasa. Realizamos por lo tanto, experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GRK2, seguido de western blot con anticuerpos anti-arrestina (**Figura 54**). β -arrestina coimmunoprecipita con GRK2 con cinética dependiente de la estimulación con MCP-1, y coincide con los tiempos de asociación de ambas al receptor, sugiriendo que tanto la quinasa como la arrestina y el receptor están presentes simultáneamente en el mismo complejo macromolecular.

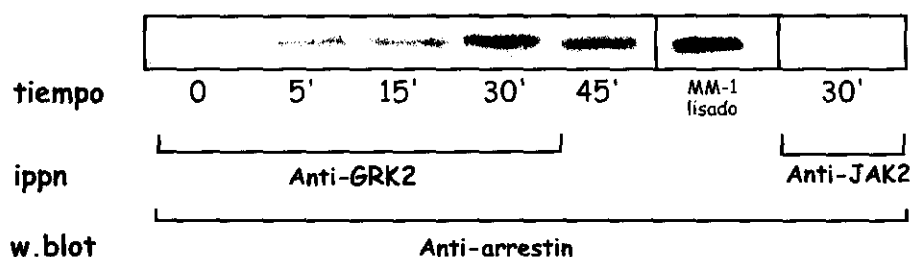


Figura 54. Asociación de β -arrestina a la quinasa GRK2 en respuesta a MCP-1. Lisados de células Mono Mac 1 estimulados con 10 nM de MCP-1 a los tiempos indicados, fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-GRK2 y analizado en ensayos de western blot con anticuerpos anti- β -arrestina. Como control negativo lisados de células no estimuladas con MCP-1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-JAK2 y la membrana fue analizada con el mismo anticuerpo anti-arrestina.

5.3.- Significación biológica del papel de las GRKs en la señalización a través del CCR2.

Nos propusimos finalmente confirmar los datos obtenidos y demostrar la significación biológica de estas asociaciones, coexpresando en células HEK 293 el CCR2 y la GRK2 así como evidenciar la especificidad de acción de la GRK2 en la desensibilización del CCR2 o si por el contrario se debía a la falta de otras GRKs como la GRK3 en las células Mono Mac 1.

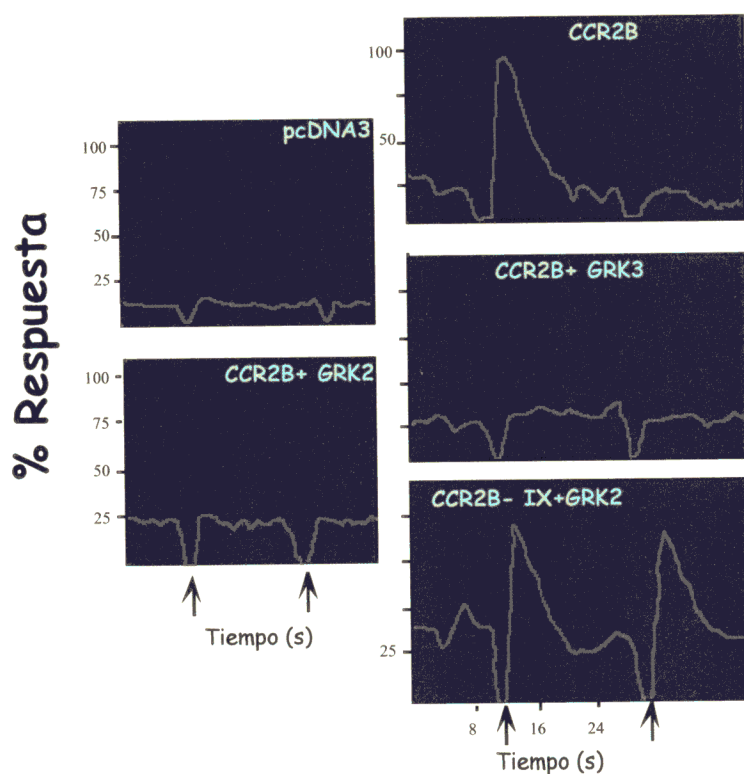


Figura 55. La señalización a través del CCR2 inducida por el MCP-1 es modulada por las quinasas GRK2 y GRK3. Células HEK-293 fueron transfectadas con pcDNA3; con pcDNACCR2 + pcDNA3, pcDNAGRK2 o pcDNAGRK3; o con pcDNACCR2IX + pcDNA3 o pcDNAGRK2, como se indica. La movilización de calcio en respuesta a 10 nM de MCP-1 se determinó como se describe en la figura 39. Los datos se expresan como el % de la máxima respuesta inducida por el MCP-1. Las flechas indican los tiempos de estimulación con MCP-1.

Cuando las células fueron co-transfectadas con CCR2 más GRK2 ó GRK3, la respuesta a MCP-1 quedaba totalmente inhibida (**Figura 55**) demostrando de nuevo que la desensibilización es un proceso mediado por la actividad de esta familia de

quinasas, pero demostrando también que en el caso del CCR2 no existe especificidad para la GRK2 sino que otras quinasas de esta familia, como la GRK3, son capaces de realizar la misma función siempre y cuando estén presentes en el sistema celular objeto de estudio. La importancia de esa fosforilación se pone de nuevo en evidencia cuando coexpresamos las GRK con un CCR2 mutante que carece de los residuos Ser/Thr del extremo carboxilo terminal (CCR2B-IX). A pesar de que los niveles de GRK2 son similares en las células transfectadas con CCR2B y con CCR2B-IX, en este último caso la unión del ligando provoca también la movilización de calcio, pero curiosamente, las células no se desensibilizan a un segundo estímulo con el ligando. (Figura 55), lo que relaciona la región carboxilo-terminal del CCR2B como diana para las GRKs. Obviamente controlamos la expresión y actividad de las quinasas transfectadas de forma transitoria en células HEK 293 mediante ensayos de western blot (Figura 56A) y de fosforilación *in vitro* de rodopsina (Figura 56B), respectivamente. Ambas quinasas presentan similar actividad, como se ve por los niveles de fosforilación de rodopsina que son capaces de inducir.

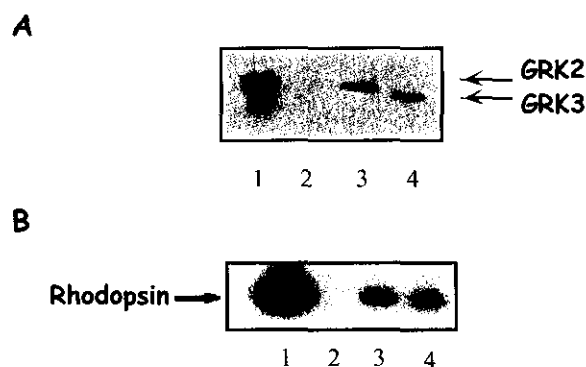


Figura 56. Expresión de GRK2 y GRK3 en células HEK-293 transfectadas con los plásmidos correspondientes. (A) GRK2 recombinante (carril 1) y lisados de células HEK-293 transfectadas con el CCR2 (carril 2), CCR2 + GRK2 (carril 3) y CCR2 + GRK3 (carril 4) fueron analizados en ensayos de western blot con mezcla de anticuerpos anti-GRK2 (AB9) y GRK3. (B) Células HEK-293 transfectadas con el CCR2 (carril 2), con el CCR2 + GRK2 (carril 3) o con el CCR2 + GRK3 fueron lisadas y la actividad quinasa de la fracción citosólica se determinó usando la rodopsina como sustrato. GRK2 recombinante (10 nM) fue empleada como control (carril 1). La figura corresponde a un experimento representativo.

Un dato más que apoya el crítico papel que juega la GRK2 en la desactivación del CCR2B se obtuvo en experimentos en los cuales se co-transfectó el CCR2B con un mutante dominante negativo de GRK2, β ARK-K220R. La expresión de este mutante en células HEK 293 a niveles similares a los obtenidos con la GRK2 nativa no llevan a

un incremento en la actividad quinasa, como se demuestra en los ensayos de fosforilación *in vitro* de rodopsinasin embargo β ARK-K220R se asocia al CCR2 igual que lo hace la GRK2 nativa al estimular dicho receptor con MCP-1 (**Figura 57**).

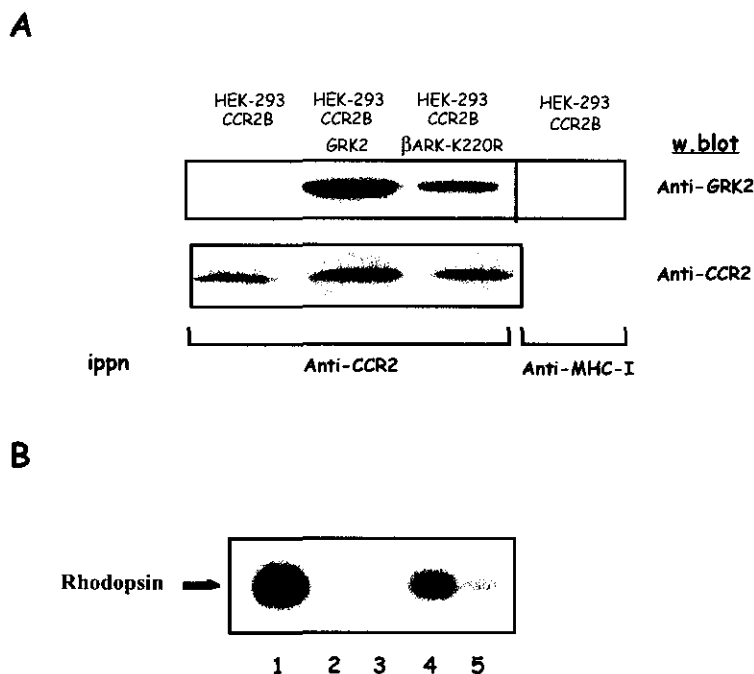


Figura 57. Tanto GRK2 como el mutante β ARK-K220R se asocian al CCR2 en respuesta a MCP-1. (A) Lisados de células HEK-293 co-transfectadas con pcDNACCR2 + pcDNA3, pcDNAGRK2 o pcDNA β ARK-K220R estimulados con 10 nM de MCP-1 durante 15 min., fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado en ensayos de western blot con anticuerpos anti-GRK2. Como control negativo lisados de células estimulados con MCP-1 durante 15 min., fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-MHC-I y la membrana fue analizada con el anticuerpo anti-CCR2 CCR2-05 (B) Células HEK-293 transfectadas con el CCR2 (carril 2), con el CCR2 + GRK2 (carril 4) o con el CCR2 + β ARK-K220R (carril 5) fueron lisadas y la actividad quinasa de la fracción citosólica se determinó usando la rodopsina como sustrato. GRK2 recombinante (10 nM) fue empleada como control (carril 1). La figura corresponde a un experimento representativo.

En presencia de este mutante el MCP-1 es capaz de inducir una movilización de calcio similar a la obtenida cuando transfectamos el CCR2 en solitario (**Figura 58**), claramente diferente al bloqueo de movilización observado cuando co-transfectamos el CCR2 con la GRK2 nativa.

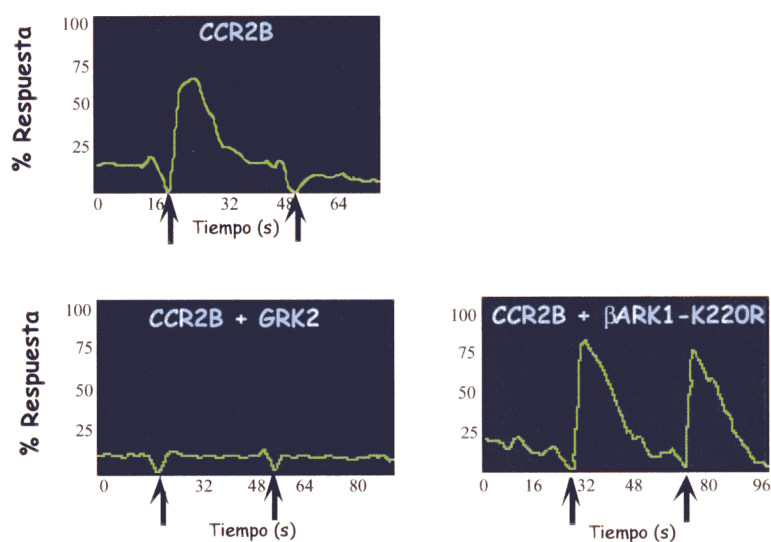


Figura 58. El mutante β ARK-K220R inhibe la desensibilización del CCR2 promovida por el MCP-1. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con el pcDNA-CCR2 + pcDNA3, pcDNA-GRK2 o pcDNA β ARKK-220R y cargadas con la sonda FLUO-3-AM. La movilización de calcio en respuesta a 10 nM de MCP-1 se analizó como se indica en la figura 39. Los datos se expresan como el % de la máxima respuesta inducida por el MCP-1. Las flechas indican los tiempos de estimulación con MCP-1.

Las células que expresan esta quinasa mutante son capaces de movilizar calcio en respuesta a un segundo estímulo con MCP-1 (**Figura 58**), incluso a concentraciones de ligando en las cuales la respuesta a este segundo estímulo se ve desensibilizada en células transfectadas únicamente con el receptor (**Figura 59**).

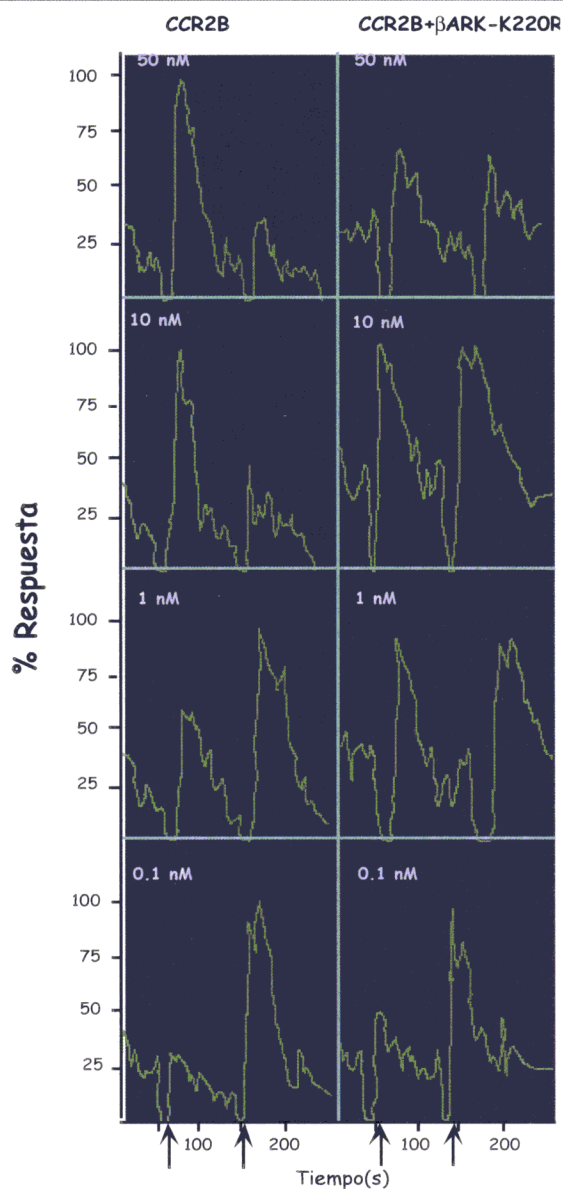


Figura 59. El mutante β ARK-K220R inhibe la desensibilización del CCR2 promovida por el MCP-1. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con el pcDNACCR2 + pcDNA3 o pcDNA β ARK-K220R y cargadas con la sonda FLUO-3-AM. Las células se estimularon con las concentraciones de MCP-1 indicadas. A los dos minutos, se volvieron a estimular con 10 nM de MCP-1, como se indica con las flechas. La movilización de calcio se analizó como se indica en la figura 39. Los datos se expresan como el % de la máxima respuesta inducida por el MCP-1. Las flechas indican los tiempos de estimulación con MCP-1.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores (Mueller *et al.* 1997) al expresar un CXCR2 mutante que carece del extremo carboxilo terminal o que contiene mutadas los residuos serina y treonina.

5.4. El MCP-1 provoca la rápida internalización del CCR2 en vesículas de clatrina.

Los fenómenos de desensibilización de la señal, asociación de GRK y arrestina tienen su continuación en la internalización del receptor. Este fenómeno se da también en el caso de los receptores de quimioquinas y de hecho cuando las células Mono Mac 1 son incubadas con 10 nM de MCP-1 a 37°C, se detecta una rápida desaparición del receptor de la membrana celular mediante experimentos de citometría de flujo (**Figura 60**) empleando anticuerpos anti-CCR2. Similares datos se obtienen cuando tras el estímulo, las células son teñidas y la tinción se observa en microscopía confocal (**Figura 61**).

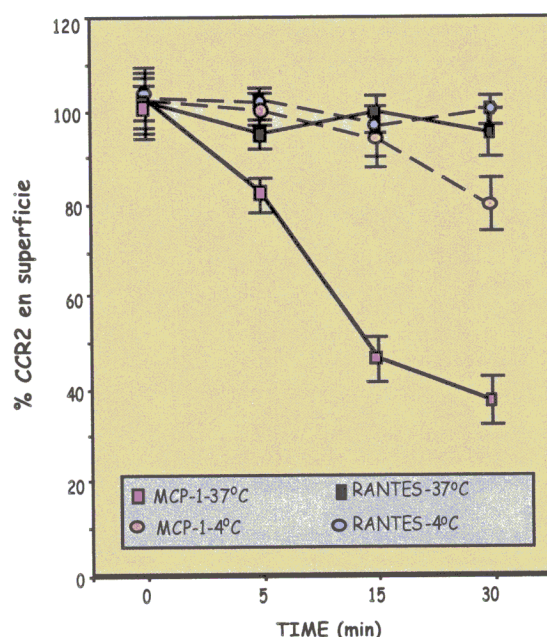


Figura 60. Internalización del CCR2 en respuesta a MCP-1. Células Mono Mac 1 fueron incubadas a los tiempos indicados con 10 nM de MCP-1 o RANTES a 37 y 4°C. La expresión del CCR2 en la membrana celular se analizó por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03), como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresan como el porcentaje de la máxima unión obtenida en ausencia de estimulación con quimioquinas, con la desviación estandar indicada.

Como cabría esperar, la internalización no se produce al estimular con otro ligando como RANTES, que se une al CCR5, o cuando el estímulo con MCP-1 se efectúa a 4°C, temperatura a la que no se producen fenómenos que requieren fluidez de la membrana celular.

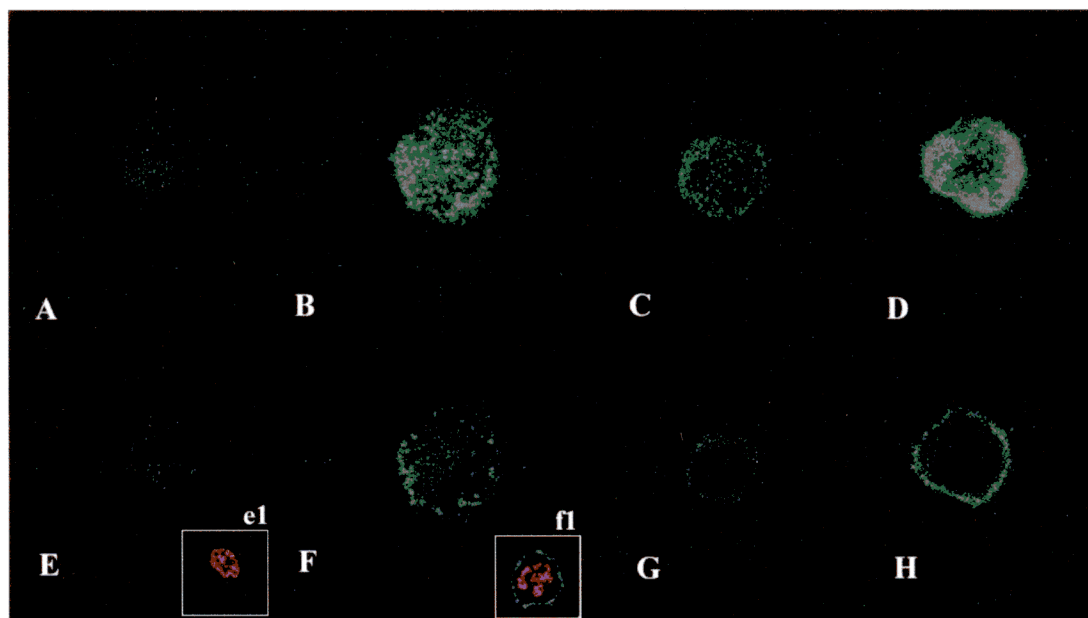


Figura 61. El MCP-1 induce la internalización del CCR2. Los experimentos de microscopía confocal fueron realizados como se indica en materiales y métodos. Las células Mono Mac 1 sin tratar (paneles A, B, E, F) o tratadas con 10 nM de MCP-1 (paneles C y G) o de RANTES (paneles D y H) durante 30 min a 37°C fueron teñidas con el anticuerpo CCR2-03 (paneles B-D y F-H) o con un anticuerpo control (paneles A y E). La figura muestra modelos de reconstitución tridimensional de la tinción celular (Paneles A-D) y secciones ópticas representativas de las distintas obtenidas para cada condición empleada (paneles E-F). En los recuadros se muestra el núcleo celular junto al marcaje con el anticuerpo CCR2-03 (f1) o con un anticuerpo control (e1)

En un intento de estudiar este proceso y relacionarlo con eventos de señalización, extractos celulares de Mono Mac 1 estimuladas con 10 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CCR2 para analizar la presencia de clatrina en western blot. Se emplearon anticuerpos anti-clatrina, ya que la internalización mediante vesículas de clatrina es una de las vías más extendida en el caso de receptores acoplados a proteínas G. Efectivamente, la clatrina se asocia al CCR2 con una cinética que alcanza un máximo a los 30 minutos (**Figura 62**).

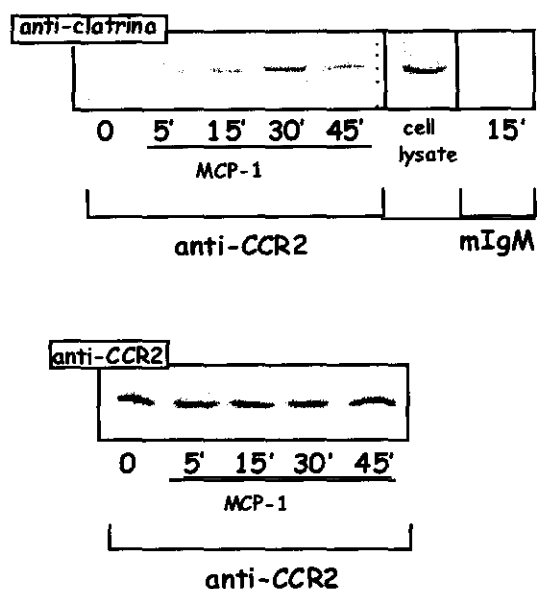


Figura 62. Asociación de clatrina al CCR2 en respuesta a MCP-1. Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 10 nM de MCP-1 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado en ensayos de western blot con anticuerpos anti-clatrina (cadena pesada). Un lisado de las mismas células es incluido como control, así como el análisis de la misma membrana con el anticuerpo CCR2-05.

La especificidad del ensayo se demostró inmunoprecipitando los mismos extractos celulares con anticuerpos anti-MHC-I. Además se controló la cantidad de CCR2 inmunoprecipitado en cada tiempo de la cinética rehibridando la misma membrana con anticuerpos anti-CCR2. Estos datos demuestran que existe una asociación física entre la clatrina y el CCR2 durante los procesos de internalización y que el CCR2 es internalizado en vesículas de clatrina.

5.5. El MCP-1 induce la asociación de dinamina al CCR2.

La endocitosis de diversos receptores acoplados a proteínas G requiere la actividad GTPásica de la dinamina. La estimulación del receptor lleva al reclutamiento de la dinamina citosólica a los *coated pits* originando su constricción y la subsiguiente formación de vesículas (Seungkirl *et al.* 1997). Para analizar si la dinamina también juega un papel en la endocitosis del CCR2, estimulamos células Mono Mac 1 con 10 nM de MCP-1 a diferentes tiempos y analizamos la presencia de dinamina en los lisados celulares inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CCR2. Los ensayos de

western blot (**Figura 63**) muestran la asociación de la dinamina al CCR2 con un máximo a los cinco minutos de activación con el MCP-1, indicando que la dinamina puede estar contribuyendo a la endocitosis del receptor.

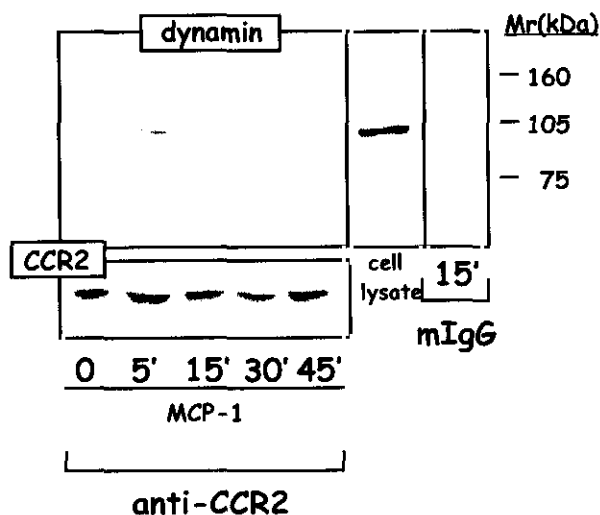


Figura 63. Asociación de dinamina al CCR2 en respuesta a MCP-1. Las células Mono Mac 1 fueron estimuladas con 10 nM de MCP-1 a los tiempos indicados y sus lisados fueron *immunoprecipitados* con anticuerpos anti-CCR2 (CCR2-03) y analizado en ensayos de western blot con anticuerpos anti-dinamina. Un lisado de las mismas células es incluido como control, así como el análisis de la misma membrana con el anticuerpo CCR2-05.

DISCUSSION

En el estudio de las quimioquinas y de sus receptores se ha producido en los últimos años un gran avance debido al interés que estas proteínas tienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos. El papel de las quimioquinas en el tráfico de diversas poblaciones leucocitarias ha sido descrito en innumerables ocasiones, aunque el hecho de que existe una gran redundancia entre quimioquinas y sus receptores y la falta de reactivos adecuados ha hecho que exista una cierta confusión en los datos obtenidos por los diferentes investigadores, asignándose a quimioquinas y receptores, papeles en diferentes procesos en los que posteriormente se ha demostrado que no intervienen. En pocos años se ha pasado de unas pocas quimioquinas conocidas a cerca del centenar y de dos o tres receptores a más de quince. A medida que aumentan las herramientas disponibles, anticuerpos monoclonales, agonistas y antagonistas, mutantes, etc., se ha podido asignar nuevas funciones a las quimioquinas, demostrando el papel que juegan en el sistema nervioso central, en el sistema circulatorio, en procesos tumorales, en angiogénesis, etc... funciones que van más allá de la hasta ahora más conocida como organizadores del tráfico de poblaciones leucocitarias.

Hoy en día las quimioquinas pueden agruparse en dos grandes grupos:

- Quimioquinas homeostáticas, que regulan la correcta disposición de la población leucocitaria en el sistema inmunitario, manteniéndose así la estructura del mismo y cuya expresión es constitutiva.
- Quimioquinas proinflamatorias, que se producen en momentos concretos y por diferentes tipos celulares en respuesta a los estímulos adecuados, esto es, con expresión inducible. Estas quimioquinas posibilitan la llegada organizada de las poblaciones leucocitarias apropiadas ante determinados estímulos a los lugares oportunos.

Como se puede intuir de esta clasificación, las quimioquinas han sido implicadas en la mayoría de procesos fisiológicos en los cuales se precisa de la localización de tipos celulares concretos en un momento y lugar determinado, incluyendo células que no pertenecen al sistema inmune. Así, se ha descrito un papel para la quimioquinas en embriogénesis, hematopoesis, así como en diversos procesos patológicos. En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento del “dónde” y el “cuándo” actúan, pero poco se sabe del “cómo” actúan, es decir cómo interaccionan quimioquina y receptor y las vías de señalización que se activan tras ésta unión.

Hasta el momento se han definido las estructuras de nueve quimioquinas humanas tanto de la familia CC como de la CXC, entre las que se incluyen la IL-8, Gro- α , NAP-2, MIP-1 β , RANTES, MCP-3, MCP-1, SDF-1 y eotaxina (Clore y Gronenborn, 1995 ; Lodi *et al.* 1994, Crump *et al.* 1997 ; Crump *et al.* 1998). A pesar de la diversidad funcional que caracteriza a estas moléculas, existen una serie de características estructurales comunes. Así, las zonas ordenadas de las estructuras tridimensionales son muy similares y el plegamiento de las quimioquinas es predecible y característico. En estos estudios se ha visto que las quimioquinas pueden existir como monómeros, dímeros o tetrámeros, sin embargo las quimioquinas se disocian en monómeros a concentraciones fisiológicas. Parece pues, que a pesar de que la dimerización tiene una base estructural no refleja la situación fisiológica o la forma en que se produce la interacción con el receptor y se media la señalización (Crump *et al.* 1997). También se ha descrito que las quimioquinas son capaces de asociarse con la matriz tisular mediante su interacción con glicosaminoglicanos, manteniendo por lo tanto a las quimioquinas confinadas a un determinado lugar (Baggiolini *et al.* 1997a). La estructura que pueden adoptar las quimioquinas en estas condiciones puede variar en gran medida, facilitándose además la formación de complejos.

En cuanto a las regiones de la quimioquina necesarias para la unión y activación del receptor, en todas las quimioquinas examinadas se ha visto que la region amino terminal contiene los residuos implicados en la unión al receptor y los necesarios para la activación del mismo (Gong *et al.* 1995) Sin embargo, en algunas quimioquinas, como es el caso de los diferentes MCPs, RANTES y SDF-1, los residuos funcionales pueden disociarse de los residuos de unión. La importancia de esta región se ve reforzada por el hecho de que péptidos correspondientes al extremo N-terminal de algunas quimioquinas tienen actividad (Loetscher *et al.* 1998).

Los receptores de quimioquinas están formados por una única cadena polipeptídica con siete regiones transmembrana. Estas proteínas tienen una porción extracelular amino terminal, que junto a los tres bucles extracelulares está implicada en la interacción entre el ligando y el receptor. Así mismo, poseen una región citoplásmica carboxilo terminal y tres bucles intracelulares que de forma conjunta participan en la unión y activación de proteínas G (Kim y Devreotes, 1994) y otras moléculas implicadas en la señalización. La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G tienen cisteínas conservadas en los bucles extracelulares, que se cree forman puentes

disulfuro que estabilizan la estructura funcional de la proteína (**Probst et al. 1992**). Los receptores de quimioquinas poseen además en el extremo amino terminal dominios ricos en residuos tirosina que parecen estar implicados en la unión al ligando (**Hebert et al. 1993, Farzan et al. 1997**). Debido al gran interés que han despertado las quimioquinas y sus receptores, el estudio de las reglas que rigen la interacción entre ligandos y receptores de esta familia ha dado lugar a un gran número de trabajos en los últimos años. En vivo, este proceso posiblemente implica una relación dinámica en la que estarían implicados no sólo la quimioquina y su receptor, sino también las distintas moléculas efectoras, entre ellas el complejo de la proteína G heterotrimérica. Curiosamente y a pesar del interés reflejado, muchos de los eventos moleculares que siguen a la activación de los receptores de quimioquinas permanecen todavía sin esclarecer.

La presencia de un puente disulfuro entre la región amino terminal y el tercer bucle extracelular conservado en los diferentes receptores de quimioquinas conocidos, sugiere un papel importante de estas regiones tanto para la unión del ligando como para la activación del receptor (**Hébert et al. 1993 ; Zhang et al. 1994 ; La Rosa et al. 1992**). De hecho se han obtenido anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el receptor del IL-8 (CXCR1 ó 2). Estos anticuerpos antagonistas reconocen la región amino terminal del receptor, a pesar de haber sido obtenidos usando como inmunógeno células que expresan altos niveles del receptor (**Chuntharapai et al. 1994 ; Mulligan et al. 1993**). Ensayos en los que se han empleado receptores quiméricos indican que ambas regiones son importantes también en el caso del MCP-1 y su receptor, el CCR2 (**Monteclaro y Charo, 1996**); sin embargo otras regiones del receptor también pueden jugar un papel crítico en la unión del ligando, como es el caso del segundo loop extracelular del CCR5 (**Atchison et al. 1996 ; Farzan et al. 1997**). También se han descrito anticuerpos neutralizantes frente al CCR3 y al CCR5 (**Bleul et al. 1997 ; Heath et al. 1997**), aunque las regiones del receptor reconocidas por los mismos no han sido definidas. El hecho de que en la mayoría de los casos una quimioquina sea capaz de unirse a diferentes receptores y que un receptor sea capaz de interactuar con varias quimioquinas diferentes hace que el estudio de los requerimientos estructurales necesarios para que se den estas interacciones sea sumamente atractivo.

Por otro lado y dado que los receptores de quimioquinas han sido descritos como coreceptores para el virus del SIDA, se añade un nuevo punto de interés sobre las regiones del receptor que interactúan con el virus así como sobre qué requerimientos

son necesarios para que de la interacción entre el virus y el receptor de quimioquinas se llegue a la infección (Alkatib *et al.* 1996).

Con todos estos condicionantes y requerimientos iniciales nos propusimos el estudio de las vías de señalización activadas por las quimioquinas, eligiendo como modelo a la proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1, y su receptor CCR2, entre otras cosas por la relevancia que ambos poseen en procesos patológicos como son la artritis reumatoide y el asma, entre otros. Para evitar que la redundancia existente entre quimioquinas y sus receptores nos pudiera llevar a resultados confusos y de difícil interpretación, se abordó la obtención de anticuerpos monoclonales frente al CCR2. Los anticuerpos monoclonales son herramientas de una gran utilidad debido a su extraordinaria especificidad y más aún si durante el proceso de su obtención se introducen criterios de selectividad que permitan obtener aquellos anticuerpos capaces de reconocer a la proteína diana en los diferentes ensayos que posteriormente van a ser empleados, como son citometría de flujo, western blot, inmunoprecipitación o inmunocitoquímica.

Caracterización del CCR2B. Obtención de anticuerpos monoclonales frente al CCR2B.

Hemos obtenido y caracterizado anticuerpos monoclonales frente al CCR2 humano, empleando péptidos sintéticos como inmunógenos. El uso de péptidos sintéticos como inmunógeno ofrece numerosas ventajas ya que nos permite obtener anticuerpos frente a regiones pre-determinadas de una determinada proteína. En un principio fueron seleccionadas diferentes regiones basadas en varios criterios: primero, la secuencia de aminoácidos, que permite seleccionar regiones específicas del CCR2, respecto de otros receptores conocidos, incluyendo los de otras especies. El segundo criterio empleado fué la selección de regiones que incluyeran amino ácidos implicados en la interacción con el ligando o en la activación del receptor, lo que nos permitiría generar anticuerpos monoclonales que pudieran afectar a la actividad del ligando. Por último, se tuvieron en cuenta los requerimientos estructurales de las secuencias elegidas que pudieran originar péptidos con estructuras similares a las que adoptan dentro del receptor nativo. El cumplimiento de estos criterios no asegura sin embargo una respuesta inmune adecuada frente a los mismos y menos aún frente a esos péptidos en el contexto del receptor. Este fué el caso de alguno de los péptidos seleccionados

frente a los cuales no se observó respuesta inmune en los ratones inmunizados medida por ELISA frente al inmunógeno. En algunos casos si se observó respuesta en ELISA frente al péptido inmunizante no en el contexto del receptor nativo medido en citometría de flujo o en western, indicando que el péptido seleccionado sí que es inmunogénico pero que esas secuencias presentan modificaciones estructurales cuando se encuentran en el contexto del receptor nativo. Este es el caso de algunos péptidos que se corresponden con la secuencia de aminoácidos CCR2(1-11) del extremo aminoterminal, secuencia con posible relevancia en la activación del receptor. Sin embargo la producción de anticuerpos que puedan afectar de alguna forma a la actividad del ligando, bien bloquenadola bien mimetizandola, no debe restringirse a aquellas secuencias descritas como implicadas en el lugar de unión al ligando. De hecho se han descrito anticuerpos monoclonales generados frente a epítomos del receptor no relacionados con el lugar de interacción con el ligando y que mimetizan la acción de éste (**Mellado *et al.* 1997b**). El concepto que aquí se maneja es que tanto el ligando como los anticuerpos agonistas, independientemente de la zona con la que interaccionan, lo que hacen es promover cambios conformacionales en el receptor, dando origen a la conformación activa o bien estabilizandola, lo que en cualquier caso induce señalización.

La **tabla X** resume las principales características de los seis anticuerpos monoclonales obtenidos. Los seis anticuerpos reconocen al receptor en citometría de flujo, hecho que nos permite emplearlos para detectar aquellas poblaciones celulares que expresan el CCR2, así como en experimentos de transfección, que permiten evaluar tanto la presencia como las cantidades de receptor presentes en las membranas. Esto no es un hecho trivial, ya que, como se discutirá más adelante, la no funcionalidad del receptor mutante CCR2bY139F se podría deber a una deficiente expresión de este receptor en la superficie de las células transfectadas y no a que la mutación introducida altere la señalización inducida por el MCP-1.

Ya hemos indicado que sólo uno de los seis anticuerpos obtenidos reconoce al CCR2 en ensayos de western blot. Este hecho podría estar relacionado con la región del CCR2 reconocida por dicho anticuerpo (CCR2-05), sin embargo, otros tres anticuerpos reconocen la misma región y sin embargo son incapaces de reconocer al receptor en este tipo de ensayos. se destaca aquí la importancia de la caracterización previa que se ha realizado, a la hora de obtener anticuerpos de interés. Lo mismo cabe decir del anticuerpo CCR2-03, capaz de inmunoprecipitar el CCR2. Todo esto también

nos indica que cada anticuerpo presenta unas características propias y que su capacidad de inmunoprecipitar o reconocer al CCR2 en western blot refleja diferencias en las regiones del receptor reconocidas.

En definitiva, hemos tratado de obtener un grupo de anticuerpos con diferentes características individuales que los hiciera idóneos para los fines perseguidos. Su alta especificidad por el CCR2 y alguna de sus características nos ha permitido el análisis de las poblaciones leucocitarias que expresan el CCR2 y establecer como ésta se vé modificada por la activación de las mismas. Pero además, el hecho de que alguno de los anticuerpos monoclonales obtenidos tenga actividad agonista o antagonista del ligando, tiene gran importancia y nos ha permitido, por ejemplo, estudiar la interacción entre el receptor y la quimioquina así como entre el receptor y el HIV-1, definiendo de esta forma regiones del CCR2 con relevancia para la unión del ligando y para su activación, de forma independiente de la importancia que pueden tener estas herramientas una vez aplicadas a patologías en las cuales las quimioquinas juegan un papel importante.

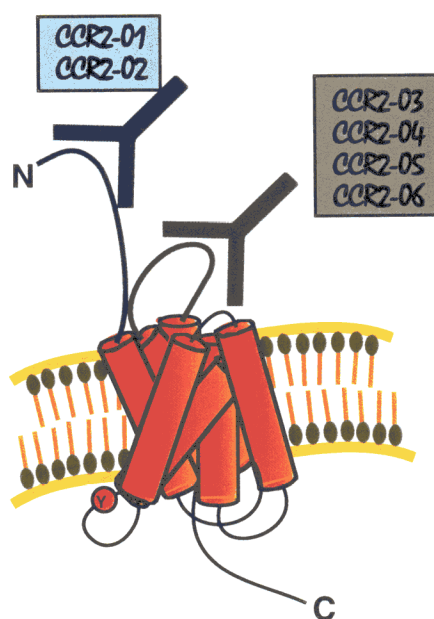


Figura 64. Regiones del CCR2 reconocidas por los anticuerpos monoclonales obtenidos.

La mayor parte de los datos bibliográficos sugieren que la interacción entre la quimioquina y su receptor se produce por la unión de aquella con el extremo amino

terminal de éste. En esta unión también participan aminoácidos del segundo o del tercer bucle extracelular. Los datos obtenidos mediante el estudio de la unión de los anticuerpos monoclonales que hemos generado apoyan estas conclusiones. De hecho anticuerpos dirigidos contra el extremo amino terminal (CCR2-02) y el tercer bucle extracelular (CCR2-04 y CCR2-05) bloquean la actividad del ligando (MCP-1) tras su unión al receptor, aunque bien es verdad que el bloqueo inducido por el CCR2-02 se debe a que es agonista del ligando. Esto indicaría la participación de ambas regiones en la unión del MCP-1 al CCR2. Sin embargo, y en contraste con lo que sucede en otros receptores de quimioquinas, como es el caso del receptor de la Il-8 (Mulligan *et al.* 1993), nuestros anticuerpos neutralizantes (CCR2-04 y 05) reconocen el tercer bucle extracelular (aminoácidos 273-292). El hecho de que otros anticuerpos dirigidos contra la misma región del receptor (CCR2-03 y 06) sean incapaces de bloquear la actividad del MCP-1, sugiere que sólo unos pocos residuos clave dentro de este bucle extracelular son los que tienen un papel clave en la interacción quimioquina-receptor. La **Figura 64** muestra esquemáticamente las regiones del CCR2 reconocidas por los anticuerpos obtenidos.

En la activación del CCR2, al igual que ocurre en el caso de los receptores CXCR-1 y -2, el extremo amino también es de gran importancia. En nuestro caso los anticuerpos que reconocen el extremo amino terminal del CCR2 (aminoácidos 24-38), no son neutralizantes, sino que mimetizan al ligando en todos los ensayos analizados. Así el CCR2-02 actúa como agonista mimetizando todos y cada uno de los efectos del MCP-1, llegando incluso a desensitizar el receptor para un segundo estímulo con el ligando. La importancia de esta región de los receptores de quimioquinas no es un hecho aislado ya que nosotros hemos generado anticuerpos monoclonales frente a diferentes zonas del extremo amino terminal de otros receptores, como son el CCR5 o el CXCR4, que también interfieren con la unión de sus respectivos ligandos. Tras la unión del ligando al receptor, seguramente a través de residuos del tercer bucle extracelular y del extremo amino terminal, se produciría un cambio conformacional en el receptor, tanto en regiones extra como intracelulares que posibilitarían la asociación de moléculas señalizadoras como son la proteína G y la tirosin quinasa JAK2.

El comportamiento de los anticuerpos en citometría de flujo nos ha permitido revelar otra conclusión de gran interés. Mientras que los anticuerpos CCR2-03 y 06 no modifican su unión al receptor en presencia del ligando, la unión de los anticuerpos CCR2-04 y CCR2-05 desaparece. Este hecho indica que el CCR2-03 y el CCR2-06

pueden unirse simultáneamente con el propio MCP-1 al CCR2, es decir reconocen diferentes regiones del receptor, mientras que el 04 y el 05 no lo hacen, hecho coherente con su carácter antagonista. El anticuerpo CCR2-01 sin embargo, incrementa su unión al CCR2 cuando el MCP-1 está unido al mismo, es decir, este anticuerpo está reconociendo mejor la conformación activa del receptor, lo que sugiere que los receptores acoplados a proteínas G estarían en un equilibrio entre una conformación inactiva y otra activa. El ligando y los agonistas desplazarían este equilibrio hacia la forma activa, mientras que un antagonista estabilizaría la conformación inactiva.

La capacidad de los anticuerpos frente al CCR2 de bloquear la actividad del ligando o de estimular el receptor, no sólo nos ayuda a identificar las regiones del receptor implicadas en la interacción con el ligando y aquellas regiones necesarias para la activación del mismo, sino que también nos ofrecen la capacidad de bloquear o activar de forma específica al CCR2. No hay que olvidar que el MCP-1, como es el caso de muchas otras quimioquinas, es capaz de activar otros receptores de quimioquinas, como es el CCR10, y que diferentes quimioquinas son capaces de inducir señalización a través de su interacción con el CCR2 (MCP-2, -3, -4, -5) (**Rollins, et al. 1997**). Estos anticuerpos, dada su especificidad, permiten definir si la activación específica del CCR2 está implicada en una determinada patología o bien si otros receptores de quimioquinas pueden también estar implicados, en otras palabras, definir a la activación de qué receptor se debe el efecto observado.

En estudios de citometría de flujo, los anticuerpos anti-CCR2 (representados por el CCR2-05) reconocen el CCR2 expresado en líneas celulares monocíticas humanas (THP-1, Mono Mac 1), así como en células HEK-293 transfectadas con el CCR2. A pesar del alto grado de homología existente entre los diferentes receptores de quimioquinas, que llega a ser del 100% en algunas regiones (por ejemplo el tercer bucle extracelular del CCR2 y del CCR5 son idénticos), los anticuerpos obtenidos sólo reconocen al CCR2. De hecho, no tienen unión en células HEK-293 sin transfectar o transfectadas con otros receptores de quimioquinas, como CCR5, CCR6, CCR3, CXCR3, etc. Así mismo, tampoco se unen a células Jurkat, línea celular T que expresa de forma constitutiva diversos receptores de quimioquinas, pero no CCR2, unión que sí se observa cuando estas mismas células son transfectadas con él.

Una vez definida la especificidad de los anticuerpos obtenidos, nos propusimos analizar la expresión del CCR2 en linfocitos procedentes de sangre periférica y de

amígdalas, así como la influencia que tiene la activación de estas células sobre la expresión del CCR2. En experimentos de citometría de flujo empleando nuestros anticuerpos monoclonales, se detecta la expresión de CCR2 en una fracción significativa de células B (40-70%) procedentes tanto de sangre periférica como de amígdalas, así como una fracción minoritaria de células T CD4⁺ no activadas. Tras la activación con mitógenos la expresión de CCR2 en células B y en la población de monocitos/macrófagos no varía, sin embargo la expresión en células T aumenta, llegando a ser de hasta un 85% en las células CD4⁺, y menor en las células CD8⁺. Este patrón de expresión del CCR2 es similar al previamente descrito (**Qin et al. 1996**), según el cual este receptor se expresa en células T activadas y en monocitos. Sin embargo, en el referido estudio no se describe la expresión de CCR2 en células B. Estas diferencias pueden deberse a las características de afinidad y al epítipo reconocido por los anticuerpos empleados en los diferentes estudios. En la literatura existen numerosos ejemplos de diferencias en la expresión de receptores de quimioquinas, no siempre atribuibles a diferencias en las herramientas empleadas para la detección de los receptores sino que reflejan fundamentalmente la alta variabilidad en la expresión que existe de un donante a otro así como con el tipo de activación y la duración de la misma.

El papel de las quimioquinas en las células B no está tan claro como en las células T. Se ha demostrado quimiotaxis e inducción de proliferación de células B inducida por diferentes quimioquinas como son SDF-1 α , IP-9, MIP-1 α and MIP-1 β (**Zipfel et al. 1989 ; Schall et al. 1993**), indicando que deben expresarse los receptores de quimioquinas apropiados capaces de traducir las señales que llevan a la migración y activación celular. Así se ha descrito la expresión en esas células de CXCR5 (**Förster et al. 1996**) y de CXCR4 (**Vicente-Manzanares et al. 1998**) como receptores con una completa funcionalidad. Mediante ensayos de southern blot y el uso de anticuerpos monoclonales demostramos que las células B también expresan CCR2. Este receptor es funcional ya que tanto el MCP-1 como el anticuerpo CCR2-02 son capaces de inducir la migración de estas células, migración que es bloqueada específicamente por el tratamiento con PTX y por el anticuerpo CCR2-05. La migración inducida en las células B difiere sin embargo de la inducida por el MCP-1 en monocitos o linfocitos T activados ya que requiere tiempos más largos. Este hecho se puede deber al bajo número de receptores presentes en la superficie de los linfocitos B, a pesar del pool intracelular de CCR2 presente o a que los mecanismos de señalización

inducidos por MCP-1 en estas células difieren de los conocidos para otros tipos celulares. De hecho se sabe que las vías de señalización activadas a través de los receptores de quimioquinas se pueden integrar de forma diferente dependiendo del tipo celular. En la literatura aparecen diversos datos que indican que sobre las células B actuarían más las quimioquinas constitutivas, que intervienen en fenómenos de "homing", mientras que jugarían un papel más secundario las quimioquinas proinflamatorias. Nuestros datos sostienen esta hipótesis ya que la migración de células B inducida por el MCP-1 se obtiene en condiciones más exigentes, que la inducida por SDF-1 α en las mismas células. El papel que juega el CCR2 en los linfocitos B queda todavía por elucidar.

Polarización celular y expresión de receptores de quimioquinas.

Cuando un tejido es dañado o se produce una infección local, se origina una respuesta inflamatoria, caracterizada por un aumento del flujo sanguíneo, de la permeabilidad capilar y de la migración de leucocitos al área afectada. La migración de leucocitos juega un papel fundamental en las respuestas inmune e inflamatoria lo que explica el considerable esfuerzo realizado en elucidar la naturaleza de los motores celulares, las adhesiones con el substrato y las señales migratorias que regulan el comportamiento leucocitario. El movimiento de leucocitos implica diferentes fenómenos que incluyen cambios en la forma celular, en la afinidad de integrinas y en la recirculación de integrinas al frente de avance celular. Estos sucesos, que implican una polarización celular, parecen estar mediados por señales de fosforilación inducidas a través de receptores de quimioquinas aunque las vías de señalización implicadas no están claramente definidas.

Además de en la migración, la polarización de leucocitos ha sido implicada en muchos procesos celulares, entre los que se incluyen la diferenciación celular, el transporte vectorial de moléculas a través de membranas celulares, la inducción de las respuestas inmunes, las interacciones entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno, el reconocimiento y muerte de células diana por células citotóxicas y la interacción entre células T y B durante los procesos de presentación de antígenos (Drubin y Nelson, 1996 ; Wilkinson, 1986 ; Negulescu *et al.* 1996 ; Donnadieu *et al.* 1994 ; Helander *et al.* 1996 ; Kupfery Singer, 1989). Las quimioquinas y algunas citoquinas son capaces de inducir cambios morfológicos dramáticos en los

linfocitos T que llevan a su polarización, resultando en la formación de un apéndice en la parte posterior denominado urópodo y extensiones citoplasmáticas en el frente de avance celular (lamelipodias). Al incubar linfoblastos T con MCP-1 se observa una rápida polarización celular que origina además la redistribución del CCR2 al frente de avance de la célula. En presencia de un gradiente quimiotáctico, el cluster de CCR2 está orientado hacia la fuente de origen quimioatrayente. Parece por lo tanto plausible que esta distribución espacial de receptores de quimioquinas juegue un papel decisivo en dirigir el movimiento celular hacia el gradiente quimiotáctico.

El uso de microscopía de fluorescencia de doble color nos ha permitido concluir que el CCR2 se localiza en el frente de avance de los linfocitos que están migrando. Estos datos se confirmaron mediante microscopía confocal, que muestra la presencia del CCR2 en la zona de la célula que está en contacto con el substrato. En el lado opuesto de la célula, el urópodo, y en diferente plano se encuentran las moléculas de adhesión que intervendrían en el reclutamiento de otras células. Este proceso es específico de determinadas proteínas de membrana implicadas en migración ya que otros receptores como son el de IL-2, TNF tipo 1 o el TGF- β II, ni se redistribuyen ni forman clusters durante la polarización.

Otras quimioquinas (RANTES e IL-8), factores quimiotácticos como las citoquinas IL-2 e IL-15 y otros agentes capaces de inducir la polarización de células T (mAb anti-ICAM3 y CD43) también inducen la redistribución del CCR2. En claro contraste la citoquina proinflamatoria TNF- α , que no es capaz de inducir polarización, no afecta a la redistribución de receptores de quimioquinas. De mayor interés si cabe es el hecho de que frente a un estímulo polarizante, ya sean quimioquinas, citoquinas o anticuerpo monoclonales, se produce redistribución no sólo del CCR2 sino también de otros receptores de quimioquinas, como es el CCR5, al frente de avance. Esto indicaría que la polarización de leucocitos se correlaciona con la adquisición de un fenotipo migratorio, con los receptores de quimioquinas en el frente de avance, fenotipo que es independiente del estímulo quimioatrayente. El conjunto de estos resultados indica la especialización en diferentes dominios que tiene lugar en linfocitos T activados durante la migración. Los receptores implicados en la detección del gradiente quimiotáctico se localizan en un polo celular, mientras que en el otro, los receptores implicados en adhesión celular reclutarían leucocitos cercanos.

Las quimioquinas también han sido descritas como moduladores de la motilidad celular y de la actividad citotóxica de las células NK (**Allavena et al. 1994 ; Loetscher et al. 1996 ; Nieto et al. 1998**). De hecho son capaces de inducir la polarización de estas células cuando están unidas a matriz extracelular o endotelial, polarización que va acompañada de la redistribución de receptores de adhesión (ICAM-1 e ICAM-3) al urópodo (**Nieto et al. 1998**). Como ocurre en los linfocitos T, los receptores de quimioquinas CCR2 y CCR5 también se localizan en el frente de avance de las células NK, redistribución que se correlaciona con la adquisición de un fenotipo migratorio. Este “cluster” de receptores funcionaría tanto en células T como en NK siendo el mecanismo que dirigiría a las células durante la migración (**Nieto et al. 1997, Nieto et al. 1998**). El papel de los receptores de quimioquinas iría más allá de este papel; en el caso de las células NK hemos observado que contactan con las células diana a través del frente de avance, región donde se concentran los receptores de quimioquinas. La redistribución de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas a polos opuestos de las células T y NK, sugiere la formación de regiones funcionalmente especializadas. Así la redistribución de receptores en células NK se mantiene no sólo durante la migración sino también cuando están unidas a su diana. Más aún, la inhibición de la polarización celular y de la redistribución de receptores bloquea la formación de conjugados entre célula efectora y célula diana así como la citotoxicidad mediada por células NK, demostrando por lo tanto la importancia funcional de este fenómeno.

Dentro de estos dominios funcionales generados por la polarización, el frente de avance, rico en receptores de quimioquinas, está implicado en la adhesión a la célula diana, en la liberación de gránulos durante los fenómenos de citotoxicidad además de dirigir a la célula durante la migración (**Lang et al. 1992**). El urópodo, que acumula ICAM, estaría implicado en el reclutamiento de leucocitos. De hecho los contactos célula-célula a través del urópodo parecen reclutar células NK adicionales a las cercanías de la célula diana, del mismo modo que ocurre en el caso de células T en las cuales la redistribución de ICAM al urópodo sirve de mecanismo de amplificación en el reclutamiento de linfocitos durante la extravasación y migración hacia el foco inflamatorio (**del Pozo et al. 1996 ; del Pozo et al. 1997**).

El papel que juegan segundos mensajeros como el calcio, el AMPc, las proteínas quinasas A y C, la PI3K y pequeñas GTPasas de la familia Rho en los mecanismos que gobiernan la polarización celular y redistribución de receptores de superficie ha sido descrita por diferentes autores (**Sanchez-Madrid y del Pozo, 1999**). Pues bien,

muchas de estas vías son activadas a través de receptores de quimioquinas (**Bokoch, 1995**). Todos estos datos demuestran la importancia de las quimioquinas en la migración celular y su implicación en fenómenos de reorganización del citoesqueleto, polarización celular y quimiotaxis.

Papel biológico del receptor CCR2 durante la infección por HIV-1

La caracterización de receptores de quimioquinas y de las vías de señalización que emplean para su activación tiene una aplicación inmediata en las diferentes patologías en las que las quimioquinas juegan algún papel. Dentro de estas patologías adquiere una relevancia particular el caso de la infección por HIV-1. La identificación de la actividad supresora del virus que poseen las quimioquinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES (**Cocchi et al. 1995**) así como la demostración de que los receptores de quimioquinas CXCR4 (**Feng et al. 1996**) y CCR5 (**Samson et al. 1996**) eran capaces de actuar como coreceptores para diferentes cepas del HIV-1 supuso un creciente interés en el estudio de las quimioquinas y de las características estructurales y funcionales de sus receptores.

La entrada del HIV-1 en la célula es un proceso que consta de diversos pasos. Las glicoproteínas de la envuelta del virus interaccionan con el CD4 presente en la célula diana concentrando al virus en la superficie celular y posibilitando los cambios conformacionales necesarios en las proteínas de la envuelta del virus para que pueda interaccionar con el receptor de quimioquinas. Sin embargo, es la interacción subsiguiente con el receptor de quimioquinas adecuado la que dispara los cambios conformacionales necesarios que llevan a la fusión entre la envuelta del virus y la membrana celular (**Berger et al. 1999**).

Una de las incógnitas que se plantean actualmente y que es de particular interés a la hora de diseñar vacunas o fármacos que impidan la infección por HIV-1 se refiere a las zonas del receptor de la quimioquina que sirven de anclaje al virus. Su estudio se ha llevado a cabo con quimeras y mutantes de receptores. Hoy parece claro que las interacciones entre el virus y los receptores de quimioquinas son complejas e implican tanto al extremo amino terminal como a los tres bucles extracelulares (**Doms y Peipert, 1997**). El extremo amino terminal del CCR5 parece ser de particular interés ya que parece capaz de conferir funcionalidad como coreceptor a otros receptores de

quimioquinas (**Doranz et al. 1997a**). Para algunas cepas, sin embargo, no parece que esta región juegue un papel tan importante, siendo la zona principal de interacción la correspondiente a los bucles extracelulares, fundamentalmente el segundo (**Doms y Peipert, 1997**). Este parece ser también el caso del CXCR4, donde los loops extracelulares y no el extremo amino parecen ser los determinantes cruciales para la interacción de las cepas X4 estudiadas hasta el momento (**Brelot et al. 1997 ; Lu et al. 1997, Doranz et al. 1999**).

Pero el estudio no se ha quedado sólo en la identificación de epítomos sino que basándose en estos resultados se han diseñado agentes capaces de bloquear el coreceptor, entre los que cabe incluir las propias quimioquinas y sus derivados (AOP-RANTES, Met-RANTES)(**Arenzana-Seisdedos et al. 1996 ; Simmons et al. 1997**), anticuerpos frente a los receptores (**McKnight et al. 1997 ; Wu et al. 1997a ; Wu et al. 1997b**), e incluso compuestos de bajo peso molecular (T22, ALX40-4C) (**Doranz et al. 1997b ; Howard et al. 1998**). Otras vías de investigación se refieren a modular la expresión de estos receptores, mediante terapia génica (intraquinas) (**Chen et al. 1997 ; Yang et al. 1997**), o incluso mediante ligandos que induzcan la internalización del receptor.

En primer lugar parece razonable pensar que al unirse tanto la quimioquina como el virus al mismo receptor el bloqueo que la proteína realiza a la infección suceda por un impedimento estérico que haga imposible la interacción entre virus y receptor en presencia de quimioquina. Diferentes autores apoyan esta hipótesis, sin embargo, han sido descritos anticuerpos frente al CCR5 capaces de bloquear la interacción quimioquina-receptor sin afectar la interacción HIV-1-receptor y viceversa, hecho que sugiere que virus y quimioquinas interactúan con diferentes regiones del receptor, pudiendo por lo tanto coexistir sobre el receptor. En nuestro caso y empleando como modelo el CCR2 y contando con los anticuerpos monoclonales generados como herramientas, llegamos a conclusiones parecidas. Los anticuerpos obtenidos frente al tercer bucle extracelular del CCR2 son incapaces *per se* de neutralizar la infección por HIV-1, sin embargo dos de ellos son capaces de inhibir la unión del MCP-1 al CCR2 y de hecho son capaces de revertir el efecto neutralizante del MCP-1. Estos datos sugieren que el MCP-1 interactúa fundamentalmente con el tercer bucle extracelular del receptor, bucle que no estaría implicado en la interacción con el virus. El uso de los anticuerpos obtenidos frente al extremo amino del CCR2 nos permite completar la visión sobre la interacción entre el virus y la quimioquina con el receptor. De los dos

anticuerpos dirigidos contra esta región (CCR2-01 y 02), uno de ellos (CCR2-02) es capaz de mimetizar los efectos del MCP-1, comportandose por lo tanto como un agonista. Este anticuerpo además de inducir movilización de calcio y migración de células que expresan el CCR2, también es capaz de neutralizar la infección por HIV-1. A pesar de que este hecho sugiere que el virus reconoce regiones diferentes a las reconocidas por el MCP-1, no se puede descartar que la actividad neutralizante de este anticuerpo se deba a la activación del CCR2 y que por tanto la señalización a través del receptor de quimioquinas fuese imprescindible para la infección por HIV-1. Sin embargo el anticuerpo CCR2-01, que también reconoce el extremo amino del receptor, no induce ninguna señalización a través del CCR2 ni tampoco afecta a la unión del MCP-1 ni a las señales que esta quimioquina induce. Este anticuerpo no induce tampoco la internalización del CCR2, mecanismo que ha sido sugerido en la bibliografía como responsable de la neutralización de HIV-1 inducida por las quimioquinas (**Amara et al. 1997 ; Mack et al. 1998**), sin embargo el anticuerpo es capaz de bloquear al HIV-1, lo que indica una clara separación entre las regiones del receptor implicadas en unión con la quimioquina y en la unión del HIV-1.

Con todos los datos mostrados se demuestra que el MCP-1 y el virus del SIDA interaccionan con diferentes regiones del CCR2. Aunque la unión del virus al receptor de quimioquinas sea capaz de activar alguna vía de señalización (**Littman, 1998**), la señalización a través del CCR2 no es necesaria para bloquear la infección. A pesar de que la internalización de receptores de quimioquinas puede y debe ser uno de los mecanismos por el cual las quimioquinas inhiben la infección (**Amara et al. 1997 ; Baggiolini y Moser, 1997b**), la infección se puede bloquear mediante anticuerpos monoclonales que no inducen internalización del receptor.

Parece razonable pensar que tanto el MCP-1 como los anticuerpos CCR2-01 y 02 al interaccionar con el CCR2 inducen un cambio conformacional en el mismo que hace imposible la interacción con el HIV-1. En función de los datos de activación de JAK/STAT inducido por MCP-1 y de acuerdo con los datos conocidos para esta vía en receptores de factores de crecimiento y citoquinas, nosotros sugerimos que ese cambio conformacional consiste en la dimerización de receptores de quimioquinas.

A pesar de la escasa relevancia que parece tener el CCR2 como coreceptor del HIV-1 (**Hoffman et al. 1998a**) se ha descrito la existencia de un polimorfismo en el CCR2, el CCR2-V64I (**Smith et al. 1997a ; Smith et al. 1997b ; Kostrikis et al.**

1998), que posee una mutación puntual que afecta al residuo valina 64 que es mutado por un residuo isoleucina y que a pesar de no tener ningún efecto sobre la transmisión inicial del HIV-1, los sujetos seropositivos con el alelo CCR2-V64I progresan más lentamente que los que llevan el CCR2 nativo. Este efecto parece ser aditivo con el alelo CCR5Δ32 (Dean *et al.* 1996 ; Benkirane *et al.* 1997). Esta mutación en el CCR2, no afecta a la expresión de coreceptores ni a la capacidad de unión de las quimioquinas ni a la actividad como co-receptor del HIV-1 (Lee *et al.* 1998). Se ha sugerido que el alelo CCR2-V64I esté asociado a otros polimorfismos que afecten a la expresión o a la función del CCR5 (Kostrikis *et al.* 1998), aunque no existen evidencias de este hecho. Sin embargo y de forma sorprendente, existe una relación entre la presencia del CCR2-V64I y niveles menores de CXCR4 en donantes sanos (Lee *et al.* 1998) . El mecanismo por el cual se afecta al CXCR4 no se deben a efectos genéticos ya que los genes que codifican a estos dos receptores, al contrario que CCR2 y CCR5, están localizados en cromosomas diferentes. Todos estos hechos sugieren que debe existir una relación entre los diferentes receptores de quimioquinas y que la expresión de los mismos no se explica de forma individual sino de forma global, existiendo patrones de expresión coordinados, en los cuales la presencia de un determinado receptor de quimioquinas y/o su activación puede influir drásticamente sobre la expresión y/o activación.

Señales tempranas mediadas por el CCR2: activación de la vía JAK/STAT

La migración de leucocitos a lugares de inflamación es un proceso complejo en que diferentes moléculas de la superficie celular, entre las que se incluyen las moléculas de adhesión y las integrinas y sus ligandos que actuando de forma coordinada regulan la migración celular. Mediadores celulares, principalmente quimioquinas, también juegan un papel central en la activación de linfocitos y en guiarlos hacia los tejidos diana. Es conocido que las quimioquinas se unen a receptores acoplados a proteínas G e inducen cambios en los niveles intracelulares de AMPc, activan fosfolipasa C y aumentan la fosforilación en tirosinas. A pesar de esto la señalización inducida por quimioquinas sigue siendo bastante desconocida, sobre todo los pasos iniciales que descubren toda la vía de señalización.

El MCP-1 fué descrito inicialmente como un potente quimiotrayente para monocitos que se une fundamentalmente al receptor CCR2 (Power *et al.* 1995). En

células monocíticas humanas, Mono Mac 1, que expresan este receptor, el MCP-1 induce movilización de calcio y migración, procesos que son bloqueados por la toxina de pertussis, pero no por la toxina del cólera (**Bokoch, 1995**), implicando a una proteína G del tipo Gi en la señalización inducida por esta quimioquina, como era de esperar por los datos previamente descritos en la bibliografía (**Bokoch, 1995 ; Charo et al. 1994**). Efectivamente, tras la activación con MCP-1 la proteína Gi se asocia rápidamente al receptor (dentro de los primeros 30 segundos). Esto confirma datos previamente publicados que indican que otros receptores de quimioquinas, como el CXCR1/2 unen G α i en respuesta a IL8 (**Damaj et al. 1996**) y los extiende a miembros de la familia CC. A pesar de la unión de la proteína Gi al CCR2 y las implicaciones que este hecho tiene en la señalización subsiguiente a la unión del MCP-1, no se puede excluir la participación de otras proteínas G. Así se ha demostrado recientemente el hecho de que la asociación de un determinado receptor de quimioquinas a diferentes proteínas G depende no sólo del receptor sino también de la línea celular empleada (**Arai y Charo, 1996**).

Las quimioquinas también inducen un aumento en la actividad tirosin-quinasa; recientemente se ha descrito que RANTES induce la activación y el ensamblaje de complejos macromoleculares de adhesión focal y provoca la adhesión homotípica de linfocitos T mediante la fosforilación de p125^{FAK} y de ZAP-70 (**Bacon et al. 1996**). De hecho, tras la activación con MCP-1, observamos que el propio CCR2 es fosforilado en residuos de tirosina muy rápidamente.

Los diferentes ensayos llevados a cabo para identificar a la quinasa responsable de la fosforilación del CCR2 nos llevaron a la identificación de JAK2 como la quinasa responsable de la activación temprana de este receptor en las células Mono Mac 1. Esta quinasa, perteneciente a la familia de las denominadas quinasas JANUS, se asocia al receptor rápidamente y lo fosforila incluso en presencia de PTX, lo que indica que la proteína Gi no interviene en este proceso; sin embargo la asociación es temporal y JAK2 termina disociándose del receptor. Este proceso si es mediado por la vía de la proteína Gi ya que no se produce cuando las células son tratadas previamente con PTX.. El hecho de que en receptores de citoquinas, JAK esté asociada constitutivamente al receptor y que se active en respuesta al ligando, sugiere que aunque los receptores de quimioquinas y de citoquinas compartan vías de señalización la regulación de las mismas varía entre estas dos familias de receptores.

De acuerdo con el papel asignado a quinasas de la familia JANUS en la señalización mediada por receptores de factores de crecimiento hematopoiéticos (Lütticken *et al.* 1994), modelo éste donde más se ha estudiado, era de esperar que tras la unión de MCP-1 al receptor se produjera la activación de factores de transcripción mediada por JAK2. De hecho ocurre así, STAT3 se asocia al CCR2 y se fosforila en residuos de tirosina en respuesta a la activación por MCP-1. Puede por lo tanto decirse que la activación y asociación de JAK2 al receptor crea sitios de anclaje para proteínas que contienen dominios SH₂, como es el caso de los factores de transcripción de la familia STAT, que llevan a su fosforilación y la activación de la transcripción.

Cuando las células Mono Mac 1 son tratadas con un inhibidor específico de las JANUS quinasas y más concretamente de JAK2, la tirfostina B42, se bloquean todos los efectos biológicos promovidos por MCP-1. Este hecho apoya y confirma la participación de la vía JAK/STAT en la señalización temprana a través del CCR2, incluyendo su participación en la asociación de Gi al CCR2. Este hecho es absolutamente novedoso ya que hasta ahora se pensaba que la asociación y activación de la proteína G era el primer paso para la señalización por receptores de 7 TM. Este resultado, junto a la asociación de JAK2 al CCR2 en células tratadas con PTX, indica que el primer suceso tras la unión del MCP-1 a su receptor es la asociación de la quinasa JAK2. Los cambios conformacionales que promueve tanto la unión del ligando como la asociación de esta quinasa, descubren el sitio de asociación de la proteína Gi en un lugar situado, probablemente, en el segundo bucle intracelular, como ocurre en el caso de otros receptores de quimioquinas como, por ejemplo, en el del receptor de IL-8 (Damaj *et al.* 1996). Estos hechos sitúan a tirosin quinasas de la familia de las JAKs en el punto clave de la activación a través de receptores de quimioquinas ya que serían responsables no sólo de los efectos mediados clásicamente por ellas, como es el caso de la activación de factores de transcripción de la familia STAT, sino también de la activación de la proteína G y por lo tanto de la señalización que este hecho conlleva. Un esquema de estos eventos se muestra en la **Figura 65**.

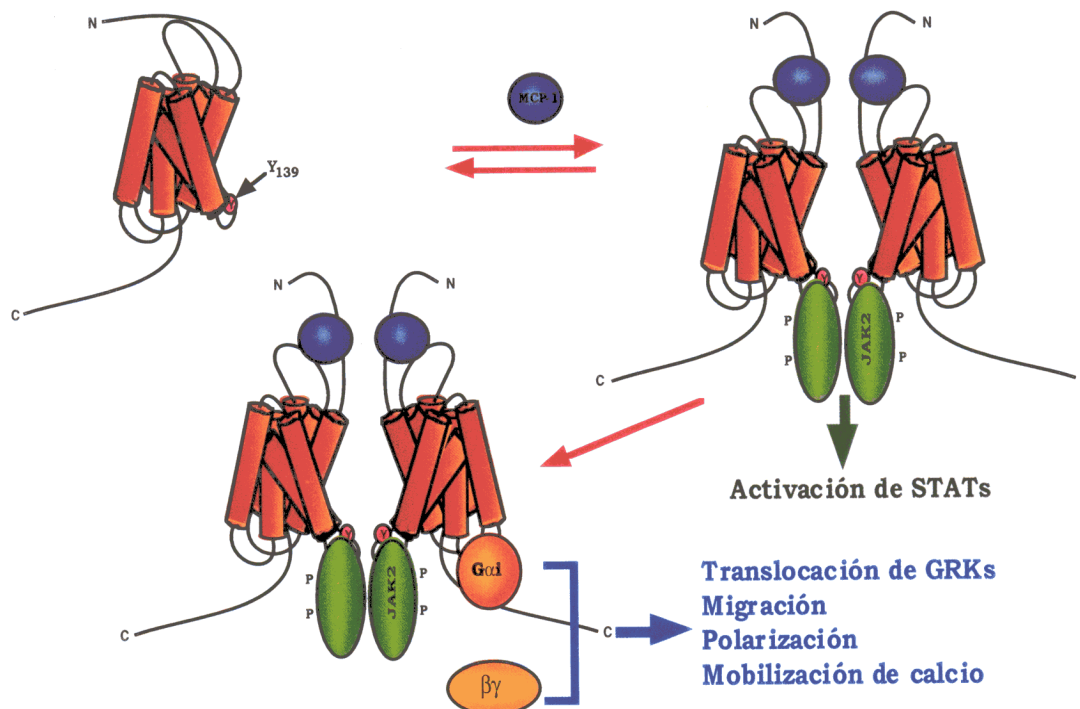


Figura 65. Modelo de los primeros eventos que se originan en la señalización por quimioquinas.

¿Qué residuos de tirosina en el receptor son susceptibles de ser fosforilados por JAK2?

El examen de la secuencia del CCR2 nos permite identificar diversas tirosinas en el segundo bucle intracelular y en el extremo carboxilo terminal del mismo como posibles dianas para la asociación de JAK2. Entre ellas, la Tyr 139 que se encuentra localizada en un motivo altamente conservado dentro de la familia de receptores de quimioquinas, presente en el segundo loop intracelular (DRYLAIV). Este dominio incluye residuos críticos para la activación de receptores acoplados a proteínas G y está presente en otros receptores de siete dominios transmembrana, como el de angiotensina II, donde también se ha descrito la activación de la vía JAK2/STAT inducida por ligando (McWhinney *et al.* 1997). Además, esta tirosina es la única presente en el receptor CCR2A, este receptor es una variante que se genera de forma natural por splicing alternativo, y tiene una secuencia idéntica a la del CCR2B a lo largo de todos los segmentos transmembrana y los bucles intra y extracelulares, diferenciándose

solamente en la presencia de un extremo carboxilo terminal más corto y con una secuencia totalmente diferente (Charo *et al.* 1994). A pesar de estas diferencias el CCR2A es capaz de unir MCP-1 con alta afinidad y de mediar las respuestas inducidas por este ligando (Charo *et al.* 1994). Estos datos sugieren que las tirosinas presentes en el extremo carboxilo terminal del CCR2B no estarían implicadas en la activación temprana del receptor y por ello nos centramos en la Y139, presente en ambos receptores y altamente conservada en todos los receptores de quimioquinas. Generamos un receptor CCR2B en el que se sustituye la tirosina 139 por fenilalanina (CCR2BY139F). Tras la expresión de este receptor en células HEK-293 se vio que aunque este receptor es capaz de unir MCP-1 con la misma efectividad que lo hace el receptor nativo, es incapaz de inducir respuestas funcionales tales como movilización de calcio o migración. Además demostramos que ésta falta de respuesta se debe a la ausencia de asociación de JAK2 al receptor que origina la falta de fosforilación del receptor y de asociación de la proteína Gi. Como ya hemos dicho, esta tirosina 139 es parte del motivo DRY presente en la mayoría de GPCRs. Estudios previos asignaron un papel decisivo a los residuos Arginina y aspártico de éste motivo en la señalización mediada por otros GPCRs (Scheer *et al.* 1996).

Todos estos datos configuran un modelo en el cual la asociación de Gi a los receptores de quimioquinas es una consecuencia de los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando y por la activación de miembros de la familia de las JANUS quinasas. Por otro lado, la relación JAK/STAT con receptores de 7 TM se conoce y de hecho la fosforilación en tirosinas del motivo DRY del receptor adrenérgico β_2 se ha sugerido como la responsable de unir este receptor con la vía de señalización del receptor de IGF-1 (Karoo y Malbon, 1996). Así mismo se ha descrito la activación de factores de transcripción de la familia STAT a través de otros GPCRs como son el receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Guillet-Deniau *et al.* 1997), el AT₁ de angiotensina (Ali *et al.* 1997) o el receptor quimiotáctico cAR1 de *Dictyoselum*, activación que es independiente de la activación de la proteína G (Araki *et al.* 1998). Este último caso está de acuerdo con nuestras observaciones, donde la activación de la vía JAK/STAT por MCP-1 no es bloqueada por el tratamiento con toxina de pertussis, indicando que es una vía independiente de la activación de la proteína G α_i . Sin embargo, tanto en el receptor cAR1 de *Dictyoselum* como en los receptores de quimioquinas, la proteína G puede tener un papel regulador de la activación de la vía JAK/STAT. En el caso del CCR2, observamos que mientras que la asociación de

JAK2 al CCR2 es independiente de la proteína G, no ocurre lo mismo con la disociación. El pretratamiento de las células con PTX afecta a la disociación de JAK del receptor, permaneciendo esta quinasa asociada durante más tiempo.

Este hecho nos llevó a identificar proteínas que pudieran estar implicadas en esta regulación. Así encontramos que la fosfatasa Shp1 se asocia al CCR2 tras la activación con MCP-1, con una cinética que coincide con la disociación de JAK del receptor. Estos datos están de acuerdo con el papel asignado a fosfotirosin fosfatasas en la regulación de la vía JAK/STAT en otros modelos como por ejemplo en el caso de la hormona del crecimiento (**Gebert et al. 1999**). Además cuando las células son tratadas con PTX, Shp1 no se asocia al CCR2, indicando que esta asociación requiere la activación de la proteína G. Esta fosfatasa puede ser por lo tanto un candidato a regular la activación de JAK/STAT mediada por quimioquinas. En este sentido miembros de la familia de las tirosin-fosfatasas han sido implicados en el control de la vía JAK/STAT activada tras la estimulación de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (**Venema et al. 1998**). Así mismo se ha descrito la activación de fosfatasas Shp en el control de activación de STAT (**Schaper et al. 1998**). La identificación de la vía JAK/STAT y su posible regulación por Shp-1 como un evento muy temprano en la señalización inducida por quimioquinas tiene importantes consecuencias ya que las quimioquinas podrían emplear vías alternativas de señalización que permitiesen respuestas precisas a un determinado estímulo dependiendo del tipo celular y de su estadio de diferenciación.

De acuerdo con datos aparecidos recientemente en la literatura que sugieren la modulación de la vía de JAK por otros GPCR (**Marrero et al. 1995**) incluyendo receptores de quimioquinas, (**Wong y Fish, 1998**) así como la dimerización del receptor β -adrenérgico inducida por ligando (**Hebert et al. 1996**) y del receptor δ opioide (**Cvejic and Devi 1997**), nosotros postulamos que la dimerización de receptores de quimioquinas puede ser el primer evento que sigue a la unión del ligando a receptores acoplados a proteínas G. Debido a la rapidez con la que se manifiestan las respuestas fisiológicas tras la activación de estos receptores, sugerimos que el receptor existiría como un equilibrio entre la forma inactiva (monómero) y la activa (Dímero); el ligando promovería cambios conformacionales que estabilizan la forma dimérica del receptor. Esto explicaría que se detecte fosforilación basal del receptor así como asociación basal de Gi aún en ausencia de activación. En este mismo sentido, la co-transfección de células con el receptor CCR2 nativo y el mutante no funcional

CCR2BY139F, demuestra que este último actúa como dominante negativo. Finalmente, la hipótesis planteada abre nuevas posibilidades en cuanto a nuevas soluciones terapéuticas a enfermedades en las cuales las quimioquinas juegan un papel fundamental, como es el caso de la artritis reumatoide, etc, tomando como base el bloqueo de la dimerización para el tratamiento de las mismas. Así mismo en el caso del HIV-1 se abren nuevas e interesantes perspectivas ya que la dimerización de receptores de quimioquinas podría afectar la interacción con el HIV-1.

Otras tirosin quinasas activadas por MCP-1

En los primeros estudios realizados para observar la relevancia de la fosforilación en tirosinas en la señalización mediada por quimioquinas, se podían observar diferentes proteínas que se fosforilaban en respuesta al MCP-1. Como ya hemos comentado una de estas proteínas fosforiladas en tirosinas se corresponde con el propio receptor y otra con JAK2. Una diferencia claramente apreciable es que el tratamiento con PTX no era capaz de bloquear la fosforilación de JAK2, mientras que bloqueaba de forma parcial la fosforilación del CCR2 y totalmente las de las otras dos proteínas predominantes de peso molecular 70 y 125 kDa. Estos datos, junto al hecho de que el receptor permanezca fosforilado en residuos de tirosinas a tiempos en los que JAK2 ya no está asociada al mismo, indica la presencia de otras quinasas que fosforilan al receptor de una forma dependiente de la proteína *G α i*.

En el caso de RANTES, se ha demostrado que en linfocitos T induce la fosforilación en residuos de tirosina y la activación de diferentes sustratos entre los que se incluyen las quinasas ZAP-70, p125^{FAK} y Pyk-2 (**Bacon et al. 1996 ; Davis et al. 1997**). La activación de estas quinasas otorga a RANTES el potencial de activar una serie de eventos moleculares y así influir sobre la activación de los linfocitos T, transcripción de genes, progresión en el ciclo celular e incluso supervivencia celular. De hecho RANTES induce la formación de un complejo funcional que consiste de p125^{FAK}, ZAP-70 y la proteína de adhesión focal, Paxilina, indicando que estas moléculas pueden ser necesarias para la formación de adhesiones focales en células T que se originan en respuesta a la estimulación con RANTES (**Bacon et al. 1996 ; Davis et al. 1997**).

En el caso de la activación del CCR2, observamos que las quinasas p125^{FAK} y la quinasa homóloga de ZAP-70 en células monocíticas, Syk, se fosforilan en residuos tirosina tras la estimulación con MCP-1 de las células Mono Mac 1. Esta fosforilación es máxima a tiempos (10 min para p125^{FAK} y 15 min para Syk) en los cuales JAK2 ya no está fosforilado. Además de la fosforilación de estas proteínas, también observamos su asociación al CCR2 de manera dependiente de la activación de la proteína G α i, ya que es bloqueable por el tratamiento con PTX de las células.

La activación de la proteína G α i y por tanto la liberación del complejo $\beta\gamma$ ha sido implicada en fenómenos de quimiotaxis y recirculación de receptores (Arai *et al.* 1997a). También se ha demostrado la relación entre p125^{FAK} y proteínas del citoesqueleto y fenómenos de migración (Sieg *et al.* 1998). La quimiotaxis implica a distintos fenómenos entre los que se incluye cambios en la forma celular, en la afinidad de las integrinas y en la recirculación de integrinas al frente de avance celular (Lawson y Maxfield, 1996; Condeelis, 1993). Estos eventos parecen estar mediados por la activación de proteínas G así como por señales de fosforilación mediadas por los receptores de quimioquinas (Bokoch, 1995). En fibroblastos y en células de músculo liso, la regulación de la quinasa de adhesión focal y de su interacción con proteínas del citoesqueleto como α -actinina, talina y vinculina, ha sido objeto de mucha atención con respecto a su papel en la polarización celular y en la migración (Miyamoto *et al.* 1995; Clark y Brugge, 1995). Como hemos visto previamente, en respuesta a la activación con MCP-1, los linfoblastos se polarizan, proceso durante el cual el CCR2 se redistribuye al frente de avance de la célula y el p125^{FAK} se asocia al receptor. Ambos sucesos son necesarios para que se produzca la quimiotaxis y ambos son inducidos por MCP-1. Lo mismo se puede decir de la redistribución de receptores de quimioquinas, proceso promovido por MCP-1 y que parece ser crítico para la migración dirigida hacia el gradiente quimiotáctico. Todos estos hechos otorgan a las quimioquinas un papel fundamental en los mecanismos que controlan la migración celular. Parece por lo tanto que la activación de estas quinasas por quimioquinas podría estar relacionado con el control de la migración celular por parte de estas proteínas.

Desensibilización e internalización del CCR2

La desensibilización y recirculación de receptores de quimioquinas parece ser un mecanismo crítico mediante el cual los leucocitos mantienen su capacidad de detectar gradientes quimioatrayentes durante el curso de la respuesta inflamatoria. Estudios previos han demostrado que receptores de la familia CXC son fosforilados en residuos serina por quinasa de la familia GRK (**Tardif et al. 1993 ; Ali et al. 1993 ; Prossnitz et al. 1995**). En este trabajo se demuestra que el CCR2, receptor que pertenece a la familia CC, también es regulado en células intactas por la GRK2. El fenómeno de la desensibilización es un proceso complejo en el que intervienen varias moléculas. Se conoce que la zona de los receptores acoplados a proteínas G más implicada es el extremo carboxilo terminal, debido al alto número de residuos de serinas y treoninas que se localizan en esta región y la importancia que tiene la fosforilación de estos residuos en la desensibilización. De hecho estudios realizados en oocitos de *Xenopus* (**Franci et al. 1996**) relacionan a la GRK3 con esa fosforilación en el CCR2B. Cuando hemos utilizado células HEK-293 transfectadas con el CCR2 demostramos que no sólo la GRK3 sino que también la GRK2 son capaces de fosforilar en serinas y treoninas al CCR2B. Estudios recientes indican que en realidad sólo se producen fosforilaciones en residuos de serina (**Franci et al. 1996, Haribabu et al. 1997**). La implicación de una u otra quinasa en fenómenos de desensibilización parece estar definida por la línea celular empleada. De hecho la expresión de GRK3 es minoritaria en la células Mono Mac 1, línea usada como modelo en este trabajo, y la quinasa responsable de la fosforilación del CCR2 en esta línea celular es la GRK2, quinasa muy abundante en estas células.

Durante el proceso de desensibilización mediado por GRK2, tanto la actividad catalítica de esta enzima como los residuos Ser/Thr del extremo carboxilo terminal del receptor son críticos. La expresión de GRK2 junto al CCR2 es capaz de bloquear las respuestas inducidas por MCP-1. Cuando se emplea en vez del receptor nativo un CCR2 mutante en el que se han eliminado todos los residuos Ser/Thr del extremo carboxilo, la señal inducida por el MCP-1 no se inhibe por la co-expresión de GRK2 (**Franci et al. 1996**). El importante papel de la GRK2 se demuestra así mismo al co-expresar el CCR2 con un mutante dominante negativo de la quinasa (**Kong et al. 1994**); la respuesta celular a un segundo estímulo con MCP-1 es equivalente a la respuesta inicial (**Aragay et al. 1998**) indicando que a pesar de que este mutante de GRK2 es capaz de asociarse al receptor, la falta de actividad catalítica le impide

fosforilarle, por lo que no se produce un aumento de la afinidad del mismo por proteínas reguladoras como la β -arrestina que finalmente son las que llevan a la desensibilización de la respuesta. El mismo tipo de respuesta a un segundo estímulo con ligando se puede observar mediante la expresión de receptores de quimioquinas con el extremo carboxilo-terminal truncado o con sus residuos ser/thr mutados (**Mueller et al. 1997**).

Es de interés el hecho de que en el receptor CCR2B, la Ser/Thr quinasa (GRK2) responsable de la desensibilización y la proteína reguladora β -arrestina se encuentren asociadas tras la estimulación con MCP-1. Datos en la literatura indican que tanto la GRK2 (**Ruiz-Gómez y Mayor, 1997**) como la arrestina (**Goodman et al. 1996**) colocalizan con receptores β -adrenérgicos en vesículas de internalización. Aunque el método experimental empleado no nos permite definir si este complejo macromolecular está localizado en la membrana plasmática o en vesículas de endocitosis, nuestros datos indican que tanto la GRK2 como la β -arrestina se asocian con el receptor a los pocos minutos de la estimulación con el ligando iniciando el proceso de internalización en vesículas de clatrina. Un mecanismo similar podría ser el empleado por otros GPCRs, GRKs y arrestinas.

La capacidad de la GRK2 de modular un receptor de quimioquinas de la familia CC es consistente con los altos niveles de expresión de esta quinasa en monocitos, granulocitos y líneas celulares linfoides (**Chuang et al. 1992**) y con el decisivo papel que juegan los procesos de desensibilización en la migración linfocitaria. Nuestros datos sugieren que proteínas de la familia de GRK juegan un papel esencial en la modulación de la señalización celular a través de los receptores de quimioquinas y por lo tanto la regulación de su actividad y de su expresión representa una forma adicional de regular la respuesta celular a las quimioquinas.

Por lo tanto, el mecanismo implicado en la regulación negativa del CCR2 implica que tras la estimulación con MCP-1 se forma un complejo macromolecular formado por el propio receptor, la GRK2, la proteína reguladora β -arrestina y la clatrina. Aunque la endocitosis de receptores de quimioquinas no ha sido estudiada en detalle, hay evidencia de que estos receptores pueden o bien reciclarse o bien entrar en una vía de degradación a través del compartimento lisosomal; de hecho ha sido demostrado que el receptor CXCR2 se degrada tras su internalización (**Mueller et al.**

1995). Se cree que la recirculación de receptores desde los orgánulos de endocitosis requiere la disociación del ligando y la defosforilación del receptor.

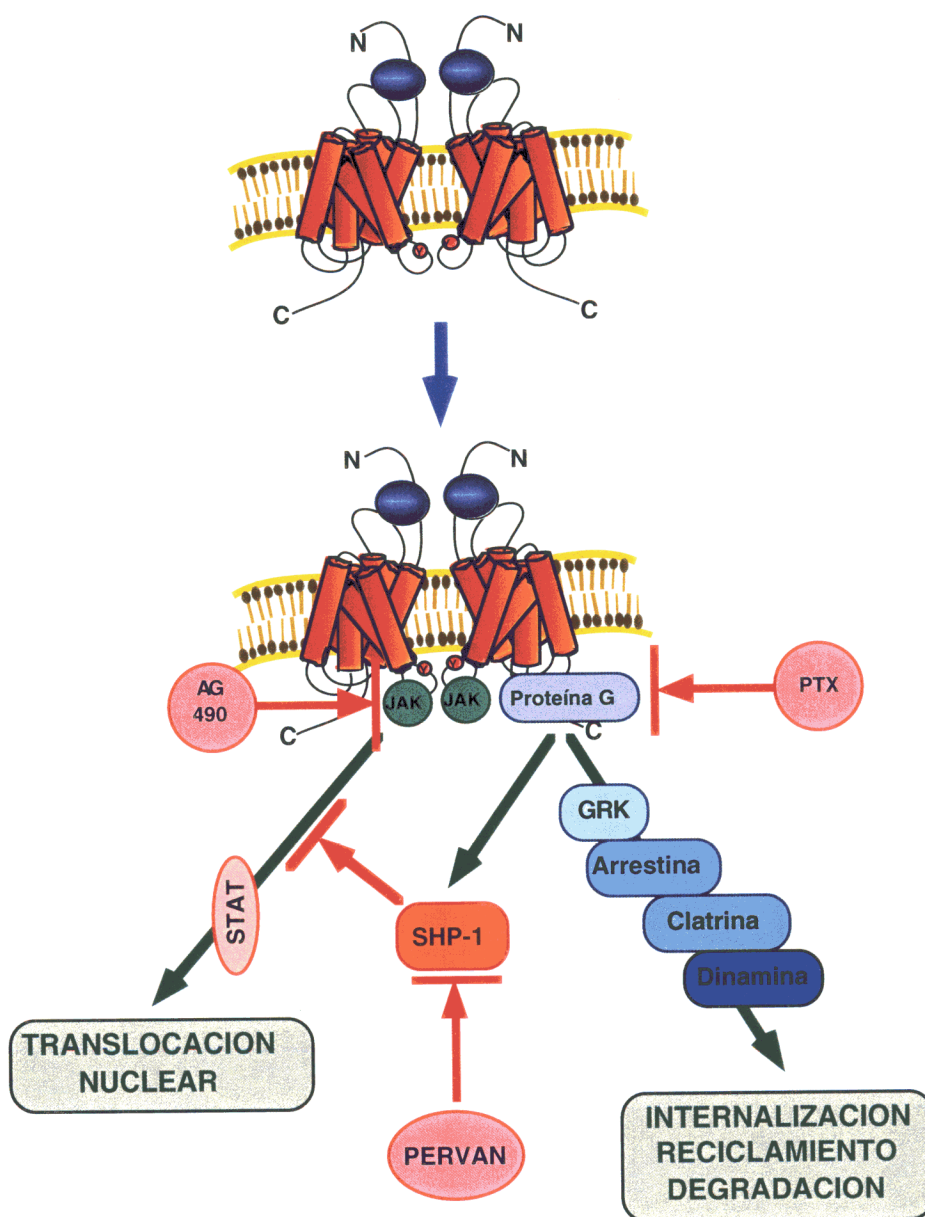


Figura 66. Modelo que representa la activación de un receptor de quimioquinas y los pasos que conducen a su desensibilización. Se localizan también los lugares susceptibles de la acción de los distintos inhibidores.

Se conoce que la endocitosis de numerosos receptores, incluyendo los acoplados a proteínas G, requiere de la actividad GTPásica de una proteína citosólica denominada dinamina. La coexpresión del CXCR2 y un mutante dominante negativo de la dinamina inhibe la internalización de este receptor (**Zhang et al. 1995**). Tras la activación mediada por el ligando y como consecuencia de fosforilación en tirosinas mediada por Src (**Ahn et al. 1997.**), la dinamina es reclutada a invaginaciones donde se une a la α -adaptina, un componente de las vesículas de clatrina (**Wang et al. 1995**). Funcionalmente la dinamina contribuye a la endocitosis catalizando la separación de las vesículas de endocitosis de la membrana plasmática de una forma dependiente de GTP. Este proceso también ocurre en la internalización del CCR5, donde RANTES induce la asociación transitoria entre la dinamina y el receptor (**Vila-Coro et al. 1999**).

Por lo tanto, tras la activación del receptor de quimioquinas CCR2, se producen cambios conformacionales que finalmente conducen a la internalización del receptor mediada por GRKs, β -arrestina, clatrina y dinamina.

Modelo del funcionamiento del receptor CCR2.

La comparación de las secuencias de los diferentes receptores acoplados a proteínas G indica la existencia de distintas familias de receptores que no comparten homología de secuencia (**Bockaert y Pin, 1999**). Sin embargo, todos estos receptores tienen en común un dominio estructural central consistente en siete hélices transmembrana que se unen entre sí por tres bucles intracelulares y tres extracelulares (**Baldwin, 1993**). Además de las variaciones en la secuencia estos receptores también difieren en la longitud y en la función de su extremo N-terminal, C-terminal y bucles intracelulares. Estos dominios proveen de propiedades específicas a los diferentes receptores.

Los cambios de conformación promovidos en el dominio central de hélices transmembrana son probablemente responsables de la activación del receptor. Estudios bioquímicos y de mutagénesis dirigida en algunos receptores modelo, como el de la rodopsina, indican que el cambio entre la conformación activa y la inactiva está asociado con un cambio en la orientación relativa de las regiones transmembrana III y VI, que expone los lugares de unión a la proteína G (**Bourne, 1997**). En otras familias el Asp de la TM II y el tripéptido DRY son importantes para la activación del receptor (**Oliviera et al. 1994 ; Scheer et al. 1996**). Se han descrito una gran variedad de mecanismos moleculares que permiten a diversos ligandos activar el dominio central de estos receptores. Así en los GPCR que son activados por pequeños ligandos como la catecolamina, el ligando se une en la cavidad formada por los segmentos transmembrana TM III a TM VI. Otros se activan por péptidos de pequeño tamaño que interaccionarían con los bucles extracelulares y el extremo amino-terminal (**Trumpp-Kallmeyer et al. 1995**). Glicoproteínas de gran tamaño también pueden activar receptores de esta familia; en este caso el lugar de unión al ligando se localiza en el extremo amino terminal del receptor y ello permite a su vez la interacción con los bucles extracelulares 2 y 3 la que lleva a la activación del dominio central (**Ji y Ji, 1995**).

De los datos anteriores podemos concluir que todos los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, independientemente del tipo de ligando que los activa, sufren un cambio conformacional inducido por el ligando que posibilita su interacción con moléculas señalizadoras.

Del conjunto de datos obtenidos, relacionados con la señalización a través del receptor de quimioquinas CCR2, postulamos un modelo de activación de estos receptores. El MCP-1, bien en forma monomérica o como dímeros preformados, interacciona con las regiones extracelulares del CCR2. Entre ellas cabe destacar el tercer bucle extracelular, implicado fundamentalmente en la interacción ligando-receptor, y el extremo amino-terminal con funciones más directamente relacionadas con la activación del receptor. Este modelo sería similar al descrito por Ji and Ji (**Ji and Ji 1995**), donde la unión del ligando al receptor también seguiría un mecanismo secuencial: reconocimiento del ligando, interacción con diferentes regiones del receptor, inducción de cambios conformacionales, activación del receptor.

Esta interacción provoca un cambio conformacional que origina como primera consecuencia la fosforilación del receptor, fosforilación que es simultánea con la activación y asociación de quinasas de la familia JAK al receptor. Estos eventos son necesarios para la activación de la proteína G, lo que indica que al menos en los receptores de quimioquinas y probablemente en otros receptores acoplados a proteínas G, existe un paso intermedio entre los cambios conformacionales inducidos por el ligando y la activación de la proteína G. Dado que la activación de JAK está mediada por transfosforilación de dos moléculas de JAK, es necesaria la presencia de al menos dos de estas quinasas cercanas, bien porque más de un JAK interacciona con un único receptor de quimioquinas bien porque estos receptores son capaces de formar oligómeros. En el caso del CCR2 describimos que la tirosina 139 presente en el motivo DRY es la única diana de ésta fosforilación temprana, lo que hace poco probable la interacción de más de una molécula de JAK por receptor. Lo más plausible es pues que se produzca la dimerización de los receptores para que sea posible la activación de JAK necesaria para la posterior activación de las demás vías de señalización (**Figuras 66 y 67**).

Estos eventos traen dos consecuencias fundamentales, en primer lugar la activación de los JAKs induce la activación de miembros de la familia de factores de transcripción STAT. Las consecuencias de la activación de estos factores está todavía por determinar, pero puede jugar un papel importante sobre todo en aquellas quimioquinas a las que se les ha asignado un papel fundamental durante el desarrollo o en la regulación de la expresión de otras moléculas implicadas en fenómenos de migración, incluidos los propios receptores de quimioquinas. En segundo lugar, los cambios conformacionales inducidos por JAK en el receptor junto a los provocados

por la unión del ligando, posibilitarían la interacción entre la proteína G y el receptor, disparándose por lo tanto aquellas vías de señalización ligadas a la activación de esa proteína (**Figura 66**) que justifican algunas de las funciones clásicamente ligadas a las quimioquinas como movilización de calcio, polarización celular, migración y otras.

Junto a estos fenómenos de activación del receptor, también tienen lugar fenómenos de desensibilización, internalización y reciclamiento de los receptores de quimioquinas, fenómenos que son críticos para la correcta funcionalidad de los mismos. Estas vías son iniciadas por la traslocación de las GRK, posiblemente mediada por el complejo G $\beta\gamma$, su asociación al receptor, al cual fosforila probablemente en residuos de serina, residuos especialmente abundantes en el extremo carboxilo de estos receptores, aumentando su afinidad por proteínas de la familia de las arrestinas que se asocian al receptor e inducen el secuestro de los receptores fosforilados en vesículas de clatrina, para su internalización.

Este modelo de actuación de las quimioquinas no es exclusivo de un único receptor. Tanto el CCR5 como el CXCR4 necesitan de eventos de fosforilación mediados por quinasas de la familia JAK para su activación y acoplamiento a la proteína G. En definitiva, en este sistema se unen las dos vías principales de activación conocidas, es decir, la de las proteínas G y la de aquellas que incluyen a tirosin quinasas, y abre nuevas posibilidades para el conocimiento de los fenómenos mediados por las quimioquinas.

Una visión global de las vías de señalización activadas por las quimioquinas se muestra en la **figura 67**, donde se pone de manifiesto la extraordinaria complejidad de las señales inducidas por las quimioquinas y la estricta regulación a la que se ven sometidas dichas señales.

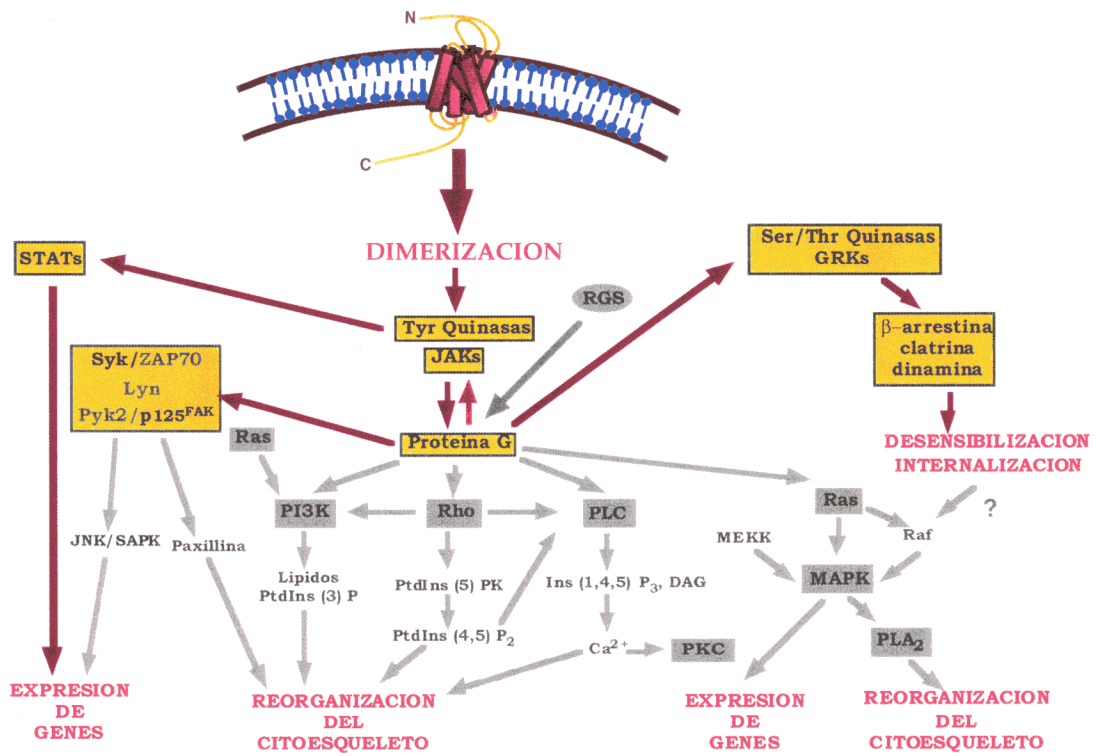


Figura 67. Resumen de las vías de señalización descritas para la activación de los receptores de quimioquinas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio junto a los datos descritos por diversos autores nos permiten sugerir las siguientes conclusiones.

1. Se han obtenido anticuerpos monoclonales específicos frente al receptor de quimioquinas CCR2, que permiten reconocer a dicho receptor en diferentes condiciones experimentales, entre las que se incluyen citometría de flujo, inmunoprecipitación, western blot e inmunofluorescencia. De ellos, el anticuerpo CCR2-02 es agonista del receptor y los anticuerpos CCR2-04 y CCR2-05 son antagonistas específicos de la acción del MCP-1.
2. El receptor CCR2 se expresa en diversas poblaciones leucocitarias entre las que se incluyen los linfocitos T y B y los monocitos. La expresión de este receptor en los linfocitos T y B varía en función de la activación *in vitro* de dichas células. En los distintos tipos celulares estudiados el receptor totalmente funcional, aunque el papel que juega en alguna de ellas, concretamente en los linfocitos B, está por definir.
3. El receptor CCR2 presente en la célula se redistribuye y se localiza en el frente de avance de los linfocitos en respuesta a diferentes estímulos entre los que se incluye el propio MCP-1, otras quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión.
4. El receptor CCR2 es capaz de actuar como co-receptor de algunas cepas del HIV-1. Tanto el MCP-1 como el anticuerpo agonista CCR2-02 son capaces de neutralizar esa infección. El hecho de que anticuerpos dirigidos contra el tercer bucle extracelular del CCR2, CCR2-04 y CCR2-05, no afecten a la infección por HIV-1 y si lo hagan anticuerpos que reconocen el extremo amino terminal del receptor, CCR2-01 y CCR2-02, indica el mayor peso específico de ésta última región en la unión del HIV-1.
5. El MCP-1 induce la fosforilación en tirosinas del CCR2 y la activación de la vía de las quinasas JANUS, que incluye la asociación y fosforilación de JAK2, así como la activación de factores de transcripción de la familia STAT.

6. El residuo tirosina 139 del CCR2 es clave para la asociación de las quinasas JANUS y la activación de la cascada de señalización. El modelo sugiere la dimerización del receptor de quimioquina como paso previo a la activación.
7. Los cambios conformacionales provocados por la unión del ligando y la asociación de JAK permite la asociación de la proteína Gi y la consiguiente activación de las vías de señalización relacionadas con ella.
8. LA vía de la proteína G incluye la activación de otras tirosin quinasas como p^{125FAK} y p^{72Syk}, así como de la tirosin fosfatasa Shp-1, que podrían relacionarse con fenómenos migratorios y con la desactivación de la vía de las quinasas JAK.
9. El MCP-1 provoca la desensibilización e internalización del CCR2. La activación con MCP-1 conduce a la formación de un complejo macromolecular formado por el receptor, la GRK y la β-arrestina, que desacoplan la proteína Gi. El CCR2 se internaliza en vesículas de clatrina, proceso en el que juega un papel importante la dinamina.

BIBLIOGRAFIA



- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 387:713-717.
- Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ and Daaka Y. 1999. Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for β_2 -adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 1185-1188.
- Ahuja SK., Gao J-L. and Murphy PM. 1994. Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunology Today*, 15:281-287.
- Ahuja, S.K., Lee, J.C., Murphy, P.M. 1996. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human Interleukin-8 receptor B. *J. Biol. Chem.* 271:225-232.
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185:111.
- Al-Aoukaty A, Schall TJ and Maghazachi AA. 1996. Differential coupling of CC chemokine receptors to multiple heterotrimeric G proteins in human Interleukin-2-activated natural killer cells. *Blood*. 87: 4255-4260.
- Ali H, Richardson RM, Tomhave ED, Didsbury JR and Snyderman R. 1993. Differences in phosphorylation of formylpeptide and C5a chemoattractant receptors correlate with differences in desensitization. *J. Biol. Chem.* 268: 24247-24254.
- Ali MS., Sayeski PP., Dirksen LB., Hayzer DJ., Marrero MB. and Bernstein KE. 1997. Dependence of the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT₁ receptor. *J. Biol. Chem.* 272:23382-23388.
- Alkhatib, G., Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy and E.A. Berger. 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958.
- Allavena P., Bianchi G., Zhou D., van Damme J., Jilek P., Sozzani S. and Mantovani A. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemoattractant protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24:3233-3236
- Amara, A., S.L. Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J.L. Virelizier and F. Arenzana-Seisdedos. 1997. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* 186: 139-146.
- Amatruda, T. T., N. P. Gerard, C. Gerard and M. I. Simon. 1993. Specific interactions of chemoattractant receptors with G-proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 10139-10144.

- Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH and Tosato G. 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med.* 182:155-xxx.
- Aragay A, Frade JMR, Mellado M, Serrano A, Martínez-A C and Mayor Jr, F. 1998. MCP-1-induced CCR2B receptor desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2985-2990.
- Arai H and Charo IF. 1996. Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 21814-21819.
- Arai H, Tsou CL and Charo IF. 1997a. Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by $\beta\gamma$ dimers released by activation of G α i-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 14495-14494
- Arai H, Monteclaro FS, Tsou C-L, Franci C and Charo IF. 1997b. Dissociation of chemotaxis from agonist-induced receptor internalization in a lymphocyte cell line transfected with CCR2B. Evidence that directed migration does not require rapid modulation of signaling at the receptor level. *J. Biol. Chem.* 272: 25037-25042.
- Araki T., Gamper M., Early A., Fukuzawa M., Abe T., Kawata T., Kim E., Firtel RA and Williams JG. 1998. Developmentally and spatially regulated activation of a *Dictyostelium* STAT protein by a serpentine receptor. *EMBO J.* 17:4018-4028.
- Arcaro A and Wymann MP. 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J.* 296: 297-301.
- Arenzana-Seisdedos, F., J-L. Virelizier, D. Rousset, I. Clark-Lewis, P. Loetscher, B. Moser and M. Baggiolini. 1996. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature.* 383:400.
- Atchison, R. E., J. Gosling, F. S. Monteclaro, C. Franci, L. Digilio, I. F. Charo and M. A. Goldsmith. 1996. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science.* 274:1924-1926

B

- Bacon, K. B., L. Flores-Romo, P. F. Life, D. D. Taub, B. A. Premack, S. J. Arkininstall, T. N. C. Wells, T. J. Schall and C. A. Power. 1995. IL-8-induced signal transduction in T lymphocytes involves receptor-mediated activation of phospholipases C and D. *J. Immunol.* 154, 3654-3666.
- Bacon, K. B., M. C. Szabo, H. Yssel, J. B. Bolen and T. J. Schall. 1996. RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p¹²⁵FAK and ZAP-70 in human T cells. *J. Exp. Med.* 184, 873-882.
- Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994a. CC Chemokines in allergic inflammation. *Immunology Today* 15, 127-133.
- Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser 1994b. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179. 1994

- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. 1997a. Human chemokines: An update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705.
- Baggiolini M and Moser B. 1997b. Blocking chemokine receptors. *J Exp Med* 186:1189-1191.
- Baggiolini M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
- Baldwin J.M. 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12:1693-1703.
- Baldwin JM. 1994. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current Opinion in Cell Biology.* 6:180-190.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature.* 385, 640-644.
- Benkirane, M., D-Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K-T. Jeang. 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5Δ32. *J. Biol. Chem.* 272, 30602-30606.
- Berman DM and Gilman AG. 1998. Mammalian RGS proteins: Barbarians at the gate. *J.Biol. Chem.* 273: 1269-1272.
- Berger, E.A., R.W. Doms, E-M. Fenyö, B.T.M. Korber, D.R. Littman, J.P. Moore, Q.J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski and R.A. Weiss. 1998. HIV-1 phenotypes classified by co-receptor usage. *Nature* 391: 240.
- Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657-700.
- Billah MM and Anthes JC. 1990. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J.* 269: 281-291.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 382:829-833.
- Bleul C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1925-1930.
- Bockaert J. and Pin J.P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary process. *EMBO J.* 18:1723-1729.
- Bohm SK, Grady EF and Bunnett NW. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322: 1-18.
- Bokoch GM. 1991. Signal transduction by GTP-binding proteins during leukocyte activation: Phagocytic cells. in *Current Topics in Membrane and Transport.* Grinstein S. and Rotstein, O.D., eds. Academic Press 35: 65-101.

- Bokoch GM and Der CJ. 1993. Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J.* 7: 750-759.
- Bokoch, G. M. 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86, 1649-1660.
- Bonecchi R, Bianchi G, Panina-Bordignon P, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A and Sinigaglia F. 1998. Differential expression of the chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper clones (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187: 129-134.
- Boring L., Gosling J., Cleary M. And Charo IF. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394:894-897.
- Bossink, A. W. J., L. Paemaen, P. M. Jansen, C. E. Hack, L. G. Thijs and J. Van Damme. 1995. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood.* 86, 3841-3847.
- Bourne HR. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 9:134-142.
- Bradley LM., Asensio VC., Schioetz L-K., Harbertson J., Krahl T., Patstone G., Woolf N., Campbell IL. and Sarvetnick N. 1999. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 162:2511-2520.
- Brelot A., Heveker N., Pleskoff O., Sol N. and Alizon M. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. 1997. *J. Virol.* 71:4744-4751.
- Buhl AM, Osawa S and Johnson GL. 1995. Mitogen-activated protein kinase activation requires two signal inputs from the human anaphylatoxin C5a receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 19828-19832.
- Burgstahler R., B. Kempkes, K. Steube and M. Lipp. 1995. Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:737.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036.
- C**
- Cairns JS and D'Souza MP. 1998. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nature Medicine* 4: 563-568.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA and Butcher EC. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279: 381-384.
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, and Soltoff S. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 64: 281-302.
- Cao YH, Chen C, Weatherbee JA, Tsang M, Folkman J. 1995. Gro- β , a CXC chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J. Exp. Med.* 182:2069-2077.

- Carolan EJ and Casale TB. 1993. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *J Allergy Clin Immunol* 92: 589-598.
- Carr, M.W., S.J. Roth, E. Luther, S.S. Rose and T.A. Springer. 1994. Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3652-3656
- Carr, M. W., R. Alon and T. A. Springer. 1996. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of β 1 and β 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 4:179-187.
- Charo, I. F., S. J. Myers, A. Herman, C. Franci, A. J. Connolly and S. R. Coughlin. 1994. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:2752-2756.
- Chee MS., Satchwell SC., Preddie E., Weston KM. and Barrel BG. 1990. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature*. 344:774-777.
- Chen HC and Guan JL. 1994. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10148-10152.
- Chen JD., Bai X., Yang AG., Cong Y., Chen SY. 1997. Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nature Med*. 3:1110-1116.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM and Schwartz MA. 1994 The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* . 79: 507-513.
- Chuang TT., Sallèse M., Ambrosini G., Parruti G. and De Blasi A. 1992. High expression of beta-adrenergic receptor kinase in human peripheral blood leukocytes. Isoproterenol and platelet activating factor can induce kinase translocation. *J. Biol. Chem*. 267:6886-6892.
- Chuntharapai, A., J. Lee, J. Burnier, W. I. Wood, C. Hébert and K. J. Kim. 1994. Neutralizing monoclonal antibodies to human IL-8 receptor A map to the NH₂-terminal region of the receptor. *J. Immunol*. 152:1783-1789.
- Clark, E.A. and J.S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 268:233-239.
- Clark-Lewis I, Schumacher S, Baggiolini M, Moser B. 1991. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem*. 266: 23128-23134.
- Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. 1993. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:3574-3577,
- Clore GM, Apella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM. 1990. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry*. 29:1689-1696.
- Clore GM. and Gronenborn AM. 1995. Three-dimensional structures of α and β chemokines. *FASEB J*. 9:57-62.

- Cocchi, F., A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 270:1811-1815.
- Coffer PJ., Geijsen N, M'rabet L., Schweizer RC, Maikoe T., Raaijmakers JA., Lammers JW, Koenderman L. 1998. Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem. J.* 329:121- 130.
- Condeelis J. 1993. Life at the leading edge. *Annu Rev Cell Biol* 9: 411-444.
- Cook, DN. 1996. The role of MIP-1a in inflammation and hematopoiesis. *J. Leukocyte Biol.* 59, 61-66.
- Coso OA, Teramoto H, Simonds WF and Gutkind JS. 1996. Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem* 271: 3963-3966.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF and Gutkind JS. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 369: 418-420.
- Crump MP, Gong J-H., Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J-L., Baggiolini M., Sykes BD. and Clark-Lewis IC. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 16:6996-7007.
- Crump MP, Rajarathnam K, Kim K-S., Clark-Lewis IC, Sykes BD. 1998. Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation. *J. Biol. Chem.* 273:22471-22479.
- Cvejic, S. and Devi, L.A. 1997. Dimerization of the δ opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272, 26959-26964
- Cyster, J. G. and C. C. Goodnow. 1995. Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J Exp. Med.* 82:581.
- Cyster JG. 1999. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 189:447-450.

D

- Damaj BB, McColl SR, Neote K, Songquing N, Ogborn KT, Hebert CA and Naccache PH. 1996. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB J.* 12: 1426-1434.
- D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, Baggiolini M, Moser B. 1997. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur. J. Immunol.* 27: 1788-1793.
- Dean M., Carrington M., Winkler M., Huttley GA., Smith MW., Allikmets R., Goedert JJ., Buchcinder SP., Vittinghoff E., Gomperts E., Donfield S., Vlahov D., Kaslow R., Saah A.,

- Rinaldo C., Detels R. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study, and O'Brien SJ. 1996. Genetic resistance of HIV-1 infection and progression to DS by a deletion Allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273: 1856-1862.
- Davis CB., Dikic I., Unutmaz D., Hill M., Arthos J., Siani MA., Thompson DA., Sclessinger J. and Littman DR. 1997. Signal transduction due to HIV-1 envelope interaction with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* 186: 1793-1798.
- Della Rocca GJ., Maudsley S., Daaka Y., Lefkowitz RJ. And Luttrell. 1999. Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen- activated protein kinase cascade. Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 274:13978-13984.
- del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos and F. Sanchez-Madrid. 1996. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment?. *Immunology Today* . 17, 127-131.
- del Pozo MA., Cabañas C., Montoya MC., Ager A., Sánchez-Mateos P. and Sánchez-Madrid F. 1997. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 13, 7493-508.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. DiMarzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman and N.R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
- Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269: 13057-13060.
- Deuel TF, Keim PS, Farmer M, Heinrikson RL. 1977. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2256-2258
- Devalaraja MN. And Richmond A. 1999. Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy?. *TIPS*- 20:151-156.
- Dieu M-C., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J-M., Oldham E., Ait-Yahia S., Briere F., Zlotnik A., Lebeque S. and Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188:373-386.
- Dilloo D, Bacon K, Holden W, Zhong W, Burdach S, Zlotnik A, Brenner M. 1996. Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances anti-tumor immunity. *Nat. Med.* 2:1090-xxx.
- Doms RW. and Peiper SC. 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology.* 235:179-190.
- Donnadiou E., Bismuth G. and Trautmann A. 1994. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of the shape and intracellular calcium. *Curr. Biol.* 4:584-595.
- Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman and R.W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158.

- Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC. 1997a. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J of Virology*. 71:6305-6314.
- Doranz BJ., Grovit-Ferbas K., Sharron MP., Mao SH., Goetz MB., Daar ES., Doms RW. and O'Brien WA. 1997b. A small molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.* 186:1395-1400
- Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, Peiper SC, Brass LF, Doms RW. 1999. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol*. 73:2752-61.
- Downey, G. P. 1994. Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. *Current Opinion in Immunology* 6:113-124.
- Drubin, D.G. and Nelson W.J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell*. 84:139-146.
- D'Souza MP and Harden VA. 1996. Chemokines and HIV-1 second receptors. *Nature Medicine* 2: 1293-1300.
- Durstin M, Durstin S, Molski TFP, Becker EL and Sha'afi RI. 1994. Cytoplasmic phospholipase A2 translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 3142-3146.

E

- Edinger, A.L., Mankowski, J.L., Doranz, B.J., Margulies, B.J., Lee, B., Rucker, J., Sharron, M., Hoffman, T.L., Berson, J.F., Zink, M.C., Hirsch, V.M., Clements, J.E. and Doms, R.W. 1997. CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:14742-14747.
- Ernst, C. A., Y. J. Zhang, P. R. Hancock, B. J. Rutledge, C. L. Corless and B. J. Rollins. 1994. Biochemical and biological characterization of murine chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* 152:3541.

F

- Farzan M., Choe H., Martin KA., Sun Y., Sidelko M., Mackay CR., Gerard NP., Sodroski J. and Gerard C. 1997. HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.* 272:6854-6857.
- Feng Y., Broder CC., Kennedy PE. And Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science*. 272:872-877.
- Flory, C. M., M. L. Jones and J. S. Warren. 1993. Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Laboratory Investigation*. 69, 396-404.

- Förster, R., A. E. Mattis, E. Kremmer, E. Wolf, G. Brem and M. Lipp. 1996. A putative chemokine receptor, BRL1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87:1037-1047.
- Frade, J. M. R., M. Llorente, M. Mellado, J. Alcamí, J. C. Gutierrez-Ramos, A. Zaballos, G. del Real and C. Martinez-A. 1997a. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 Infection. *J. Clin. Invest.* 100, 497-502.
- Frade, J. M. R., M. Mellado, G. del Real, J. C. Gutierrez-Ramos, P. Lind and C. Martinez-A. 1997b. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: Functional CCR2 receptor expression in B cells. *J. Immunol.* 159, 5576-5584
- Franci, C., L. M. Wong, J. Van Damme, P. Proost, P. and I. F. Charo. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3 but not monocyte chemoattractant protein-2 is a functional ligand for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor. *J. Immunol.* 154:6511.
- Franci C, Gosling J, Tsou CL, Coughlin SR and Charo IF. 1996. Phosphorylation by a G protein-coupled kinase inhibits signaling and promotes internalization of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor. Critical role of carboxyl-tail serines/threonines in receptor function. *J. Immunol.* 157: 5606-5612.
- Franke, R.R., König, B., Sakmer, T.P., Khorana, H.G. and Hofmann, K.P. (1990). Rhodopsin mutants that bind G proteins but fail to activate transduction. *Science* 250, 123-125.
- Freed E, Symons M, Macdonald SG, McCormick F and Ruggieri R. 1994. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* 265: 1713-1716.
- Fromm C, Coso OA, Montaner S, Xu N and Gutkind JS. 1997. The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and G α 12 to the serum response element and to cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 10098-10103.
- Fuentes, M. E., S. K. Durham, M. R. Swerdel, A. C. Lewin, D. S. Barton, J. R. Megill, R. Bravo and S. A. Lira. 1995. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* 155:5769.

G

- Ganju RK, Dutt P, Wu L, Newman W, Avraham H, Avraham S and Groopman J. 1998. β -chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood.* 91: 791-197.
- Gaudry M, Gilbert C, Barabé F, Poubelle PE and Naccache PH. 1995. Activation of lyn is a common element of the stimulation of human neutrophils by soluble and particulate agonists. *Blood.* 86: 3567-2574.
- Gayle III, R. B., P. R. Sleath, S. Srinivason, C. W. Birks, K. S. Weerawarna, D. P. Cerreti, C. J. Kozlosky, N. Nelson, T. Vanden Boss and M. P. Beckmann. 1993. Importance of the amino terminus of the interleukin-8 receptor in ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 268, 7283-7289.
- Glabinsky, A. R., V. Balasingam, M. Rani, S. L. Kunkel, R. M. Strieter, V. W. Yong, and R. M. Ransohoff. 1996. Chemokine monocyte chemoattractant protein 1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* 156:4363.

- Gebert CA., Park S-H. and Waxman DJ. 1999. Downregulation of liver JAK2/STAT5b signaling by the female plasma pattern of continuous growth hormone stimulation. *Mol. Endocrinol.* 13:213-227.
- Godiska, R., D. Chantry, G.N. Dietsch and T.W. Gray. 1995. Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 58:167-176.
- Gong J-H, Clark-Lewis I. 1995. Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 defined by modification of functionally critical NH₂-terminal residues. *J. Exp. Med.* 183:631-640.
- Gong, J.H., M. Uggucioni, B. Dewald, M. Baggiolini and I. Clark-Lewis. 1996. RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 271:10521-10527.
- Gonzalo JA, Lloyd CM, Albar JP, Finger E, Martínez-A C, Siegelman MH, Cybulski M and Gutierrez-Ramos JC. 1996. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation: The role of T cells, chemokines and endothelial adhesion molecules. *J Clin Invest* 98: 2332-2345.
- Gonzalo JA, Lloyd C, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martínez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ and Gutierrez-Ramos, JC. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188:157-167.
- Goodman, OB., Kruonick JG., Santini F., Gurevich VV., Penn RB., Gagnon WW., Kenn JH. and Benovic JL. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. 1996. *Nature.* 383:447-450.
- Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shiokawa K, Akiyama T, Ohta K and Sakai H. 1991. In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature.* 349: 251-254.
- Grandaliano G., Gesualdo L., Ranieri E., Monno R, Stallone G. and Schena FP. 1997. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation.* 63:414-420.
- Gröne HJ. 1996. Histopathology of the renal allograft. *Neph. Dial. Transplant.* 11:1916-1917.
- Gröne HJ., Weber C, Gröne EF, Weber KSC, Klier C, Wells TNC, Proudfoot A., Schlöndorff D. and Nelson PJ. 1999. Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection : blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J.* 13, 1371-1383.
- Guillet-Deniau I., Burnoi AF. and Girard J. 1997. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the JAK/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 272:14825-14829.
- Gunn MD., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams LT. and Nakano H. 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* 189:451-460.
- Gutkind JS. 1998. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842.



- Hall A. 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249: 635-640.
- Hall A. 1993. Ras-related proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:265-268..
- Hamm HE. and Gilchrist A. 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:189-196.
- Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273:669-672.
- Harhammer R, Gohla A and Schultz G. 1996. Interaction of G protein G $\beta\gamma$ dimers with small GTP-binding proteins of the Rho family. *FEBS Lett.*399: 211-214
- Haribabu B, Richardson RM, Fisher Y, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H and Snyderman R. 1997. Regulation of human chemokine receptor CXCR4: role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J. Biol. Chem.* 272:28726-28731.
- Harlow, E. and D. Lane, eds. 1988. Storing and purifying antibodies. In *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, NY, p. 298.
- Heath, H., S. Qin, P. Rao, L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, P. D. Ponath and C. D. Mackay. 1997. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* 99:178.
- Hebert CA, Viytangcol RV, Baker JB. 1991. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 266:18989-18994.
- Hébert, C. A., A. Chuntharapai, M. Smith, T. Colby, J. Kim and R. Horuk. 1993. Partial functional mapping of the human interleukin-8 type A receptor. Identification of a major ligand binding domain. *J. Biol. Chem.* 268:18549.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C and Bouvier M. 1996. A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* 271: 16384-16392.
- Hedrick, J. A. and A. Zlotnik. 1996. Chemokines and lymphocyte biology. *Current Opinion in Immunology* 8: 343-347.
- Helander T.S., Carpen O., Turunen O., Kovanen P.E., Vaheri A. and Timonen T. 1996. ICAM-2 redistributed by erzin as target for killer cells. *Nature.* 382:265-268.
- Hill CS and Treisman R. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211.
- Hoffman, T.L., E.B. Stephens, O. Narayan and R.W. Doms. 1998a. HIV type Y envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11360-11365.
- Hoffman, T.L. and R.W. Doms. 1998. Chemokines and receptors in HIV/SIV-host interaction. *AIDS* 12 (suppl A): S17-S26.

- Horuk, R. 1994. The interleukin-8 receptor family: from chemokines to malaria. *Immunology Today*, 15:169.
- Horuk, R. 1994. Molecular properties of the chemokine receptor family. *TIPS* 15:159.
- Horuk, R., A.W. Martin, Z. Wang, L. Schweitzer, A. Gerassimides, H. Guo, Z. Lu, J. Hesselgesser, H.D. Perez, J. Kim, J. Parker, T.J. Hadley and S.C. Peiper. 1997. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J. Immunol.* 158:2882-2890.
- Horuk R. 1999. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunology Today*. 20:89-94.
- Howard, O. M. Z., A. Ben-Baruch and J.J. Oppenheim. 1996. Chemokines: progresstoward identifying molecular targets for therapeutic agents. *TIBTECH* 14:46-51.
- Howard OMZ., Openheim JJ, Hollingshead MG., Covey JM., Bigelow J., McCormack JJ., Buckeit RW., Clanton DJ., Turpin JA and Rice WG. 1998. Inhibition of in vitro and in vivo HIV replication by a distamycin analogue that interferes with chemoikine receptor function: a candidate for chemotherapeutic and microbicidal application. *J. Med. Chem.* 41:2184-2193
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:99-102.
- Huffnagle, G. B., R. M. Strieter, T. J. Standiford, R. A. McDonald, M. D. Burdick, S. L. Kunkel and G. B. Toews. 1995. The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 155:4790.

I

- Ihle, J.N. 1996. STATs: Signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-334.
- Irie K, Gotoh Y, Yashar BM, Errede B, Nishida E and Matsumoto K. 1994. Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* 265: 1716-1719.
- Irving BA, Chan AC and Weiss A. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* 177: 1092-1103.

J

- Ji I and Ji TH. 1995. Differential roles of exoloop 1 of the human follicle stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* 270:15970-15973.
- Jia G-Q, Gonzalo JA, Lloyd C, Kremer L, Lu L, Martínez-A C, Wershil B and Gutierrez-Ramos JC. 1996. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine mMCP-5 in lung allergic inflammation and in lymph node germinal center. *J Exp Med* 184: 1939-1952.

- Jiang, Y., D. I. Beller, G. Frendl and D. T. Graves. 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148:2423.
- Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Surcka A, Simon MI and Wu D. 1996. Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J. Biol. Chem.* 27: 13430-13434.
- Jones SA, Moser B and Thelen M. 1995. A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). *FEBS Lett.* 364: 211-214.



- Karoor V and Malbon CC. 1996. Insulin-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the β 2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 271: 29347-29352.
- Katz A, Wu D and Simon MI. 1992. Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate β 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360: 686-689.
- Knall C, Worthen GS and Johnson GL. 1997. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3052-3057.
- Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleyensteuber, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall and A. Zlotnik. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 266:1395-1399.
- Kehrl, J.H. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity.* 8:1-10. 1998
- Kim, J.-Y. and P. N. Devreotes. 1994. Random chimeragenesis of G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 269:28725.
- Kitayama, J., M. W. Carr, S. J. Roth, J. Buccola and T. A. Springer. 1997. Contrasting responses to multiple chemotactic stimuli in transendothelial migration. Heterologous desensitization in neutrophils and augmentation of migration in eosinophils. *J. Immunology* 158:2340.
- Knall C, Worthen GS and Johnson GL. 1997. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3052-3057.
- Kock AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Ener SG, Strieter RM. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 258:1798-1801,
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF and Lefkowitz RJ. 1994. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by $G\beta\gamma$ activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12706-12710.

- Kong G, Penn R and Benovic JL. 1994. A β -adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 13084-13087.
- Kostrikis, L.G., Y. Huang, J.P. Moore, S.M. Wolinsky, L. Zhang, Y. Guo, L. Deutsch, J. Phair, A.U. Neumann and D.D. Ho. 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* 4: 350-353.
- Kupfer A. and Singer S.J. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7:309-337.
- Kunkel, S. L., R. M. Strieter, I. J. D. Lindley and J. Westwick. 1995. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunology Today* 16: 559-561.
- Kuribara H, Tago K, Yokozeki T, Sasaki T, Takai Y, Morii N, Narumiya S, Katada T and Kanaho Y. 1995. Synergistic activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factor and rhoA p21, and its inhibition by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J. Biol. Chem.* 270: 25667-25671.

L

- Lang P., Guizani L., Vitte-Mony I., Stancou R., Dorseuil O., Gacon G. and Bertoglio J. 1992. ADP-ribosylation of the ras-related, GTP binding protein Rho-A inhibits lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267:11677-11680.
- Laning J, Kawasaki H, Tanaka E, Luo Y, Dorf ME. 1994. Inhibition of in vivo tumor growth by the beta chemokine TCA3. *J. Immunology.* 153:4625-4635.
- LaRosa G.J., Thomas KM., Kaufmann ME., Mark R., White M., Taylor L., Gray G., Witt D. and Navarro J. 1992. Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity. *J. Biol. Chem.* 267:25402-25406.
- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant- activated leukocyte adhesion through integrins. *Acience*, 271: 981-983. 1996.
- Lawson MA and Maxfield FR. 1996. Ca^{2+} and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75-78.
- Lee, B., B.J. Doranz, S. Rana, Y. Yi, M. Mellado, J.M.R. Frade, C. Martínez-A., S.J. O'Brien, M. Dean, R.G. Coleman and R.W. Doms. 1998. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on HIV-1 coreceptor activity and chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5 and CXCR4. *J. Virology*, 72: 7450-7458.
- Leevers SJ, Paterson HF and Marshall CJ. 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369: 411-414.
- Lefkowitz RJ. 1993. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74: 409-412.
- Legler DF et al. BCA-1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BRL1/CXCR5. *J. Exp. Med.* 187:655-660 (1998).

- Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: Biochemical and functional characterization. *J. Exp. Med.* 182:1301, 1995
- Lin CH, Duncan JA, Kozasa T and Gilman AG. 1998. Sequestration of G protein $\beta\gamma$ subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5057-5060.
- Littman, D.R. 1998. Chemokine receptors: Keys to AIDS pathogenesis. *Cell* 93: 677-680.
- Liu, R., W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup and N.R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86:367-377.
- Lloyd, C. M., Minto, A. W., Dorf, M. E., Proudfoot, A., Wells, T. N., Salant, D. J. and Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation in interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 185, 1371-1380.
- Locati M, Zhou D, Luini W, Evangelista V, Mantovani A and Sozzani S. 1994. Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. Role of calcium influx, synergism with platelet-activating factor and significance for chemotaxis. *J Biol Chem* 269: 4746-4753.
- Locati M, Lamorte G, Luini W, Introna M, Bernasconi S, Mantovani A and Sozzani S. 1996. Inhibition of monocyte chemotaxis to C-C chemokines by antisense oligonucleotide for cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 271: 6010-6016.
- Lodi PJ, Garret DS, Kuszewski J, Tsan ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM. 1994. High resolution solution structure of the β -chemokine hMIP-1 β by multidimensional NMR. *Science*, 263:1762-1767.
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M and Moser B. 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269: 232-237.
- Loetscher P., Seitz M., Clark-Lewis I., Baggiolini M. and Moser B. 1996. Activation of NK cells by CC chemokines. *J. of Immunol.* 156:322-327.
- Loetscher P., Gong J-H., Dewald B., Baggiolini M. and Clark-Lewis I. N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J. Biol. Chem.* 273:22279- 22283. 1998.
- Lu Z, Berson JF, Chen Y, Turner JD, Zhang T, Sharron M, Jenks MH, Wang Z, Kim J, Rucker J, Hoxie JA, Peiper SC, Doms RW. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 94:6426-6431.
- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. γ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315:672, 1985
- Luster A.D. 1998. Chemokines -chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine.* 338: 436-445.

Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AJ, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Barbieri G, Pellegrin S, Sendtner M, Heinrich PC and Horn F. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263: 89-92.

M

Machesky LM, Hall AJ. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *Cell Biol.* 25:913-926. 1997.

Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, and Proudfoot AE. 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* 187: 1215-1224.

Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunat AJ, Donner AL, Bauer SI, Carsson HF, Sharpe RJ. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247:77, 1990

Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Eerdt LH, Berk BC, Delafontaine P and Bernstein KE. 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375: 247-250.

Marte BM, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH and Downward J. 1997. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol* 7: 63-70.

Matsushima, K., C. Larsen, G.C. DuBois and J.J. Oppenheim. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169, 1485-1490.

McKnight A., Wilkinson D., Simmons G., Talbot S., Picard L., Ahuja M., Marsh M., Hoxie JA, Clapham PR. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J. Virol.* 72:1692-1696.

McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE and Baker KM. The type I angiotensin II receptor couples to STAT1 and STAT3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997:2513-2524. 1997

Mellado, M., J. M. Rodríguez-Frade, L. Kremer and C. Martínez-A. 1996. Characterization of monoclonal antibodies specific for the human growth hormone 22K and 20K isoforms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 18:1613.

Mellado, M., L. Kremer, S. Mañes, C. Martínez-A. and J. M. Rodríguez-Frade. 1997 a. Characterization of antigen-antibody and ligand-receptor interactions. In *Immunological methods manual*, I. Lefkovits, ed. Academic Press Ltd, p. 1145.

- Mellado, M., J. M. Rodríguez-Frade, L. Kremer, C. von Kobbe, A. Martín de Ana, I. Mérida and C. Martínez-A. 1997b. Conformational changes required in the human growth hormone receptor for growth hormone signalling. *J. Biol. Chem.* 272:9189.
- Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martín AM, Vila-Coro A, Serrano A, Mayor Jr, F and Martínez-A C. 1998. The chemokine MCP-1 triggers JAK2 kinase activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161: 805-813.
- Meydan, N., T. Grunberger, H. Dadi, M. Shahar, E. Arpaia, Z. Lapidot, J. S. Leeder, M. Freedman, A. Cohen, A. Gazit, A. Levitzki and C. M. Roifman. 1996. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature.* 379, 645-648.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Durbelo, S.K. Akiyama and K.M. Yamada. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell. Biol.* 131:791-805.
- Monteclaro, F. S. and I. F. Charo. 1996. The amino terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1 α receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J. Biol. Chem.* 271:19084.
- Monteclaro, F. S. and Charo, I. F. 1997. The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. *J. Biol. Chem.* 272, 23186-23190.
- Moore BB., Arenberg DA., Addison CL, Keane MP., Polverini PJ, Strieter RM. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. 1999. *Angiogenesis* 2:123-134.
- Mueller SG., Schaw WP and Richmond A. 1995. Activation of protein kinase C enhances the phosphorylation of the type B interleukin-8 receptor and stimulates its degradation in non-hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 270:10439-10448.
- Mueller SG, White JR, Schraw WP, Lam V and Richmond A. 1997. Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor. *J Biol Chem* 272: 8207-8214.
- Mulligan, M. S., M. L. Jones, M. A. Bolanowski, M. P. Baganoff, C. L. Deppeler, D. M. Meyers, U. S. Ryan and P. A. Ward. 1993. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* 150:5585.
- Murphy PM. 1994. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12: 593-633.
- Myers SJ, Wong LM and Charo IF. 1995. Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J Biol Chem* 270: 5786-5792.

N

- Nagasawa T., Kikutani H. and Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 2305-2309 (1994).
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 382, 635-638.
- Negulescu, P.A., Krasieva T.A., Khan A., Kerschbaun, HH. and Calahan M.D. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996, 4:421-430.
- Nel AE, Pollack S, Landreth G, Ledbetter JA, Hultin L, Williams K, Katz R and Akerley B. 1990. CD-3-mediated activation of MAP-2 kinase can be modified by ligation of the CD4 receptor. Evidence for tyrosine phosphorylation during activation of this kinase. *J Immunol* 145: 971-979.
- Nelson PJ and Krensky AM. 1998. Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around comes around. *Current Opinion in Immunology* 10:265-270.
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL and Heasley LE. 1993. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 268: 1960-1964.
- Neptune ER and Bourne HR. 1997. Receptors induce chemotaxis by releasing the $\beta\gamma$ subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14489-14494.
- Nieto M, Frade JMR, Sancho D, Mellado M, Martínez-A C and Sánchez-Madrid F. 1997. Polarization of the chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte migration. *J Exp Med* 186: 153-158.
- Nieto M., Navarro F., Perez-Villar JJ., del Pozo MA., Gonzalez-Amaro R., Mellado N., Rodríguez-Frade JM., Martínez-A. C., López-Botet M. and Sánchez-Madrid F. 1998. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J. of Immunol.* 161:3330-3339.

O

- Oliviera L., Paiva ACM., Sander C. and Vriend G. 1994. A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:170-172.
- Oppermann M., Mack M., Proudfoot AEL. and Olbrich H. 1999. Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 274:8875-8885.
- O'Shea, J.J. 1997. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: Are we there yet? *Immunity*, 7:1-11.

P

- Paolini, J. F., Willard, D., Consler, T., Luther, M. and Krangel, M. S. 1994. The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein 1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J. Immunol.* 153, 2704-2717.
- Pattison J., Nelson PJ., Huie P., von Luetlichau I., Farshid G., Sibley RK and Krensky AM. RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* 343:209-211. (1994).
- Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ and De Laat SW. 1993. Epidermal growthfactor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell* 74: 565-575.
- Pitcher JA., Freedman NJ. and Lefkowitz RJ. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:653-692.
- Power, C. A., A. Meyer, K. Nemeth, K. B. Bacon, A. J. Hoogewerf, A. E. I. Proudfoot and T. N. C. Wells. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J. Biol. Chem.* 270, 19495-19500.
- Premack, B.A. and T.J. Schall. 1996. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat. Med.* 2: 1174-1178.
- Probst, W. C., L. A. Snyder, D. I. Schuster, J. Brosius and S. C. Sealfon. 1992. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and Cell Biology* 11:1.
- Prossnitz ER, Kim CM, Benovic JL and Ye RD. 1995. Phosphorylation of the N-formylpeptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled kinase GRK2. *J Biol Chem.*270: 1130-1137.
- Proost P., De Meester I., Schols D., Struyf S., Lambeir A-M., Wuyts A., Opdenakker G., De Clercq, E., Scharpé S. and Van Damme J. Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 273:7222-7227. 1998.

Q

- Qin, S., G. LaRosa, J. Campbell, J. Smith-Heath, N. Kassam, X. Shu, L. Zeng, E. Butcher and C. R. Mackay. 1996. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur. J. Immunol.* 26:640.
- Qin S., Rottman JB., Myers P., Kassam N., Weinblatt M., Loetscher M., Koch AE., Moser B. and Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* 101:746-754. (1998)

R

- Reid, S., Ritchie A., Boring L, Gosling J, Cooper S., Hango G, Charo I. Enhanced myeloid progenitor cell cycling and apoptosis in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Blood*, 93:1524-1533. 1999.
- Richmond A, Belentien E, Thomas HG, Flaggs G, Barton DE, Spiess J, Bordoni R, Francke U, Derynck. Molecular characterization and chromosomal mapping of a melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to β .thromboglobulin. *EMBO J*. 7:2025, 1988
- Ridley A, Paterson H, Johnston C, Diekmann D and Hall A. 1992. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410.
- Ridley AJ. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5:24-30. 1995
- Rodríguez-Frade, J.M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Lin, P. and Martínez-A., C. (1997). Characterization of the CCR2 chemokine receptor. Functional CCR2 receptor expression in B cells. *J. Immunol.* 159, 5576-5584.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD and Downward J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khawaja A, Marte BM, Pappin D, Das P., Waterfield MD, Ridley A. and Downward J. 1997. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89:457-467.
- Rollins BJ and Sunday ME. 1991. Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:3125-3131.
- Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood* 90: 909-928.
- Rossomando AJ, Sanghera JS, Marsden LA, Weber MJ, Pelech SL and Sturgill TW. 1991. Biochemical characterization of a family of serine/threonine protein kinases regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylations. *J Biol Chem* 266: 20270-20275.
- Ruiz-Gomez, A. and Mayor F. Jr. 1997. β -adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with β -adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272, 9601-9604.

S

- Saeki H., Moore AM., Brown MJ. and Hwang ST. 1999. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. of Immunol.* 162:2472-2475.

- Sallusto F., Lening D., Mackay CR. and Lanzavecchia A. 1998a. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187:875-883.
- Sallusto F., Lanzavecchia A. and Mackay CR. 1998b. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today* 12:568-574.
- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725.
- Samson M., LaRosa G., Libert F., Paindavoine P., Detheux M., Vassart, G. and Parmentier M. 1997. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* 272:24934-24941.
- Sánchez-Madrid F. & del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. 1999. *EMBO J.* 18:501-511.
- Schall, T. J., K. Bacon, R. D. Camp, J. W. Kaspari and D. V. Goeddel. 1993. Human macrophage inflammatory protein 1 α and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177:1821.
- Schall, T. J. 1994. The Chemokines in the Cytokine Handbook. A.W. Thompson, editor, Academic Press, London. pp. 181-272.
- Schall TJ and Bacon KB. 1994. Chemokines, leukocyte trafficking and inflammation. *Curr Opin Immunol* 6: 865-873.
- Schaper F., Gendo C., Eck M., Schmitz J., Grimm C., Anhof D., Kerr IM. and Heinrich PC. 1998. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem. J.* 335:557-565.
- Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P. G. De Benedetti and S. Cotecchia. 1996. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* 15, 3566-3578.
- Schluger NW and Rom WN. 1997. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol* 9: 504-508.
- Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. 1993. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365:654-657.
- Shimizu Y and Hunt III, SW. 1996. Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI3-kinase? *Immunol Today* 17: 565-573.
- Siciliano, SJ., TE. Rollins and MS. Springer. 1990. Interaction between the C5a receptor and Gi in both the membrane-bound and detergent-solubilized states. *J. Biol. Chem.* 265, 19568-19574.

- Sieg DJ., Llic KC., Jones CH., Hunter T. and Schlaepfer DD. 1998. Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK-cell migration. *EMBO J.* 17: 5933-5947.
- Simmons, G., P.R. Clapham, L. Picard, R.E. Offord, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, R. Busser, T.N.C. Wells and A.E.I. Proudfoot. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 276:276-279.
- Siveke JT and Hamann A. 1998. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 160: 550-554
- Smith, M.W., M. Dean, M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, D.A. Lomb, J.J. Goedert, T.R. O'Brien, L.P. Jacobson, R. Kaslow, S. Buchbinder, E. Vittinghoff, D. Vlahov, K. Hoots, M.W. Hilgartner and S.J. O'Brien. 1997a. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277: 959-965
- Smith, M.W., M. Carrington C. Winkler, D. Lomb, M. Dean, G. Huttley and S.J. O'Brien. 1997b. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat. Med.* 3: 1052-1053.
- Sozzani, S., M. Molino, M. Locati, W. Luini, C. Cerletti, A. Vecchi and A. Mantovani. 1993. Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines. *J. Immunol.* 150:1544.
- Sozzani, S., D. Zhou, M. Locati, M. Rieppi, P. Proost, M. Magazin, N. Vita, J. Van Damme and A. Mantovani. 1994. Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J. Immunol.* 152:3615.
- Sozzani S., Allavena P., D'Amico G., Luini W., Bianchi G., Kataura M., Imai T., Yoshie O., Bonocchi R. and Mantovani A. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. of Immunol.* 161:1083-1086.
- Springer TA. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell* 76,:301-314.
- Stasia M, Jouan A, Bourmeyster N, Boquet P and Vignais P. 1991. ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* and effect on cell motility. *Biochem Biophys Res Comm* 180: 615-622.
- St Charles R, Walz D, Edwards BFP. 1989. The three-dimensional structure of bovine platelet factor 4 at 3.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 264:2092,
- Stephens LR, Hughes KT and Irvine RF. 1991. Pathway of phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351: 33-39.
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD and Wetzker R. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269: 690-693.

Strieter RM, Polcerini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van DJ, Waltz A, Marriot D, Chan SY, Rocznik S, Shanafelt AB. 1995a. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 270:27348-27357.

Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van DJ, Kunkel SL. 1995b. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J. Leukoc Biol* 57:752-762.

T

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 393 591-594.

Takaishi K, Kikuchi A, Kuroda S, Kotani K, Sasaki T and Takai Y. 1993. Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. *Mol Cell Biol* 13: 72-79.

Tanaka Y, Mine S, Figdor CG, Wake A, Hirano H, Rskada J, Aso M, Fujii K, Saito K, van Kooyk Y and Eto S. 1998. Constitutive chemokine production results in activation of leukocyte function-associated antigen-1 on adult T-cell leukemia cells. *Blood* 91: 3909-3919.

Tardif M, Mery L, Brouchon L and Boulay F. 1993. Agonist-dependent phosphorylation of N-formylpeptide and activation peptide from the fifth component of C (C5a) chemoattractant receptors in differentiated HL60 cells. *J Immunol* 150: 3534-3545.

Taub, D. D., P. Proost, W. J. Murphy, M. Anver, D. L. Longo, J. Van Damme and J. J. Oppenheim. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2 and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95:1370.

Taub, D.D., T.J. Sayers, C.R. Carter and J.R. Ortaldo. 1995. α and β chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis. *J. Immunol.* 155:3877-3888.

Thelen M, Ugucioni M and Bosiger J. 1995. PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 217: 1255-1262.

Theriot JA and Mitchison TJ. 1993. The three faces of profilin. *Cell* 75: 835-838.

Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA and Thelen M. 1997. G protein-coupled receptors and Fc γ -receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem.*272: 28096-28101.

Trumpp-Kallmeyer S., Chini B., Mouillac B., Barberis C., Hoflack J. and Hibert M. 1995. Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetica* 70:, 255-262.

Turner L, Ward SG and Westwick J. 1995. RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* 155: 2437-2444.

U

Ugoccioni, M., M. D'Apuzzo, P. Loetscher, B. Dewald and M. Baggiolini. 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:64-68

V

VanDamme, J., P. Proost, W. Put, S. Arens, J-P. Lenaerts, R. Conings, G. Opdemakker, H. Heremans and A. Billau. 1994. Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. *J. Immunol.* 152, 5495-5502.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G and Waterfield MD. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *TIBS* 22: 267-272.

Venema RC., Venema VJ, Eaton DC. and Marrero MB. 1998. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* 273:30795-30800.

Verfaillie CM. Chemokines as inhibitors of hematopoietic progenitors. *J. Lab. Clin. Med.* 127:148-150. (1996.)

Vicari AP. et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291-301. (1997)

Vicente-Manzanares M, Montoya MC, Mellado M, Frade JMR, del Pozo MA, Nieto M, Ortíz de Landázuri M, Martínez-A C and Sánchez-Madrid F. 1998. The chemokine SDF-1 α triggers chemotactic responses and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 28,197-207.

Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER, Ye RD, Marder P, Schelm JA, Rothfuss KJ, Serlin BJ and Simpson PJ. 1995. Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 154: 2413-2422.

W

Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL, Strieter RM. 1991. Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J. Exp. Med.* 174:1355

Wang, J. M., D. W. McVicar, J. J. Oppenheim and D. J. Kelvin. 1993. Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. *J. Exp. Med.* 177:699.

- Wang, L.H., Südhof T.C. and Anderson R.G. 1995. The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J. Biol. Chem.* 270:10079-10083.
- Wang J, Huang M, Lee P, Komanduri K, Sharma S, Chen G, Dubinett SM. 1996. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. *J. Interferon Cytokine Res* 16:53-60.
- Ward, S.G., K. Bacon and J. Westwick. 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 9: 1-11.
- Wilcox RA, Challiss RA, Baudin G, Vasella A, Potter BV and Nahorski SR. 1993. Stereoselectivity of Ins(1,3,4,5)P4 recognition sites: implications for the mechanism of Ins(1,3,4,5)P4-induced Ca^{2+} mobilization. *Biochem J* 294: 191-194.
- Wilkinson P.C. 1986. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology*, 57:281-289.
- Wong M and Fish EN. 1998. RANTES and MIP-1 α activate STATs in T cells. *J Biol Chem* 273: 309-314.
- Worthen, G. S., N. Avdi, A. M. Buhl, N. Suzuki and G. L. Johnson. 1994. FMLP activates Ras and Raf in human neutrophils. Potential role in activation of MAP kinase. *J. Clin. Invest.*, 94, 815-823.
- Wu D, La Rosa G and Simon MI. 1993. G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* 261: 101-103.
- Wu L., Paxton WA., Kassam N., Ruffing N., Rottman JB., Sullivan N., Choe H., Sodroski J., Newman W., Koup RA and Mackay CR. 1997a. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* 185:1681-1691.
- Wu L., LaRosa G., Kassam N., Gordon CJ., Heath H., Ruffing N., Chen H., Humblas J., Samson M., Parmentier M., Moore JP., Mackay CR. 1997b. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Medicine* 186:1373-1381.
- Wu G, Benovic JL, Hildebrandt JD and Lanier SM. 1998. Receptor docking sites for G-protein by subunits. Implications for signal regulation. *J Biol Chem* 273: 7197-7200.

Y

- Yang AG., Bai X., Huang XF., Yao C., Chen S. 1997. Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:11567-11572.
- Yoshida, R., T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Baba, M. Kitaura, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiyama and O. Yoshie. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *J. Biol. Chem.* 272, 13803-13809.

- Yoshida R., Nagira M., Kitaura M., Imagawa N, Imai T. and Yoshie O. 1998. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J. Biol. Chem* 273:7118-7122.
- Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host-defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:9233-9237.
- Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. 1989. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunology.* 142:1956-1962.

Z

- Zhang, Y. J., J. Rutledge and B. J. Rollins. 1994. Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269:15918.
- Zhang J., Ferguson SSG., Barak LS., Ménard L. and Caron MG. 1996. Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 271:18302-18305.
- Zingoni A., Soto H., Hedrick JA., Stoppacciaro A., Storlazzi CT., Sinigaglia F., D'Ambrosio, O'Garra A., Robinson D., Rocchi M., Santoni A., Zlotnik A. Napolitano, M. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not in Th1 cells. *J. of Immunology.* 161:5457-551.
- Zipfel, P. F., J. Balke, S. J. Irving, K. Kelly and U. Siebenlist. 1989. Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. *J. Immunol.* 142:1582.
- Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 393: 595-599.

PUBLICACIONES

Characterization of antigen-antibody and ligand-receptor interactions

14.4

Mario Mellado
Leonor Kremer
Santos Manes
Carlos Martinez-A
J. M. Rodriguez Frade

Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

TABLE OF CONTENTS

| | |
|--|------|
| Abstract | 1145 |
| Introduction | 1145 |
| Screening in ELISA | 1146 |
| General strategies | 1146 |
| Materials | 1146 |
| Procedures | 1146 |
| Use of BIAcore™ | 1154 |
| General strategies | 1154 |
| Analysis of kinetic parameters in ligand-receptor interactions | 1155 |
| Experimental procedures | 1155 |
| References | 1161 |

Characterization of the CCR2 Chemokine Receptor: Functional CCR2 Receptor Expression in B Cells¹

Jose M. R. Frade,* Mario Mellado,* Gustavo del Real,* Jose C. Gutiérrez-Ramos,* Peter Lind,[†] and Carlos Martínez-A.^{2*}

We have derived anti-human CCR2-specific mAbs by immunization with synthetic peptides corresponding to CCR2 sequences presumably involved in the interaction with its ligand(s). The characterization of these mAbs includes the ability to recognize the CCR2 receptor specifically, as well as the function based on their ability to promote Ca²⁺ influx or to block MCP-1-induced Ca²⁺ influx and chemotaxis. One mAb (MCP-1R02) that is directed to the NH₂ terminal domain of the CCR2 receptor has MCP-1 agonist activity, and two that recognize the third extracellular domain (MCP-1R04 and MCP-1R05) have MCP-1 antagonist activity. We analyzed the presence of CCR2 in several PBL and tonsil-derived leukocyte populations and found expression of this receptor in monocytes, activated T cells, and, surprisingly, in B cells. CCR2 receptor expression in B cells was further corroborated in Southern blot using CCR2-specific probes. Moreover, both MCP-1 and the agonist mAb trigger specific B cell migration via a PTX-sensitive mechanism, indicating the presence of a functional CCR2 receptor in these cells. *The Journal of Immunology*, 1997, 159: 5576–5584.

Chemokines are a family of proinflammatory cytokines that attract and activate specific types of leukocytes. The known human chemokines are divided into two subfamilies based on overall sequence homology, the position of the first two of four canonical cysteine residues and the chromosomal location of the corresponding genes. These subfamilies are the β or CC chemokines, in which the cysteines are adjacent, and the α or CXC chemokines, in which the cysteine residues are separated by one amino acid residue (1–3). This structurally defined subdivision correlates with their activity on blood leukocyte populations; the CXC chemokines primarily affect neutrophils (and, to some extent, lymphocytes) and CC chemokines act on monocytes, lymphocytes, NK cells, basophils, and eosinophils (4, 5).

Chemokines mediate their effects via interactions with seven transmembrane-spanning, G protein-coupled receptors (GPCR),³ which can be grouped according to their ligand specificity. It is unclear how the chemokines achieve their functional diversity (at times specific, at times redundant) by binding to this assembly of receptors, and these interactions appear to be complex (6, 7). Che-

more receptors are expressed in a wide variety of cell populations and a single cell population can express a vast array of receptors. Monocytes express high affinity binding sites for MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, and RANTES (8, 9). Although functional analysis by receptor cross-desensitization suggests the existence of at least three discrete chemokine receptors on monocytes, the desensitization may also correspond to differential recognition (affinity variance or different receptor residues involved in chemokine binding) by several chemokines of a single receptor type. Much less is known of the presence of the chemokine receptor in other leukocyte populations.

MCP-1 is a member of the CC chemokine family, produced by endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages in response to a variety of mediators, including platelet-derived growth factor, TNF- α , LPS, and oxidized low density lipoproteins (10, 11). MCP-1 is active on monocytes, T cells, NK cells, basophils, mast cells, and dendritic cells (12, 13). It is considered important in mediating monocyte tissue infiltration in a variety of inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis and alveolitis, as well as in macrophage infiltration of tumors (3). In this last case, monocyte/macrophage activation by MCP-1 may contribute to suppression of tumor growth in animal models. Monocyte invasion of the artery wall is also a critical event in the initiation of atherosclerosis, and MCP-1 is expressed abundantly in the active, macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques (14).

MCP-1 induces, through its binding to specific GPCR, histamine release, calcium influx, and in vitro monocyte migration, activates murine mast cells in vivo, regulates monocyte integrin expression, and is chemotactic for T lymphocytes (15–18). The CCR2 receptor is expressed in monocytes, myeloid precursor cells and activated T lymphocytes (19, 20). Two CCR2 receptor forms, differing only in their alternatively spliced carboxyl tails, were cloned and characterized. These receptors, CCR2A and CCR2B, signal in a highly specific manner in response to MCP-1 (21).

Although little is known of the molecules directing B cell migration, it has been shown that B cells produce and respond to different chemokines. SDF-1 and IP-9 have thus been described as B cell growth factors (22), and lymphotactin, MIP-1 α , MIP-1 β ,

*Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Cantoblanco, Universidad Autónoma, Madrid, Spain; and [†]Department of Molecular Biology, Pharmacia and Upjohn AB, Stockholm, Sweden.

Received for publication June 13, 1997. Accepted for publication August 15, 1997.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1724, solely to indicate this fact.

¹ This work was partially supported by grants from the Spanish Dirección General de Ciencia y Tecnología and by the European Union. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Pharmacia & Upjohn. J.M.R.F. and C.M.A. contributed in equal part to the work leading to this article.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Carlos Martínez-A., Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, UAM, Campus Cantoblanco, F-28049 Madrid, Spain. E-mail address: cmartinez@cnb.uam.es.

³ Abbreviations used in this paper: GPCR, G protein-coupled receptor; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; SDF, stromal cell-derived factor; PTX, pertussis toxin; HA, enzyme-linked immunosorbent assay.

Rapid Publication

The Amino-terminal Domain of the CCR2 Chemokine Receptor Acts as Coreceptor for HIV-1 Infection

José M.R. Frade, Mercedes Llorente, Mario Mellado, José Alcami,* José C. Gutiérrez-Ramos, Angel Zaballos, Gustavo del Real, and Carlos Martínez-A.

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain; and *Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Abstract

The chemokines are a homologous serum protein family characterized by their ability to induce activation of integrin adhesion molecules and leukocyte migration. Chemokines interact with their receptors, which are composed of a single-chain, seven-helix, membrane-spanning protein coupled to G proteins. Two CC chemokine receptors, CCR3 and CCR5, as well as the CXCR4 chemokine receptor, have been shown necessary for infection by several HIV-1 virus isolates.

We studied the effect of the chemokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and of a panel of MCP-1 receptor (CCR2)-specific monoclonal antibodies (mAb) on the suppression of HIV-1 replication in peripheral blood mononuclear cells. We have compelling evidence that MCP-1 has potent HIV-1 suppressive activity when HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes are used as target cells. Furthermore, mAb specific for the MCP-1R CCR2 which recognize the third extracellular CCR2 domain inhibit all MCP-1 activity and also block MCP-1 suppressive activity. Finally, a set of mAb specific for the CCR2 amino-terminal domain, one of which mimics MCP-1 activity, has a potent suppressive effect on HIV-1 replication in M- and T-tropic HIV-1 viral isolates.

We conjecture a role for CCR2 as a coreceptor for HIV-1 infection and map the HIV-1 binding site to the amino-terminal part of this receptor. This concurs with results showing that the CCR5 amino terminus is relevant in HIV-1 infection, although chimeric fusion of various extracellular domains shows that other domains are also implicated. We discuss the importance of CCR2 structure relative to its coreceptor role and the role of anti-CCR2 receptor antibodies

in the prevention of HIV-1 infection. (*J. Clin. Invest.* 1997, 100:497-502.) Key words: chemokine receptor • HIV-1 coreceptor • monoclonal antibodies

Introduction

Chemokines are a family of proinflammatory cytokines which attract and activate specific types of leukocytes. Based on the position of the first two of four canonical cysteine residues and the chromosomal location of the corresponding genes, two main chemokine families, CC or α and CXC or β , have been identified. They act on monocytes, lymphocytes (including natural killer cells), basophils, eosinophils, and neutrophils (1-3). Chemokines mediate their effects via interactions with a seven-transmembrane glycoprotein receptor coupled to a G-protein signaling pathway (4, 5). This type of receptor consists of a single polypeptide chain with an extracellular amino-terminal domain and a cytoplasmic carboxy-terminal domain. The amino-terminal and third extracellular domain have been implicated in receptor-ligand interaction, while the carboxy-terminal and the third intracellular domain cooperate to bind and activate the G proteins (5).

The recent descriptions of the CCR3, CCR5 (6-12), and CXCR4 or fusin (10, 13-15) chemokine receptors as HIV-1 coreceptors, and of the chemokine ligands RANTES, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α),¹ and MIP-1 β as neutralizing agents for HIV-1 infection, assign these molecules a key role in HIV-1 pathogenesis (6-15). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), a CC chemokine family member, is produced by endothelial cells, smooth muscle, and macrophages in response to a variety of stimuli (16). It has been implicated as a mediator of monocyte and macrophage infiltration of tumor cells, where it may contribute to tumor growth suppression (17). MCP-1 interacts with the CCR2 receptor and induces histamine release, calcium influx, regulates integrin expression, and acts as a chemotactic factor for monocytes/macrophages, T cells, natural killer cells, basophils, mast cells, and dendritic cells (18-20). We have assayed the ability of the CCR2 receptor to act as an HIV-1 coreceptor on human PBMC by testing the HIV-1 suppressive activity of MCP-1, as well as the ability of monoclonal anti-CCR2 antibodies to interfere with HIV-1 replication. Our studies show the importance of the CCR2 amino terminus as the domain interacting

J.M.R. Frade and M. Llorente contributed equally to this study.

Address correspondence to Dr. Carlos Martínez-A., Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Phone: 34-1-585-4537; FAX: 34-1-372-0493; E-mail: cmartineza@cnb.uam.es

Received for publication 28 January 1997 and accepted in revised form 24 April 1997.

J. Clin. Invest.

© The American Society for Clinical Investigation, Inc.

0021-9738/97/1080497-06 \$2.00

Volume 100, Number 3, August 1997, 497-502

http://www.jci.org

1. Abbreviations used in this paper: CCR2, monocyte chemoattractant protein 1 receptor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP, macrophage inflammatory protein.

Brief Definitive Report**Polarization of Chemokine Receptors to the Leading Edge during Lymphocyte Chemotaxis**

By Marta Nieto,* José M.R. Frade,† David Sancho,* Mario Mellado,† Carlos Martínez-A,‡ and Francisco Sánchez-Madrid*

*From the *Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, E-28006, Madrid, Spain; and †Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain***Summary**

Leukocyte migration in response to cell attractant gradients or chemotaxis is a key phenomenon both in cell movement and in the inflammatory response. Chemokines are quite likely to be the key molecules directing migration of leukocytes that involve cell polarization with generation of specialized cell compartments. The precise mechanism of leukocyte chemoattraction is not known, however. In this study, we demonstrate that the CC chemokine receptors CCR2 and CCR5, but not cytokine receptors such as interleukin (IL)-2R α , IL-2R β , tumor necrosis factor receptor 1, or transforming growth factor β R, are redistributed to a pole in T cells that are migrating in response to chemokines. Immunofluorescence and confocal microscopy studies show that the chemokine receptors concentrate at the leading edge of the cell on the flattened cell-substratum contact area, induced specifically by the signals that trigger cell polarization. The redistribution of chemokine receptors is blocked by pertussis toxin and is dependent on cell adhesion through integrin receptors, which mediate cell migration. Chemokine receptor expression on the leading edge of migrating polarized lymphocytes appears to act as a sensor mechanism for the directed migration of leukocytes through a chemoattractant gradient.

Chemokines exert their effects by interacting with seven transmembrane glycoprotein receptors coupled to a G protein signaling pathway (1, 2). Several chemokine receptors have now been cloned and classified into two groups, CC chemokine receptor (CCR) and CXC chemokine receptor (CXCR) (1). Some of these receptors, including CCR5, CCR3, and CXCR4 or fusin, have recently been described to function as coreceptors for HIV infection (see review in reference 1). Chemokine receptor expression on T cells seems to be tightly regulated at the transcriptional level. The upregulated mRNA expression of several chemokine receptors on activated and memory T cells has been described, a phenomenon that appears to be dependent on exogenous cytokines such as IL-2 (2, 3). Consequently, memory T cells represent the lymphocyte subset showing a higher transendothelial chemotactic potential (4).

Cell locomotion is extremely important, especially in the case of leukocyte migration. Certain aspects of the chemotaxis mechanism have been studied in various cell types and experimental systems. It is now becoming clear that cell motility involves cell polarization, with the formation of lamellipodia at the leading edge (5), where several unrelated reports suggest that an exocytosis process occurs (6). This promotes the redistribution of specific molecules during cell motion, such as α v β 3 (7), β actin (8), or the urokinase type plasminogen receptor (9).

The chemotactic response is fundamental in leukocyte physiology and implies recognition of an external stimulus gradient. Several mechanisms responsible for the chemotactic response have been suggested, including those dependent on receptor occupancy. Chemotactic receptor enrichment at the anterior cell pole has been difficult to demonstrate, due to the lack of specific antibodies. Preliminary evidence was shown in early studies describing the asymmetric binding of labeled *N*-formylmethionyl-leucylphenylalanine on neutrophils (10). These studies suggested that phenomena taking place at the leading edge might direct cell motility, but a more definitive demonstration was necessary. In this paper, we demonstrate that CCR2 and CCR5 receptors polarize to the leading edge of migrating lymphocytes, a finding that helps to understand the chemotactic response mechanism.

Materials and Methods

Cytokines and Reagents. The anti-CCR2 mAb (monocyte chemoattractant protein [MCP]-1R03) was obtained and characterized as described elsewhere. Mouse anti-CCR5 antiserum was obtained by immunization with a KLH-coupled synthetic peptide corresponding to amino acids 6–20 of the human CCR5 chemokine receptor. Recombinant human (rh) regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) (R&D Sys. Inc., Minneapolis, MN), and rhIL-8, and rhMCP-1 (PeproTech EC, Ltd., London, U.K.) were purchased. Recombinant IL-15 de-

The Chemokine Monocyte Chemotactic Protein 1 Triggers Janus Kinase 2 Activation and Tyrosine Phosphorylation of the CCR2B Receptor¹

M. Mellado,^{2*} J. M. Rodríguez-Frade,^{2*} A. Aragay,^{2†} G. del Real,^{*} A. M. Martín,^{*} A. J. Vila-Coro,^{*} A. Serrano,^{*} F. Mayor, Jr.,[†] and C. Martínez-A.,^{3*}

The chemokines are a growing family of low m.w., 70- to 80-residue proinflammatory cytokines that operate by interacting with G protein-coupled receptors. Chemokines are involved in cell migration and in the activation of specific leukocyte subsets. Using the Mono Mac 1 monocytic cell line, we show that monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) triggers activation of the Janus kinase 2 (JAK2)/STAT3 pathway and CCR2 receptor tyrosine phosphorylation. Both Ca²⁺ mobilization and cell migration are blocked in Mono Mac 1 cells by tyrphostin B42, a specific JAK2 kinase inhibitor. Within seconds of MCP-1 activation, JAK2 phosphorylates CCR2 at the Tyr⁴³⁹ position and promotes JAK2/STAT3 complex association to the receptor. This MCP-1-initiated phosphorylation and association to JAK2 is also observed in CCR2B-transfected HEK293 cells. In contrast, when a CCR2B Tyr⁴³⁹Phe mutant is expressed in HEK293 cells, it is not phosphorylated in tyrosine and triggers neither JAK2/STAT3 activation nor Ca²⁺ mobilization in response to MCP-1. These results implicate the tyrosine kinase pathway in early chemokine signaling, suggesting a key role for this kinase in later events. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 805–813.

Leukocyte migration to inflammation sites is a multistep process mediated by a series of sequential, but overlapping, interactions in which the generation of chemotactic gradients plays a key role. Chemotactic cytokines, or chemokines, are responsible for chemoattraction of specific subsets of leukocyte populations to inflammation sites (1, 2).

The chemokines are a growing family of low m.w., 70- to 80-residue proinflammatory cytokines, characterized by their ability to induce migration and activation of specific leukocyte population subsets (2–6). The two main branches of the family are distinguished by overall sequence homology, chromosomal location, and leukocyte population specificity (7). The CXC (α) chemokines act on neutrophils and nonhemopoietic cells involved in wound healing, whereas the CC (β) chemokines act on monocytes, eosinophils, basophils, NK cells, and different lymphocyte subpopulations (5, 6). New chemokine families have been identified recently, which maintain overall sequence homology but lack the typical cysteine distribution (C, or γ , and CX₃C, or δ , chemokines) (8, 9).

The CC chemokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)⁴ was originally described as a potent chemoattractant for monocytes (10), produced by different cell types in response to a variety of mediators including PDGF (platelet-derived growth factor), TNF- α , LPS, and oxidized low density lipoproteins (11, 12). Since then, many other activities have been assigned to MCP-1, including induction of T cell migration (13), suppression of tumor growth in animal models (14), and neutralization of HIV-1 (15). MCP-1 has also been associated with several disease states in which monocyte infiltration plays a role, such as granulomatous disease, host responses to bacteria, rheumatoid arthritis, inflammatory heart disease, bone trauma, asthma, and sepsis (16, 17).

Chemokines activate their functions through interaction with single-chain, seven-helix membrane-spanning receptors coupled to G proteins (GPCR) (3). To date, nine receptors have been defined for the CC chemokines (18) and four for the CXC family, together with several putative CC or CXC receptors for which the ligands remain to be determined. They have an N terminus and three extracellular loops that act in concert to bind the chemokine ligand (19, 20), while the three intracellular loops and the C terminus are involved in transduction of the chemokine signal. The activation signals following chemokine stimulation are not well defined, and various signal transduction pathways have been implicated through the association of the chemokine receptors with guanine nucleotide-binding protein (G proteins) (21). In all cases, a pertussis toxin (PTX)-sensitive G protein was found, although there are also examples of PTX-insensitive G proteins, as is the case for the C5a receptor, which also couples to G α 16 (22). The biochemical signaling pathways include changes in intracellular cAMP levels (23), phospholipase activation (24), increases in tyrosine phosphorylation including the Src substrates focal adhesion kinase (p125^{Fak}) and ZAP-70 (25), increased association of Src family

¹Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, and ²Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

Received for publication October 2, 1997. Accepted for publication March 18, 1998. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

³This work was supported in part by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICYT)/PM95-0033 and the Fundación Ramón Areces to F.M., and by grants from the DGICYT and the European Union to C.M.-A. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the CSIC and Pharmacia and Upjohn.

⁴M.M., J.M.R.-F., and A.A. contributed equally to the work leading to the present manuscript.

[†]Address correspondence and reprint requests to Dr. Carlos Martínez-A., Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. E-mail address: cmartinez@cnb.uam.es

⁴Abbreviations used in this paper: MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; CTX, cholera toxin; EGF, epidermal growth factor; GPCR, G protein-coupled receptor; JAK, Janus kinase; PTX, pertussis toxin; PTyr, phosphorytyrosine.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 95, pp. 2985–2990, March 1998
Cell Biology

Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2

(chemokines/arrestin)

A. M. ARAGAY*†, M. MELLADO‡, J. M. R. FRADE†‡, A. M. MARTIN‡, M. C. JIMENEZ-SAINZ*, C. MARTINEZ-A‡, AND F. MAYOR, JR.*§

*Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," and †Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

Edited by Robert J. Lefkowitz, Duke University Medical Center, Durham, NC, and approved December 31, 1997 (received for review June 4, 1997)

ABSTRACT Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) is a member of the chemokine cytokine family, whose physiological function is mediated by binding to the CCR2 and CCR4 receptors, which are members of the G protein-coupled receptor family. MCP-1 plays a critical role in both activation and migration of leukocytes. Rapid chemokine receptor desensitization is very likely essential for accurate chemotaxis. In this report, we show that MCP-1 binding to the CCR2 receptor in Mono Mac 1 cells promotes the rapid desensitization of MCP-1-induced calcium flux responses. This desensitization correlates with the Ser/Thr phosphorylation of the receptor and with the transient translocation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2, also called β -adrenergic kinase 1 or β ARK1) to the membrane. We also demonstrate that GRK2 and the uncoupling protein β -arrestin associate with the receptor, forming a macromolecular complex shortly after MCP-1 binding. Calcium flux responses to MCP-1 in HEK293 cells expressing the CCR2B receptor were also markedly reduced upon cotransfection with GRK2 or the homologous kinase GRK3. Nevertheless, expression of the GRK2 dominant-negative mutant β ARK-K220R did not affect the initial calcium response, but favored receptor response to a subsequent challenge by agonists. The modulation of the CCR2B receptor by GRK2 suggests an important role for this kinase in the regulation of monocyte and lymphocyte response to chemokines.

The chemokines are a large family of chemotactic cytokines that have a central role in leukocyte migration. The C-X-C chemokines act on neutrophils and nonhematopoietic cells involved in wound healing, whereas the C-C chemokines act on monocytes, eosinophils, basophils, natural killer (NK) cells, and diverse lymphocyte subpopulations. Chemokines interact with an array of G protein-coupled receptors (GPCRs) that can be grouped on the basis of their ability to bind to one or more C-X-C or C-C chemokines (1–4). The C-C chemokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was originally described as a potent chemoattractant for monocytes and is produced by several cell types in response to a variety of mediators (5, 6). Since then, many other activities have been assigned to MCP-1, including induction of T cell migration, tumor growth suppression in animal models, and HIV-1 neutralization (7–9).

Two MCP-1 receptor forms, the type A (CCR2A) and type B (CCR2B) CCR2 receptors, have recently been cloned and found to differ only in their carboxyl tails (10). In signaling

studies, both mediate agonist-dependent calcium mobilization, as well as inhibition of adenylyl cyclase and cell migration through the coupling to pertussis toxin-sensitive G proteins (11). We have recently shown that *Gai* coimmunoprecipitates with the CCR2 receptor in Mono Mac 1 cells (M.M., J.M.R.F., A.M.A., G. del Real, A.M.M., A. Serrano, F.M., and C.M.-A. unpublished work); however, it has been suggested that MCP-1 receptors, as well as those for other chemotactic chemokines such as RANTES (regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted), may couple to multiple G proteins (12–14).

Little is known about the regulation mechanisms of the cellular response to chemokines, or of the role of desensitization in lymphocyte migration. The trafficking of different lymphocyte populations is a complex process controlled by a vast array of molecules. In this process, cells must be able to continuously sense small changes in chemoattractant gradients. Migration through a chemotactic gradient probably employs an *on-off* mechanism in which chemokine receptor desensitization may be an important step. For a large number of related GPCRs, rapid desensitization appears to involve agonist-promoted receptor phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) (15–17). GRK-mediated phosphorylation of serine/threonine residues in the carboxyl tail and/or intracellular loops of GPCR increases the affinity for arrestin-type proteins, the binding of which prevents any further coupling between the receptor and G proteins (18, 19). The uncoupled receptors are subsequently removed from the plasma membrane in a process termed *internalization*. Recent evidence suggests that both GRK and arrestins also play a key role in the sequestration process (20, 21).

There are six known members of the GRK family, GRK1 to GRK6 (16–18). On the basis of sequence homology, they are classified into three groups: GRK1 (also known as rhodopsin kinase), GRK2 and -3 [also called β -adrenergic receptor kinase 1 and 2 (β ARK1 and -2), respectively], and GRK-4, -5, and -6. Several unique features distinguish agonist-induced desensitization mediated by the second group. Cytosolic GRK2 and GRK3 are translocated to the membrane upon receptor activation in a process facilitated by interactions with released *G $\beta\gamma$* dimers (22–24). Although GRK2, -3, -5, and -6 subtypes are ubiquitous, GRK2 is particularly abundant in peripheral blood leukocytes, as well as in myeloid and lym-

This paper was submitted directly (Track II) to the *Proceedings* office. Abbreviations: GRK, G protein-coupled receptor kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; *G $\beta\gamma$* , $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins; β ARK, β -adrenergic receptor kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; SDF-1 α , stromal cell-derived factor 1 α ; HEK293, human embryonic kidney cells.

†A.M.A., M.M., and J.M.R.F. contributed equally to this work.

§To whom reprint requests should be addressed. e-mail, Fmayor@cbm.uam.es.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

© 1998 by The National Academy of Sciences 0027-8424/98/052985-06\$2.00/0 PNAS is available online at <http://www.pnas.org>.

Influence of the *CCR2-V64I* Polymorphism on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Activity and on Chemokine Receptor Function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4

BENHUR LEE,¹ BENJAMIN J. DORANZ,¹ SHALINI RANA,² YANJI YI,² MARIO MELLADO,³
 JOSE M. R. FRADE,³ CARLOS MARTINEZ-A.,³ STEPHEN J. O'BRIEN,⁴ MICHAEL DEAN,⁴
 RONALD G. COLLMAN,² AND ROBERT W. DOMS^{1*}

Department of Pathology and Laboratory Medicine¹ and Pulmonary and Critical Care Division,² University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104; Department of Immunology and Oncology, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain³; and Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, Maryland 21702-1201⁴

Received 31 March 1998/Accepted 5 June 1998

The chemokine receptors CCR5 and CXCR4 are used by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in conjunction with CD4 to infect cells. In addition, some virus strains can use alternative chemokine receptors, including CCR2b and CCR3, for infection. A polymorphism in *CCR2* (*CCR2-V64I*) is associated with a 2- to 4-year delay in the progression to AIDS. To investigate the mechanism of this protective effect, we studied the expression of CCR2b and CCR2b-V64I, their chemokine and HIV-1 coreceptor activities, and their effects on the expression and receptor activities of the major HIV-1 coreceptors. CCR2b and CCR2b-V64I were expressed at similar levels, and neither molecule affected the expression or coreceptor activity of CCR3, CCR5, or CXCR4 in cotransfected cell lines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from *CCR2-V64I* heterozygotes had normal levels of CCR2b and CCR5 but slightly reduced levels of CXCR4. CCR2b and CCR2b-V64I functioned equally well as HIV-1 coreceptors, and CCR2-V64I PBMCs were permissive for HIV-1 infection regardless of viral tropism. The MCP-1-induced calcium mobilization mediated by CCR2b signaling was unaffected by the polymorphism, but MCP-1 signaling mediated by either CCR2b- or CCR2-V64I-encoded receptors resulted in heterologous desensitization (i.e., limiting the signal response of other receptors) of both CCR5 and CXCR4. The heterologous desensitization of CCR5 and CXCR4 signaling by both *CCR2* allele receptor types provides a mechanistic link that might help explain the *in vivo* effects of *CCR2* gene variants on progression to AIDS as well as the reported antiviral activity of natural *CCR2* ligands.

Infection of cells by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires the presence of the viral receptor CD4 and an appropriate coreceptor on the cell surface. Direct interactions between the viral Env protein and the coreceptor are thought to trigger conformational changes in Env that lead to fusion between the viral and cellular membranes, allowing the viral genome to enter the host cell cytoplasm (reviewed in references 7, 10, 12, 23, and 43). The recent identification of certain chemokine receptors as coreceptors for HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV) has provided tremendous insight into the mechanisms underlying viral entry and tropism. The virus strains responsible for transmission and which are the predominant virus type isolated from asymptomatic, HIV-positive individuals use CCR5 as a coreceptor, while viruses that emerge later during the course of infection use CXCR4 either in place of or in addition to CCR5 for cellular entry (2, 9, 16, 21, 26, 27, 31). By virtue of their differential use of the major HIV-1 coreceptors, it has been proposed that these viruses be referred to as R5, X4, and R5X4 strains, respectively (8, 22). In addition, a host of other chemokine and orphan seven-transmembrane domain receptors have been shown to support infection by one or more virus strains *in vitro*,

including CCR2b and CCR3 (16, 22, 26, 50). Evolution of coreceptor use *in vivo* from CCR5 to additional coreceptors has been linked to disease progression and may help explain certain aspects of viral pathogenesis (18, 52).

The importance of CCR5 for viral transmission is shown by the fact that approximately 1% of Caucasians are CCR5 negative due to a naturally occurring polymorphism and that these individuals are very highly resistant to virus infection (20, 35, 39, 51). The critical role of CCR5 for viral transmission and the association between the emergence of viruses that use CXCR4 and accelerated disease progression has triggered a search for additional polymorphisms in chemokine receptor genes that may influence viral transmission and disease course. Recently, a polymorphism in *CCR2* in which Val 64 is replaced by Ile (*CCR2-V64I*) has been reported (55). This polymorphism, which occurs at an allele frequency of 10 to 25%, depending on the ethnic population, is associated with a 2- to 4-year delay in the progression to AIDS. However, relatively few virus strains that can use CCR2b in conjunction with CD4 to infect cells have been reported (22). Therefore, the mechanism underlying this protective effect is not apparent.

To investigate the protective effect of the *CCR2* polymorphism, we studied the expression as well as the chemokine receptor and HIV-1 coreceptor activities of the major *CCR2* isoform, *CCR2b*, with and without the *V64I* mutation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and transfected cell lines. *CCR2b-V64I* was expressed at levels similar to

* Corresponding author. Mailing address: Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, 806 Abramson, 34th and Civic Center Blvd., Philadelphia, PA 19104. Phone: (215) 898-0890. Fax: (215) 573-2883. E-mail: doms@mail.med.upenn.edu.

Roles of Chemokines and Receptor Polarization in NK-Target Cell Interactions¹

Marta Nieto,* Francisco Navarro,* Juan José Pérez-Villar,* Miguel Angel del Pozo,* Roberto González-Amaro,* Mario Mellado,[†] José M. R. Frade,[†] Carlos Martínez-A,[†] Miguel López-Botet,* and Francisco Sánchez-Madrid^{2*}

We report that the ability of NK cells to produce chemokines is increased in NK-target cell conjugates. The chemokines produced play a critical role in the polarization and recruitment of NK cells as well as in the NK effector-target cell conjugate formation. Chemokines induce the formation of two specialized regions in the NK cell: the advancing front or leading edge, where chemokine receptors CCR2 and CCR5 cluster, which might guide the cells toward the chemotactic source, and the uropod, where adhesion molecules ICAM-1 and -3 are redistributed. NK cell polarity was intrinsically involved in conjugate formation. The redistribution of both adhesion receptors and CCR was preserved during the formation of NK-target cell conjugates. Time-lapse videomicroscopy studies of the formation of effector-target conjugates showed that morphologic poles are also functionally distinct; while the binding to target cells was preferentially mediated through the leading edge, the uropod was found at the rear of migrating NK cells and recruited additional NK cells to the vicinity of K562 target cells. Inhibition of cell polarization and adhesion receptor redistribution blocked the formation of NK-K562 cell conjugates and the cytotoxic activity of NK cells. We discuss the implication of NK-cell polarization in the development of cytotoxic responses. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 3330–3339.

NK cells belong to a distinct lineage of lymphocytes capable of killing a variety of target cells, including tumor cells, cells infected by viruses or bacteria, and some normal cells (1). NK cells resemble CTL in certain respects, including the cytokine production profile and the use of a perforin-dependent lytic mechanism, but they do not rearrange TCR or *ig* genes. The migration and recruitment of NK cells from blood vessels to target tissues are the first steps in the cascade of events in the NK cytotoxic response. The diverse factors involved in this complex process have recently been explored. NK cells exhibit rapid migration *in vitro* (2) and express a repertoire of adhesion molecules from β_1 and β_2 integrin families, enabling them to interact with endothelial cell counter-receptors (3, 4) and extracellular matrix proteins (5).

It has been widely proposed that chemokines are the major soluble mediators of leukocyte recruitment in inflammation and immunity (6–8). These molecules are differentially secreted by platelets and a broad spectrum of nucleated cells, including endothelial cells, T lymphocytes, and monocytes (7, 9, 10). Although little is known about the effects of chemokines on human NK cells, it has been shown that these cytokines induce chemotaxis and chemoki-

nesis of NK cells *in vitro*. In addition, it has been reported that chemokines stimulate Ca^{2+} mobilization and cytolytic granule release, promote cytotoxic activity, and regulate the adhesiveness of NK cells (11–14). NK cells, in turn, synthesize chemotactic factors, including IL-8, MIP-1 α ,³ and lymphotactin (15–17), which may induce the migration of additional effector cells into the target tissue. Chemokines specifically interact with receptors that possess seven transmembrane domains and are coupled to a G protein signaling pathway. Several of these receptors have been cloned and classified into two groups, CCR and CXCR (6, 18), but their patterns of expression on NK cells have not been fully elucidated.

Leukocyte migration requires cell polarization, a phenomenon that is involved in many other processes, such as cell differentiation, vectorial transport of molecules across cell layers, induction of immune response, cognate interactions between APC and T cells, and target cell recognition and killing (19–24). Cell polarization is required for the release of NK cytolytic granules as well as for the formation of conjugates between killer cells and their target cells (25). We recently reported that chemokines and other chemotactic cytokines induce in T cells the polarization of chemokine receptors (CCR) to the cell leading edge, probably directing the cells along the chemokine gradient (26). In addition, chemokines induce the formation of a cell projection at the rear of the cell, termed the uropod, accompanied by redistribution of specific adhesion molecules such as ICAM-1, ICAM-3, CD43, and CD44 to this structure (27–29).

We have studied the polarization of NK cells induced by chemokines or during NK-target cell interaction as well as the possible role of the cellular uropod in the migration and recruitment of NK cells. We have found that the leading edge of NK cells concentrates chemokine receptors and is implicated in target interactions, while the uropod mediates homotypic NK cell interaction, which might be important for the recruitment of these cells into

*Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, and [†]Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain. Received for publication February 23, 1998. Accepted for publication June 1, 1998. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant SAF 96/0039 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Grant 0744/96 from the Comunidad Autónoma de Madrid, a grant from Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (to F.S.-M.), and fellowships from the Fondo de Investigaciones Sanitarias BAE 97/5089 (to M.A.P.) and the Ministerio de Educación y Ciencia (to M.N.). The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Pharmacia and Upjohn.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Diego de León 62, E-28006, Madrid, Spain. E-mail address: fsmadrid@princesa.hop.es.

³ Abbreviations used in this paper: MIP-1, macrophage inflammatory protein-1; rh, recombinant human; MCP, monocyte chemoattractant protein; FN, fibronectin.

The chemokine SDF-1 α triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes

Miguel Vicente-Manzanares¹, María C. Montoya¹, Mario Mellado², José M. R. Frade², Miguel A. del Pozo¹, Marta Nieto¹, Manuel O. de Landazuri¹, Carlos Martínez-A.² and Francisco Sánchez-Madrid¹

¹ Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

² Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

We studied the expression and possible functional role of chemokine receptors CXCR3, CXCR4 and CCR5 in normal human B lymphocytes. B cells from both peripheral blood and tonsils expressed high levels of CXCR4 but not the other chemokine receptors tested. CXCR4 ligand, stromal cell-derived factor (SDF)-1 α , elicited a potent chemotactic response and induced a polarized motile phenotype in B cells, resulting in redistribution of the adhesion molecule ICAM-3 to a posterior appendage of the cell, termed uropod, and of CXCR4 receptor to the leading edge of migrating B cells. Time-lapse videomicroscopy studies revealed that SDF-1 α -treated cells recruited additional bystander B cells through the uropod. SDF-1 α induced levels of cellular recruitment comparable to those elicited by polarization-inducing anti-ICAM-3 monoclonal antibody, in an LFA-1/ICAM-1, -3-dependent fashion. Moreover, this chemokine increased intracellular Ca²⁺ levels in B lymphocytes, and induced a rapid CXCR4 receptor down-regulation on the cell surface membrane. These results provide new insight into the important biological role of SDF-1 α in physiological processes in which B cells participate, and suggest a key role for chemokines in normal B cell trafficking and recirculation.

Key words: Stromal cell-derived factor- α / CXCR4 / B lymphocyte / Polarization / Uropod

| | |
|----------|---------|
| Received | 16/3/98 |
| Revised | 14/4/98 |
| Accepted | 20/4/98 |

1 Introduction

B lymphocytes are generated in the bone marrow and, through a process that involves rearrangement and expression of Ig genes, produce an antigen-specific receptor. After a process of selection to eliminate reactivity to self antigens, mature B cells emerge into the peripheral lymphocyte pool, which recirculates through secondary lymphoid organs where antigen is encountered [1]. Although their maturation and development processes are well characterized, less is known of the

[1 18119]

Abbreviations: SDF-1 α : Stromal cell-derived factor-1 α
MIP: Macrophage inflammatory protein **MCP-1:** Monocyte chemotactic protein-1 **RANTES:** Regulated on adhesion, normal T cell expressed and secreted **LFA-1:** Lymphocyte function-associated antigen-1 **ICAM:** Intercellular adhesion molecule **CKR:** Chemokine receptor

chemotactic signals that drive B cells to the sites of antigen exposure. It has recently been shown that Ig cross-linking by antibodies against B cell surface Ig can be chemotactic, although accessory signals, such as those induced by IL-4 and generated through CD40 are required [2]. On the other hand, while B cell chemotaxis directed by the CXC chemokine IL-8 has been reported, expression of the corresponding receptors remains controversial [3, 4].

The chemokines, a large family of low molecular mass (8–10 kDa) cytokines, have chemotactic and pro-activatory effects on different leukocyte lineages both *in vitro* and *in vivo* [5, 6]. Chemokines have been classified in two main categories, the CXC and CC chemokines, according to the position of their first two conserved cysteine residues. The CXC chemokines, including IL-8, MGSA/gro, IP-10, Mig and stromal cell-derived factor (SDF)-1 α , have been classically described as neutrophil

Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Stromal Cell-Derived Factor-1 α -Induced Lymphocyte Polarization and Chemotaxis¹

Miguel Vicente-Manzanares,* Mercedes Rey,* David R. Jones,[†] David Sancho,* Mario Mellado,[†] José Miguel Rodríguez-Frade,[†] Miguel Ángel del Pozo,^{2*} María Yáñez-Mó,* Ana Martín de Ana,[†] Carlos Martínez-A.,[†] Isabel Mérida,[†] and Francisco Sánchez-Madrid^{3*}

The role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), an important enzyme involved in signal transduction events, has been studied in the polarization and chemotaxis of lymphocytes induced by the chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α). This chemokine was able to directly activate p85/p110 PI3-kinase in whole human PBL and to induce the association of PI3-kinase to the SDF-1 α receptor, CXCR4, in a pertussis toxin-sensitive manner. Two unrelated chemical inhibitors of PI3-kinase, wortmannin and Ly294002, prevented ICAM-3 and ERM protein moesin polarization as well as the chemotaxis of PBL in response to SDF-1 α . However, they did not interfere with the reorganization of either tubulin or the actin cytoskeleton. Moreover, the transient expression of a dominant negative form of the PI3-kinase 85-kDa regulatory subunit in the constitutively polarized Peer T cell line inhibited ICAM-3 polarization and markedly reduced SDF-1 α -induced chemotaxis. Conversely, overexpression of a constitutively activated mutant of the PI3-kinase 110-kDa catalytic subunit in the round-shaped PM-1 T cell line induced ICAM-3 polarization. These results underline the role of PI3-kinase in the regulation of lymphocyte polarization and motility and indicate that PI3-kinase plays a selective role in the regulation of adhesion and ERM proteins redistribution in the plasma membrane of lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 4001–4012.

Chemokines are a growing superfamily of 8- to 10-kDa molecules that selectively attract different subsets of leukocytes (1–3). Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)[†] is a member of the CXC chemokine subfamily that attracts T as well as B lymphocytes (4–6). Its role in T cell-HIV-1 infection has been well characterized (7). Studies performed in CXCR4- and SDF-1 α -deficient mice confer special significance to the role of SDF-1 α in lymphopoiesis as well as in cardiac and neural tissue development (8–11).

Leukocyte chemotaxis is a crucial phenomenon both in the immune and inflammatory response (12). During chemotaxis, chemoattractant molecules, such as chemokines, induce lymphocyte polarization with generation of specialized cell compartments (13). Chemoattractant receptors concentrate at the cell leading edge, whereas the adhesion molecules ICAM-1, ICAM-3, and CD44 redistribute to the uropod, which is involved in the recruitment of bystander leukocytes (6, 14–16). Several cytoskeletal elements including the ERM protein moesin and the microtubule organizing center (MTOC) also concentrate at the uropod of polarized migrating lymphocytes (17, 18). Moreover, the actin-binding protein moesin interacts with ICAM-3 and its association increases during the polarization process of lymphocytes (17).

Signals regulating lymphocyte polarization and chemotaxis are largely unknown. However, different signaling molecules have been proposed as potential candidates in the regulation of such processes. One of these molecules is the type I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), which consists of an 85-kDa regulatory subunit responsible for protein-protein interactions via Src-homology (SH), SH2, and SH3 domains, and a catalytic 110-kDa subunit (19). PI3-kinase has been implicated in insulin-stimulated glucose uptake (20), membrane ruffling induced by platelet-derived growth factor (PDGF) or IL-2 (21, 22), and activation of additional signaling molecules, such as p70 S6 kinase (23) and Akt/protein kinase B (24). A G-protein-coupled PI3-kinase, the PI3-kinase γ , which is not regulated by p85, has been recently identified (25, 26). In addition, there is evidence implicating seven transmembrane domain G-protein-coupled receptors in the activation of p85/p110 PI3-kinase (27). Furthermore, signaling by chemokines through their seven transmembrane domain receptors has been reported to activate PI3-kinase (28–30). However, controversial data exists regarding the negative effect of PI3-kinase in chemokine-induced chemotaxis by using chemical inhibitors (31).

*Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; and [†]Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

Received for publication April 13, 1999. Accepted for publication July 20, 1999.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants SAF 99/0034-CO1 and 2FD97-0680-CO2-CO2 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, 08.1/0011/1997 from the Comunidad Autónoma de Madrid, the Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer to F.S.M., an EMBO ALTF 501-1997 Fellowship to M.A.P., and Grant PM97-0132 (I.M.) from the Association for International Cancer Research to D.R.J. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Pharmacia and Upjohn.

² Current address: Department of Vascular Biology, The Scripps Research Institute, CVN223/VB4, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, c/Diego de León, 62, E-28006 Madrid, Spain. E-mail address: fsmadrid/princesa@hup.es

[†] Abbreviations used in this paper: SDF-1 α , stromal cell-derived factor-1 α ; GFP, green fluorescent protein; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; pAb, polyclonal Ab; MTOC, microtubule organizing center; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; SH, Src homology; PDGF, platelet-derived growth factor; WMN, wortmannin; MEK, mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase-1; MIP, macrophage inflammatory protein; p85wt, wild-type p85; Δ p85, dominant negative p85.