

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO

Papel das interações mediadas pelo receptor EphB2 sobre a migração de precursores de células T

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

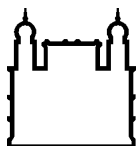
Orientador (es): Prof. Dr. Wilson Savino
Prof.^a Dr.^a Suse Dayse Silva Barbosa

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO

**PAPEL DAS INTERAÇÕES MEDIADAS PELO RECEPTOR EPHB2 SOBRE A
MIGRAÇÃO DE PRECURSORES DE CÉLULAS T**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Wilson Savino
Prof.^a Dr.^a Suse Dayse Silva Barbosa

Aprovada em: 08/06/2009

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida - Presidente
Prof.^a Dr.^a Adriana Cesar Bonomo
Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima
Prof. Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto

Rio de Janeiro, 08 de junho de 2009

Dedico esta tese à minha família

AGRADECIMENTOS

Em poucas palavras, nos próximos parágrafos me dedico a descrever os meus sentimentos de gratidão a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho. Tenho consciência que devo a cada um de vocês, em maior ou menor medida, a conclusão de mais esta etapa de minha vida profissional. Mas, sobretudo, sou grato pelo companheirismo, amizade ou amor a mim dedicado durante todo este tempo e que certamente jamais será extinto pelo distanciamento. Temo não recordar de todos, mas saibam, caso o faça, que será apenas devido ao momento conturbado característico de final de tese e não por desdém. Os agradecimentos que aqui descrevo sem preocupação de ordem ou importância são incondicionais, independem da prévia aprovação desta tese ou qualquer outro motivo.

Agradeço a Deus pela minha vida, por estar sempre ao meu lado protegendo, abençoando e guiando meus passos.

Aos meus pais por serem meu alicerce. Agradeço a vocês por sempre terem apoiado meus sonhos (mesmo quando não concordavam muito com eles). Obrigado por estarem sempre perto, mesmo tão longe!

Ao Júnior pelo exemplo sempre presente em minha vida, e à Josiane por seu carinho e apoio em todos os momentos. Mas acima de tudo obrigado por serem os irmãos maravilhosos que sempre foram.

Ao grande amor da minha vida agradeço por dividir comigo todos os momentos de sofrimento e alegria, pelos quais passamos juntos durante esses quatro anos de tese. Muito obrigado por confiar em mim e compartilhar comigo todos os meus sonhos.

À Betty e à Bonnie, por seu amor incondicional.

A toda minha família pelo amor, incentivo e torcida. Em especial à Tia Zilma e à Vó Ana pelas orações incessantes.

A minha querida sogra D. Marlene por me ter encorajado a alçar vôos mais altos, e por ter cuidado das “netinhas” Betty e Bonnie enquanto estávamos em Madrid. Aliás, agradeço também ao Sérgio, Marina, Mariana e André por dividirem a árdua tarefa de agüentar os dois “foguetinhos”.

À Mariana por sempre resolver meus problemas com reserva de hotéis, passagens...

Ao meu orientador Savino, por me ter aceitado em seu laboratório e por ter proporcionado tantos crescimentos pessoais e profissionais. Por ter dividido comigo seu conhecimento (e conselhos) e por haver possibilitado a realização desta tese. Muito obrigado por tudo!

À minha orientadora Suse, pelo carinho e incentivo na realização desta tese. Também pelos momentos de bancada durante a trabalhosa tarefa de realização dos experimentos de migração celular.

Aos amigos Luiz, Leandra, Klayza e Eugênia, como também aos cônjuges, Débora, Rômulo, Adriano e Marlio, respectivamente. Obrigado pela ajuda, compreensão e cumplicidade. Pelos momentos inesquecíveis e pelas viagens a Guapi (nosso refúgio!!). Parafraseando Shakespeare, depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

Aos amigos Wallace, Fausto, Cecília, Barbara, Tininha, Patrícia, Carla, Juliana, Désio, Dani, Ingo, Déa, Tiago, Ellen, Flavia, Eduardo, Fernanda,..., e a todos os colegas do LPT, por dividirem essa jornada comigo, pelos momentos de descontração e de trabalho, pela ajuda e carinho. Mas principalmente por atenuarem a saudade de casa!

A mi jefe español Agustin Zapata por hacer posible la realización de este trabajo. Por creerme listo para trabajar con su grupo y por siempre dejarme las puertas abiertas. Vivir fuera de Brasil ha sido siempre un sueño y usted lo ha tornado posible recibíendome en su laboratorio, muchas gracias!

A mi tutora y amiga Eva Jimenez por la dedicación, cariño y amistad. Eres una de las grandes responsables por la realización de este trabajo. Gracias por creerme un buen investigador. Tengo seguro que eres un angel que Dios ha puesto en mi vida para ayudarme en esta caminada.

A los Doctores Alfaro, G^a Ceca y eternos amigos David, Javi, Eva, Bea, Tere, Susana, Vanesa, Raul, Mario, Conchi, Pepe, Sarah, Merche, Manolo. Muchas gracias por hacer inolvidable la experiencia de vivir tan lejos de casa. Por recibirme en vuestro país y hacerme sentir uno de sus compatriotas. Espero un día poder retribuir todo lo que han hecho por mi!

A Luiz, Alfonso, Amalia, Juanjo, Carmen, Jaris, Victor, Javier Arias, Rosa, Alberto, Nines y demás amigos españoles, gracias por los consejos y por su ayuda.

A mi profesor de español y amigo Victor y su familia por enseñarme a hablar el castellano y por la amistad siempre presente.

Aos colegas da BCM, em especial à Daniele, Fabíola e Milton pela ajuda e atenção durante esse período.

Aos meus eternos amigos Ricardo, Giordano, Eloisa, Cláudia, Lúcio, Sabrina, Tiago e Bruno, mesmo de longe sempre pude contar com vocês. Obrigado pelo apoio.

Respeitosamente agradeço às vidas dos animais de experimentação, as quais foram ceifadas na intenção de contribuir com a manutenção de milhares de vidas humanas.

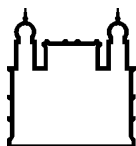
Obrigado a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Gracias a todos los que de alguna forma contribuieran para la realización de este trabajo.

Apoio e Suporte Financiero

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil – e no Departamento de Biologia Celular da Universidade Complutense de Madrid – Madrid, Espanha – com o apoio financeiro das seguintes entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo 142019/2005-4.
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Programa PDEE, processo 0465-06-2.
 - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).
 - Ministério da Educação e Cultura (MEC) – Governo da Espanha – *grants* BFU2004-03132 e BFU2006-65520.
-



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Papel das interações mediadas pelo receptor EphB2 sobre a migração de precursores de células T

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

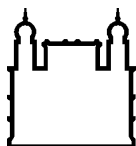
Marco Augusto Stimamiglio

A colonização do timo por precursores hematopoéticos representa um evento crucial para o desenvolvimento deste próprio órgão, assim como garante a diferenciação e a formação do repertório de células T maduras. Entretanto, os mecanismos moleculares que dirigem este processo não são totalmente conhecidos. A entrada destes precursores depende da ativação de uma cascata de sinalizações intermoleculares, onde participam algumas moléculas, como as integrinas e as quimiocinas.

Os receptores Eph, que compõem a maior família de receptores tirosina-quinase, representam importantes moléculas reguladoras do desenvolvimento de sistemas e órgãos, sendo encontrados também no tecido linfóide. Mais recentemente, essa família de receptores, juntamente com seus ligantes, efrinas, foi descrita como moléculas co-estimulatórias de sinais transmitidos em linfócitos T pelo receptor de antígeno, por quimiocinas e integrinas. Neste contexto, o objetivo central deste trabalho foi o de avaliar as possíveis funções dos receptores Eph, em particular EphB2, em modular a atividade migratória de precursores T durante os processos de colonização do timo e maturação intratímica de linfócitos.

Nossos resultados demonstram a expressão dos receptores EphB2 no timo de camundongos e a sua participação tanto nos processos iniciais da organogênese do timo, quanto na diferenciação intratímica de timócitos. Este receptor, assim como seus principais ligantes, também é expresso em células precursoras derivadas da medula óssea de camundongos e é capaz de modular a migração e a capacidade de entrada destes precursores em lóbulos tímicos alinfóides. Além disso, vimos que a falta deste receptor, ou de seu domínio catalítico tirosina-quinase, promove uma redução na deposição de proteínas da matriz extracelular e de quimiocinas no timo, assim como resulta em importante inibição da entrada dos precursores hematopoiéticos neste órgão. De igual maneira, o desequilíbrio dos sinais transmitidos pelo complexo EphB2/efrina-B impede o correto posicionamento intratímico destes precursores, possivelmente levando a um bloqueio na maturação dos timócitos. Finalmente, demonstramos que a ausência do receptor ou dos sinais EphB2 não modifica os níveis de expressão de outros receptores como integrinas e receptores de quimiocina nos precursores hematopoiéticos e timócitos, mas possivelmente modula sua atividade e, desta forma, a atividade migratória destas células frente a estímulos haptó e quimiotáticos.

Em conjunto, nossos resultados apontam uma importante participação dos sinais desencadeados pelo complexo Eph/efrina e sua co-regulação com outros receptores que modulam o processo de migração dos precursores de células T, desde sua entrada no timo, até o seu correto desenvolvimento e migração dentro deste órgão.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Role of EphB2 receptor-mediated interactions in migration of T-cell precursors

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Marco Augusto Stimamiglio

Thymus settling by hematopoietic progenitors represents a crucial event during thymus ontogeny and guarantees the proper differentiation of the T-cell repertoire. However, the molecular mechanisms that drive such process are not completely understood. Progenitor settling depends on the activation of intercellular signaling cascades, where some integrins and chemokines play a role. Eph receptors, the major tyrosine-kinase receptor family, are important regulatory molecules for the development of several systems and organs, being also expressed in lymphoid tissues. More recently, this receptor family, conjointly with the corresponding ligands, the ephrins, has been reported as costimulatory molecules for the T-cell receptor, chemokine receptors and integrins on T lymphocytes. In this context, the aim of this work was to evaluate the possible functions of Eph receptors, in particular EphB2, as modulators of T-cell progenitor migration during thymus settling and intrathymic T-cell maturation.

Our results demonstrate that EphB2 receptors are expressed in the mouse thymus and participate in its organogenesis and intrathymic T-cell development. This receptor and its main ligands are also expressed in mouse bone marrow-derived progenitor cells, being able to modulate migration and the ability of these cells to settling thymic lobes. Moreover, the lack of such receptor, or its tyrosine-kinase domain, results in a reduced deposition of extracellular matrix proteins and chemokines in the thymus, and leads to an important inhibition of thymus settling by hematopoietic progenitors. Furthermore, an imbalance of the signals transmitted by EphB2/ephrin-B complex prevents proper intrathymic positioning of progenitor cells, possibly causing a blockade in thymocyte maturation. Finally, we demonstrated that the lack of EphB2 receptor or signaling does not change the expression level of integrins and chemokine receptors on hematopoietic progenitors and thymocytes, but possibly modulates the activity of these receptors and the cell migration activity through hapto and chemotactic stimuli.

Taken together, our results point to an important participation of Eph/ephrin complex signaling and its cross-regulation with other receptors that modulates T-cell migration process, from thymus settling until the proper thymocyte development within the organ.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
<i>CAPÍTULO 1</i>	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 A família dos receptores Eph e seus ligantes efrinas	4
1.1.1 Bases estruturais da sinalização Eph-efrina	5
1.1.2 Vias de sinalização e atividades funcionais de Ephs e efrinas	9
1.1.3 O papel de Ephs e efrinas na organogênese e em processos patológicos	14
1.2 Ephs e efrinas no sistema imune	17
1.3 O Timo	20
1.3.1 Componentes estromais do microambiente tímico	22
1.3.2 Organogênese e compartimentalização do timo	24
1.3.3 Entrada dos precursores de células T no timo	26
1.3.4 Diferenciação intratímica de linfócitos T e os eventos de seleção	29
1.3.5 Diferenciação e migração intratímica de linfócitos T	33
1.4 Sinais que modulam o desenvolvimento de células T: uma nova perspectiva	40
2. OBJETIVOS	42
<i>CAPÍTULO 2</i>	44
3. ARTIGO 1: Organising the thymus gland. The role of Eph and ephrins	45
<i>CAPÍTULO 3</i>	52
4. ARTIGO 2: EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T-cell precursors	53
<i>CAPÍTULO 4</i>	93
5. DISCUSSÃO	94
5.1 O papel de Eph e efrinas na organogênese do timo	95
5.2 Interações mediadas por EphB2 regulam a migração de progenitores T durante a colonização do timo	98
6. CONCLUSÕES	107
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
<i>ANEXOS</i>	126
8. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutorado I	127
9. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutorado II	129
10. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutorado III	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura molecular e interações entre Ephs e efrinas. _____	7
Figura 1.2	Sinalização cruzada entre Eph-efrinas e outros receptores. _____	14
Figura 1.3	Desenvolvimento do epitélio tímico com base na expressão das citoqueratinas K5 e K8. _____	25
Figura 1.4	Vias de diferenciação que conectam a medula óssea e o timo. _____	31
Figura 1.5	Desenvolvimento intratímico dos linfócitos T. _____	34
Figura 1.6	Sinais derivados do microambiente tímico durante o desenvolvimento dos timócitos. _____	39
Figura 5.1	Diferentes sinais Eph-efrina estabelecidos entre células do microambiente tímico de camundongos SCID (WT) e os precursores hematopoiéticos WT, EphB2 ^{-/-} e EphB2 ^{LacZ} . _____	97
Figura 5.2	Diferentes sinais Eph-efrina estabelecidos entre precursores hematopoiéticos WT e células microambientais dos lóbulos tímicos provenientes de camundongos WT, EphB2 ^{-/-} e EphB2 ^{LacZ} . _____	102
Figura 5.3	Sistema de migração onde diferentes sinais EphB e de integrinas ou receptores de quimiocina são desencadeados em células WT e EphB2 ^{LacZ} . _____	104
Figura 5.4	Participação dos receptores EphB2 no modelo de migração multivetorial durante a colonização do timo. _____	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Nomenclatura para as famílias Eph e efrina _____	5
Tabela 1.2. Expressão de Ephs e efrinas no sistema imune _____	19
Tabela 1.3. Moléculas que regulam a entrada de precursores no timo _____	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AGM	Aorta-gônada-mesonefro
CCL21	Ligante 21 de quimiocinas com motivos C-C
CCL25	Ligante 25 de quimiocinas com motivos C-C
CCR7	Receptor 7 de quimiocinas com motivos C-C
CCR9	Receptor 9 de quimiocinas com motivos C-C
CFSE	Marcador celular fluorescente verde
CLP	Precursor linfóide comum
cTECs	Células epiteliais tímicas corticais
CXCL12	Ligante 12 de quimiocinas com motivos C-X-C (SDF-1; fator 1 derivado de células estromais)
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas com motivos C-X-C
DCs	Células dendríticas
DN	Células T duplo negativas (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Células T duplo positivas (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
ECM	Matriz extracelular
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
Eph	Receptor tirosina-quinase Eph, da língua inglesa, <i>Erythropoietin-producing hepatocyte kinase</i>
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
FAK	Proteína quinase de adesão focal
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FN	Fibronectina
FTOC	Cultivo organotípico de timo fetal
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN γ	Interferon gamma
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
K5	Citoqueratina 5

K8	Citoqueratina 8
Lin ⁻	Negativo para marcadores de linhagens celulares hematopoiéticas diferenciadas
LN	Laminina
LSK	Precursor Lin ⁻ SCA-1 ⁺ c-KIT ⁺
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mTECs	Células epiteliais tímicas medulares
MTS10	da língua inglesa, <i>Mouse Thymic Stroma 10</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI ₃ K	Enzima fosfoinositídeo 3-quinase
PKH26	Marcador celular fluorescente vermelho
RTKs	Receptores do tipo tirosina-quinase
SCID	Imunodeficiência combinada severa
SP	Células T simples positivas (CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺)
TCR	Receptor de células T
TEC	Célula epitelial tímica
TGF	Fator transformador de crescimento
TNC	Complexo tímico <i>nurse</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VAB-1	Receptor tirosina-quinase Eph, da língua inglesa, <i>Variable ABnormal Morphology</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1 (da língua inglesa, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VLA4	Integrina $\alpha 4\beta 1$ (da língua inglesa, <i>Very Late Antigen-4</i>)
VLA5	Integrina $\alpha 5\beta 1$ (da língua inglesa, <i>Very Late Antigen-5</i>)
VLA6	Integrina $\alpha 6\beta 1$ (da língua inglesa, <i>Very Late Antigen-6</i>)
WT	Genótipo semvagem (da língua inglesa, <i>Wild Type</i>)

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares é marcante a característica que suas células possuem de comunicar-se entre si e com seu microambiente, coordenando suas atividades fisiológicas. Esta comunicação é mediada através da interação entre receptores e seus respectivos ligantes. Várias classes de receptores são conhecidas nos sistemas biológicos, cada uma com seu mecanismo característico de transdução dos sinais extracelulares em sinais intracelulares. Uma das maiores classes de receptores conhecidas compreende os receptores do tipo tirosina-quinase (RTKs). Estes receptores possuem domínios quinase intracelulares que são ativados através da interação ligante-receptor. Esta ativação leva a modificações nos resíduos de tirosina presentes na molécula do receptor que, posteriormente, se ligam e ativam uma série de moléculas sinalizadoras, desencadeando assim uma cascata de sinalização no interior da célula. Estas modificações nos resíduos de tirosina ocorrem pela fosforilação destes aminoácidos. De fato, os sistemas biológicos usam extensivamente grupos fosfato para a manutenção de funções vitais, como o armazenamento e transmissão da informação genética, a geração e transferência de energia, e a sinalização. A modificação nos resíduos de tirosina pelos grupos fosfato nas proteínas tirosina-quinase consiste em um dos maiores mecanismos de transdução de sinais nas células (Hubbard & Miller, 2007).

Muitos dos RTKs são importantes receptores de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, da língua inglesa, *Platelet-derived growth factor*), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF, da língua inglesa, *Fibroblast growth factor*), o fator de crescimentos epidermal (EGF, da língua inglesa, *Epidermal growth factor*), dentre outros. Eles são classificados em diferentes subfamílias com base em suas similaridades estruturais. Em 1987, portanto antes do início do projeto genoma humano, quando a clonagem homóloga representava o grande avanço científico daquele momento, o primeiro membro da subfamília de receptores **Eph** foi caracterizado por Hirai e colaboradores, quando tentavam identificar novos RTKs relacionados a câncer (Hirai et al., 1987). O receptor encontrado foi denominando Eph (da língua inglesa, *Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*) devido à linhagem celular tumoral da qual foi clonado e, atualmente, corresponde à molécula EphA1. Até o presente, a subfamília Eph, nos vertebrados, contém 16 membros e constitui o maior grupo de receptores com atividade tirosina-quinase.

Desde sua descoberta, os receptores Eph vem sendo relacionados a um número crescente de processos fisiológicos e patológicos em muitos tipos celulares e diferentes órgãos. Os receptores Eph apresentam diversas atividades, incluindo múltiplos efeitos sobre a citoarquitetura, a adesão celular, as junções intercelulares e a migração celular (Pasquale, 2008). Além disso, efeitos sobre a proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e secreção vêm também sendo descritos. Essas atividades dependem da interação dos receptores Eph aos seus ligantes efrinas (da língua inglesa, *Ephrin – Eph receptor interacting proteins*). No genoma humano, existem 9 receptores da classe EphA (EphA1 – EphA5) que se ligam a 5 ligantes efrina-A (efrina-A1 – efrina-A5), que são proteínas ligadas à superfície celular através de um âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ainda existem outros 5 receptores da classe EphB (EphB1 – EphB5) que interagem a 3 ligantes transmembranares efrina-B (efrina-B1 – efrina-B3). Essas interações são promíscuas dentro de cada classe e alguns receptores Eph podem ainda interagir com efrinas da outra classe.

A interação entre receptores e ligantes, que formam os complexos Eph-efrina, gera sinais intracelulares bidirecionais que afetam tanto a célula que expressa o receptor Eph, quanto a célula que expressa a efrina. Esses sinais bidirecionais, induzidos pelo complexo Eph-efrina, ativam cascatas intracelulares de sinalização que podem culminar até mesmo em efeitos opostos nas células sensibilizadas (Pasquale, 2008). Estas atividades dos receptores Ephs e das efrinas vêm sendo extensivamente estudadas no sistema nervoso, onde estas proteínas são amplamente expressas e possuem papéis conhecidos no estabelecimento da conectividade neural através de seus sinais que guiam os axônios a regiões apropriadas e regulam a formação das conexões sinápticas (Pasquale 2005). Muitas destas funções têm sido também estudadas em outros sistemas e, na última década, resultados interessantes foram gerados com relação ao sistema imune, onde muitos receptores Eph e seus ligantes efrinas são expressos e apresentam propriedades regulatórias (Wu & Luo, 2005).

Neste sentido, nosso trabalho procura identificar funções da atividade dos receptores Eph, em particular do receptor EphB2, e sua interação com seus ligantes durante o desenvolvimento dos linfócitos T e sua maturação no timo, órgão linfóide primário que constitui um dos controles centrais do sistema imune. Este trabalho está dividido em capítulos, nos quais contextualizamos inicialmente o papel dos receptores Eph e das efrinas na organogênese do timo e, posteriormente,

apresentamos nossos mais novos avanços para a caracterização da interação entre o microambiente tímico e os precursores T em diferenciação mediada pela ativação do complexo Eph-efrina.

Para melhor entendermos a estrutura e fisiologia dos protagonistas deste estudo, apresentamos nos subitens que se seguem, uma série de informações relacionadas à família dos receptores Eph, assim como, ao sistema imune em geral e ao timo em particular.

1.1 A família dos receptores Eph e seus ligantes efrinas

De todos os RTKs encontrados nos genomas de vertebrados, a subfamília de receptores Eph constitui o maior grupo. Os genes que codificam as Ephs e efrinas estão presentes em todo o reino animal e tem uma origem que possivelmente antecede a dicotomia dos grupos *Parazoa-Eumetazoa* (Drescher, 2002). A conservação da estrutura e da função de Ephs e efrinas durante a evolução contrasta com o elevado número de membros desta família encontrados nos vertebrados, onde são conhecidas 16 Ephs (Eph A1-A10 e Eph B1-B6) e 9 efrinas (efrina A1-A6 e efrina B1-B3) (Pasquale, 2005). Neste contexto, é interessante considerar que a família Eph foi inicialmente descrita com um único membro, descrito em *Caenorhabditis elegans* como o receptor VAB-1 (da língua inglesa, *Variable ABnormal Morphology*) (George et al., 1998), o qual interage não apenas com uma, mas com quatro efrinas (Wang et al., 1999).

O que poderia ter levado a esta considerável expansão evolutiva na família dos receptores Eph? Especula-se que a expansão dos receptores Eph, permitindo a formação da maior família de RTKs nos vertebrados, reflete seu importante papel como sistema de controle de migração e posicionamento celular, essencial para a evolução do complexo plano corporal dos vertebrados (Lackmann & Boyd, 2008). A duplicação gênica destes receptores deve ter permitido a indução de diferenças funcionais sutis entre as distintas classes de receptores Eph e o estabelecimento de um código combinado de padrões de expressão que permite regular a complexa citoarquitetura tecidual (Murai & Pasquale, 2003).

Atualmente, todos os receptores e ligantes das famílias Eph e efrina conhecidos estão classificados, de acordo com a homologia de seus domínios extracelulares e as suas afinidades de ligação, nos subgrupos A e B e tiveram sua nomenclatura

unificada conforme representado na tabela 1.1 (*Eph Nomenclature Committee*, 1997).

Tabela 1.1 Nomenclatura para as famílias Eph e ephrina*.

Receptores		Ligantes	
<i>Novo nome</i>	<i>Nomes anteriores</i>	<i>Novo nome</i>	<i>Nomes anteriores</i>
EphA1	Eph, Esk	ephrin-A1	B61; LERK-1, EFL-1
EphA2	Eck, Myk2, Sek2	ephrin-A2	ELF-1; Cek7-L, LERK-6
EphA3	Cek4, Mek4, Hek, Tyro4; Hek4	ephrin-A3	Ehk1-L, EFL-2, LERK-3
EphA4	Sek, Sek1, Cek8, Hek8, Tyro1	ephrin-A4	LERK-4; EFL-4
EphA5	Ehk1, Bsk, Cek7, Hek7; Rek7	ephrin-A5	AL-1, RAGS; LERK-7, EFL-5
EphA6	Ehk2; Hek12	ephrin-A6	
EphA7	Mdk1, Hek11, Ehk3, Ebk, Cek11		
EphA8	Eek; Hek3		
EphA9			
EphA10			
EphB1	Elk, Cek6, Net; Hek6	ephrin-B1	LERK-2, Elk-L, EFL-3, Cek5-L; STRA1
EphB2	Cek5, Nuk, Erk, Qek5, Tyro5, Sek3; Hek5, Drt	ephrin-B2	Htk-L, ELF-2; LERK-5, NLERK-1
EphB3	Cek10, Hek2, Mdk5, Tyro6, Sek4	ephrin-B3	NLERK-2, Elk-L3, EFL-6, ELF-3; LERK-8
EphB4	Htk, Myk1, Tyro11; Mdk2		
EphB5	Cek9; Hek9		
EphB6	Mep		

*Adaptado de <http://eph-nomenclature.med.harvard.edu>, local destinado à publicação e coordenação de futuras mudanças ou atualizações na nomenclatura publicada em agosto de 1997.

A formação do complexo Eph-efrina através da interação entre estes receptores e ligantes segue, em geral, a afinidade dos domínios de ligação dentro de cada subgrupo, onde as Ephs A interagem preferencialmente com efrinas A e as Ephs B com efrinas B (Pasquale, 2004). Contudo, algumas exceções são conhecidas, como a efrina-A5 que em altas concentrações pode interagir com a EphB2 (Himanen et al., 2004) e as efrinas-B2 e B3 que podem se ligar à EphA4 (Gale et al., 1996). Dentro de cada subgrupo as interações entre Ephs e efrinas são promíscuas, ainda que as afinidades de interação variem consideravelmente (Pasquale, 2004; Lackmann & Boyd, 2008).

1.1.1 Bases estruturais da sinalização Eph-efrina

Estruturalmente, os receptores Eph são proteínas transmembranares do tipo I, caracterizadas por apresentar um único domínio transmembrana e um domínio amino terminal extracelular (Fig. 1.1a). Este domínio extracelular é composto por uma região N-terminal altamente conservada e responsável pelo reconhecimento e

interação ao ligante; uma região rica em cisteínas, que contém um motivo similar ao fator de crescimento epitelial (EGF); e duas regiões fibronectina tipo III repetidas que participam da dimerização do receptor e de interações com outras proteínas (Pasquale, 2005). Os receptores Eph apresentam ainda uma região transmembranar seguida de uma porção justamembranar que contém dois resíduos de tirosina conectados a um domínio tirosina-quinase bastante conservado, um motivo α -estéril (SAM, da língua inglesa, *Sterile Alpha Motif*) e um motivo de união PDZ próximo ao extremo carboxi-terminal, que participa em interações proteína-proteína (Kullander & Klein, 2002). Existem, entretanto, dois receptores Eph (EphA10 e EphB6) cujo domínio tirosina-quinase é desprovido de alguns resíduos essenciais para a deflagração da atividade catalítica. Ainda que inicialmente se tenha pensado que estes receptores não podiam transmitir sinais intracelulares, atualmente sabemos que, ao menos no caso da EphB6, o domínio intracitoplasmático pode ser fosforilado após associar-se com o a EphB1 (Freywald et al., 2002; Boudeau et al., 2006).

Por outro lado, as efrinas são caracterizadas estruturalmente pela presença de um único domínio amino-terminal de interação ao receptor, o qual se encontra separado da membrana celular por uma curta seqüência de aminoácidos (Fig. 1.1a). As efrinas A se unem à membrana plasmática através de uma âncora de GPI, enquanto que as efrinas B possuem uma região transmembranar e um curto, mas altamente conservado, domínio citoplasmático que apresenta resíduos de tirosina e um motivo de união PDZ na extremidade carboxi-terminal (Kullander & Klein, 2002). A fosforilação de vários resíduos de tirosina na porção intracelular das efrinas B, após ligação com seu receptor, possibilita a interação com proteínas adaptadoras SH2/SH3 que apresentam um importante papel na sinalização desencadeada por esta molécula (Cowan & Henkemeyer, 2001).

A interação receptor-ligante entre Ephs e efrinas requer o contato célula-célula, uma vez que ambas as moléculas estão ancoradas à membrana celular. Uma vez que ocorra esta interação, são formados heterodímeros de alta afinidade (Fig. 1.1b), que posteriormente se agrupam em tetrâmeros de sinalização (Fig. 1.1c) compostos por dois receptores Eph e dois ligantes efrina (Himanen et al., 2004; Nikolov et al., 2005). Os domínios extracelulares formados a partir de tais agrupamentos aumentam a especificidade entre os subgrupos. Posteriormente, estes tetrâmeros se agregam e formam estruturas de maior complexidade que se localizam nos denominados microdomínios ricos em glicolipídeos (GEM, da língua inglesa,

Glycolipid-enriched microdomains), ou *lipid rafts*, na membrana celular (Gauthier & Robbins, 2003). A alta densidade destas estruturas, formadas por complexos Eph-efrina, possibilita sua agregação e a ativação de diferentes cascatas intracelulares de sinalização (Bruckner & Klein, 1998; Murai & Pasquale, 2003).

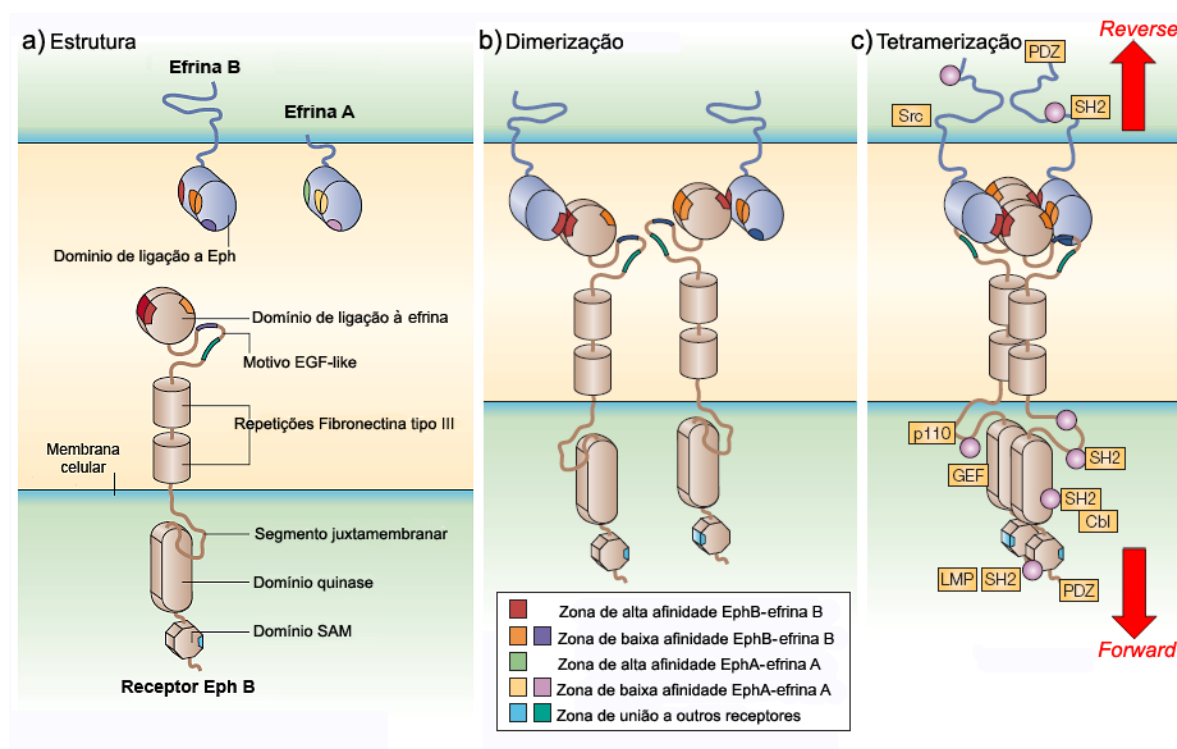


Figura 1.1 - Estrutura molecular e interações entre Ephs e efrinas. a) Representação da estrutura molecular de receptores Eph B e de ligantes efrina dos subgrupos A (ligação à membrana plasmática através de uma âncora de GPI) e B (proteína transmembranar); b) Representação da formação de dímeros durante a interação ligante-receptor entre Ephs e efrinas B. As cores presentes nos domínios extracelulares de ambas as proteínas representam zonas de diferentes afinidades intermoleculares (indicado na legenda); c) Esquema da estruturação tetramérica e da sinalização desencadeada pela formação do complexo Eph-efrina. (Adaptado de Pasquale, 2005)

Uma das características mais interessantes da formação dos complexos Eph-efrina é a capacidade de sinalização bidirecional (Fig. 1.1c). Esta sinalização é deflagrada no citoplasma da célula que expressa os receptores Eph, sinal este denominado didaticamente como *forward*, e no citoplasma da célula que expressa os ligantes efrina, cujo sinal se denomina *reverse* (Pasquale, 2005). Através da formação dos tetrâmeros, os receptores Eph passam a transmitir o sinal *forward* para o interior celular, o que permite a transfosforilação dos domínios citoplasmáticos de outras

Ephs contíguas (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Além disso, outro modo de aumentar este sinal ocorre pela ativação de outras quinases da família SRC (Knoll & Drescher, 2004) e pela interação com moléculas que contém domínios de homologia SRC (Kullander & Klein, 2002). Outras interações entre proteínas ocorrem independente de fosforilação, como é o caso daquelas que possuem domínios PDZ e GTPases da família Rho (Noren & Pasquale, 2004; Lackmann & Boyd, 2008).

Além dos diversos mecanismos de sinalização ativados por Ephs e efrinas, se conhecem também distintas formas de atenuação e término dos sinais deflagrados pelo complexo ligante-receptor. Um dos mecanismos seria através da intervenção de receptores com domínios quinase inativos (EphA10 e EphB6), que dificultariam a expansão da fosforilação aos receptores adjacentes (Freywald et al., 2002; Konstantinova et al., 2007). As interações laterais entre Ephs e efrinas presentes na mesma célula também podem ocorrer, atenuando as interações intercelulares uma vez que foi comprovado que tais interações são incapazes de transmitir sinais (Yin et al., 2004; Egea & Klein, 2007). Outro mecanismo consiste na internalização dos complexos ligante-receptor por endocitose, favorecendo assim a separação destas células (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003; Egea & Klein, 2007). Neste mesmo sentido, podemos citar ainda a digestão proteolítica dos complexos Eph-efrina através da secreção de metaloproteases (Hattori et al., 2000) ou de serina-proteases da família romboide (Pascall & Brown, 2004), pelas células que estão interagindo entre si (Himanen et al., 2007).

Em conjunto, estes mecanismos permitem que a resposta fisiológica, através da interação Eph-efrina, se traduza, por exemplo, em fenômenos de repulsão (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998; Wilkinson, 2001) ou de adesão celular (Holmberg et al., 2000; Dravis et al., 2004), assim como na reversão destes fenômenos, de acordo com a intensidade do sinal deflagrado (Poliakov et al., 2004) ou a duração da respectiva interação molecular (Konstantinova et al., 2007). De fato, a importância do grau de agrupamento entre receptores e ligantes na membrana celular tem sido estudada por vários autores (Stein et al., 1998; Huynh-Do et al., 1999; Hindges et al., 2002; McLaughlin et al., 2003; Hattori et al., 2000; Marston et al., 2003; Hansen et al., 2004). De maneira geral, se entende que uma baixa ativação da sinalização Eph-efrina se traduz no aumento dos fenômenos de adesão, tanto célula-célula como célula-matriz extracelular, enquanto que o aumento nestes níveis de ativação pode induzir as células a se repelirem, muito embora esta regra não seja verdadeira para

todos os casos (Pasquale, 2005; Lackmann & Boyd, 2008). Em todos estes processos, o grau de agrupamento dos complexos Eph-efrina estaria modulando o equilíbrio de sinais que regulam os fenômenos de adesão/repulsão. Diversos trabalhos têm demonstrado que o comportamento de células que interagem através dos complexos Eph-efrina é diferente, dependendo do modo em que se transmitem os sinais *forward* e *reverse* nestas células (revisados por Wilkinson, 2003; Davy & Soriano, 2005; Pasquale, 2005; Lackmann & Boyd, 2008). Desta forma, se após o contato inicial, tanto Ephs quanto efrinas forem capazes de sinalizar (sinal bidirecional), o sinal desencadeado gerará uma resposta celular específica (repulsão, por exemplo). Se, por outro lado, o complexo Eph-efrina transmitir somente sinais através de uma única célula (sinal unidirecional), a resposta desencadeada seria a oposta (adesão, seguindo nosso exemplo). Outros autores sugerem ainda que, não apenas é relevante o sinal Eph *forward* em uma célula e o sinal efrina *reverse* na célula adjacente, mas que a resposta celular depende do equilíbrio global de sinais *forward* e *reverse* que cada uma delas recebe (Dravis et al., 2004).

Naturalmente, todos estes mecanismos celulares de adesão/repulsão, assim como outros processos regulados pela sinalização Eph-efrina, requerem a participação de muitas moléculas adaptadoras e, em última instância, a ativação de diferentes mecanismos de regulação do citoesqueleto, de expressão gênica e de atividade de complexos efetores.

1.1.2 Vias de sinalização e atividades funcionais de Ephs e efrinas

Os receptores Eph e as efrinas são expressos em praticamente todos os tecidos de um embrião, e estão envolvidos em uma grande gama de processos durante o desenvolvimento (Palmer & Klein, 2003). Em muitos destes processos, a função biológica da sinalização Eph-efrina está principalmente relacionada à modulação da adesão celular: retração dos cones de crescimento na migração axonal, organização celular no embrião, migração celular no desenvolvimento, agregação plaquetária, dentre outros (Arvanitis & Davy, 2008). O complexo Eph-efrina tem ainda sido descrito em processos de aprendizado e memória (Gerlai, 2002), na homeostase óssea (Zhao et al., 2006), na secreção de insulina (Konstantinova et al., 2007) e na modulação da resposta imune (Alfaro et al., 2008; Sharfe et al., 2008). Alterações

na sinalização Eph-efrina em humanos podem levar ao surgimento de doenças congênitas e câncer (Pasquale, 2008).

Do ponto de vista molecular, os sinais ativados pelo complexo Eph-efrina que regulam a organização do citoesqueleto, modulando muitos dos processos celulares citados anteriormente (adesão/repulsão; migração; etc.), ocorrem fundamentalmente através de GTPases monoméricas da família Rho: RhoA, Rac e Cdc42 (Noren & Pasquale, 2004; Arvanitis & Davy, 2008), cuja atividade controla a morfologia e o movimento celular, promovendo ou inibindo formações de adesões focais, fibras de estresse, lamelipódios e filopódios (Nobes & Hall, 1995; Cory et al., 2002; Murai & Pasquale, 2003). Por exemplo, a modulação de proteínas RhoA pelo sistema Eph-efrina, particularmente no que diz respeito a efrina-A2, regula a dinâmica de crescimento dos cones neurais no sistema nervoso, provocando retração do seu crescimento (Gallo et al., 2002; Gallo & Letourneau, 2004). Por outro lado, a ativação de Rac1, através da efrina-B1 ou do receptor EphA2, estimula a migração e extensão dos prolongamentos neuronais (Tanaka et al., 2004). De forma similar, fora do sistema nervoso como, como por exemplo, em células endoteliais, a ativação de Rac1, através do receptor EphA2, promove o aparecimento de prolongamentos celulares e a migração destas células (Brantley-Sieders et al., 2004). Já a regulação de Rac1, através da efrina-A1, inibe a formação destes prolongamentos nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Deroanne et al., 2003). Esta especificidade tecidual é também patente ao comprovar-se que Eph-efrinas da família B podem produzir, em algumas ocasiões, modificações celulares diferentes daquelas induzidas pela família A. Por exemplo, no estabelecimento do sistema visual, os receptores EphA medeiam a repulsão e retração dos axônios, enquanto que os receptores EphB proporcionam os sinais para que se interrompa o crescimento dos cones neuronais (Hindges et al., 2002; Mann et al., 2002; Murai & Pasquale, 2003), demonstrando assim que, os diferentes membros da família Eph podem modular diferentes funções ou diferentes aspectos dentro de um mesmo sistema. Uma possível explicação para funções diferenciadas, inclusive em uma mesma célula, seria a existência de distintas moléculas citoplasmáticas que interagem de forma preferencial com uma ou outra família de Ephs e efrinas (Poliakov et al., 2004; Arvanitis & Davy, 2008).

Além de seus efeitos sobre as proteínas da família Rho, os sinais deflagrados pelo complexo Eph-efrina podem regular a atividade da via de sinalização ERK/MAPK

através de interações com proteínas H-Ras. Diferentemente dos demais RTKs que normalmente ativam esta via de sinalização, o complexo Eph-efrina pode também inibir os sinais ERK/MAPK (Poliakov et al., 2004), importantes não apenas como reguladores da transcrição gênica e da proliferação celular, mas também para o controle da adesão celular, da migração celular, etc. (Marshall, 1995; Hughes et al., 1997; Forcet et al., 2002).

Assim, diferentes efeitos promovidos pelos receptores Eph foram descritos durante a ativação da cascata de sinalização MAPK. Efeitos estes que variam em função do tipo celular sobre o qual atuam: diminuição da adesão à matriz extracelular em células tumorais de mama (Pratt & Kinch, 2002), ativação da quimiotaxia em células endoteliais (Vindis et al., 2003), regulação da diferenciação de precursores neurais (Aoki et al., 2004), estimulação da proliferação de células T (Yu et al., 2003a; Freywald et al., 2003), etc. Por outro lado, ao inibir a via Ras/MAPK, a ativação de Ephs A e B pode, por exemplo, promover a retração de dendritos neuronais (Elowe et al., 2001), a supressão da proliferação de células epiteliais (Miao et al., 2003), e a determinação da diferenciação celular (Picco et al., 2007).

Como vemos, as sinalizações Eph-efrina não atuam isoladamente modulando atividades efetoras nas células, mas são parte de um mecanismo complexo de vias regulatórias que agem em conjunto controlando apropriadamente as respostas biológicas. Neste sentido, podemos descrever ainda vias de sinalização cruzada (*cross-talking*) entre Eph-efrinas e outros sistemas de comunicação celular controlados por proteínas de superfície celular (Fig. 1.2). Por exemplo, estudos recentes demonstraram que outros membros da família RTK (EGFR, FGFR) podem interagir direta ou indiretamente com Ephs e efrinas modulando processos de migração e proliferação celular (Yokote et al., 2005; Brantley-Sieders et al., 2008) (Picco et al., 2007; Arvanitis & Davy, 2008). Outros estudos têm demonstrado ligação entre receptores EphB e proteínas de adesão intercelular do tipo E-caderina. Estes estudos indicam que a sinalização via EphB promove o deslocamento de E-caderinas para a superfície celular levando à formação de junções aderentes e impedindo a separação dos complexos EphB/efrina-B (Cortina et al., 2007; Noren & Pasquale, 2007). Tal regulação pode ser recíproca, pois a adesão intercelular dependente de E-caderina pode regular a expressão dos receptores Eph, sua localização na superfície celular e, desta forma, sua ativação (Ireton & Chen, 2005).

O sistema Eph-efrina pode também afetar a comunicação celular com o microambiente extracelular mediada por integrinas (Figura 1.2). Um número crescente de trabalhos vem demonstrando que essa comunicação cruzada Eph-efrina/integrinas não está ligada especificamente a uma classe de Ephs ou efrinas, assim como não parece ser dependente de um sinal específico *forward* ou *reverse* (Arvanitis & Davy, 2008). Dependendo do contexto celular em que atuam, os sinais desencadeados pelo complexo Eph-efrina podem induzir um aumento da adesão celular mediada por integrinas (Huynh-Do et al., 1999; Huynh-Do et al., 2002; Davy & Robbins, 2000; Gu & Park, 2001; Huai & Drescher, 2001; de Saint-Vis et al., 2003; Prevost et al., 2004; Prevost et al., 2005) ou ainda, apresentar um efeito contrário limitando a ativação das integrinas e diminuindo a adesão celular mediada por estes receptores (Zou et al., 1999; Miao et al., 2000; Miao et al., 2005) (Deroanne et al., 2003; Bourgin et al., 2007). A cooperação entre os sinais derivados da ativação Eph-efrina e integrinas pode ser demonstrada até mesmo nas fases iniciais do desenvolvimento em peixes-zebra, onde a redução da sinalização Eph-efrina pode levar a uma desorganização no desenvolvimento dos somitos de animais deficientes em integrinas $\alpha 5\beta 1$ (VLA5) ou seu ligante na matriz extracelular, a molécula de fibronectina (FN) (Koshida et al., 2005). O ponto de convergência entre estas duas vias de sinalização parece ocorrer nas cascatas intracelulares de sinalização através de proteínas quinase (FAK, PI_3K , MAPK) e/ou pequenas GTPases (Rac, Rho, Ras, Rap1).

Outra família de receptores de membrana que apresentam sinalizações cruzadas com Eph-efrinas são os receptores de quimiocinas (Fig. 1.2), uma família de receptores de superfície celular ligados à proteína-G que também participam na regulação da migração celular. Dentre as inúmeras quimiocinas e seus receptores podemos citar o complexo CXCR4/CXCL12, responsável pela regulação de vias de sinalização que não apenas modulam a migração celular, mas também a adesão, secreção e, potencialmente, sobrevivência e proliferação celular (Kucia et al., 2004). Em 2001, Lu e colaboradores (2001) demonstraram que a ativação do sinal *reverse* deflagrado por efrinas-B inibiam a quimiotaxia induzida por CXCL12 em células granulares do cerebelo. O mecanismo molecular para essa inibição foi parcialmente descrito com a identificação da PDZ-RGS3, uma proteína que interage com domínios citoplasmáticos de efrinas-B e é capaz de inativar o sinal via proteína-G (Lu et al., 2001). Resultados similares foram obtidos em linfócitos T, onde foi demonstrado que a ativação de receptores EphA inibiam a quimiotaxia induzida por

CXCL12 alterando a atividade de pequenas GTPases nestas células (Sharfe et al., 2002). Diferentemente dos exemplos citados acima, que demonstram uma relação antagônica entre Eph-efrina e CXCR4/CXCL12, outros estudos demonstram que interações agonistas entre estas vias de sinalização regulam a migração de células endoteliais e a morfogênese de vasos sanguíneos (Salvucci et al., 2006). Desta forma, estes estudos claramente demonstram que as sinalizações Eph-efrina e quimiocinas-receptores de quimiocina agem cooperativamente regulando vários processos biológicos que envolvem quimiotaxia.

Existem ainda outros exemplos de comunicações recíprocas que podem ocorrer entre Eph-efrinas e receptores de membrana. A sinalização cruzada de EphA2 ou efrina-B1 com claudinas, que são componentes de junções celulares oclusivas presentes em células epiteliais, tem sido relacionada à regulação da adesão celular e à permeabilidade intercelular (Arvanitis & Davy, 2008). As junções comunicantes do tipo “gap” também são críticas para a função Eph-efrina durante a divisão celular, a secreção de insulina e a diferenciação osteogênica (Davy et al., 2006; Konstantinova et al., 2007). Canais de cálcio do tipo NMDA (*N*-metil *D*-aspartato) também podem ser regulados através da sinalização cruzada com EphB2, promovendo o influxo de cálcio através da ativação de quinases da família Src, que, por sua vez, promove a degradação proteolítica da EphB2 (Fig. 1.2) (Litterst et al., 2007).

Finalmente, existem ainda trabalhos que demonstram a ocorrência de sinalização cruzada entre Eph-efrinas e outros receptores em tecidos e células específicos. Em relação ao sistema imune, por exemplo, alguns trabalhos que discutiremos posteriormente com mais detalhe, demonstram que a ativação de EphsB em células T produz efeitos diversos sobre a cascata de sinalização do receptor de célula T (TCR), ativando sinergicamente a via MAPK e aumentando a proliferação celular (Wu & Luo, 2005), ou inibindo a ativação de Rac e JNK (Freywald et al., 2003).

Todos estes exemplos indicam que Ephs e efrinas constituem um sistema altamente plástico, com múltiplas interações, e que está relacionado a numerosos processos de desenvolvimento, definindo padrões histológicos, processos dinâmicos de posicionamento celular, interações e sinalizações intercelulares.

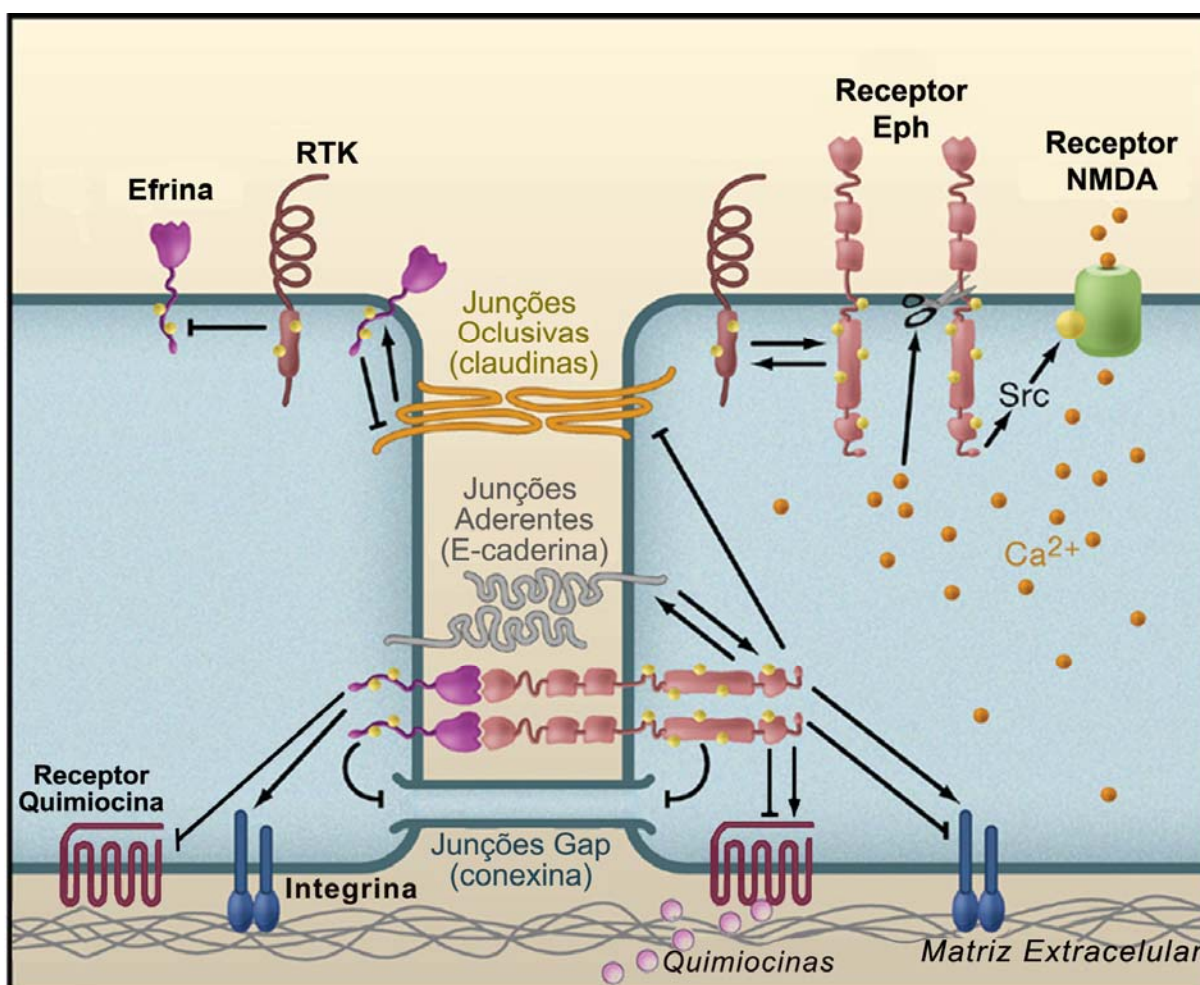


Figura 1.2 - Sinalização cruzada entre Eph-efrinas e outros receptores. Representação de algumas formas de *cross-talk* que podem ocorrer de forma bidirecional entre Eph-efrinas e outros sistemas de comunicação celular. As bolinhas amarelas representam a fosforilação em resíduos de tirosina e a tesoura indica a clivagem proteolítica. (Adaptado de Pasquale, 2008).

1.1.3 O papel de Ephs e efrinas na organogênese e em processos patológicos

A primeira função descrita para a família Eph-efrina ocorreu no sistema nervoso e fazia referência à sua capacidade para guiar o crescimento dos prologamentos neuronais (Pasquale, 2005). Estudos posteriores demonstraram várias outras funções biológicas destas moléculas, tanto no próprio sistema nervoso, quanto em outros tecidos e órgãos. Alguns exemplos são:

- No sistema nervoso, regula a formação dos mapas neuronais através do estabelecimento da conectividade neural e da formação das conexões sinápticas (Luo & Flanagan, 2007);

- Ainda neste tecido, regula a plasticidade das conexões neuronais em estruturas como o hipocampo, onde mudanças no número e no tamanho das sinapses são importantes para os processos de aprendizado e memória (Dalva et al., 2007);
- Participa do estabelecimento de domínios na formação das bordas teciduais (Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1999) e na segmentação e diferenciação de somitos (Durbin et al., 1998), regulando estruturalmente a migração e a interação célula-célula, assegurando seu correto posicionamento;
- Participa do desenvolvimento de estruturas craniais, como a formação e fechamento do palato (Orioli et al., 1996);
- Regula o desenvolvimento do esqueleto ósseo e cartilaginoso (Compagni et al., 2003);
- Modula a migração de células da crista neural (Davy & Soriano, 2005);
- Participa na angiogênese e remodelação do sistema vascular (Adams et al., 1999; Foo et al., 2006; Zhang & Hughes, 2006), regulando também o processo de agregação plaquetária (Prevost et al., 2002);
- Intervem na diferenciação de diferentes epitélios, como o sistema urorretal (Dravis et al., 2004), sistema mamário (Munarini et al., 2002), túbulos e glomérulos renais (Takahashi et al., 2001; Ogawa et al., 2006), sistema pancreático (van Eyll et al., 2006), epitélio intestinal (Battle et al., 2002) e epitélio tímico (Munoz et al., 2006; Alfaro et al., 2007; Munoz et al., 2009);
- Apresenta funções imunoregulatórias durante o desenvolvimento e atividade de linfócitos T (Alfaro et al., 2008; Alfaro et al., 2007; Munoz et al., 2006; Yu et al., 2006; Wu & Luo, 2005), as quais discutiremos em maior detalhe na próxima seção.

Devido à sua função como moduladores da migração e diferenciação celular, não é surpreendente que o sistema Eph-efrina tenha sido relacionado a diferentes tipos de processos tumorais (Hafner et al., 2004; Surawska et al., 2004; Ireton & Chen, 2005; Noren & Pasquale, 2007; Pasquale, 2008). Muitos estudos demonstram que receptores Eph são amplamente expressos em uma grande variedade de tumores, incluindo tumores mamários (Brantley-Sieders et al., 2008; Larsen et al., 2007; Berclaz et al., 2002), melanomas (Hess et al., 2007; Guo et al., 2006b; Easty &

Bennett, 2000; Easty et al., 1999), carcinomas de cólon (Liu et al., 2002; Saito et al., 2004; Clevers & Batlle, 2006; Guo et al., 2006a), cânceres de esôfago (Miyazaki et al., 2003) e tumores linfóides (Alonso et al., 2009; Smith et al., 2004; Wicks et al., 1992). De maneira geral, existe uma relação direta entre o grau de malignidade do tumor e os níveis de expressão dos receptores Eph e seus ligantes efrinas (Poliakov et al., 2004), que, em muitos casos, podem intervir em vias de sinalização de oncogenes, de hipóxia ou de citocinas inflamatórias (Pasquale, 2008). A progressão tumoral pode ocorrer ainda através de mudanças nas atividades de adesão celular, alterações da citoarquitetura ou através de fenômenos de neovascularização (Heroult et al., 2006), processos estes regulados por Ephs e efrinas como citado anteriormente.

Outro processo patológico onde a sinalização Eph-efrina está implicada, diz respeito à regulação da secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Estudo recente demonstrou, através de cultivos de células e modelos animais, que as células β comunicam-se através de receptores EphA e ligantes efrinas-A (Konstantinova et al., 2007), sugerindo que, em consequência da quantidade de complexos EphA/efrina-A formados, a secreção de insulina pode ser limitada ou aumentada, regulando assim o metabolismo da glicose de maneira a manter sua homeostase ou promovendo o diabetes.

Algumas malformações estruturais do sistema esquelético, como palato fendido, craniocinostoses e outras síndromes craniofrontonasais, também foram relacionadas a deficiências na sinalização EphB/efrina-B (Davy et al., 2006; Pasquale, 2005).

Recentemente foi descoberto que as efrinas B2 e B3 servem ainda como receptores para a entrada dos vírus Nipah e Hendra, dois paramixovírus emergentes que, em humanos, são altamente letais e de categoria 4 na classificação dos patógenos contaminantes (Bonaparte et al., 2005; Negrete et al., 2006). Estes estudos demonstraram que a distribuição de efrina-B2 no sistema vascular e de efrina-B2 e efrina-B3 no sistema nervoso estão de acordo com o tropismo tecidual destes vírus. Ambos os vírus se ligam à mesma região nas efrinas-B2 e B3 que também participa na interação com receptores EphB.

Atividades adicionais relacionadas aos receptores Eph e às efrinas no desenvolvimento de sistemas e órgão, assim como no desenvolvimento de patologias, têm sido continuamente descobertas. Exemplos recentes envolvem o sistema Eph-efrina na diferenciação de precursores hematopoiéticos, demonstrando

que a ativação do sinal EphB4, por exemplo, causa o desligamento entre as células progenitoras e as células estromais da medula óssea promovendo sua diferenciação a células eritróides maduras (Suenobu et al., 2002). Outros trabalhos, relacionados ao sistema imune, também demonstram a participação do sistema Eph-efrina durante o desenvolvimento e a atividade de células T (Munoz et al., 2009). Entretanto, o papel dos receptores Eph e seus ligantes efrina na biologia das células tronco e do sistema imune apenas começa a ser caracterizado (Pasquale, 2005). Neste sentido, dedicamos esta próxima seção a descrever alguns aspectos relativos à participação de Ephs e efrinas no sistema imune.

1.2 Ephs e efrinas no sistema imune

Muitos receptores Eph e efrinas, tanto da família A quanto da B, são expressos em órgãos e células do sistema imune (Tabela 1.2) sugerindo que estas moléculas apresentem propriedades imunoregulatórias (Wu & Luo, 2005). Com respeito ao timo, órgão linfóide primário responsável pela maturação dos linfócitos T, foram identificadas a expressão dos receptores EphA1-A4, EphA7-A8, EphB2, EphB4 e EphB6, que aparentemente representa a Eph com maior expressão no timo (Andres et al., 1994; Ciossek et al., 1995; Fox et al., 1995; Gurniak & Berg, 1996; Lickliter et al., 1996; Munoz et al., 2002; Shimoyama et al., 2002; Vergara-Silva et al., 2002; Alfaro et al., 2007). Também foram encontradas as efrinas A1-A5, efrina-B1 e efrina-B2 (Davis et al., 1994; Shao et al., 1995; Munoz et al., 2002; Vergara-Silva et al., 2002; Yu et al., 2003a; Yu et al., 2006; Alfaro et al., 2007).

Os dados a respeito da distribuição destas Ephs e efrinas no parênquima tímico são controversos. Enquanto estudos anteriores, através de técnicas de hibridização *in situ*, caracterizam uma distribuição regionalizada de determinadas Ephs e efrinas no timo, estudos recentes utilizando técnicas imunohistoquímicas demonstram, pelo contrário, um padrão de expressão homogêneo de EphB2, EphB3, efrina-B1, efrina-B2 no parênquima do órgão (Alfaro et al., 2008; García-Ceca *et al.*, dados não publicados).

Com relação a outras células do sistema imune, como em timócitos e linfócitos B e T periféricos, existe uma grande quantidade de trabalhos demonstrando a expressão membranar de diversas Ephs e efrinas (Lickliter et al., 1996; Aasheim et al., 1997; Shimoyama et al., 2000; Luo et al., 2002; Vergara-Silva et al., 2002; Yu et al., 2003a; Ivanov et al., 2005; Yu et al., 2006; Alfaro et al., 2007; Alfaro et al., 2008). Por outro

lado, a expressão das efrinas B1-B3, por exemplo, foi descrita em monócitos e macrófagos (Yu et al., 2003a), enquanto que EphA2, EphB1 e EphB3 foram detectadas em células dendríticas (Aasheim et al., 2000; Rissoan et al., 2002; de Saint-Vis et al., 2003). Estes trabalhos demonstram que a expressão de distintos membros da família Eph-efrina está regulada no sistema imune e que várias moléculas desta família podem ser expressas em uma mesma célula e/ou em um mesmo estágio de desenvolvimento (Shimoyama et al., 2002; Yu et al., 2006).

Quanto ao papel de Ephs e efrinas no sistema imune, a função mais amplamente descrita diz respeito às suas funções como moléculas coestimulatórias dos sinais transmitidos pelos receptores de células T (TCR) em linfócitos T periféricos (Wu & Luo, 2005). Neste sentido, Luo e colaboradores (2001) demonstraram como a ligação cruzada da EphB6 com anticorpos anti-EphB6 e anti-CD3 modifica a produção de interleucinas, inibindo a proliferação celular e aumentando a apoptose de células Jurkat. Esta mesma ligação cruzada, entretanto, em células T periféricas humanas, induz a proliferação celular e a produção de certas citocinas, como $IFN\gamma$, IL-6/10, TGF- β , TNF- α e GM-CSF (Luo et al., 2002). Resultados similares foram obtidos usando-se proteínas quiméricas efrina-B1/Fc, efrina-B2/Fc e efrina-B3/Fc em combinação com anti-CD3, que induziram proliferação de linfócitos T periféricos, além da expressão de marcadores de ativação (CD25 e CD69) e a secreção das citocinas citadas anteriormente (Yu et al., 2003b; Yu et al., 2004). Foi ainda observado a colocalização entre EphB6 e TCR em regiões específicas da membrana celular (GEM ou *lipid rafts*) após a ativação de linfócitos T utilizando-se anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, que, após esta indução, promovem a ativação da via de sinalização p38 MAPK (Luo et al., 2002; Yu et al., 2004).

Além de suas funções como moléculas coestimulatórias dos sinais advindos do TCR, algumas Ephs e efrinas foram descritas como importantes moduladoras da migração de linfócitos T. Alguns exemplos demonstram que as efrinas A1-A3, A5, B1 e B2 podem inibir a quimiotaxia induzida por CXCL12 em células Jurkat e linfócitos T periféricos (Sharfe et al., 2002; Aasheim et al., 2005). Esta capacidade de interação com vias quimiotáticas provavelmente indica uma relação da sinalização Eph-efrina com a capacidade migratória de células B e T que promove o posicionamento específico destas células nos distintos compartimentos dos órgãos linfóides primários e secundários (Wu & Luo, 2005).

Tabela 1.2 Expressão de Ephs e efrinas no sistema imune*.

Timo	Timócitos
Eph A1 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002; Lickliter <i>et al.</i> , 1996)	Eph A1 (Sharfe <i>et al.</i> , 2002, Muñoz <i>et al.</i> , 2002)
Eph A2 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Andrés <i>et al.</i> , 1994; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)	Eph A2 (Sharfe <i>et al.</i> , 2002, Lindberg <i>et al.</i> , 1990)
Eph A3 } (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002)	Eph A3 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Sharfe <i>et al.</i> , 2002; Boyd <i>et al.</i> , 1992; Wicks <i>et al.</i> , 1992; Dottori <i>et al.</i> , 1999; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)
Eph A4 }	Eph A4 }
Eph A7 } (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)	Eph A6 } (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002)
Eph A8 }	Eph A7 }
Eph B2 (Fox <i>et al.</i> , 1995; Alfaro <i>et al.</i> , 2008)	Eph A8 }
Eph B3 (Alfaro <i>et al.</i> , 2008)	Receptores ephrina B1 } (Yu <i>et al.</i> , 2006)
Eph B4 (Gurniak <i>et al.</i> , 1996; Ciossek <i>et al.</i> , 1995)	Receptores ephrina B3 }
Eph B6 (Gurniak <i>et al.</i> , 1996; Shimoyama <i>et al.</i> , 2002)	Eph B2 } (Alfaro <i>et al.</i> , 2008)
	Eph B3 }
Efrina A1 (Shao <i>et al.</i> , 1995)	Eph B6 (Luo <i>et al.</i> , 2002; Shimoyama <i>et al.</i> , 2002)
Efrina A2 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)	Efrina A1 }
Efrina A3 (Davis <i>et al.</i> , 1994)	Efrina A2 } (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)
Efrina A4 } (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)	Efrina A3 }
Efrina A5 }	Efrina A4 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002)
Efrina B1 (Davis <i>et al.</i> , 1994; Yu <i>et al.</i> , 2006; Coles <i>et al.</i> , 2004; Alfaro <i>et al.</i> , 2008)	Efrina A5 (Vergara-Silva <i>et al.</i> , 2002; Muñoz <i>et al.</i> , 2002)
B2 (Yu <i>et al.</i> , 2003; Coles <i>et al.</i> , 2004; Alfaro <i>et al.</i> , 2008)	Efrina B1 (Yu <i>et al.</i> , 2006; Alfaro <i>et al.</i> , 2008)
	Efrina B2 (Alfaro <i>et al.</i> , 2008)
	Efrina B3 (Yu <i>et al.</i> , 2006)

*Resumo dos trabalhos que caracterizam a expressão de receptores Eph e ligantes efrina no timo total e em timócitos em diferenciação.

Além dos linfócitos periféricos, as Ephs e efrinas também estão relacionadas à biologia dos linfócitos T durante seu desenvolvimento no timo. Freywald e colaboradores (2003), demonstraram que a ligação cruzada entre EphB6 e a proteína quimérica efrina-B1/Fc pode proteger os timócitos da apoptose induzida por anticorpos anti-CD3. Resultados similares também foram obtidos em estudos posteriores (Freywald *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Alfaro *et al.*, 2007), dos quais destacamos o trabalho de Alfaro e colaboradores (2007) que demonstra claramente a modulação da apoptose de determinadas subpopulações de timócitos estimulados com anticorpos anti-CD3 e concentrações variáveis de proteínas quiméricas EphB2/Fc ou efrina-B1/Fc. Neste trabalho, baixas concentrações da EphB2/Fc ou da efrina-B1/Fc induzem morte nos timócitos, enquanto que a presença de altas concentrações destas proteínas protegem os timócitos da morte celular programada.

Através de técnicas de cultivo organotípico de timo fetal (FTOC), alguns trabalhos têm demonstrado que, alterando as interações Eph-efrina através da utilização de Ephs ou efrinas recombinantes, pode-se interferir nos padrões de diferenciação de timócitos em desenvolvimento e induzir a apoptose destas células (Wu & Luo, 2005; Munoz et al., 2006; Alfaro et al., 2007). Defeitos na maturação dos timócitos têm sido também observados em camundongos nocaute para EphA4, os quais apresentam um decréscimo nos números de células T periféricas (Munoz et al., 2006). Mais recentemente, foi visto que camundongos nocaute para EphB2 e EphB3 apresentam desorganização da arquitetura tímica e decréscimo no número de timócitos (García-Ceca, dados não publicados) (Alfaro et al., 2008; Munoz et al., 2009). Estes resultados demonstram que o sistema Eph-efrina é importante para a organização estrutural do timo, e que possivelmente estaria envolvido no desenvolvimento e na migração e/ou morte destas células e de sua saída para a periferia. Neste sentido, descreveremos a seguir alguns aspectos da biologia do timo e do desenvolvimento das células T, abordando, quando possível, a participação do sistema Eph-efrina nestes processos.

1.3 O Timo

O timo é um órgão linfóide primário, bilobado, situado no mediastino anterior, sobre o coração. É revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, de onde partem septos que dividem cada lobo em lóbulos. Estes apresentam uma região externa chamada córtex, onde existe uma densa acumulação de linfócitos, e uma região medular central, menos povoada por células linfóides. Os septos, formados por fibroblastos e matriz extracelular enriquecida em colágeno tipo I, partem da cápsula e penetram no parênquima do timo chegando às regiões de interseção entre córtex e medula, delimitando os lóbulos tímicos e carreando vasos sanguíneos (Crivellato et al., 2004).

O timo é o órgão que promove o desenvolvimento e a formação do repertório de linfócitos T. Seu parênquima é formado basicamente por timócitos, que darão origem às linhagens de linfócitos T, e várias células de microambiente, que incluem as células epiteliais tímicas (TEC, da língua inglesa, *Thymic epithelial cell*), além dos componentes extracelulares que formam a matriz extracelular (ECM, da língua inglesa, *Extracellular matrix*) (Nitta et al., 2008). As células do microambiente tímico emitem múltiplos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos, e que são

essenciais para a manutenção da população de células T circulantes. Em resposta a estes sinais, os timócitos em desenvolvimento são induzidos a proliferar e migrar através do parênquima tímico, diferenciando-se em linfócitos T maduros. Estas etapas do desenvolvimento dos linfócitos T ocorrem em regiões anatômicas específicas do timo, onde existem diferentes células microambientais especializadas (von Boehmer et al., 2003; von Boehmer, 2004; Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo são derivados de células-tronco hematopoiéticas que migram ativamente para o timo, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-ECM ou ainda através da liberação de fatores solúveis (Savino et al., 2002; 2004; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Estas interações celulares determinam a migração e diferenciação dos precursores, que é comumente caracterizada pela expressão temporal e coordenada de proteínas de superfície celular, que incluem entre outras, as moléculas CD25, CD44, CD4, CD8 e o receptor clonal de linfócitos T (TCR, da língua inglesa, *T cell receptor*) (Takahama, 2006; Nitta et al., 2008). Conseqüentemente, a interação dos timócitos com o microambiente tímico e sua gradual diferenciação, gera um repertório intratímico de células T, diverso e funcional, restrito ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC, da língua inglesa, *Major histocompatibility complex*) e tolerante aos antígenos próprios do organismo (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

Por fim, os linfócitos T maduros, positivamente selecionados no timo, são liberados para a corrente sanguínea e, através do processo de circulação contínua, participam da formação de regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos, as chamadas áreas timo-dependentes. Nestes sítios, os linfócitos T maduros poderão proliferar em resposta a um determinado estímulo antigênico, e em seguida migrar para sítios específicos, onde irão exercer sua atividade efetora. Portanto, a formação do repertório de células T consiste em etapas determinantes durante o desenvolvimento dos timócitos, e que ocorrem em diferentes microambientes do timo. A migração dos timócitos em desenvolvimento através destes distintos microambientes é crucial para a seleção e formação deste repertório de células T, que iremos discutir detalhadamente nas seções posteriores.

1.3.1 Componentes estromais do microambiente tímico

O controle das etapas do desenvolvimento de células T no timo ocorre em múltiplos nichos no microambiente tímico, formados por diferentes arranjos de células microambientais e diferentes proteínas de ECM. O compartimento celular do microambiente tímico é composto por TECs, além de células mesenquimais, endoteliais e de hematopoiéticas tais como células dendríticas (DCs, da língua inglesa, *Dendritic cells*), macrófagos e fibroblastos. O epitélio tímico é o maior componente deste microambiente, sendo interconectado por desmossomas formando uma rede tridimensional preenchida por timócitos em desenvolvimento (Savino et al., 2003; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008).

As TECs formam um tecido heterogêneo em termos de morfologia, fenótipo e função. As subpopulações de TECs podem ser definidas de acordo com a expressão diferencial de citoqueratinas e de outros marcadores. As TECs corticais (cTECs) são caracterizadas pela expressão de citoqueratina 8 (CK8), EpCAM1 (molécula de adesão celular epitelial 1) e de Ly51 (Derbinski et al., 2001). Expressam ainda moléculas classe I e classe II do MHC. As cTECs são responsáveis pelo recrutamento dos precursores hematopoiéticos do sangue, comprometimento destes precursores com a diferenciação em linfócitos T, polarização da migração dos timócitos, indução do gene da recombinase e da recombinação V(D)J, controle da expansão dos timócitos, expressão dos co-receptores CD4 e CD8 e seleção positiva. Cada uma destas funções ocorre em resposta à expressão de Notch e de diferentes integrinas, e à produção de proteínas da ECM e de citocinas pelas cTECs (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008).

No córtex também podemos identificar o complexo linfoepitelial chamado de complexo tímico *nurse* (TNC, da língua inglesa, *Thymic nurse cell*), que corresponde a uma estrutura multicelular formada por uma TEC abrigando vários timócitos. Os timócitos internalizados pela TNC, são geralmente $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{low}}\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, residem dentro de vacúolos e fazem interações com a membrana do vacúolo da TNC (Webb et al., 2004). A internalização dos timócitos é reduzida com inibidores de microtubulos e microfilamentos sugerindo que tais estruturas estejam envolvidas na ligação e internalização do timócito. De fato, é possível que após a ligação do timócito haja a reorganização dos microtubulos, formando “canais”, que promoveriam o movimento direcionado dos timócitos no interior da TNC (Webb et al., 2004). As TNCs, juntamente com macrófagos tímicos, participam da eliminação dos

timócitos que sofrem apoptose, devido ao rearranjo gênico não funcional do TCR, ou por não terem sido positivamente selecionados (Hiramine et al., 1996). TNCs também secretam várias citocinas, hormônios tímicos e matriz extracelular, e expressam moléculas do MHC classe I e II (Villa-Verde et al., 1995; Hansenne et al., 2009).

As TEC medulares (mTECs) apresentam fenótipo EpCAM1⁺Ly51⁻. Análises de cortes histológicos mostram a expressão da citoqueratina 5 (CK5), além da expressão das moléculas do MHC classe I e II. As mTECs são responsáveis pela atração dos timócitos positivamente selecionados, pela indução de tolerância central e pela migração das célula T maduras para a periferia (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008). Tais células são essenciais no estabelecimento da seqüência de eventos associados à diferenciação e à migração das células T através da liberação de citocinas, secreção de proteínas da ECM e interações adesivas, as TECs (Crisa et al., 1996).

Na medula, podemos ainda destacar as células dendríticas que também participam dos eventos que culminam com a tolerância central de células T. As células dendríticas medulares apresentam uma gama de peptídeos tecido-específicos às células T em desenvolvimento, sendo também responsáveis pelo fenômeno de seleção negativa (Heath et al., 2004; Kyewski & Derbinski, 2004), como veremos mais adiante.

Outro componente do microambiente tímico, os fibroblastos, são essenciais na proliferação das TECs durante a embriogênese, através da produção dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF, da língua inglesa, *Fibroblast growth factor*) 7 e 10 (Jenkinson et al., 2003). De fato, fibroblastos MTS15⁺ são as maiores fontes de FGF-1, FGF-7 e FGF-10. É interessante notar que estes fatores de crescimento são ainda necessários na regeneração pós-natal do timo (Gray et al., 2007).

Além dos componentes celulares, o microambiente tímico é formado por uma rede tridimensional de glicoproteínas que compõem a ECM. Estas glicoproteínas da ECM formam um complexo macromolecular que contribui com pontos de ancoragem para as células microambientais e timócitos, sendo importantes moléculas sinalizadoras intervenientes no desenvolvimento dos timócitos através de sua participação nos eventos de diferenciação, migração, proliferação e ativação celular (Savino et al., 2004). Além disso, diferentes fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios estão associados com a ECM, representando um importante fator na regulação da

resposta imune celular (Savino et al., 2004; Smaniotto et al., 2005; Mendes-da-Cruz et al., 2008).

1.3.2 Organogênese e compartimentalização do timo

Durante a embriogênese, as interações epitélio-mesênquima entre a endoderme do terceiro arco branquial e a crista neural, ao redor da qual deriva o mesênquima desta região, são necessárias para a formação e subsequente desenvolvimento do primórdio tímico (Gordon et al., 2004). Este processo é dividido em dois estágios: o primeiro envolve as interações epitélio-mesênquima na ausência dos timócitos, enquanto no segundo estágio há a interação mútua entre as células epiteliais e os timócitos em desenvolvimento (Zhang et al., 2007).

Os primeiros sinais para a organogênese tímica ainda são desconhecidos, mas sabe-se que as células mesenquimais respondem a sinais da endoderme para a formação do primórdio tímico e suportam o crescimento e diferenciação do epitélio tímico rudimentar. No dia 10 do desenvolvimento embrionário de camundongos (E10) as células mesenquimais derivadas da crista neural iniciam interação física com o terceiro arco branquial, estabelecendo-se o primórdio tímico (Zhang et al., 2007).

Aproximadamente no dia E11,5 o rudimento tímico começa a brotar e crescer. Nesta etapa do desenvolvimento, a expressão do fator de transcrição Foxn1 (*Fork-head box N1*) é necessária para a diferenciação e a proliferação das TECs, que são capacitadas a atrair os precursores de linfócitos T (Nehls et al., 1996; Su et al., 2003). O comprometimento dos precursores hematopoiéticos com a linhagem T ocorre por volta dos dias E-14/E-15 e marca a transição entre a diferenciação do epitélio tímico independente de timócitos e a diferenciação dependente de timócitos. A partir de então, muitos autores assumem que o padrão de crescimento e a diferenciação do epitélio tímico irão ocorrer em paralelo e de forma dependente ao desenvolvimento dos timócitos (Klug et al., 1998; Anderson & Jenkinson, 2001; Gill et al., 2003).

De forma geral, como comentamos anteriormente, é possível definir a diferenciação das regiões epiteliais tímicas com base na expressão de CK5 e CK8 (Fig. 1.3). No estágio de desenvolvimento E13 em camundongos, surgem no centro do timo as primeiras TECs de fenótipo CK5⁺ CK8⁺, que estão rodeadas por células CK5⁻ CK8⁺ (Klug et al., 2002). Dois dias depois, começa a regulação negativa de CK8 nas áreas

medulares, de maneira que se identificam pequenos grupos CK5⁺ CK8^{-/lo} rodeados de células CK5⁻ CK8⁺, que formam o parênquima cortical. Aos 17 dias de desenvolvimento fetal, o córtex está bem organizado em uma população epitelial predominantemente CK5⁻ CK8⁺, onde a presença de TECs CK5⁺ CK8⁺ se restringe a algumas células isoladas pela rede cortical, observando-se regiões medulares de pequeno tamanho com um fenótipo maduro CK5⁺ CK8⁻ (Klug et al., 1998; Klug et al., 2002; Bennett et al., 2002). O timo neonatal é similar ao descrito no dia E17, mostrando um epitélio cortical CK5⁻ CK8⁺ com prolongamentos celulares orientados perpendicularmente à cápsula e pequenas regiões medulares CK5⁺ CK8⁻, um pouco maiores que a E17, rodeadas por uma região de TECs CK5⁺ CK8⁺, que formam a junção córtico-medular (Klug et al., 2002). Na 3^a semana de idade, o timo já está totalmente compartimentalizado (Fig. 1.3).

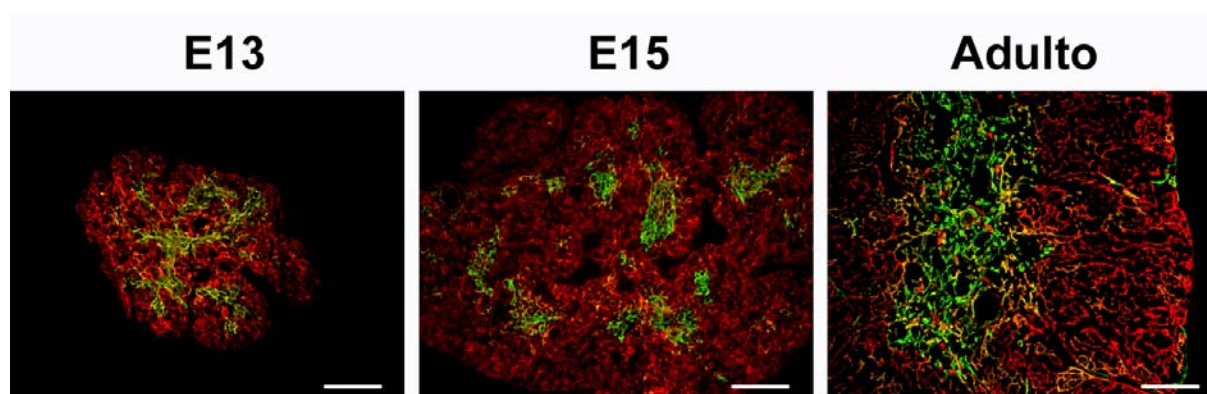


Figura 1.3 - Desenvolvimento do epitélio tímico com base na expressão das citoqueratinas 5 e 8. Representação de criosecções tímicas marcadas com anticorpos anti-CK5 (verde) e anti-CK8 (vermelho) em diferentes estágios de desenvolvimento em camundongos. Escala 100µm. (Cortesia de Javier Garcia-Ceca).

A identificação dos mecanismos moleculares que regulam as primeiras etapas do desenvolvimento tímico, assim como o modelo de diferenciação dos precursores epiteliais que originam todos os tipos de células epiteliais conhecidas no timo adulto e os mecanismos de organização tridimensional da rede epitelial tímica ainda não são completamente entendidos e continuam sendo estudados extensivamente nos últimos anos. Alguns fatores de transcrição (Pax-1, Pax9, Hoxa3, Foxn1), junto com fatores de crescimento (FGF-7, FGF-8, FGF-10, IGF1, IGF-2), já foram descritos como participantes de diferentes etapas do desenvolvimento tímico (Gordon et al., 2001; Balciunaite et al., 2002; Tsai et al., 2003; Blackburn & Manley, 2004; Gray et al., 2005; Chidgey & Boyd, 2006; Hollander et al., 2006; Jenkinson et al., 2006; Patel

et al., 2006). Do ponto de vista da família Eph-efrina, podemos citar a participação dos receptores EphA4 que, em camundongos nocaute, promovem um severo bloqueio na diferenciação T e uma profunda modificação do epitélio tímico cortical que aparece colapsado e desorganizado (Munoz et al., 2006). De maneira similar, o tratamento de reagregados, estabelecidos com timócitos e TECs fetais, com proteínas quiméricas efrina-B1/Fc, leva a uma profunda desorganização da rede tridimensional epitelial ocasionando o encurtamento dos processos epiteliais (Alfaro et al., 2007). Ainda, a falta de EphB2 e/ou EphB3 em camundongos nocaute leva a uma importante alteração na celularidade e na formação da rede epitelial tímica (Muñoz et al., 2009).

1.3.3 *Entrada dos precursores de células T no timo*

Como discutimos anteriormente, o timo é um órgão importante para o desenvolvimento normal das células T. Entretanto, os progenitores de células T no timo não são capazes de sustentar seu desenvolvimento indefinidamente. De fato, o timo é colonizado constantemente por progenitores hematopoiéticos da medula óssea, o que permite a geração contínua de células T maduras no decorrer da vida pós-natal (Boehm & Bleul, 2006).

O desenvolvimento intratímico de células T é iniciado pela colonização do timo por células linfóides progenitoras (progenitores T), que se inicia no dia E11,5 do desenvolvimento embrionário de camundongos ou na oitava semana de gestação em humanos. De acordo com o que vem sendo descrito, a entrada de progenitores T no timo ocorre por duas vias distintas: uma via independente de vasos sanguíneos, que ocorre antes da vascularização do timo durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário; e uma via dependente dos vasos sanguíneos que ocorre nos estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário e no período pós-natal (Rossi et al., 2005; Liu et al., 2006; Li et al., 2007).

A migração inicial dos progenitores hematopoiéticos para o timo fetal no estágio pré-vascular ocorre através do tecido conjuntivo (mesênquima) que circunda o timo nesta fase do desenvolvimento (Boehm & Bleul, 2006). Esta migração inicial ocorre em duas ondas de colonização que acontecem entre os dias E11-E13 e E18-E21 (Misslitz et al., 2006). Acredita-se que a primeira onda de colonização consista de progenitores linfóides gerados na região da aorta-gônada-mesonefro (AGM) nos embriões E10 e que são encontrados na circulação sanguínea e no fígado fetal nos

estágios E11 e E12, coincidindo com o momento da colonização inicial do rudimento tímico (Moore, 2004). Os progenitores que colonizam o rudimento tímico na segunda onda de colonização são, por outro lado, gerados na medula óssea, tendo em vista que tais precursores são detectados na medula óssea do fêmur de ratos no estágio E17 do desenvolvimento (Clapp et al., 1995).

Dados da literatura sugerem que a colonização pré-vascular do timo fetal é regulada pela atração quimiotática dos progenitores T pelo primórdio tímico via interações entre quimiocinas e receptores de quimiocinas (Liu et al., 2006; Li et al., 2007; Jenkinson et al., 2007). Além disso, outras moléculas também estariam regulando este processo, como as integrinas que, no momento da primeira onda de colonização do rudimento tímico (E12), são expressas pelos progenitores (Sunjara et al., 1999). Após a etapa de vascularização do timo, os progenitores T são preferencialmente encontrados nas junções córtico-medulares (Lind et al., 2001), assim como nos espaços que circundam os vasos sanguíneos deste compartimento (Mori et al., 2007). Embora as etapas que norteiam a entrada de progenitores no timo ainda não estejam completamente elucidadas, acredita-se que devam ocorrer de forma similar à entrada de linfócitos maduros em órgãos linfóides secundários (Zlotoff et al., 2008). Tais etapas devem incluir o reconhecimento do endotélio vascular, rolamento de células, adesão firme ao endotélio e, finalmente, extravasamento destes progenitores para o interior do órgão (Schwarz & Bhandoola, 2006). Apesar dos mecanismos moleculares que controlam estes eventos serem ainda pouco entendidos, acredita-se que, como na migração dos linfócitos maduros, envolvam moléculas de adesão celular e gradiente de quimiocinas. A tabela 1.3 resume os principais trabalhos que caracterizam algumas destas moléculas que regulam a entrada de células precursoras hematopoiéticas no timo durante os períodos pré e pós-vascularização deste órgão.

No que diz respeito à família Eph-efrina, não existem relatos demonstrando sua participação neste processo de migração e entrada de progenitores no timo, apesar do conhecido potencial destas moléculas em modular processos de adesão/repulsão e migração de células progenitoras (Stokowski et al., 2007; Chumley et al., 2007) e linfócitos T (Sharfe et al., 2002; Sharfe et al., 2008; Aasheim et al., 2005; Kitamura et al., 2008).

Tabela 1.3 Moléculas que regulam a entrada de precursores no timo*.

Moléculas	Período	Modelo experimental	Referência
<i>Quimiocinas e receptores</i>			
CCR7 CCR9	pré-vascular	Camundongos deficientes apresentaram severo defeito na colonização do timo fetal	Wurbel <i>et al.</i> , 2001 Liu <i>et al.</i> , 2005, 2006
CCR9	pós-vascular	Células progenitoras deficientes foram ineficientes em recolonizar o timo	Uehara <i>et al.</i> , 2002 Schwartz <i>et al.</i> , 2007
CCL21 CCL25	pré-vascular	Expressão em células do rudimento tímico/paratireóide	Jenkinson <i>et al.</i> , 2007
<i>Integrinas e ligantes</i>			
$\alpha 4\beta 1$ $\alpha 5\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$	pré-vascular	Expressão em células progenitoras hematopoiéticas e adesão destas à superfície de lóbulos tímicos fetais	Suniara <i>et al.</i> , 1999 Kawakami <i>et al.</i> , 1999 Wada <i>et al.</i> , 1996
$\alpha L\beta 2$ $\alpha 4\beta 1$	pós-vascular	Utilização de anticorpos bloqueadores reduz entrada de progenitores no timo	Scimone <i>et al.</i> , 2006
<i>Moléculas de adesão celular</i>			
CD44	pré-vascular	Migração de células progenitoras para dentro dos lóbulos tímicos	Kawakami <i>et al.</i> , 1999
P-selectina PSGL-1	pós-vascular	Camundongos deficientes apresentaram defeitos na recolonização do timo	Rossi <i>et al.</i> , 2005 Scimone <i>et al.</i> , 2006
ICAM-1 VCAM-1	pós-vascular	Expressão em células endoteliais; bloqueio reduz colonização do timo	Lepique <i>et al.</i> , 2003 Scimone <i>et al.</i> , 2006

*Resumo dos trabalhos que caracterizam as moléculas que participam na entrada de células precursoras hematopoiéticas no timo durante o período pré e pós-vascularização deste órgão.

Outro importante aspecto a ser elucidado no sentido de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na migração dos progenitores T diz respeito à identidade dos progenitores que saem da medula óssea para entrar no timo e manter a produção de linfócitos T maduros. Neste caso, o conhecimento atual permanece controverso.

Muitos progenitores da medula óssea têm potencial para se diferenciar em células T sob estímulos adequados. Tais células são classificadas fenotipicamente como progenitores LSK (Lin⁻SCA-1⁺KIT^{hi}), pois, embora não apresentem a expressão de marcadores de diferenciação de linhagens celulares maduras, expressam o antígeno

de células tronco (SCA-1, da língua inglesa, *stem cell antigen 1*) e o receptor CD117 (KIT), que se liga ao fator derivado de células tronco (SCF, da língua inglesa, *stem cell factor*) (Bhandoola & Sambandam, 2006). Estes progenitores incluem: as células-tronco hematopoiéticas (HSC, da língua inglesa, *hematopoietic stem cells*), que podem originar todas as linhagens celulares sanguíneas e possuem habilidade de se auto-renovar (Morrison et al., 1995); o progenitor multipotente (MPP, da língua inglesa, *multipotential progenitor*), que pode originar todas as linhagens hematopoiéticas, mas não tem capacidade de auto-renovação (Adolfsson et al., 2001; Christensen & Weissman, 2001); o progenitor linfóide comum (CLP, da língua inglesa, *common lymphocyte progenitor*), que foi originalmente identificado como comprometido com a linhagem linfóide (Kondo et al., 1997); e células derivadas do CLP (Martin et al., 2003; Balciunaite et al., 2005). Entretanto, ainda não está claro o quanto cada uma destas células seria fisiologicamente capaz de colonizar o timo através da corrente sanguínea. A identificação do CLP foi vinculada à capacidade destas células em originar células T *in vivo*, sugerindo que essa população de progenitores poderia ser a população imediatamente precursora dos timócitos (Kondo et al., 1997). Entretanto, o modelo proposto contrasta com uma teoria alternativa onde os MPP seriam a principal fonte de origem dos timócitos (Bhandoola et al., 2007). Trabalhos recentes têm demonstrado que os CLP rapidamente adotam o fenótipo DN1 após sua entrada no timo (Schwarz et al., 2007; Karsunky et al., 2008). A figura 1.4 resume de forma objetiva as possíveis vias de diferenciação de progenitores hematopoiéticos, seus fenótipos e a forma como estão conectados em sua rota de diferenciação intratímica.

De fato, após a entrada no timo os progenitores, sejam eles CLPs ou MPPs, irão receber sinais específicos deste microambiente que os levarão a migrar e seguir diferentes etapas de diferenciação dentro do órgão.

1.3.4 Diferenciação intratímica de linfócitos T e os eventos de seleção

O processo de diferenciação intratímica de linfócitos pode ser definido com base na expressão diferencial das moléculas CD4, CD8 e TCR. Inicialmente, os progenitores T não expressam os co-receptores CD4 e CD8, sendo, por conseguinte, denominados duplo-negativos (DN). Em camundongos, essas células DN podem ainda ser subdivididas de acordo com a expressão das moléculas CD44 e CD25 em DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺) e DN3 (CD25⁺CD44^{lo}). Na etapa seguinte, as células passam a expressar simultaneamente CD4 e CD8, sendo então

denominadas como células duplo-positivas (DP). As células em transição DN/DP foram nomeadas como DN4. Entretanto, conceitualmente estas células poderiam ser denominadas de pré-DP ($CD4^{lo}CD8^{lo}CD25^{-}CD44^{lo}$), tendo em vista que neste momento já expressam os co-receptores CD4 e CD8 em sua superfície, embora em baixos níveis. Este estágio evolui para as chamadas células duplo-positivas (DP) $CD4^{+}CD8^{+}$, que correspondem à cerca de 80% de todos os timócitos. No entanto, apenas uma pequena porção de células DP geradas é selecionada positivamente e torna-se funcionalmente madura. Nesta etapa elas param de expressar um dos co-receptores CD4 ou CD8 e são designadas como células T simples-positivas (SP) $CD4^{+}$ ou $CD8^{+}$ (Fig. 1.5) (Nitta et al., 2008).

As células DN1 encontram-se na região cortical, onde níveis mais altos do ligante de Notch, Delta-like1, são expressos (Schmitt et al., 2004). Existem dados que demonstram que os sinais desencadeados pelo microambiente tímico, via Notch, induzem o comprometimento destas células com a linhagem linfóide (Figura 1.5) (Laiosa et al., 2006; Radtke et al., 1999). No entanto, cabe frisar que outros fatores, tais como a Interleucina-7 (IL-7) e o ligante de CD117 são necessários para a proliferação de timócitos no estágio DN1 (Wang et al., 2006).

A expressão dos genes da recombinase (RAG) aumenta nas células DN2 e neste estágio é detectado o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias $TCR\gamma$ e $TCR\delta$, mas não para a cadeia $TCR\beta$ (Capone et al., 1998; Livak et al., 1999). As células do microambiente continuam provendo os ligantes de Notch, dando continuidade à especificação para diferenciação em células T (Schmitt et al., 2004). Entretanto, algumas células DN2 retêm o potencial de gerar DCs e células *natural killer* (NK) (Lu et al., 2005), sugerindo a presença de nichos específicos onde a sinalização de Notch não ocorre (Radtke et al., 2000).

No estágio DN3 ocorre o rearranjo do gene $TCR\beta$ que marca irreversivelmente o comprometimento com a linhagem T. Nesta etapa, ocorre um processo de seleção chamado seleção β , onde as células que não finalizam o rearranjo do $TCR\beta$ morrem e as células bem sucedidas expressam um receptor de célula T imaturo (pré-TCR) em suas superfícies e proliferam aumentando em até quatro vezes seu número (Penit et al., 1995; Petrie et al., 1995), além de aumentarem a expressão dos RNAs mensageiros que codificam para as moléculas CD4 e CD8 (Rothenberg et al., 2008). A partir de então, ocorre a transição de DN para DP passando pelo estágio pré-DP (Fig. 1.5) (Petrie, 2003).

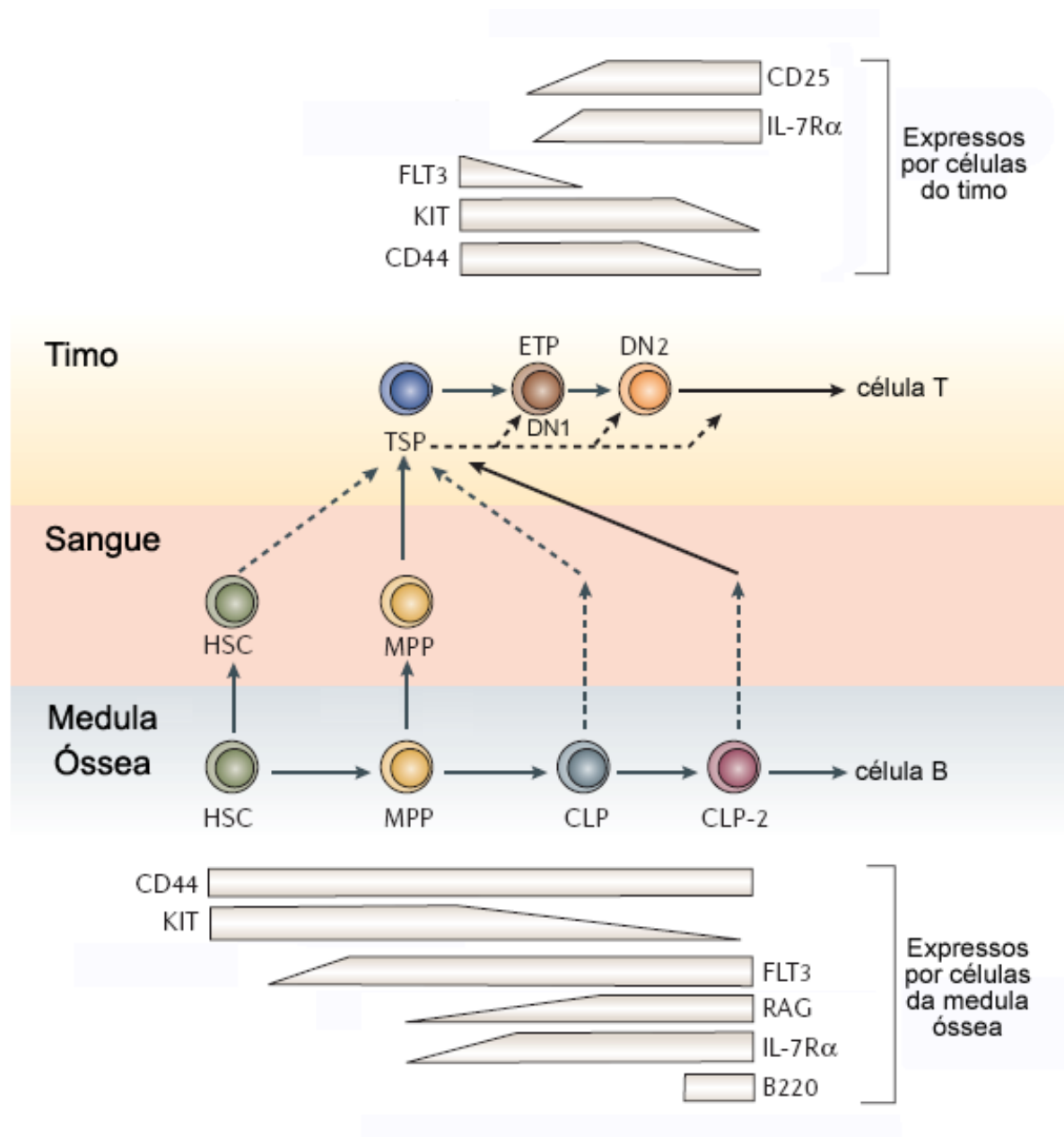


Figura 1.4 - Vias de diferenciação que conectam a medula óssea e o timo. Os precursores hematopoiéticos da medula óssea (HSCs) se diferenciam em progenitores multipotentes (MPPs). Os progenitores subsequentes incluem o progenitor linfóide comum (CLP) e CLP-2. HSCs e MPPs já foram encontrados circulando no sangue periférico, enquanto que CLP e CLP-2 são capazes de colonizar eficientemente o timo se injetados na corrente sanguínea. As flechas pontilhadas representam vias que ainda não são bem caracterizadas, enquanto que as flechas contínuas representam vias de diferenciação bem conhecidas. A identidade precisa dos progenitores que colonizam o timo (TSPs) é ainda desconhecida e pode incluir várias populações de progenitores. Os recentes imigrantes tímicos (ETPs ou DN1), os timócitos duplo-negativos 2 (DN2) e outros timócitos derivados destes se originam dos TSPs, mas é possível que alguns progenitores entrem diretamente como DN2 ou outros estágios de desenvolvimento de timócitos DN sem passar pelo estágio ETP. (Adaptado de Bhandoola & Sambandam, 2006).

É proposto que células DP continuem dependentes dos sinais derivados do microambiente, tanto diretamente, através de contato célula-célula, como indiretamente, através de interações com proteínas da ECM e de fatores solúveis. A maior necessidade de contato direto ocorre na seleção positiva que acontece na interação com TECs corticais expressando moléculas de MHC (Bevan, 1997; Speiser et al., 1989). Além disso, ainda nesta etapa, a especificidade dos timócitos pelo MHC classe I ou classe II é considerada como determinante na divergência entre as subpopulações CD4/CD8. Um modelo para esta dicotomização e o surgimento das populações simples positivas supõe que as células que passam pela seleção positiva param de expressar CD8 por negligência de sinal e super-expressam o receptor de IL7 (IL-7R) (Brugnera et al., 2000). Se a perda de sinalização via CD8 não abolir o sinal via TCR, a expressão de CD8 continua “desligada” e passa-se à produção da subpopulação de timócitos CD4. Se a perda de CD8 interrompe o sinal da seleção positiva, a sinalização via IL-7R faz o silenciamento da expressão da molécula CD4, re-indução da expressão da molécula CD8 e, assim, a célula assume o fenótipo CD8 positivo (Yu et al., 2003b).

Tendo em vista estes dados, conclui-se que as células do microambiente controlam, tanto diretamente (através do contato entre as moléculas de TCR e MHC) como indiretamente (via interação IL7/IL7R), a seleção positiva e o destino das células T em CD4⁺ ou CD8⁺ (Figura 1.5).

O processo de seleção envolve a afinidade/avidez das interações entre o TCR dos timócitos e o complexo peptídeo-MHC expresso por células apresentadoras de antígeno (APC, da língua inglesa, *antigen-presenting cell*). A seleção positiva resgata os timócitos da morte celular programada quando há uma avidez moderada na interação TCR/peptídeo-MHC. Entretanto, se há alta afinidade nesta interação, os timócitos morrem por apoptose. A partir da seleção positiva são obtidos clones de células T que apresentam um repertório de TCR restrito ao MHC próprio (Mick et al., 2004). Já na medula, as células SP resultantes da seleção positiva, ainda através das interações entre TCR e MHC, passam por uma nova etapa de seleção denominada como “seleção negativa” (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008).

A interação dos receptores de célula T e dos complexos peptídeo-MHC representa um exemplo clássico de uma interação que determina o destino no desenvolvimento dos timócitos. As mTECs são cruciais no controle da autoimunidade devido à expressão promíscua de antígenos tecido-específicos (TRAs, da língua inglesa,

tissue-restricted antigens) que selecionam negativamente os clones de células T auto-reativos e possivelmente promovem a geração das células T regulatórias (Boehm et al., 2003; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007).

A expressão de TRAs não-tímicos pelas mTECs está sob controle do fator de transcrição Aire (da língua inglesa, *Autoimmune regulator*) (Anderson et al., 2002). A proteína Aire promove uma atividade transcricional em vários sítios cromossômicos, aumentando a expressão de genes pelas mTEC, que normalmente só seriam expressos em tecidos específicos. Este arranjo de proteínas próprias da periferia é apresentado aos timócitos pelas mTECs ou por células dendríticas. Os timócitos que reconhecem estes antígenos são removidos por deleção clonal via apoptose. No entanto, alguns devem sobreviver adotando destinos alternativos com propriedade regulatória, ao invés de atividade efetora auto-reativa (Derbinski et al., 2005; Mathis & Benoist, 2007).

Após os processos de seleção positiva e negativa, linfócitos T originados no timo são capazes de reconhecer as moléculas próprias do MHC e discriminar entre antígenos próprios e não-próprios.

Todo este processo de desenvolvimento das células T no timo descrito acima consiste em vários passos que requerem a realocação dinâmica dos timócitos em desenvolvimento para dentro e fora de múltiplos nichos tímicos (Nitta et al., 2008). Portanto, a migração dos timócitos é um evento crucial na diferenciação intratímica (Savino et al., 2002; 2004).

1.3.5 Diferenciação e migração intratímica de linfócitos T

Após a entrada no timo, os progenitores T hematopoiéticos iniciam o processo de diferenciação de timócitos dando origem ao estágio DN do desenvolvimento de células T. No decorrer deste processo, os timócitos DN1 movem-se no interior do córtex em direção à região subcapsular, diferenciando-se progressivamente em DN2 e DN3. A transição para células DP, após a recombinação dos genes do TCR, coincide com a reversão da polaridade da migração que passa a ser em direção à medula. Mas, de acordo com alguns modelos de migração intratímica de timócitos, só as células resultantes da seleção positiva voltam a migrar pelo córtex e entram na medula onde passam pela seleção negativa. Assim, os timócitos em diferenciação fazem um percurso em forma de ferradura (Fig. 1.5) no interior do lóbulo tímico (Witt & Robbins, 2005). A reversão da direção de migração no córtex faz com que a mesma região que sinalizou para as células DN que migravam para a cápsula,

signalize para as células DP que migram para o interior do córtex. Essa ambigüidade pode ser explicada devida às mudanças na expressão gênica na transição DN para DP, que resulta na aquisição de respostas a novos sinais e a perda de respostas a sinais já formados. Assim, as células DP podem responder ao estímulo que antes, como células DN, não poderiam e vice-versa. Por outro lado, a região do córtex onde ocorre a migração inversa apresenta uma gama de estímulos funcionais distintos, que formam um espaço tri-dimensional exclusivo (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

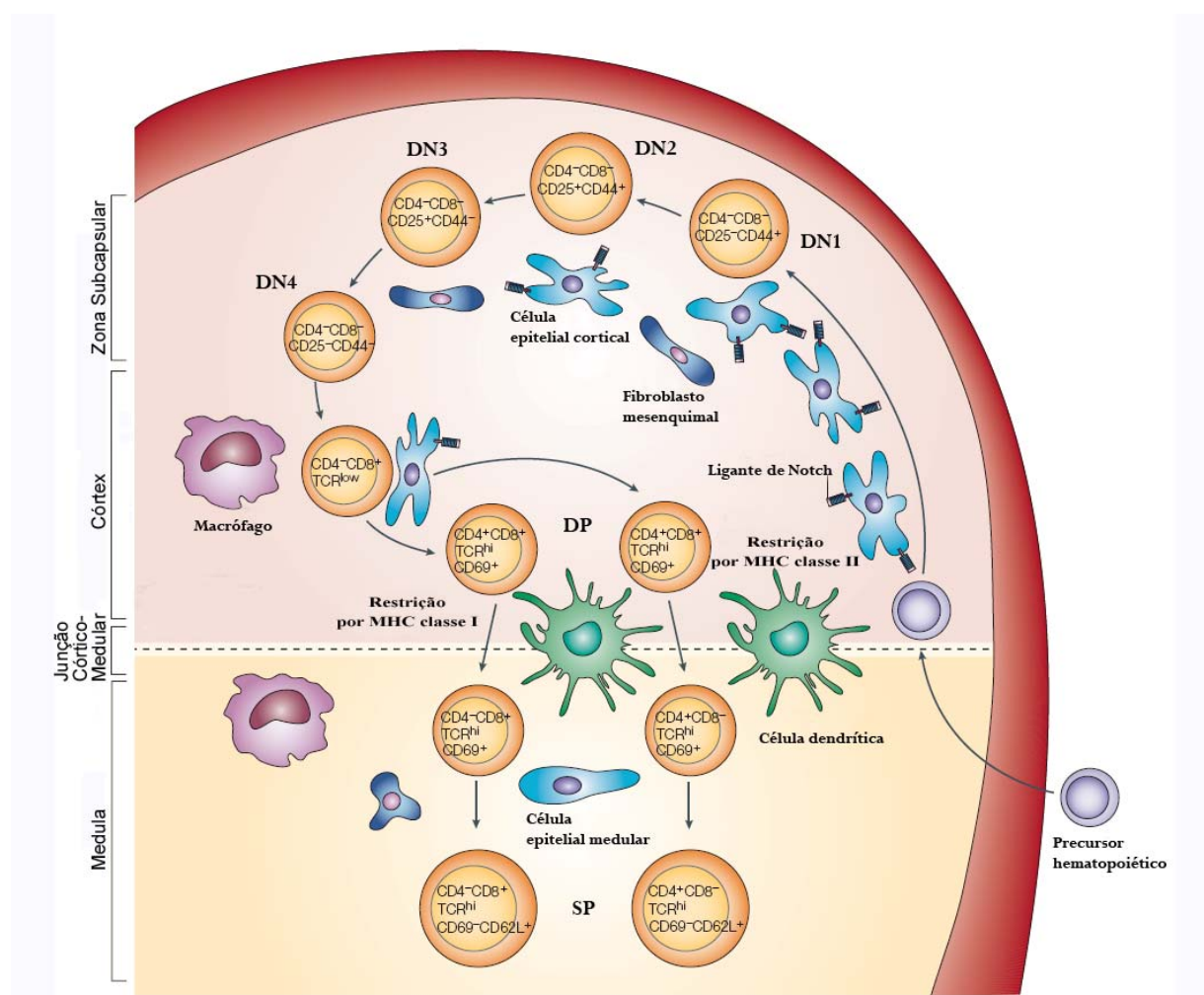


Figura 1.5 - Desenvolvimento intratímico dos linfócitos T. Os lóbulos tímicos estão organizados basicamente em duas regiões denominadas córtex e medula, cada uma das quais apresenta tipos específicos de células do microambiente e timócitos em diferentes estágios de maturação. O fenótipo dos timócitos em diferenciação pode ser definido em função da expressão de diversos marcadores, como CD44, CD25, CD4, CD8 e TCR, os quais permitem sua classificação em diversas subpopulações: DN (DN1-DN4), DP e SP (CD4 e CD8). (Adaptado de Zuniga-Pflucker, 2004).

Por fim, os timócitos SP maduros que completaram o desenvolvimento e estão presentes na região medular do órgão, passam pela seleção de repertório e são exportados deste órgão para a corrente sanguínea, indo então colonizar os órgãos linfóides periféricos. Acredita-se que os timócitos maduros deixam o timo através dos espaços perivasculares, espaços estes circundados por células epiteliais e que estão predominantemente presentes nas junções córtico-medulares e na medula (Mori et al., 2007).

Esta migração ordenada depende do controle da seqüência de eventos de adesão e de-adesão das células migrantes ao estroma. As células do estroma tímico fornecem aos timócitos nichos apropriados que promovem e regulam o desenvolvimento no interior do órgão. No entanto, a comunicação entre timócitos e células do microambiente é bilateral, gerando sinalizações cruzadas (*crosstalk*) entre estes diferentes tipos celulares. Estas sinalizações cruzadas envolvem uma série de interações ligante/receptor, entre elas as quimiocinas produzidas pelas células do microambiente, que guiam o sentido de migração dos timócitos, e os receptores de quimiocinas, que são expressos de maneira específica e seqüencial na membrana dos timócitos em desenvolvimento (Takahama, 2006).

A quimiocina CXCL12 está presente nas células do microambiente tímico, e timócitos imaturos expressam seu receptor CXCR4. Em quimeras onde o gene para CXCR4 foi condicionalmente suprimido, o desenvolvimento é bloqueado no estágio DN1, o que demonstra a importância de CXCL12 na migração e também no desenvolvimento normal da célula T (Fig. 1.6).

A falta de sinalização via CCR7 também gera o acúmulo de células na região córtico-medular nos eventos iniciais da diferenciação dos timócitos. Neste caso, há o acúmulo das células DN2, com diminuição das células DN3 e pré-DP, além da diminuição da celularidade do timo (Misslitz et al., 2004; Forster et al., 2008). Já nos eventos mais tardios, após a seleção positiva, a falta do receptor CCR7 ou de seus ligantes, gera o acúmulo de células SP no córtex acompanhado pela redução destas células na medula. Tal fato indica a importância desta molécula na migração de linfócitos do córtex para a medula, entretanto, a sua deficiência não impede a diferenciação de células DP em SP (Ueno et al., 2004).

Algumas quimiocinas são expressas tanto pelas células epiteliais corticais, quanto medulares. Exemplo disto é a quimiocina CCL25 que se liga ao receptor CCR9. Em camundongos deficientes em CCR9 não foi detectado acúmulo de timócitos DN2 e DN3 na região subcapsular, seu microambiente fisiológico, ficando estas células

distribuídas por todo o córtex (Benz et al., 2004). A importância desta quimiocina também foi investigada através da geração de um camundongo transgênico para CCR9. O fenótipo deste camundongo indica que a regulação na expressão de CCR9 no estágio de transição de DN para DP é crítica para o desenvolvimento da célula T (Fig. 1.6) (Uehara et al., 2006).

Além da quimiotaxia, a migração celular requer uma interação dinâmica entre ligantes e receptores de ECM e o citoesqueleto, particularmente no que diz respeito ao microfilamentos de actina, permitindo assim a geração de força para locomoção. No entanto, a simples presença destes receptores não é necessariamente uma indicação funcional, pois, geralmente, estes receptores devem ser ativados por estímulos extracelulares.

Neste sentido, dentre outros modelos de interação, as TECs podem interagir com os timócitos em diferenciação diretamente, ou ainda, através de ligantes e receptores de ECM (Savino et al., 2002). Os componentes da ECM são produzidos por distintas células do microambiente tímico, como as próprias TECs, que são capazes de produzir laminina (LN), fibronectina (FN) e colágeno do tipo IV. A distribuição destas proteínas no timo não segue um padrão homogêneo e não está restrita à membrana basal (Savino et al., 2002, 2004).

Algumas isoformas de glicoproteínas de ECM já foram descritas no timo. A FN clássica, a qual é reconhecida pela integrina $\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29; VLA-5), está localizada em todo o parênquima tímico. A isoforma derivada de *splicing* alternativo do RNA mensageiro da fibronectina, reconhecida pela integrina $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29; VLA-4), está restrita à medula, claramente definindo a junção córtico-medular do lóbulo tímico. A migração dos timócitos envolve a ligação de VLA-4 e VLA-5 às seqüências CS1 e RGD da FN, respectivamente. Já foi demonstrado que ambos os receptores estão envolvidos na continuidade e no direcionamento do movimento celular (Fig. 1.6) (Crisa et al., 1996). Além da ligação com FN, a integrina $\alpha_4\beta_1$ também se liga a VCAM-1, expressa no córtex. A compartimentalização destes dois ligantes indica que a estrutura tímica deve estar diretamente ligada aos estágios de desenvolvimento dos timócitos (Salomon et al., 1997).

A análise de timócitos humanos mostrou que a maioria das células DN expressa altos níveis de VLA-4 e VLA-5, entretanto, a expressão de VLA5 diminui na população DP. Em contraste, há diminuição da expressão de VLA-4 e aumento da expressão de VLA-5 após a maturação das células em SP. Assim, as interações de VLA-4 com FN e VCAM-1 podem modular a transição das células DN para DP

(Mojcik et al., 1995). Também foi demonstrado que as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ (CD49d/Ly69; LPAM-1), expressas por timócitos DN e a molécula de adesão VCAM-1, expressa pelas cTEC, são críticas para a adesão entre estas células e a migração dos timócitos DN para a região subcapsular (Prockop et al., 2002).

Em camundongos, a expressão de VLA-4 e VLA-5 se mantêm alta nos timócitos imaturos CD25⁺ até a perda completa de expressão deste co-receptor. Nas células DP a expressão destas integrinas é diminuída. Experimentalmente, foi visto em nosso Laboratório, que o uso de anticorpos anti-CD49d afeta a transição das células DN2 para DP (Fig. 1.6) em culturas organotípicas fetais indicando que a alta expressão desta cadeia de integrina coincide com a transição das células DN para DP (Dalmau et al., 1999).

As interações dos timócitos através de isoformas de LN também são reguladas espacialmente e de acordo com o desenvolvimento do timo. Algumas isoformas de LN (lamininas- 1, 2, 4, 10 e 11) foram detectadas nos vasos sanguíneos tímicos e nas células epiteliais, sendo relacionadas à adesão TEC-timócitos e à migração de timócitos nos complexos TNC (Kutlesa et al., 2002; Ocampo et al., 2008). Ensaios de adesão revelaram que os timócitos DN localizados abaixo do epitélio subcapsular aderem fortemente às lamininas 10 e 11, mas não às lamininas 2, 4 e 5. A adesão destes timócitos às lamininas 10 e 11 é mediada pela integrina $\alpha_6\beta_1$ (CD49f/CD29; VLA-6). Durante o desenvolvimento, os timócitos DP localizados no córtex perdem a capacidade de aderir às lamininas 1 e 10. Já os timócitos SP CD8⁺ localizados na medula são capazes de ligar-se à LN-5 expressa pelas mTECs, através da integrina $\alpha_6\beta_4$ (Aumailley et al., 2005; Kutlesa et al., 2002).

Outros ligantes e receptores também participam dos processos de migração intratímica, como o receptor 1 de esfingosina1-fosfato (S1P₁, da língua inglesa, *sphingosine 1-phosphate receptor*). Antes de sair do timo, as células T devem completar a seleção negativa, assim, um dos mecanismos que previne a saída prematura destas células é a regulação da expressão do receptor S1P₁. Foi visto que células T adquirem a habilidade de migrar em direção ao ligante S1P somente no estágio de células SP maduras (CD69^{low}CD62L^{hi}). A expressão do mRNA para S1P₁ aumenta cinquenta vezes entre o estágio DP para o estágio SP imaturo (CD69^{hi}CD62L^{low}) e mais trinta vezes entre o estágio SP imaturo para maduro. As células T deficientes de S1P₁ não conseguem deixar o timo, o que resulta no acúmulo de timócitos maduros (Fig. 1.6) (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004).

Como previamente comentado, as Ephs e ephrinas também podem estar atuando nestes processos migratórios da diferenciação T. Neste sentido, Sharfe e colaboradores (2002) demonstraram que a quimiotaxia induzida por CXCL12 era consistentemente inibida em timócitos co-estimulados com proteínas quiméricas efrina-A/Fc e efrina-B/Fc. Recentemente, novos estudos demonstraram a participação de Ephs e efrinas na diferenciação intratímica de células T (Fig. 1.6) (Munoz et al., 2006; Freywald et al., 2006; Yu et al., 2006; Alfaro et al., 2007; Alfaro et al., 2008; Munoz et al., 2009). Através da utilização de cultivos organotípicos de timos fetais, foi demonstrado que a inibição dos sinais deflagrados por EphBs modifica a proporção das subpopulações de timócitos no dia E17 em camundongos, diminuindo a porcentagem de timócitos DP e aumentando o percentual de timócitos SP, levando ainda a um aumento significativo da apoptose nestas mesmas subpopulações (Yu et al., 2006). Camundongos deficientes em EphA4 apresentam um colapso da rede epitelial cortical que provoca um bloqueio na diferenciação inicial dos timócitos, resultado assim em uma redução no número de células DP, aumento da taxa apoptótica e redução da proliferação celular (Munoz et al., 2006). Outros resultados utilizando cultivos de reagregados ou experimentos de formação de conjugados entre timócitos DP e células epiteliais demonstraram que o tratamento com proteínas quiméricas EphB/Fc e efrina-B/Fc desestabiliza a formação, dependente de TCR, de tais conjugados e desorganiza a rede tridimensional epitelial, ocasionando o encurtamento dos processos epiteliais (Alfaro et al., 2007). Corroborando estes resultados, camundongos deficientes em EphB2 e/ou EphB3 apresentam um aumento da apoptose de timócitos que afeta principalmente os compartimentos DN e DP. Neste sentido, a redução no número de timócitos SP observada nestes camundongos pode estar relacionado ao reduzido número de células DN capazes de sofrer maturação e/ou defeitos no processo de transição DP-SP (Alfaro et al., 2008). A figura 1.6 mostra resumidamente as sinalizações atuantes nas diferentes fases da migração e diferenciação intratímica dos linfócitos T em desenvolvimento.

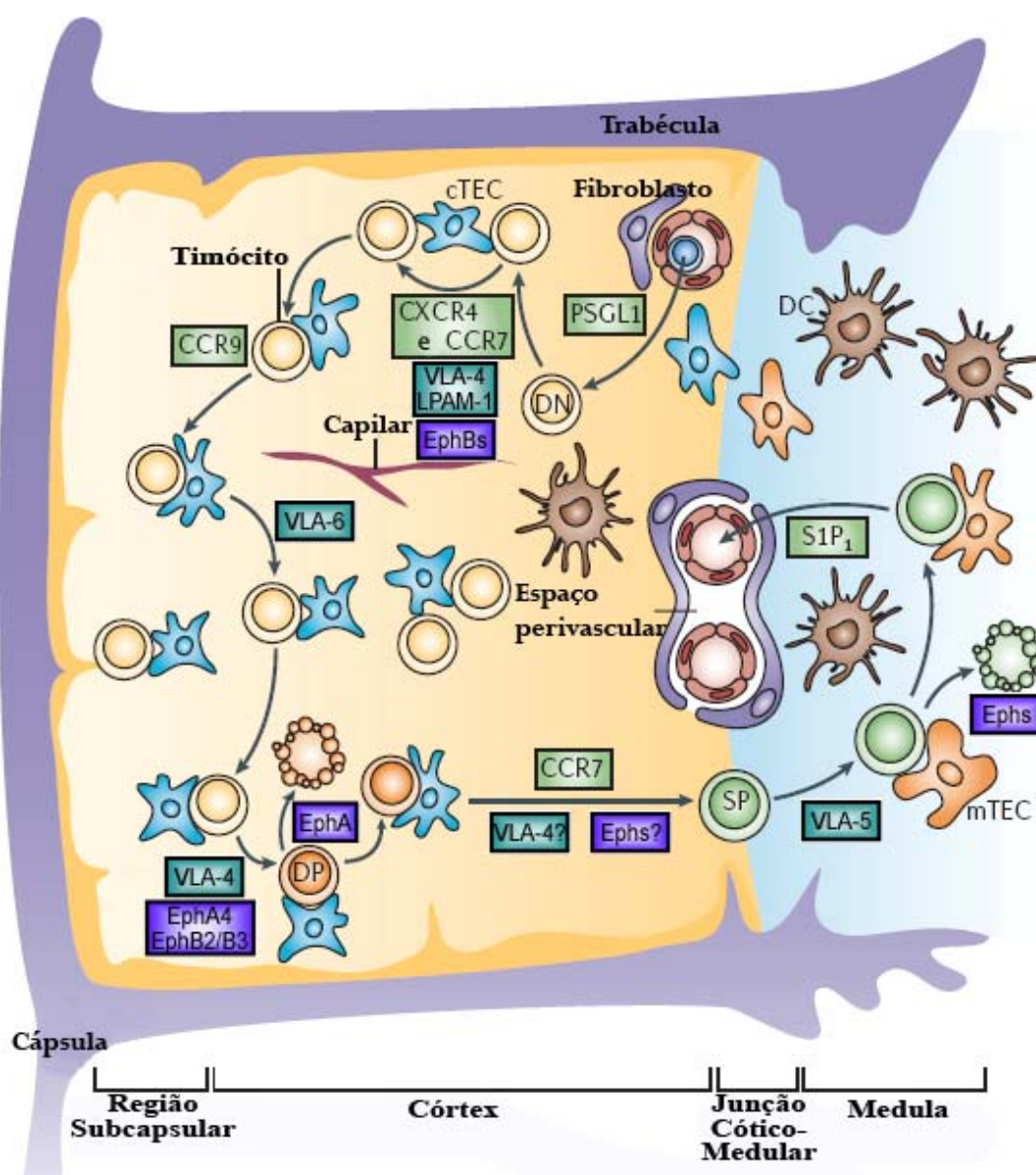


Figura 1.6 - Sinais derivados do microambiente tímico durante o desenvolvimento dos timócitos. As células linfóides que entram no timo seguem uma rota de migração até a região subcapsular e, subseqüentemente, até a medula. Durante este caminho, recebem estímulos provenientes de diferentes moléculas sinalizadoras necessárias para a migração e diferenciação dos progenitores T. Dentre estas moléculas, podemos destacar as quimiocinas e seus receptores, proteínas da matriz extracelular e integrinas, moléculas de adesão celular e seus receptores, Ephs e ephrinas. (Adaptado de Takahama 2006).

1.4 Sinais que modulam o desenvolvimento de células T: uma nova perspectiva

Desde as primeiras publicações de J. F. Miller há cerca de 50 anos, demonstrando as funções imunológicas do timo, muitos trabalhos vêm caracterizando este órgão, seus distintos microambientes e suas formas de atuação em relação ao desenvolvimento de células T e à formação de seu repertório. Entretanto, muitas questões permanecem sem resposta, ou ainda controversas. Dentre elas podemos considerar: Quais os sinais que induzem e regulam os processos de diferenciação intratímica? Todos os sinais citados, e aqueles já detectados, mas não descritos, nas seções anteriores deste trabalho, muito provavelmente, não são suficientes para explicar os múltiplos e complexos processos que ocorrem durante a diferenciação dos linfócitos T (entrada no timo, especificação de linhagens, proliferação, migração, sobrevivência, seleção, divergência de diferentes linhagens T, etc.). Contudo, as recentes descobertas de novas moléculas, que apresentam funções específicas ou que são capazes de modular determinados eventos durante a formação de tecidos e órgãos, têm nos permitido estudar diferentes mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e à formação do repertório de células T.

Neste sentido, várias interações moleculares descritas em outros sistemas ou tecidos podem ser encontradas no sistema imune. Algumas moléculas envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso são também expressas por células do sistema imune (Ephs, efrinas, semaforinas, neuropilinas, slits, netrinas, prion, etc.), sugerindo o envolvimento de mecanismos comuns entre estes sistemas (Teyssier et al., 2001; Wu et al., 2001; Mendes-da-Cruz et al., 2009; Munoz et al., 2009). Em particular, algumas destas moléculas são relacionadas ao processo de migração de timócitos. Resultados recentes de nosso próprio grupo demonstram que neuropilina-1 (NP-1) e seu ligante semaforina-3A (Sema-3A) são expressos por TECs, DCs e timócitos humanos. Funcionalmente, Sema-3A diminui a capacidade adesiva dos timócitos NP-1⁺ e exerce um efeito quimiorrepulsivo nestas células, inibindo ainda a migração induzida por FN e LN (Lepelletier et al., 2007). Outros resultados, utilizando camundongos transgênicos que superexpressam a proteína prion celular (PrP(C)), demonstram que, além da grande hipoplasia encontrada no timo destes animais, existe uma redução na resposta migratória dos timócitos à laminina (Terra-Granado et al., 2007). Além disso, observou-se nesses animais, e também em camundongos nocaute para PRP(C), uma redução na migração dos timócitos frente a FN e LN (Terra-Granado, dados não publicados). No que concerne ao papel de

Ephs e efrinas neste processo, descreveremos com detalhes nossos resultados e conclusões nos capítulos subseqüentes.

Todos os dados discutidos até aqui demonstram que a migração dos progenitores T e timócitos é crucial para o correto desenvolvimento dos linfócitos T. Este processo intratímico de migração envolve sinais bidirecionais, tanto atrativos quanto repulsivos, que estabelecem a direção do movimento. Desta forma, muitos sinais bioquímicos cooperam entre si para permitir ou restringir o movimento celular. Como resultado desta interação, a migração celular pode ser modulada em termos de direção e velocidade, o que definimos como migração multivetorial (Mendes-da-Cruz et al., 2008). Conceitualmente, o vetor resultante que guia o processo migratório é dinâmico, mudando de acordo com a concentração e a combinação de estímulos, e dependente da capacidade das células em responder através de receptores específicos. Assim, o conhecimento dos mecanismos moleculares que envolvem a função de ligantes e receptores, que compõem cada um destes vetores, se faz importante para o entendimento dos processos que guiam o desenvolvimento dos linfócitos T no timo como um todo.

2. OBJETIVOS

A interação entre receptores e ligantes que formam os complexos Eph-efrina é capaz de gerar sinais intracelulares bidirecionais que estão envolvidos na morfogênese de numerosos tecidos, modulando migração celular, determinando o posicionamento celular e organizando os domínios teciduais. Dentre estes, está o sistema imune, onde os receptores Eph e seus ligantes efrinas são expressos e apresentam propriedades regulatórias. Algumas atividades regulatórias de Ephs e efrinas já descritas dentro deste sistema são: participação como moléculas coestimulatórias dos sinais transmitidos pelo TCR; modulação da quimiotaxia de linfócitos B e T; indução ou proteção da apoptose em timócitos; modulação da diferenciação de timócitos; e organização da rede epitelial tímica. Recentemente, o estudo das atividades regulatórias de Ephs e efrinas no sistema imune através de modelos animais geneticamente modificados, tem permitido a caracterização de diferentes vias moleculares moduladas pela ativação dos complexos Eph-efrina. Neste panorama, a utilização de camundongos nocaute para o gene do receptor EphB2 (EphB2^{-/-}) ou ainda, camundongos que expressam uma forma truncada deste receptor (EphB2^{lacZ}), onde a cadeia intracelular é substituída por uma molécula de β -galctosidase (desta forma, este receptor perde a capacidade de ativar sinais intracelulares sem apresentar problemas na interação e ativação de seu ligante) tem servido como uma ferramenta importante para estudos do desenvolvimento de sistemas e órgãos.

Neste sentido, através da utilização de células e tecidos de animais normais e deficientes em sinalizações EphB2, este trabalho procurou identificar novas funções da atividade dos receptores Eph e sua interação com seus ligantes efrina durante o desenvolvimento dos linfócitos T e sua maturação no timo.

De forma mais específica, tivemos como objetivos:

- Determinar a expressão do receptor EphB2 e seus principais ligantes em células progenitoras hematopoiéticas de medula óssea e avaliar sua capacidade em recolonizar lóbulos tímicos alinfóides, utilizando camundongos selvagens, EphB2^{-/-} e EphB2^{lacZ};

- Avaliar se a modulação/interferência na sinalização de EphB2 altera o desenvolvimento de subpopulações de células progenitoras hematopoiéticas e a distribuição/presença de proteínas de ECM e de quimiocinas no timo de camundongos EphB2^{-/-} e EphB2^{lacZ} em diferentes fases do desenvolvimento;
- Caracterizar fenotipicamente as subpopulações de progenitores hematopoiéticos e de tímócitos quanto à expressão de receptores de ECM e de quimiocinas e avaliar o papel da sinalização Eph-efrina como moduladora da migração celular dirigida, utilizando camundongos deficientes e proteínas efrina-B1/Fc.

CAPÍTULO 2

3. ARTIGO 1

Organizing the thymus gland. The role of Eph and ephrins

Manuscrito Publicado:

Muñoz JJ, García-Ceca J, Cejalvo T, Alfaro D, Stimamiglio MA, Jiménez E, Zapata AG. (2009). Organizing the thymus gland. The role of Eph and ephrins. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 14-9.

Justificativa

O estudo das funções desempenhadas pela família de receptores Eph e seus ligantes efrina durante a ontogenia do timo tem sido objeto de recentes trabalhos na área. A caracterização dos perfis de expressão destas moléculas dentro do timo e o estudo dos possíveis papéis desempenhados pelo sistema Eph-efrina neste órgão se faz importante para o entendimento de seu funcionamento como órgão responsável pela maturação e formação do repertório de células T. Este capítulo revisa os numerosos resultados *in vivo* e *in vitro* que confirmam o papel de Ephs e efrinas na maturação do epitélio tímico e na diferenciação de células T, assim como, apresenta novos resultados demonstrando o possível envolvimento de Ephs e efrinas em diferentes estágios da organogênese tímica, que incluem o desenvolvimento do primórdio tímico, a colonização linfóide e as interações TEC-timócitos.

Organizing the Thymus Gland

The Role of Eph and Ephrins

Juan José Muñoz,^a Javier García-Ceca,^a David Alfaro,^a
Marco Augusto Stimamiglio,^b Teresa Cejalvo,^a Eva Jiménez,^c
and Agustín G. Zapata^a

^aDepartment of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

^bLaboratory of Thymus Research, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^cDepartment of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

Eph receptors and their ligands, ephrins, are molecules involved in the morphogenesis of numerous tissues, including the central nervous system in which they play a key role in determining cell positioning and tissue domains containing or excluding nerve fibers. Because common features have been suggested to occur in the microenvironmental organization of brain and thymus, a highly compartmentalized organ central for T cell differentiation, we examined the expression and possible role of Eph/ephrins in the biology of the thymus gland. We reviewed numerous *in vivo* and *in vitro* results that confirm a role for Eph and ephrins in the maturation of the thymic epithelial cell (TEC) network and T cell differentiation. Their possible involvement in different steps of early thymus organogenesis, including thymus primordium branching, lymphoid colonization, and thymocyte–TEC interactions, that determine the organization of a mature three-dimensional thymic epithelial network is also analyzed.

Key words: thymocytes; thymic epithelial cells; Eph; ephrins

The thymus is a highly compartmentalized organ in which lymphoid progenitors mature under the influence of a specialized epithelial cell microenvironment, which has been compared with that present in the brain.¹ It is, therefore, possible to speculate that molecules important for brain development could also be involved in thymus organogenesis.

Among these molecules are the Eph, a family of tyrosine kinase receptors (16 members) known to participate in the topological organization of the developing central nervous system,² and their ligands, ephrins (nine members). Both groups of molecules are divided into two families, A and B, based on sequence similarities of the molecules and ligand bind-

ing preferences. In fact, it is a very promiscuous molecular system in which each Eph and ephrin binds different ligands. Accordingly, different combinations of Eph and ephrin signals result in different behavior of the interacting cells. Furthermore, both the receptors (Eph) and their ligands (ephrins) transmit signals (forward and reverse, respectively) to the molecule-expressing cell, making the system particularly complex. Eph/ephrins are involved in numerous cellular processes, including cell attachment/detachment, migration, positioning, shape, and chemotaxis, and also in more general biological phenomena, such as gene expression, apoptosis, cell proliferation, and cell differentiation.^{3,4}

Over the past few years we have analyzed the expression and possible role played by Eph/ephrins in the biology of the thymus and T cell differentiation. We and other authors have demonstrated that most Eph and ephrins

Address for correspondence: Dr. Agustín G. Zapata, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, C/ José Antonio Nováis 2; Ciudad Universitaria, C.P. 28040, Madrid, Spain. Voice: +34 91 394 49 79; fax: +34 91 394 49 81. zapata@bio.ucm.es

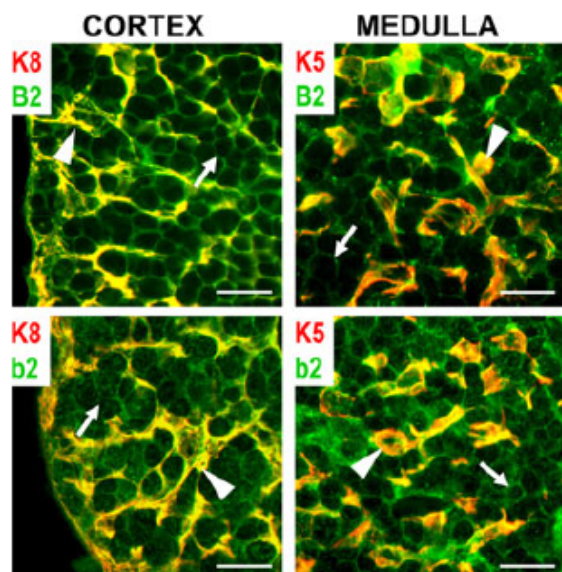


Figure 1. Expression of EphB receptors and ephrinB ligands in mouse thymus. Immunofluorescence detection of EphB2 (B2) and ephrinB2 (b2) on thymus cryosections from adult wild-type (WT) mice. EphB2 and ephrinB2 are expressed on both thymocytes (keratin-negative cells shown by arrows/green cells) and epithelial cells (arrowheads/yellow cells) of thymic cortex (K8⁺ cells) and medulla (K5⁺ cells). Scale bar: 10 μ m. (In color in *Annals* online.)

are expressed in the thymus.⁵⁻⁸ Furthermore, all thymocyte subsets, as well as both cortical and medullary thymic epithelial cells (TECs) from fetal and adult thymus, express Eph and ephrins, especially those of the B family. One thymic cell may, therefore, express several Eph and/or ephrins (Fig. 1).

Blockade of Eph/Ephrin Signaling Differentially Affects the Thymus

With respect to the possible functions of Eph/ephrins in the thymus, we first demonstrated that EphA-Fc fusion proteins blocked *in vitro* T cell differentiation, drastically reducing the numbers of thymocytes, especially those of the double positive (DP) (CD4⁺CD8⁺) cell compartment, in correlation with increased proportions of apoptotic cells. Furthermore, the lack of one or more Eph/ephrins A or B results in hypocellularity, increased numbers of apoptotic cells, and decreased proportions of cycling

cells *in vivo* but affects T cell differentiation differently.

Some authors have reported that the thymi of both EphB6^{-/-} and EphB2^{-/-} mice do not show special changes compared to those of wild-type (WT) mice.⁹⁻¹¹ However, ephrin B1, one of the main ligands of EphB2, has been claimed to be critical for T cell development,^{12,13} and EphB6 overexpression results in the breakdown of the thymic cortex-medulla limits.¹¹ On the other hand, EphA4-deficient mice show a blockade of T cell maturation, exhibiting reduced proportions of DP thymocytes.¹⁴ In this case, we demonstrated that the blockade of T cell development was dependent on the changes taking place in the nonlymphoid thymic microenvironment. Thus, mutant bone marrow lymphoid progenitors normally differentiate in severe combined immunodeficiency (SCID) thymus, but EphA4-deficient alymphoid thymic stroma grafted under the kidney capsule of WT mice and colonized by WT lymphoid progenitors supported defective T cell differentiation with decreased proportions of DP cells.¹⁴ In fact, immunohistochemical analysis of the mutant thymi showed a profound collapse of the cortical thymic epithelial network.

EphB-deficient Mice Show Profound Alterations of the Maturation and Organization of Thymic Epithelial Cells

The lack of EphB2 and/or EphB3 only slightly affected T cell differentiation, resulting in just a slight accumulation of double negative (DN) (CD4⁻CD8⁻) cells but, importantly affected the thymic cell content and the TEC network (Fig. 2) (García-Ceca *et al.*, submitted manuscript) resulting in disorganization of the cortical epithelial network, increased numbers of K5⁺K8⁺ epithelial cells in the thymic cortex, and the presence of K5⁻K8⁻ areas that correlated well with the presence of degenerated TECs but could also be a consequence of

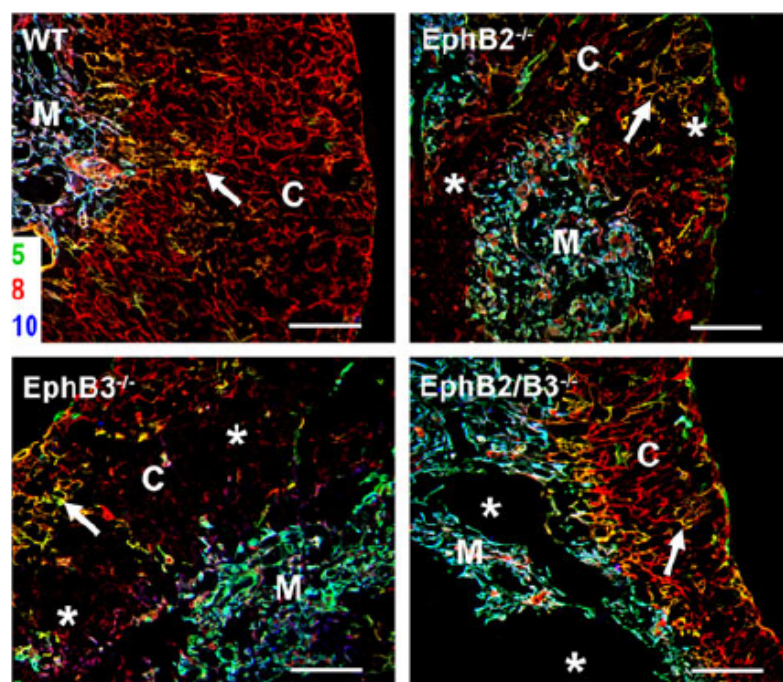


Figure 2. Immunofluorescence study of the thymus of adult WT and EphB-deficient mice. The immunofluorescence analysis was carried out combining specific markers for thymic epithelial cells (TECs) [keratin 5 (5), keratin 8 (8), mouse thymic stromal (MTS)10 (10)]. WT thymi consist of an outer cortex (C), showing largely a K5-K8+MTS10⁻ TEC population (red cells) and a few K5+K8+MTS10⁻ cells (arrow/yellow cells), and a central medulla (M) formed mainly by K5+K8-MTS10⁺ TEC cell population (blue cells). EphB-deficient thymi presented altered distribution and organization of these two compartments as well as important variations in their cell content, including among other features the existence of large K5-K8⁻ areas (asterisks) and increased numbers of cortical K5+K8⁺ cells (arrows/yellow cells). Scale bar: 100 μ m. (In color in *Annals* online.)

downregulated keratin expression and/or altered thymocyte-TEC interactions.

Apart from these remarkable and common changes in the thymic epithelial phenotypes, the deficient thymi showed specific features for every mutant studied. These features began early in thymus ontogeny and became more severe at the end of fetal life and in the neonatal thymus (García-Ceca *et al.*, submitted manuscript), suggesting a role for these EphB in TEC maturation.

Imbalance of Eph/EphrinB Signaling Is Critical for T Cell Development

The balance between the different transmitted signals rather than the presence or ab-

sence of Eph and/or ephrins is determinant, as previously demonstrated in other systems,⁴ for the final phenotype of tissues. Thus, despite the minimal effects observed in EphB-deficient mice on the thymocyte phenotype, important alterations occurred *in vivo* in chimeric thymi generated in SCID mice, expressing Eph and ephrinB as WT mice, that received either WT or EphB-deficient bone marrow lymphoid progenitors (Alfaro *et al.*, manuscript in preparation). SCID mice receiving EphB2^{-/-} lymphoid progenitors show a total blockade of T cell differentiation with an increased percentage of DN (CD4⁻CD8⁻) cells and a severe reduction in DP (CD4⁺CD8⁺) thymocytes. However, SCID thymi colonized by lymphoid progenitors expressing a EphB2 devoid of the cytoplasmic domain but containing an

ectodomain capable of activating ephrinB signaling in ephrinB-expressing cells (EphB2-LacZ mice) supported a maturation of DN thymocytes in the DP cell compartment, although only a small proportion of single positive (SP) (both CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺) cells are formed. Therefore, the absence of EphB2 determines the blockade of T cell maturation at the DN stage, while a signaling reversal, presumably generated by the interactions of EphB2-LacZ-expressing lymphoid progenitors with ephrinB-expressing TECs, allows the progression of DN cells to the DP cell compartment. However, this signal seems to be insufficient to permit progression of the DP thymocytes to the mature SP cell compartment. A forward signal seems to be necessary for the final maturation to SP thymocytes. The condition in the SCID mice injected with EphB3^{-/-} lymphoid progenitors is intermediate with a significant but lesser reduction in the percentage of DP thymocytes. Transmitted signaling through EphB2, therefore, seems to be more important for the maturation of DN thymocytes than those mediated through EphB3. Accordingly, the differentiation of double EphB2/B3-deficient lymphoid progenitors in the SCID thymus exhibits a similar blockade to that observed for EphB2-deficient progenitors.

Together, these results support a role for Eph/ephrins in thymus morphogenesis, controlling cell survival, apoptosis, and cell proliferation and modulating gene expression in both developing thymocytes and TECs. As a result, Eph/ephrins seem to affect TEC development and, to a variable degree, T cell differentiation.

Role of Eph/Ephrins in Early Thymus Ontogeny

Over the last few years, increasing interest for the thymic epithelial stroma has allowed two steps to be recognized in the maturation of thymic epithelium primordium: an early lymphocyte-independent stage and a lymphoid-dependent differentiation after

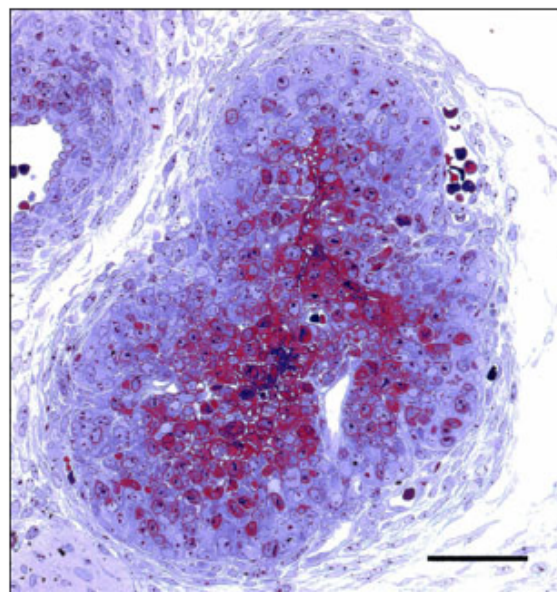


Figure 3. Branching pattern of the thymic epithelium during early development. Histological section of a 12.5-day-old fetal thymic lobe showing a central area (red) exhibiting a branching pattern that will determine the histological compartmentalization of the organ in later stages of development. Scale bar: 100 μ m. (In color in *Annals* online.)

the lymphoid colonization of primordium.^{15,16} The organization of mouse thymic primordium on day 10.5 post coitum is the result of the interaction of the third pharyngeal pouch endoderm with the neural crest-derived mesenchyme.¹⁷ One day later, molecules of the Wnt family activate the transcription factor Foxn1, which induces the maturation of TEC progenitors.¹⁸⁻²⁰ Because very little is known about the histological, cellular, and molecular mechanism governing this first stage of thymus development and because the involvement of Eph/ephrins in the organogenesis of other tissues is clearly established, we have also analyzed the role of EphB in early thymus organogenesis.

At 11.5 days post coitum, when the thymic primordium is still joined to the pharyngeal cavity and most cells already express keratins K5 and K8, the branching of the thymic epithelium, which is folded repeatedly to histologically organize a gland, seems to begin. Thus, as early as 12.5 days post coitum it is

possible to clearly distinguish a branching tree (Fig. 3) that exhibits an incipient $K5^+K8^{-/lo}$ medullary thymic epithelial phenotype in the central area, in the outer zone $K8^+$ cells, and in an enlarged area between the two that still contains numerous presumptive $K5^+K8^+$ epithelial cell progenitors. Accordingly, the commitment to the thymic cortex and medulla seems to be an early process intimately associated with an epithelial branching outgrowth pattern.

Comparative analysis of the thymic epithelial branching in EphB2-deficient mice demonstrates that this follows a general pattern similar to that found in WT mice but the epithelial branches of the mutants exhibit a more compact, almost collapsed, histological organization compared with that of WT mice, suggesting that EphB could also be involved in determining the branching pattern of thymic epithelial parenchyma.

For many years, lymphoid colonization of thymus has been extensively studied although the mechanisms involved are as yet unknown. In this line, we have studied by flow cytometry and confocal microscopy the colonization of dGuo-treated fetal thymic lobes by Lin^- bone marrow cell progenitors from WT EphB2-deficient mice and EphB2-LacZ mice and showed that EphB2^{-/-} but not EphB2-LacZ lymphoid progenitors colonize the alymphoid thymic lobes less efficiently; however, once lymphoid progenitors are inside the thymic parenchyma, the behavior of both EphB2-deficient cells and EphB2-LacZ-expressing thymocytes is similar. In both cases, the cells remain at the periphery rather than scattered at random throughout the parenchyma, as found in lobes receiving WT lymphoid progenitors.

These results demonstrate that different signals mediated through EphB are involved in colonization of the thymic primordium and the intrathymic migration of developing thymocytes; reverse signaling mediated through ephrinB-expressing thymic cells is sufficient to recover the capacity of lymphoid precursors to colonize the thymic lobes but not to control the migration of developing cells throughout

the thymic parenchyma. We are currently analyzing the underlying mechanisms that govern this role of EphB2 in lymphocyte migration to and throughout the thymic parenchyma (Stimamiglio *et al.*, manuscript in preparation) on the basis of the relationship between this family of molecules and both integrins²¹ and chemokines.²²

Finally, once lymphoid progenitors have colonized the thymic primordium, thymocyte-TEC interactions become important for the development of both thymocytes and TECs. In order to evaluate the possible importance of Eph/ephrinB in this process, we tested the effects of ephrinB1-Fc (or IgG-Fc as a control) fusion proteins on the thymocyte-TEC interactions established in re-aggregates (RTOC) constituted by fetal thymic lobes and isolated DP thymocytes.²³ After 24 h, the control RTOC showed a compact organization in which thymocytes were closely associated to the TEC processes that formed a continuous epithelial network. On the contrary, in the RTOC to which ephrinB1-Fc proteins had been added, the epithelial cells appeared rounded without organized keratin filaments in the cell processes and were unable to interact with thymocytes. Accordingly, in the presence of ephrinB1-Fc, thymocytes and TECs are unable to organize a three-dimensional epithelial network housing the developing thymocytes.⁸

These results suggest that Eph/ephrin are key molecules for establishing links between histological organization, topological distribution, and phenotypical differentiation of TEC progenitors and thymocytes. Further studies must focus on confirming the role of Eph/ephrins in the earliest stages of thymus development and to determine both the specific Eph signals involved in every step of TEC maturation and the nature of the molecules associated with Eph/ephrins in the control of all these processes.

Acknowledgments

This work was supported by Grants BFU 2004-03132 and BFU 2007-65520 from the

Spanish Ministry of Education and Science, RD06/0010/0003 from Spanish Ministry of Health and Consumption, and S-BIO/0204/2006 and R74/91 05552/08 from the Regional Government of Madrid.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Mentlein, R. & M.D. Kendall. 2000. The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. *Immunol. Today* **21**: 133–140.
- Goldshmit, Y., S. McLenachan & A. Turnley. 2006. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **52**: 327–345.
- Pasquale, E.B. 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**: 38–52.
- Pasquale, E.B. 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 462–475.
- Munoz, J.J. et al. 2002. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J. Immunol.* **169**: 177–184.
- Vergara-Silva, A., K.L. Schaefer & L.J. Berg. 2002. Compartmentalized Eph receptor and ephrin expression in the thymus. *Mech. Dev.* **119**(Suppl 1): S225–229.
- Wu, J. & H. Luo. 2005. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr. Opin. Hematol.* **12**: 292–297.
- Alfaro, D. et al. 2008. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* **125**(1): 131–143.
- Luo, H. et al. 2004. EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J. Clin. Invest.* **114**: 1762–1773.
- Shimoyama, M. et al. 2002. Developmental expression of EphB6 in the thymus: lessons from EphB6 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**: 87–94.
- Coles, M.C. et al. 2004. The role of Eph receptors and ephrins ligands in T-cell development in the thymus. 12th Int. Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July 18–23. Clin Invest Med56D.
- Yu, G. et al. 2004. EphrinB1 is essential in T-cell-T-cell co-operation during T-cell activation. *J. Biol. Chem.* **279**: 55531–55539.
- Yu, G. et al. 2006. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J. Biol. Chem.* **281**: 10222–10229.
- Munoz, J.J. et al. 2006. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J. Immunol.* **177**: 804–813.
- Manley, N.R. & C.C. Blackburn. 2003. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr. Opin. Immunol.* **15**: 225–232.
- Rodewald, H.R. 2008. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**: 355–388.
- Blackburn, C.C. & N.R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 278–289.
- Blackburn, C.C. et al. 1996. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5742–5746.
- Balciunaite, G. et al. 2002. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* **3**: 1102–1108.
- Su, D.M. et al. 2003. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat. Immunol.* **4**: 1128–1135.
- Sharfe, N. et al. 2008. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol.* **45**: 1208–1220.
- Sharfe, N. et al. 2002. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur. J. Immunol.* **32**: 3745–3755.
- Alfaro, D. et al. 2007. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur. J. Immunol.* **37**: 2596–2605.

CAPÍTULO 3

4. ARTIGO 2

EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T-cell precursors

Manuscrito submetido à publicação *Nature Immunology*.

Stimamiglio MA, Jiménez E, Silva-Barbosa SD, Alfaro D, García-Ceca J, Muñoz JJ, Cejalvo T, Savino W, Zapata AG. (2009). EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T-cell precursors. *Nat Immunol*, submetido.

Justificativa

Os complexos formados por receptores e ligantes do tipo Eph/efrina representam um conhecido sistema de comunicação celular caracterizado como regulador do desenvolvimento de sistemas e órgãos através da modulação de diferentes atividades celulares. Dentre estas estão: a migração e o posicionamento celular órgão-específico; a adesão e desadesão das células a nichos específicos; a sobrevivência/proliferação e a diferenciação celular. No que diz respeito ao timo, trabalhos recentes têm demonstrado importantes alterações na rede formada pelas células epiteliais e uma profunda hipocelularidade no timo de camundongos deficientes em diferentes receptores Eph ou ligantes efrinas. Além disso, estas alterações são seguidas por distúrbios na diferenciação dos timócitos e pela modulação da sobrevivência e proliferação celular. Devido à participação deste sistema de comunicação celular em diferentes aspectos da biologia do timo e sua conhecida função como modulador da migração celular, descrevemos neste capítulo seu papel como sistema regulador da migração e entrada de precursores provenientes da medula óssea ao timo, bem como na migração timócitos em diferentes fases do desenvolvimento.

EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T-cell precursors

Marco Augusto Stimamiglio^{1,3}, Eva Jimenez*², Suse Dayse Silva-Barbosa^{3,4}, David Alfaro¹, José Javier García-Ceca¹, Juan José Muñoz¹, Teresa Cejalvo¹, Wilson Savino³, Agustín Gregorio Zapata¹*

¹Department of Cell Biology, Faculty of Biology; ²Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, University City, 28040, Madrid, Spain; ³Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Ave. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil; ⁴Center for Bone Marrow Transplantation, Brazilian National Cancer Institute, Praça Cruz Vermelha, 23, Centro, Rio de Janeiro, Brazil.

* M.A.S. and E.J. contributed equally to this work.

Corresponding Author:

Dr. Agustín G. Zapata,

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, C/ José Antonio Novais 2; Ciudad Universitaria, C.P. 28040, Madrid, Spain. Phone number: +34 91 394 49 79. Fax number: +34 91 394 49 81.

E-mail address: zapata@bio.ucm.es

Key words: Thymus, thymocytes, hemotopoietic progenitors, Eph, ephrins, migration

Abstract.

Ephrin-Eph ligand-receptor pair is known to control repulsion/adhesion process in the nervous tissue. Recently, a role for this interaction in the immune system has been reported. Herein, we evaluated the role of the tyrosine kinase receptor protein EphB2 in T-cell precursor migration during thymus colonization and under with extracellular matrix proteins or chemokine stimuli. EphB2 and its main ligands, ephrin-B1 and ephrin-B2, are expressed in bone marrow-derived progenitors and EphB2^{-/-} cells had a diminished thymus colonization capacity, indicating a cell autonomous role of EphB2 expressed on these cells. Conversely, EphB2^{LacZ} cells that maintain a preserved ephrin-binding domain were capable to colonize the thymus similarly to WT progenitors, highlighting the importance of the reverse signal transmitted to thymic microenvironmental cells. Moreover, EphB2 receptor present in thymic cells seems to play a role on progenitor immigration capacity since recolonization of EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} fetal thymic lobes was compromised. Additionally, we observed a significantly lower deposition of extracellular matrix (ECM) proteins and chemokines on these mutant thymuses. Migration of EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} bone marrow-derived progenitors and thymocytes was also reduced through ECM or chemokine stimuli, suggesting an EphB2-mediated ECM or chemokine receptor activation defect in these cells. Furthermore, ephrin-B1 costimulation inhibits haptotaxis and chemotaxis of wild type, but not EphB2^{LacZ} cells demonstrating the involvement of EphB2 signaling on T-cell precursor migration. In conclusion, our data place EphB2-mediated interactions as key players in migration of T-cell precursors into the thymus and within the organ.

Introduction

Ephrin-Eph ligand-receptor pair comprises a cell communication system known to participate in a wide array of developmental processes, regulating morphogenesis of different tissues, cell migration and positioning, cell attachment/detachment, survival and differentiation^{1,2}. Both Eph and Ephrins are divided into two families, A and B, based on: gene sequence similarities and ligand binding preferences. EphA (10 members) bind GPI-anchored ligands, the Ephrin A (6 members) whereas EphB (6 members) bind transmembrane proteins, the Ephrin B (3 members). Each Eph kinase can bind several Ephrins and vice versa and both Eph and ephrins signal bidirectionally into Eph-expressing cells (forward signalling) and ephrin-expressing cells (reverse signalling)^{1,3}. We⁴⁻⁷ and other authors⁸⁻¹⁰ have demonstrated the important regulatory functions of Eph-ephrin family members in the thymus biology. Thus, EphB2 and/or EphB3-deficient mice show profound alterations in the thymic epithelial cell (TEC) network that begins early in thymus ontogeny and becomes more severe with development⁶. These changes have been shown to be accompanied by slight alterations in thymocyte differentiation, largely affecting the CD4⁻CD8⁻ (DN) cell compartments⁷. In addition, the thymus of these mice shows a marked hypocellularity, which appears to be associated to increased apoptosis of thymocytes^{4,5,7,9,10} and thymic epithelial cells (TEC)⁶. Nevertheless, other factors including the thymic colonization by bone marrow-derived precursors could also determine the marked thymic hypocellularity observed in EphB2 deficient mice.

All these data taken into account, together with the broadly involvement of EphB2 in migration process, prompted us to study the role of EphB2 during fetal thymus colonization by lymphocyte progenitors.

It is known that during thymus ontogeny lymphocyte progenitors coming from hematopoietic stem cell sources (i.e. bone marrow, fetal liver) enter the thymus and differentiate into mature thymocytes¹¹. Several bone marrow (BM)-derived progenitors have been described as potential thymus-homing precursors and the most immature of these progenitors is termed LSK (Lin⁻SCA-1⁺KIT^{hi})¹². Downstream of this population, other stages of differentiation have been described, including the common lymphoid progenitors (CLP; Lin⁻SCA-

$1^{\text{low}}\text{KIT}^{\text{low}}\text{IL-7R}\alpha^+$), which were initially identified as possessing only lymphoid potential¹³. The migration of these lymphocyte progenitors into the thymic parenchyma is the first step of intrathymic T cell development and the subsequent orchestrated migration of developing thymocytes through distinct thymic epithelial microenvironments is essential for their proper differentiation¹⁴. However, the mechanisms involved in these key steps of T cell development are not completely understood and have been shown to include a wide network of signaling molecules. In this regard, it has been suggested that chemokines (i.e. CCL19, CCL21, CCL25 and CXCL12) and diverse adhesion molecules (i.e. $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ integrins, CD44) play essential roles in the migration of progenitors during fetal thymus colonization¹⁵⁻¹⁸. Nevertheless, one can expect that such process is under a broader control that comprises yet unknown molecular interactions. Accordingly, we recently proposed that intrathymic T-cell migration is a multivectorial event, resulting from the various attractive and repulsive signals that developing thymocytes are exposed to¹⁹.

The function of Eph-ephrin signaling as modulators of cell migration and establishment/remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions have been studied³. The bi-directional signals transmitted by Eph-ephrin complexes are known to control cell adhesion and migration by activate intracellular signaling molecules or even by regulating the activity of other surface receptors⁴. In agreement with this, EphB2 receptors are shown to reduce cell adhesion by down-regulating integrin activity²⁰. Additionally, chemokine-driven cell migration can be impaired by ephrin stimulation of Eph receptors²¹. However, increase of cell adhesion and migration could also be promoted, depending on the context of Eph-ephrin interactions²².

Herein, we analyzed the possible participation of EphB2 in thymic colonization by bone marrow precursors, as well as in the migration of developing thymocytes.

Our results demonstrate cell autonomous and non-autonomous roles for EphB2 in thymus settling progenitors. The lack of EphB2 in BM progenitors or TEC prevents the correct thymus colonization and progenitor settling on the thymic microenvironment, whereas a conserved ephrin-binding domain on EphB2 receptors was able to rescue colonization capacity but not intrathymic cell

migration of thymic progenitors. Moreover, migration of BM progenitors and thymocytes seems to be modulated by cross-regulation between EphB2 and integrins or chemokine receptors since co-stimulation of EphB2 receptor signaling in ECM or chemokine-driven systems was shown to consistently reduce cell migration.

Results

EphB2 receptor and its ligands are expressed in bone marrow-derived progenitors

Since we have previously demonstrated the expression of EphB2 and its ligands, ephrinB1 and ephrinB2, in thymic lymphoid and epithelial cell subpopulations⁷, we checked their expression in bone marrow-derived precursors. To this purpose, RT-PCR analysis was performed on RNA extracted from total bone marrow cells and purified lineage negative (Lin⁻; B220⁻, Gr-1⁻, CD11b⁻, CD3e⁻, Ter119⁻) progenitors. We noticed that EphB2, ephrin-B1 and ephrin-B2 mRNAs were expressed in total BM cells as well as in Lin⁻ progenitors from adult mice (Fig. 1A).

EphB2 mutant mice present normal proportion of common lymphoid precursors in their bone marrow but reduced capability to colonize the thymus

A deficient differentiation of the BM precursors could be responsible for a reduction in the precursors arriving the thymus. However, we found that both EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} mice have normal proportions of the LSK (Lin⁻SCA-1⁺KIT^{hi}) and common lymphoid precursors (CLP; Lin⁻SCA-1^{low}KIT^{low}IL-7R α ⁺) (Fig. 1B) indicating that possible alterations on EphB2 mutant precursors in colonizing the thymus is likely due to directly participation of EphB2 signaling in the process. Accordingly, we carried out fetal thymus recolonization assays with Lin⁻ BM progenitors from wild type (WT), EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} deficient mice in order to determine their functional ability to colonize the thymic lobes. We found

that EphB2^{-/-} progenitors had a diminished thymus colonization capacity in comparison with WT progenitors (Fig. 1C). By contrast, EphB2^{LacZ} progenitors (that maintain a preserved EphB2 ectodomain and the capacity to interact with its ligands) were capable to colonize fetal thymus, similarly to WT progenitors (Fig. 1C). These results point to the cell autonomous role of EphB2 expressed on BM precursors and the importance of the reverse signal through the thymic microenvironmental cells activated by the EphB2^{LacZ} ectodomain.

In order to analyze a possible cell non autonomous role of this EphB2 receptor present in the thymus microenvironment, we evaluated the recolonization of EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} fetal thymic lobes. Remarkably, we found a prominent decrease of the thymus immigration capacity of all the studied BM progenitors, significantly more important from that using WT fetal lobes (Fig. 1C), indicating the importance of EphB2 expressed on TEC in the colonizing process, independently of the used BM precursor cells. Furthermore, the lack of EphB2 in both thymic components has additive effects since colonizing capability was even more reduced in both mutant lobes colonized with EphB2^{-/-} precursors, but not in those lobes recolonized with EphB2^{LacZ} which enter in the WT lobes in a normal rate (Fig. 1C).

To further confirm these data and to compare the capacity of progenitors to colonize the same fetal thymic niches, we performed a competition assay with WT and mutant progenitors, stained with CFSE and PHK26 respectively, recolonizing the same lobes simultaneously in a 1:1 proportion (Fig. 1D). The progenitors were yielded with the thymic lobes in hanging drop cultures during 20 hours, which reduces the variation caused by proliferation, differentiation or cell death, as in previous experiments. Furthermore, a flow cytometry analysis showed that the two cell subpopulation present in the liquid of the hanging drop after recolonization period showed opposite variation than the ones found inside the lobe, indicating that the migration process did occur (data not shown). This experiment confirmed the reduced thymus colonization capacity of EphB2^{-/-} progenitors to WT lobes, as well as the mutant ones. With this approach, we also demonstrated that under competition situation the EphB2^{LacZ} progenitors presented immigration capacity disadvantages compared with WT progenitors through the mutant microenvironment (Fig. 1D).

Settling of hematopoietic progenitors into fetal thymus is regulated by EphB2

There is accumulating evidence that the precursors have to reach the appropriate thymic niches to receive specific signals for their survival, proliferation and differentiation²³⁻²⁴. To determine whether this process is influenced by EphB2 receptor signaling, we compared the positioning of EphB2 mutant and WT hematopoietic progenitors in 20h reconstituted thymic lobes. To this purpose, EphB2 mutant or WT fetal thymic lobes, reconstituted by combinations of CFSE stained WT progenitors and PKH26 stained WT or EphB2 mutant progenitors, were analyzed by confocal microscopy. The number and location of such progenitors within the reconstituted lobes were analyzed in a broad range of scanned stacks and the thymic lobes were subdivided for analysis in a central and a peripheral area (Fig. 2A). Corroborating our previous results, the analysis of whole WT reconstituted thymic lobes demonstrated a reduced number of PKH26 stained EphB2^{-/-} progenitors in comparison with CFSE stained WT progenitors, whereas the numbers of EphB2^{LacZ} and WT progenitors were similar (Fig. 2B). Positioning analyses revealed that both EphB2^{-/-} as well as EphB2^{LacZ} progenitors were preferentially settled in thymic peripheral area, in comparison with the uniform distribution of WT progenitors (Fig. 2B), suggesting a failure of both EphB2 mutant progenitors to migrate and settle in appropriate fetal thymic central niches. Overall, these findings show that in addition to the profound reduction of settling progenitors there is a reduced number of EphB2 mutant progenitors in the central area of the thymic lobes in comparison with WT progenitors, and a competition disadvantage of EphB2^{LacZ} cells (Figs. 2C-D).

EphB2-deficient mice present decreased thymus expression of extracellular matrix molecules and chemokines

The above described results demonstrated that the EphB2 mutant microenvironment is responsible for an important reduction in the colonizing abilities of all the precursors tested, including those derived from normal animals. It has been widely reported the role of the ECM proteins, laminin and

fibronectin, as well as the chemokines CXCL12, CCL21 and CCL25 in thymus colonization and T-cell progenitor migration^{15,16,25,17,18}. We then analyzed if these molecules present a modified pattern of expression in the EphB2 mutant thymus. To this purpose, we compared offsprings at the embryonic day 15 (E15) from heterozygous parents. *In situ* immunohistochemistry of deficient thymuses revealed a significantly lower deposition of almost all the molecules studied in comparison with WT littermate controls. This decrease was significantly different as ascertained by computer-based quantification (Figs. 3A-B). In contrast, the expression of CXCL12 in EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} mutant E15 thymuses was not changed.

To further evaluate the course of the observed phenotype in the fetal EphB2 mutant thymuses we searched for possible alterations in adult mutant mice. In the adult, EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} thymuses also exhibited a decreased deposition of all studied molecules in comparison to controls (Figs. 4A-B). In addition, the combination of specific reagents for detecting either ECM or chemokines and cytokeratin-8 allowed the expression of those molecules to be determined in both cortical and medullary thymic regions.

EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} thymuses showed a significant decrease in the laminin and fibronectin contents, in both cortical and medullary regions, with a rather weak density in the thymus capsule. The reduced deposition of fibronectin in the EphB2^{-/-} thymus was proportionally much more severe in the cortical compartment whereas decreased laminin deposition was more clear-cut in the medulla of thymic lobes (Figs. 4A). In accordance with previous reports demonstrating thymic medullary expression of CXCL12 and CCL21 in different mouse strains²⁶, we showed that the medullary expression of CXCL12 in both EphB2 mutant thymuses had a slight reduction, in comparison to controls, whereas the expression of CCL21 was clearly reduced. Moreover, the chemokine CCL25 was expressed in cortical and medullary regions, with proportional decrease in both thymic compartments of EphB2 mutant mice (Figs. 4B).

EphB2 deficient T-cell progenitors exhibit decreased migratory responses

To further determine whether EphB2 participates in T-cell progenitor migration, we submitted freshly isolated thymocytes or Lin⁻SCA-1⁺KIT⁺ BM progenitors (BMP) to ECM or chemokine-driven migration on a transwell system. EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} BMP exhibited lower transmigration capacity than WT cells in all haptotactic (laminin or fibronectin membrane coating) or chemotactic (CXCL12, CCL21 or CCL25) stimuli tested. Actually, EphB2^{-/-} BMP exhibited an even lower chemotactic response through the CXCL12 and CCL21 stimuli than the corresponding EphB2^{LacZ} BM precursors (Figs. 5A-C).

The EphB2 receptor could be involved in the later migration and positioning of the thymocytes within the organ. We then carried out the same experiments observing thymocyte subpopulation response. Total EphB2 mutant thymocytes were less efficient in migrate through laminin, fibronectin or towards CXCL12, CCL21 or CCL25 than WT thymocytes. In addition, total thymocyte populations had equivalent migration profiles through ECM stimuli in both mutants, which was in contrast with chemokine-driven migration, where EphB2^{-/-} thymocytes showed the lowest migratory responses (Figs. 5B-D). When examining the migratory capacity of CD4/CD8-defined thymocyte subsets, overall we observed similar differences to those seen in the bulk population. For EphB2-deficient double negative (DN) thymocyte subsets, defined for the expression of CD117, CD44 and CD25, ECM-driven migration was reduced in comparison with WT controls, particularly in more mature stages, whereas CCL21 and CCL25-driven migration was reduced essentially in the more immature DN subsets (i.e. DN1 and DN2 subpopulations). These results are summarized in tables I and II.

EphB2-mutant BM progenitors exhibit normal expression levels of extracellular matrix and chemokine receptors.

We further studied the expression of ECM receptors (VLA-4, VLA5 and VLA6) and chemokine receptors (CXCR4, CCR7 and CCR9) on hematopoietic progenitor subsets from EphB2^{-/-}, EphB2^{LacZ} and WT mice, aged 6-8 weeks, as well as the different thymocyte subpopulations. Membrane levels of all analyzed receptors did not change on thymocyte subpopulations and hematopoietic

progenitor subsets, studied in EphB2 mutant mice in comparison with WT controls (Tables III and IV).

Although the EphB2 mutant cells present no modified expression of integrins and chemokine receptors, it is broadly known that the functionality is also dependent of their activation level²⁷ and it could be modified by the total or partial absence of the EphB2 receptor^{20,4}. The evidence provided herein clearly point to an EphB2-mediated ECM or chemokine receptor activation defect in T-cell progenitors.

Ephrin-B1 stimulation modulates ECM or chemokine-driven migration in normal thymocytes and BM precursors through EphB2 forward signaling

Because EphB2 mutant thymocytes and bone marrow precursors (BMP) showed decreased ability to migrate through ECM or chemokine-driven stimuli, and considering that this effect could be mediated by the lack of EphB2, we searched whether the induction of EphB signaling could modulate such migration patterns. For that purpose, 5µg/ml ephrin-B1/Fc fusion protein was additionally coated to ECM or chemokine-driven transwell system to mimic their membrane-bound nature *in vivo*, inducing promiscuous EphB receptor activation, as described elsewhere²¹. We noticed that EphB stimulation in ephrin-B1/Fc coated inserts inhibited laminin or fibronectin-driven migration of WT-derived BMP by approximately 50% and 70%, respectively (Fig. 6A). Inhibition of haptotaxis appeared at 5µg/ml of immobilized ephrin-B1/Fc proteins and reached a plateau with higher concentrations (data not shown). Of note, in control situations where BSA was used as a haptotactic negative control, ephrin-B1/Fc-induced signaling did not change migratory responses (data not shown), suggesting a specific role of EphB signaling in modulating ECM-driven migration. In addition, blocking EphB signaling by preincubating the cells with the soluble form of ephrin-B1/Fc fusion protein restored migratory responses of BMP to ECM stimuli (Fig. 6A).

It should also be pointed out that the blockade of EphBs signaling with soluble ephrin-B1/Fc to the medium without ephrin stimuli (no ephrin-B1/Fc coated

inserts) did not alter cell migration responses in control experiments (data not shown).

To further investigate the involvement of EphB2 forward signaling in ECM or chemokine-driven migration, we tested migration responses of EphB2^{LacZ} BMP in the same system. These EphB2^{LacZ} progenitors were able to bind membrane-coated ephrin-B1/Fc ligands through other EphB receptor or the conserved EphB2 receptor extracellular domain, but with the lack of EphB2 kinase cytoplasmic domain, resulting that EphB2^{LacZ} BMP failed to induce an intracellular forward signaling. We found that, despite their reduced migration capacity showed above, EphB2^{LacZ} BMP did not exhibit a diminished migration response to ECM stimuli when co-stimulated with ephrin-B1/Fc proteins as did WT controls, demonstrating the specific involvement of EphB2 forward signaling in this process (Fig. 6B).

The ability of the ephrin-B1/Fc-driven stimulus to modulate ECM-induced migration was not limited to BMP, and similar results were seen for thymocyte migration (Figs. 6C-D), in all CD4/CD8-defined subsets. In addition, it was true for almost all CD44/CD25-defined thymocyte subsets, with exception of DN1 thymocytes for laminin-driven migration and DN1/DN2 cells for fibronectin-induced responses (Tables V and VI).

Lastly, we investigated whether EphB signaling could modulate chemokine-driven migration. We showed that ephrin-B1/Fc stimulation blocked, almost totally, chemotaxis driven by the chemokines CXCL12, CCL21 and CCL25 (Fig. 7). Furthermore, although this blockage was observed in all thymocyte subsets, it was less pronounced in DN thymocytes (Table VI). Once again, blocking ephrin-B1/Fc stimulus by preincubating the cells with the soluble form of ephrin-B1/Fc fusion proteins restored cellular migratory responses (Fig. 7).

Discussion

Growing evidence point to a role of Ephs and ephrins during T-cell development⁸⁻¹⁰. We reported a profound thymic hypocellularity in EphB2-deficient mice, caused by a partial differentiation blockage, and altered survival and proliferation rates of the differentiating lymphocytes⁷. Furthermore, we

unraveled the importance of bidirectional signaling transmitted by EphB2 receptor for correct T-cell development and the disturbed thymic functions in EphB2 mutant mice^{7,28}. Herein, we demonstrated that the lack of EphB2 in BMP or TEC prevents the correct colonization of the thymus, as well as thymocyte migratory responses.

We first showed that the EphB2 receptor, as well as its main ligands, ephrin-B1 and ephrin-B2, are constitutively expressed in Lin⁻ BMP. Considering the expression of EphB receptors and ligands in thymic epithelial cells⁷, it is conceivable that these molecules regulate cell interactions during migration and positioning of T-cell precursors in the thymus, as reported during development of other tissues^{29,1}.

We checked the involvement of EphB2 signaling in modulating cell migration during fetal thymus colonization, by challenging Lin⁻ BMP to colonize alymphoid fetal thymic lobes. Both progenitors and thymuses were obtained from EphB2 normal and mutant mice, which prompted us to search firstly for a possible altered development of BMP. Since the precise identity of the progenitors settling the thymus from the blood remains unknown¹³, we analyzed BM LSK cells, that comprises the most immature hematopoietic progenitors, and CLP cells, both potential T-cell precursors¹². We showed that both EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} mice have normal proportions of such BMP populations. A role for Eph signaling in maintenance of stem cell pools have been reported in different systems, some of which showing unchanged profiles as reported to intestinal crypts from EphB2 and EphB3 mutant mice³⁰, and others promoting reduced amounts, as seen in the hippocampus of mice lacking EphB1 and/or EphB2³¹. Such unchanged BMP proportions seen in EphB2 mutant mice allowed us to study the participation of EphB2 signaling using thymus recolonization assays, although an altered release of those progenitors from BM niches could be occurring in physiological conditions of EphB2 mutant mice. We showed that the lack of EphB2 on BMP reduced the cell migration capacity towards thymic lobes, demonstrating an autonomous role for EphB2 in thymus settling progenitors. However, targeted expression of a truncated EphB2-β-gal fusion protein (EphB2^{LacZ} progenitors) rescued this migratory response. The recovered capacity to settle the thymus seen in EphB2^{LacZ} progenitors, that conserve a

functional extracellular domain, indicate an important role for the reverse signaling induced in TEC. Previous reports have claimed the relevance of reverse signals for the biological functions of EphB2³²⁻³⁵, including cell migration. In the same way, we previously observed that EphB2^{LacZ} thymocytes overcome the arrest of EphB2^{-/-} thymocytes in the DN to DP differentiation in a SCID chimeric system (Alfaro *et al.*, unpublished)

It is noteworthy that during intrathymic T-cell maturation there is a requirement of several time-dependent signaling events modulated by cell-cell and cell-ECM contacts²⁵ that may allow the transmigration of T-cell progenitors towards specific thymic niches. It is possible that the ephrin reverse signaling trigger changes on TEC interactions allowing the entry of lymphocyte progenitors into the thymic microenvironment. In this respect, the role of ephrin reverse signaling as modulator of cell-cell interactions (i.e. cytoskeletal organization and morfological changes, cell activation, adhesion, migration) has been described in other systems, as neuron-astrocyte, astrocyte-meningeal fibroblast, and endothelium-leukocyte interactions³⁶⁻³⁹. Furthermore, we demonstrated the participation of ephrin-B reverse signaling during TEC-thymocyte interactions and the blockade of this association when EphB2/Fc fusion proteins (that prevent ephrin-B signaling) was added to the system⁷.

Despite the autonomous role for EphB2 receptors seen in lymphoid progenitor cells that migrate towards a normal thymic microenvironment, we noticed a huge impairment of BMP migration to EphB2 mutant thymus, even when WT-derived progenitors were applied. This result indicates that EphB2 expressed in TEC exerts a cell non autonomous role on progenitor cell migration. Additionally, the decrease in WT progenitor entry in EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} lobes is similar, indicating that the effect is due to the TEC EphB2 forward signal. In this regard, we observed that EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} thymic lobes grafted under the kidney capsule of WT mice, present an important reduction in the number of WT differentiating thymocytes compared with the WT lobes (Garcia-Ceca *et al.*, unpublished), supporting the cell non autonomous role of the TEC EphB2 and its forward signal.

Differing from the results obtained in non competitive experiments, competitive migration of EphB2^{LacZ} progenitors into EphB2 mutant lobes was reduced when

compared to WT progenitors, indicating a diminished ability of EphB2^{LacZ} progenitors to reach specific thymic niches. Moreover, such impaired migration was even worse when EphB2^{-/-} progenitors were challenged to repopulate mutant thymuses. Overall, these results suggest that the impairment of migration caused by EphB2 lack on BMP and TEC could have additional effects.

It is known that during thymus ontogeny immigrating progenitor cells interact with the thymic microenvironment through a coordinate cascade of molecular mechanisms that involve chemotactic attraction of progenitors and subsequent adhesion to microenvironmental cells and extracellular matrix molecules⁴⁰.

Next, we evaluated if EphB2 mutant thymuses could show a compromised deposition pattern of ECM molecules and chemokines that might corroborate with the noticed thymic impaired colonization. We showed an important decrease of some ECM proteins and chemokines in the fetal and adult thymuses of these animals. Nevertheless, the expression of integrins and chemokine receptors studied was not changed in T-cell progenitors (i.e. bone marrow Lin⁻ cells and thymocytes) of EphB2 mutant mice, suggesting that Eph signaling cross-regulates the activation of these cell migration-related receptors, as reported elsewhere^{20,2}.

It has been shown that Eph-ephrin signaling regulates adhesion/attraction or de-adhesion/repulsion processes, including for TEC-thymocytes interactions^{5,7,1}. Actually, we showed that migration through ECM proteins or towards chemokine stimuli was consistently reduced in both EphB2 mutant Lin⁻ bone marrow progenitors and thymocytes, indicating that the lack of EphB2 receptor, or its cytoplasmic domain, abrogates cell migration driven by haptotactic and chemotactic stimuli, possibly by the lack of integrin or chemokine receptor cross-talk with EphB2 receptors. In fact, previous reports have described physical association or costimulation between Eph receptors and integrins⁴¹ or chemokine receptors⁴². Furthermore, ephrin-B1 costimulation promoted the inhibition of ECM- and chemokine-driven migration of BMP and thymocytes, as previously shown for other models^{44,21,45}.

Interestingly, a similar down-regulating effect upon ECM- and chemokine-mediated thymocyte migration was seen in relation to semaphorin-3A^{46,47}, raising the notion that multiple de-adhesion promoting ligands play a role in migration of T-cell precursors.

In conclusion, our data place EphB2-mediated interactions as key players in migration of T-cell progenitors into the thymus and within the organ. We recently proposed that developing T-cell migration is likely a multivectorial process, involving several molecular interactions¹⁹. In this respect, EphB2-mediated signals can be placed as further players in the process, acting on both developing T-cells and the microenvironment counterpart.

Methods

Animals

EphB2-deficient and EphB2-LacZ mice in a CD-1 background were provided by Dr Mark Henkemeyer (University of Texas, Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX). Their generation and genotyping has been previously described³². The EphB2LacZ cells, which express an intracellular truncated form of EphB2 fused to β -galactosidase, are unable to transmit classic forward signals but retain some of its signaling properties by presenting phosphotyrosine residues to cytoplasmic effector molecules. Through its conserved extracellular domain, this truncated EphB2 receptor is able to induce reverse signals on neighboring ephrin-B-expressing cells⁴³.

Additional wild type (WT) CD-1 mice were obtained from Charles River Laboratories, MA, USA. All animals were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the Complutense University of Madrid Animal Care Facility. Fetuses were obtained from timed mating females. The day of vaginal plug detection was designated as day E0.5. Offsprings from heterozygous parents were used in immunohistochemistry experiments.

Cell isolation and flow cytometry analysis

Bone marrow cells (BMC) and thymocytes were isolated according to standard protocols from 6 to 8-wk-old WT and EphB2 mutant mice. In brief, mononuclear BMC were obtained by flushing femur and tibia with RPMI/10% FCS/5mM EDTA and a subsequent Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) density gradient centrifugation according to supplier's instructions. BMC were incubated in a cocktail of predetermined optimal concentrations of lineage specific biotin-conjugated antibodies to B220, Gr-1, CD11b, CD3e and Ter119 (BD Bioscience, San Diego, USA), followed by a bead-conjugated anti-biotin antibody (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). Lineage-negative cells (Lin^-) were enriched by negative magnetic selection in an AutoMACS (Miltenyi Biotec), reaching >95% purity. After washing, Lin^- cells were stained with antibody cocktails for LSK progenitors ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{IL-7R}\alpha^-$) or common lymphoid progenitors (CLP; $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{low}} \text{c-kit}^{\text{low}} \text{IL-7R}\alpha^+$).

Thymocyte cell suspensions were prepared by gently pressing thymic lobes. Cells were washed in cold medium (RPMI/5% FCS) and subsequently submitted to immunofluorescence staining with specific antibodies against CD4, CD8 α , TCR β , CD25, CD44, CD117 and Lin cocktail (BD Biosciences), labeled with either FITC, PE, PerCP-Cy5.5 or APC. Additionally, thymocyte subsets as well as LSK and CLP bone marrow subsets were phenotyped for the expression of VLA-4, VLA-5, VLA-6 (BD Bioscience), CXCR4, CCR7 and CCR9 (eBioscience, San Diego, USA); specific antibodies being all labeled with PE.

Cell staining was performed according to routine procedures for 20 min in phosphate-buffered saline (PBS) 1% FCS with specific mAbs or appropriate Ig isotype controls (BD Biosciences). After staining, cell suspensions were washed and resuspended in PBS for analysis. Flow cytometric analyses were performed using a FACSCalibur device (BD Bioscience) equipped with CellQuest software at either the Microscopy and Cytometry Centre (Complutense University, Madrid, Spain) or the Cytometry Platform Network (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). Analyses were done with the FCS-Express software (De Novo Software, Thornhill, Canada).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Bone marrow cell suspensions were prepared for mononuclear and Lin⁻ cell subset analysis as described in the previous section. Isolation of RNA from mononuclear or Lin⁻ fractions of bone marrow cells was carried out with tri-reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's specifications. PCR primer sequences for EphB2, ephrin-B1, ephrin-B2, β -actin and PCR conditions used were previously described⁹. The amplification products were analyzed by 1.5% agarose electrophoresis.

Cell labeling and thymus recolonization assay

Alymphoid lobes were prepared by culturing thymic lobes from 15-day old fetal (E15) WT or mutant mice in fetal thymus organ cultures (FTOC) in the presence of 1.35 mmol/L 2'deoxiguanosine (dGuo) (Sigma-Aldrich) for 5 days as previously described⁴⁸. After extensively washing and additionally 24 hours in culture, single depleted lobes were plated with 5×10^4 BMC from adult WT and/or mutant mice in a total volume of 30 μ l in Terasaki plates (Nalge Nunc Int., Naperville, IL). Plates were then inverted to allow lobe and cells to combine at the bottom of the hanging drop. After 20 hours, recolonized lobes were extensively washed and processed for phenotypic analysis by flow cytometry or fixed in 4% formaldehyde for 30 min and scanned by a confocal microscope (Leica TCS-SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Donor-derived BMC were prepared as mentioned above and labeled with the Vybrant CFSE Cell Tracer (Molecular Probes, Oregon, USA) or PKH26 red fluorescent dye (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. For competition reconstitution assays, hanging drops received 2.5×10^4 CFSE-labeled BMC and 2.5×10^4 PKH26-labeled BMC from WT and EphB2 mutant mice. In microscopy studies, fluorescence images acquired in a TCS-SP2 Leica confocal system (Microscopy and Cytometry Center, Complutense University, Madrid, Spain) by scanning entire recolonized thymic lobes were analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) for counting labeled cells inside the lobes.

Immunohistochemistry

Six μm thick cryosections from either WT or mutant mice (6 to 8-wk-old and E15) were fixed in acetone for 10 min and air dried. Blockade slides were incubated for 1 h at room temperature with the following primary Abs: anti-mouse fibronectin or laminin rabbit antisera (Novotec, Saint Martin La Garenne, France), anti-mouse CXCL12 rabbit antiserum or anti-mouse CCL21 or CCL25 goat antiserum (R&D Systems, Oxon, UK) and anti-mouse cytokeratin-8 (Troma-1) rat antiserum (Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA). Donkey Texas Red-conjugated anti-rat serum (Jackson Laboratories, Newmarket, UK) and Alexa-488-conjugated anti-rabbit or anti-goat serum (Molecular Probes) served as secondary antibodies. Cell nuclei were stained with Hoechst-3342 and the sections were mounted in Antifade Prolong Gold (Molecular Probes). Samples were photographed using a Zeiss Axioplan microscope equipped with a Spot 2 digital camera at the Microscopy and Cytometry Centre (Complutense University, Madrid, Spain). Images obtained after double labeling for a given ECM ligand or chemokine and cytokeratin-8 were quantified using Metamorph software (MDS Inc., Toronto, Canada). Quantitative fluorescence analyses were performed by transforming specific staining in pixels and dividing the total pixel numbers by the area analyzed, obtaining the numbers of pixels/ μm^2 . Eight to ten non-overlapping fields comprising thymic cortex and medulla were analyzed from at least four animals per genotype. They were randomly selected from five independent thymus cryosections. In the case of mutant mice, cytokeratin negative areas were not included for morphometric studies.

Cell migration Assay

Migration activity of thymocytes and bone marrow-derived progenitors was assessed *ex vivo* in 5- μm pore size Transwell plates (Corning Costar, Cambridge, USA) as previously reported^{49,19}, with some modifications. Briefly, membrane inserts were coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine serum albumin (BSA), human fibronectin or murine laminin (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C, followed by 1 h of blocking with 1% BSA. Additionally, in stimulation experiments, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ephrin-B1/Fc proteins (R&D Systems) were immobilized on membrane inserts

with BSA or ECM coating proteins and maintained at 37°C until the blocking procedure, as mentioned above. Purified human IgG Fc fragment (Jackson Laboratories) were used as specificity controls. Cells (1×10^6 in 100 μ l of RPMI 1640/1% BSA) were plated in the upper chambers and 600 μ l of RPMI/1% BSA were added to the lower chamber. After 4 h of incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, cells migrated into lower chambers were collected, labeled with appropriate antibodies, analyzed and counted by flow cytometry gated to exclude debris and normalized by reference to a fluorescent bead (CountBright absolute counting beads, Invitrogen) internal control. In the indicated experiments, the cells (1×10^6 in 100 μ l of RPMI 1640/1% BSA) were pre-incubated with 10 μ g/ml soluble ephrin-B1/Fc for 30 min at 4°C to block the possible EphB-ephrin activation, as a control, and added to the upper transwell chamber. In additional experiments, we tested the ability of the chemokines CXCL12, CCL21 and CCL25 (R&D Systems) added in the lower transwell chambers at 100ng/ml, with or without ephrin-B1/Fc stimulus. No chemotactic responses to ephrin-B1/Fc alone were seen (data not shown).

Statistical analysis

Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test or, in competition experiments, by two-way ANOVA with Bonferroni as *post-hoc* test (GraphPad Prism 5 software). Significance of differences in relation to control ones was calculated according to single Student's *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Data were expressed as mean \pm standard error (SEM).

Acknowledgements

We would like to thank to Dr. Mark Henkemeyer for providing EphB-deficient mice and to the Microscopy and Cytometry Centre of Complutense University of Madrid for the use of its facilities and technical assistance. We also thank to the “Developmental Studies Hybridoma Bank” of the Iowa University for supplying the anti-K8 keratin antibody. This work was funded by Brazilian Research Council (CNPq, Brazil), Coordination for the Advance of Graduate Personnel

(Capes, Brazil), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Brazil) and grants BFU2004-03132 and BFU2006-65520 from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC, Spain).

References

1. Pasquale, E.B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**, 38-52 (2008).
2. Arvanitis, D. & Davy, A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* **22**, 416-29 (2008).
3. Pasquale, E.B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 462-75 (2005).
4. Munoz, J.J. et al. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* **169**, 177-84 (2002).
5. Munoz, J.J. et al. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* **177**, 804-13 (2006).
6. Garcia-Ceca JJ, Jimenez E, Alfaro D, Cejalvo T, Muñoz JJ, Zapata AG. The failure of EphB2 and/or EphB3 deficient mice to organize a normal thymic epithelial network reinforces the role of Eph signaling in the thymus histogenesis. (2009). *Int J Dev Biol*, no prelo.
7. Alfaro, D. et al. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* **37**, 2596-605 (2007).
7. Alfaro, D. et al. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* **125**, 131-43 (2008).
8. Wu, J. & Luo, H. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol* **12**, 292-7 (2005).
9. Freywald A, Sharfe N, Miller CD, Rashotte C & Roifman CM. EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. (2006). *J Immunol*, **176**, 4066-74.
10. Yu G, Mao J, Wu Y, Luo H & Wu J. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. (2006). *J Biol Chem*, **281**, 10222-9.
11. Boehm, T. & Bleul, C.C. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol* **27**, 477-84 (2006).
12. Bhandoola, A. & Sambandam, A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* **6**, 117-26 (2006).
13. Zlotoff, D.A., Schwarz, B.A. & Bhandoola, A. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Semin Immunopathol* **30**, 371-82 (2008).

14. Nitta, T., Murata, S., Ueno, T., Tanaka, K. & Takahama, Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* **99**, 59-94 (2008).
15. Wada, K., Kina, T., Kawamoto, H., Kondo, M. & Katsura, Y. Requirement of cell interactions through adhesion molecules in the early phase of T cell development. *Cell Immunol* **170**, 11-9 (1996).
16. Kawakami, N. et al. Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J Immunol* **163**, 3211-6 (1999).
17. Liu, C. et al. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531-9 (2006).
18. Jenkinson, W.E. et al. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol* **37**, 2090-6 (2007).
19. Mendes-da-Cruz, D.A., Smaniotto, S., Keller, A.C., Dardenne, M. & Savino, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol* **180**, 4639-47 (2008).
20. Zou, J.X. et al. An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13813-8 (1999).
21. Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H. & Roifman, C. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* **32**, 3745-55 (2002).
22. Poliakov, A., Cotrina, M. & Wilkinson, D.G. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* **7**, 465-80 (2004).
23. Prockop, S.E. & Petrie, H.T. Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *J Immunol* **173**, 1604-11 (2004).
24. Jenkinson, W.E., Bacon, A., White, A.J., Anderson, G. & Jenkinson, E.J. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J Immunol* **181**, 6101-8 (2008).
25. Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D.A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E. & Villa-Verde, D.M. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* **75**, 951-61 (2004).
26. Misslitz, A. et al. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* **200**, 481-91 (2004).
27. Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**, 546-59 (2005).
28. Munoz, J.J. et al. Organizing the thymus gland. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 14-9 (2009).
29. Miao, H. & Wang, B. Eph/ephrin signaling in epithelial development and homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 762-70 (2009).

30. Holmberg, J. et al. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* **125**, 1151-63 (2006).
31. Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G. & Henkemeyer, M. EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* **27**, 13481-90 (2007).
32. Henkemeyer, M. et al. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* **86**, 35-46 (1996).
33. Orioli, D., Henkemeyer, M., Lemke, G., Klein, R. & Pawson, T. Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *Embo J* **15**, 6035-49 (1996).
34. Cowan, C.A. et al. Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. *Dev Biol* **271**, 263-71 (2004).
35. Dravis, C. et al. Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. *Dev Biol* **271**, 272-90 (2004).
36. Bundesen, L.Q., Scheel, T.A., Bregman, B.S. & Kromer, L.F. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci* **23**, 7789-800 (2003).
37. Zamora, D.O., Babra, B., Pan, Y., Planck, S.R. & Rosenbaum, J.T. Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells. *Cell Immunol* **242**, 99-109 (2006).
38. Nestor, M.W., Mok, L.P., Tulapurkar, M.E. & Thompson, S.M. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *J Neurosci* **27**, 12817-28 (2007).
39. Pfaff, D. et al. Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *J Cell Sci* **121**, 3842-50 (2008).
40. Misslitz, A., Bernhardt, G. & Forster, R. Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. *Immunol Rev* **209**, 115-28 (2006).
41. Prevost, N. et al. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9820-5 (2005).
42. Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S. & Flanagan, J.G. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* **105**, 69-79 (2001).
43. Grunwald, I.C. et al. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* **32**, 1027-40 (2001).
44. Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. & Mueller, B.K. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* **149**, 263-70 (2000).

45. Poliakov, A., Cotrina, M.L., Pasini, A. & Wilkinson, D.G. Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *J Cell Biol* **183**, 933-47 (2008).
46. Lepelletier, Y. et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5545-50 (2007).
47. Mendes-da-Cruz, D.A. et al. Neuropilins, semaphorins and their role in thymocyte development. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 20-8 (2009).
48. Carreno, P.C., Sacedon, R., Jimenez, E., Vicente, A. & Zapata, A.G. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J Neuroimmunol* **160**, 135-45 (2005).
49. Cotta-de-Almeida, V. et al. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol* **34**, 1578-87 (2004).

Figure Legends

Figure 1. Requirement for EphB2 signaling in thymus settling. **A**, mRNA expression of EphB2, ephrin-B1 and ephrin-B2 on total bone marrow cells and lineage negative bone marrow progenitors. **B**, Percentages of bone marrow progenitor subsets: Lin⁻SCA-1⁺KIT^{hi} (LSK); and Lin⁻SCA-1^{low}KIT^{low}IL-7R α ⁺ (CLP) on total bone marrow mononuclear cells from WT, EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} mice. **C**, dGuo-treated alymphoid fetal thymic lobes (E15) were recolonized by adult Lin⁻ bone marrow progenitors stained with CFSE. Both fetal thymic lobes (stroma) and Lin⁻ bone marrow cells (progenitors) were obtained from wild type (WT) or mutant mice knocked for EphB2 receptor (B2^{-/-}) or expressing a EphB2- β gal fusion receptor (B2^{LacZ}). After 20 hs, recolonized thymic lobes were analyzed by flow cytometry for the presence of CFSE stained progenitors. The percentages of progenitor cells inside the lobes \pm SEM are shown. **D**, Mixed bone marrow progenitors were generated by combining PKH26 stained Lin⁻ cells (red bars) from either WT, EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} mutant mice with CFSE stained WT Lin⁻ cells (green bars) from CD1 mice. Recolonized E15 thymic lobes with mixed Lin⁻ progenitors were processed as described in A. The degree of thymus colonization after 20 hs is represented by percentages of both stained progenitors inside the lobes. Asterisks indicate the statistic significance: ***p \leq 0.001; **p \leq 0.01; *p \leq 0.05; ns, no significant. Data shown in each graph are representative of three to six experiments.

Figure 2. Thymic settling of recent immigrated EphB2 mutant hematopoietic progenitors. **A**, Fetal thymic lobes from control CD1 mice, **C**, EphB2^{-/-} mice or **D**, EphB2^{LacZ} mice, recolonized by CFSE stained WT progenitors and PKH26 stained WT or EphB2 mutant progenitors were visualized by confocal microscopy and the cell numbers quantified by the NIH software Image J. Results are expressed as percentage of both stained progenitors inside the lobes in different thymic areas. **B**, Representative images of reconstituted WT thymic lobes scanned by confocal microscopy. Dotted lines define the boundaries of lobe central and peripheral areas. Asterisks indicate the statistic

significance: *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; ns, no significant. Data shown in each graph are representative of three to six experiments.

Figure 3. Decreased deposition of extracellular matrix proteins (ECM) and chemokines in EphB2 mutant fetal thymus. Computer-based quantitative analysis of selected microscopic fields of embryonic day 15 (E15) thymuses from EphB2^{+/+}, EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} littermate mice ($n = 5$ thymi/genotype). Panel **A** corresponds to laminin (upper panel) and fibronectin (lower panel) deposition, whereas panel **B** depicts the deposition of CCL21 (upper panel), CCL5 (middle panel) and CXCL12 (lower panel) chemokines. As detailed in *Materials and Methods*, quantitative fluorescence analyses were performed, using Metamorph software, in terms of pixels/ μm^2 . Eight to ten non-overlapping fields were analyzed for the expression of each marker. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$; ns, no significant. Panel **C** illustrates typical immunohistochemical profiles showing the deposition of citokeratin 8 (red) and fibronectin or the chemokine CCL21 (green). Inserts show Hoechst-3342 staining (blue) and bars is 300 μm .

Figure 4. Decreased ECM and chemokine contents in EphB2 mutant adult thymuses. Computer-based quantitative analysis of selected microscopic fields from both thymic cortex and medulla. Thymuses were obtained from WT, EphB2^{-/-} and EphB2^{LacZ} mice ($n = 5$ thymi/group). Panel **A** corresponds to laminin (left panel) and fibronectin (right panel) deposition, whereas panel **B** depicts the deposition of CCL21 (left panel), CCL5 (middle panel) and CXCL12 (right panel) chemokines. Cytokeratin labeling was also performed and keratin-free areas, seen in EphB2 mutant thymuses, were not included for morphometric studies. Eight to ten non-overlapping fields comprising thymic cortex and medulla were analyzed for the expression of each marker. Asterisks indicate the statistic significance for medullary and cortical depositions, as well as for total thymus deposition of each molecule in relation to WT thymus: *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$; ns, no significant. Panel **C** illustrates typical immunohistochemical profiles showing the deposition of citokeratin 8 (red) and fibronectin or the chemokines CCL21 or CXCL12 (green). Inserts show Hoechst-3342 staining (blue) and bars is 300 μm .

Figure 5. Loss of EphB2 signaling results in decreased T-cell progenitor migration through haptotactic or chemotactic stimuli. In panels **A** and **C**, bars show the relative numbers (percentages of input in relation to control WT cell migration) of migrating Lin⁻ bone marrow progenitors through laminin or fibronectin (upper panel), or towards CXCL12, CCL21 or CCL25 chemokines (lower panel). Migration is clearly diminished when laminin or fibronectin were applied as haptotactic stimuli as well as when CXCL12, CCL21 or CCL25 were used as chemotactic stimuli to EphB2 mutant progenitors. Note that in these experiments, the migration capacity of EphB2 mutant progenitors was not equivalent. In panels **B** and **D**, bars represent the relative migration capacity of total thymocytes through laminin or fibronectin (upper panel), or toward CXCL12, CCL21 or CCL25 chemokines (lower panel). In general, the decreased migration of EphB2 mutant progenitors seen in **A** were also found with regard to total thymocytes. However, for total thymocytes, the lowest chemotactic response was seen in EphB2^{-/-} cells. No differences in migration were observed between control and mutant cells through unspecific stimuli (BSA) and without haptotactic or chemotactic stimuli. In all panels, values correspond to specific migration after subtracting the number of migrating cells obtained for each individual in wells coated with BSA. Fluorescent beads were added as an internal standard for counting, and the results are expressed as mean ± SEM. ***p≤0.001; **p≤0.01; *p≤0.05; ns, no significant.

Figure 6. Ephrin-B1/Fc costimulation modulates ECM-induced migration of T-cell progenitors. Ephrin-B1 was immobilized on 5-µm Transwell membranes with a coating of laminin or fibronectin. Lin⁻ bone marrow progenitors (panel **A**) or total thymocytes (panel **C**) from CD1 mice were placed in the upper chamber in serum-free medium. The cells passing into the bottom chamber after 4 hs were collected and counted by flow cytometry. Panels **B** and **D** show respectively, Lin⁻ bone marrow progenitors or total thymocytes from EphB2^{LacZ} mice, submitted to the same migration experiments. Although ECM-driven migration of CD1 cells is clearly diminished in ephrin-B1 coated wells, it is not changed when EphB2LacZ cells were applied to migrate. No differences in migration were observed when ephrin-B1 was used alone, immobilized or in

solution. In each panel, the relative mean response (percentages of input in relation to control without ephrin-B1 coating) of four experiments \pm SEM is shown. Fluorescent beads were added as an internal standard for counting. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$; ns, not significant.

Figure 7. Ephrin-B1/Fc fusion protein exhibits ligand-like activity to control thymocyte chemotaxis. Thymocytes were added to the upper chamber of chemotaxis assay inserts coated with ephrin-B1/Fc fusion proteins. CXCL12, CCL21 or CCL25 (100ng/ml) was added to the bottom chamber. Chemotaxis was allowed to proceed for 4 hs at 37°C. Thymocytes migrating into the lower chamber were collected and counted. Fluorescent beads were added as an internal standard for counting. Ephrin-B1 costimulation clearly inhibits thymocyte chemotaxis. Spontaneous migration was subtracted to the number of each migrating cells obtained for each specific chemokine and no differences in migration were observed when ephrin-B1 was used alone, immobilized or in solution. Results are expressed as relative mean of three experiments \pm SEM. *** $p \leq 0.001$

Table III and IV. Expression of integrins and chemokine receptor in T-cell progenitors from control and EphB2 mutant mice^a

Table III	VLA-4			VLA-5			VLA-6			
	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	
BM	LSK	94.32 ± 1.31	92.97 ± 2.98	95.82 ± 1.05	73.28 ± 3.82	64.58 ± 6.07	69.13 ± 7.11	71.54 ± 4.24	61.61 ± 6.89	69.78 ± 5.38
	CLP	94.91 ± 1.42	96.86 ± 0.97	96.12 ± 0.72	70.14 ± 6.81	71.56 ± 9.17	68.27 ± 6.81	56.63 ± 7.21	68.49 ± 8.05	59.30 ± 6.02
Thymus	DN1	39.50 ± 6.20	31.67 ± 5.24	49.50 ± 3.88	64.50 ± 5.25	68.67 ± 3.48	72.33 ± 3.59	73.80 ± 2.71	78.00 ± 6.82	72.00 ± 3.05
	DN2	97.40 ± 2.36	88.33 ± 6.01	95.50 ± 2.33	93.33 ± 4.17	87.00 ± 4.00	87.67 ± 3.38	74.67 ± 3.71	74.25 ± 7.41	71.50 ± 7.76
	DN3	99.67 ± 0.33	99.50 ± 0.50	99.50 ± 0.50	96.00 ± 1.30	97.33 ± 0.88	93.80 ± 2.69	96.00 ± 2.28	97.50 ± 1.19	94.40 ± 1.47
	DN4	78.60 ± 4.46	66.00 ± 9.00	83.50 ± 2.50	76.60 ± 1.17	65.33 ± 8.57	77.00 ± 3.72	81.25 ± 2.29	73.67 ± 1.86	71.40 ± 3.14
	DP	95.89 ± 0.63	95.20 ± 1.16	96.43 ± 1.13	91.22 ± 2.36	87.33 ± 5.21	92.00 ± 1.41	99.44 ± 0.24	99.80 ± 0.20	99.25 ± 0.16
	CD4SP	83.11 ± 2.77	84.00 ± 3.74	88.29 ± 3.83	83.67 ± 3.37	77.67 ± 6.12	88.75 ± 1.96	93.67 ± 1.56	94.20 ± 1.24	95.13 ± 0.79
	CD8SP	84.44 ± 2.47	85.20 ± 3.65	88.57 ± 3.01	81.33 ± 3.88	74.33 ± 6.39	87.38 ± 2.40	90.33 ± 2.41	91.00 ± 2.37	91.38 ± 2.01

Table IV	CCR7			CCR9			CXCR4			
	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2 ^{LacZ}	
BM	LSK	27.97 ± 2.50	21.32 ± 1.71	25.73 ± 5.76	14.11 ± 3.99	9.34 ± 1.33	14.94 ± 2.62	10.35 ± 1.80	9.98 ± 2.04	9.57 ± 2.19
	CLP	46.85 ± 7.86	45.30 ± 8.70	43.52 ± 9.60	68.41 ± 2.39	68.07 ± 3.70	67.65 ± 3.96	52.21 ± 2.65	52.40 ± 9.40	51.34 ± 4.20
Thymus	DN1	33.50 ± 8.03	24.00 ± 4.00	37.75 ± 6.05	43.60 ± 6.14	26.00 ± 3.00	26.75 ± 7.78	10.25 ± 1.65	14.67 ± 4.26	23.00 ± 4.04
	DN2	31.00 ± 1.34	67.00 ± 3.00	61.00 ± 7.76	32.00 ± 5.53	41.00 ± 7.00	28.25 ± 9.07	40.17 ± 4.92	44.00 ± 9.97	56.50 ± 4.50
	DN3	57.00 ± 6.96	55.00 ± 6.66	58.25 ± 8.65	37.00 ± 3.80	42.67 ± 4.10	39.00 ± 8.08	49.60 ± 8.73	59.67 ± 8.65	49.00 ± 5.00
	DN4	56.60 ± 4.98	45.00 ± 8.00	65.00 ± 7.77	49.40 ± 5.06	68.50 ± 2.50	59.00 ± 3.81	54.40 ± 9.13	54.50 ± 9.50	58.00 ± 9.00
DP	38.00 ± 4.04	38.00 ± 9.02	28.80 ± 4.21	92.83 ± 1.33	90.33 ± 2.96	94.40 ± 1.97	36.00 ± 6.10	15.50 ± 0.50	37.33 ± 2.40	
CD4SP	58.33 ± 4.10	46.67 ± 1.45	65.40 ± 8.69	41.33 ± 2.20	41.33 ± 0.88	46.20 ± 3.22	21.60 ± 3.44	15.00 ± 6.56	16.67 ± 5.70	
CD8SP	48.67 ± 9.84	42.33 ± 9.55	53.20 ± 9.86	61.60 ± 5.22	59.00 ± 9.91	68.00 ± 6.11	21.50 ± 3.75	15.00 ± 4.00	23.67 ± 2.96	

^a Results are expressed as mean percentages ± SEM of defined bone marrow progenitors or thymocyte subsets as described in the *Methods* section. There were not statistically significant differences between WT and EphB2 mutant cell membrane expression for searched molecules.

Table V and VI. Migration profiles of thymocyte subpopulations following ephrin-B1 costimulation^a

Table V	Laminin			Fibronectin		
	Ephrin-B1	Ephrin-B1+bloq	Ephrin-B1	Ephrin-B1	Ephrin-B1+bloq	Ephrin-B1
WT	DN1	80.79 ± 13.89	109.70 ± 18.09	97.41 ± 20.27	99.77 ± 25.31	
	DN2	41.59 ± 9.48*	105.60 ± 25.60	83.64 ± 17.35	100.60 ± 31.19	
	DN3	40.29 ± 6.25*	91.78 ± 19.51	37.64 ± 7.07*	111.20 ± 2.44	
	DN4	67.73 ± 2.72*	97.64 ± 7.87	38.56 ± 15.20*	88.66 ± 9.65	
	DP	63.30 ± 5.15*	100.50 ± 8.21	47.43 ± 9.51*	92.75 ± 5.27	
	CD4SP	53.25 ± 4.15*	91.47 ± 3.35	45.23 ± 22.15*	106.20 ± 13.10	
	CD8SP	22.86 ± 2.88*	98.23 ± 11.48	39.74 ± 17.29*	92.47 ± 1.53	
		DN1	120.90 ± 4.09	134.00 ± 14.59	103.80 ± 30.77	129.50 ± 12.41
EphB2 ^{LoxZ}	DN2	107.90 ± 1.90	113.80 ± 23.75	84.73 ± 29.42	102.00 ± 25.04	
	DN3	101.00 ± 32.36	136.50 ± 3.21	95.73 ± 12.61	104.20 ± 5.49	
	DN4	107.00 ± 6.99	107.90 ± 17.11	96.84 ± 16.65	87.28 ± 13.84	
	DP	112.10 ± 1.58	106.5 ± 6.95	119.20 ± 17.51	98.77 ± 1.96	
	CD4SP	107.80 ± 7.35	102.10 ± 2.28	120.80 ± 1.71	100.10 ± 12.20	
	CD8SP	104.80 ± 9.25	109.8 ± 17.27	100.80 ± 16.72	96.16 ± 14.72	

Table VI	CCL21			CCL25			CXCL12		
	Ephrin-B1	Ephrin-B1+bloq	Ephrin-B1	Ephrin-B1	Ephrin-B1+bloq	Ephrin-B1	Ephrin-B1	Ephrin-B1+bloq	Ephrin-B1
WT	DN1	54.48 ± 9.41*	102.20 ± 0.38	58.30 ± 5.52*	96.88 ± 25.45	87.78 ± 16.77	98.22 ± 25.47		
	DN2	103.90 ± 22.54	110.90 ± 22.48	108.00 ± 31.07	106.10 ± 17.01	99.10 ± 23.31	108.10 ± 1.66		
	DN3	100.30 ± 2.54	106.40 ± 9.21	29.58 ± 6.32*	103.30 ± 8.38	20.87 ± 3.74*	103.10 ± 12.82		
	DN4	104.10 ± 7.01	101.10 ± 25.13	35.80 ± 13.58*	111.10 ± 12.28	7.83 ± 3.73*	102.70 ± 25.06		
	DP	3.57 ± 2.63*	112.50 ± 28.83	2.32 ± 1.33*	102.60 ± 32.48	7.39 ± 2.92*	97.12 ± 9.55		
	CD4SP	53.89 ± 8.47*	116.1 ± 22.81	9.73 ± 2.29*	100.30 ± 18.80	21.19 ± 4.57*	104.20 ± 15.74		
	CD8SP	27.09 ± 11.54*	104.00 ± 12.63	13.94 ± 1.94*	98.37 ± 19.42	12.07 ± 2.96*	101.30 ± 6.00		

^a Results are expressed as mean of input percentages ± SEM of defined thymocyte subsets as described in the *Methods* section.

* Differences were statistically significant when compared to the control without ephrin-B1 coating or when ephrin-B1 was used in solution as a blocker of EphB signaling.

Figure 1

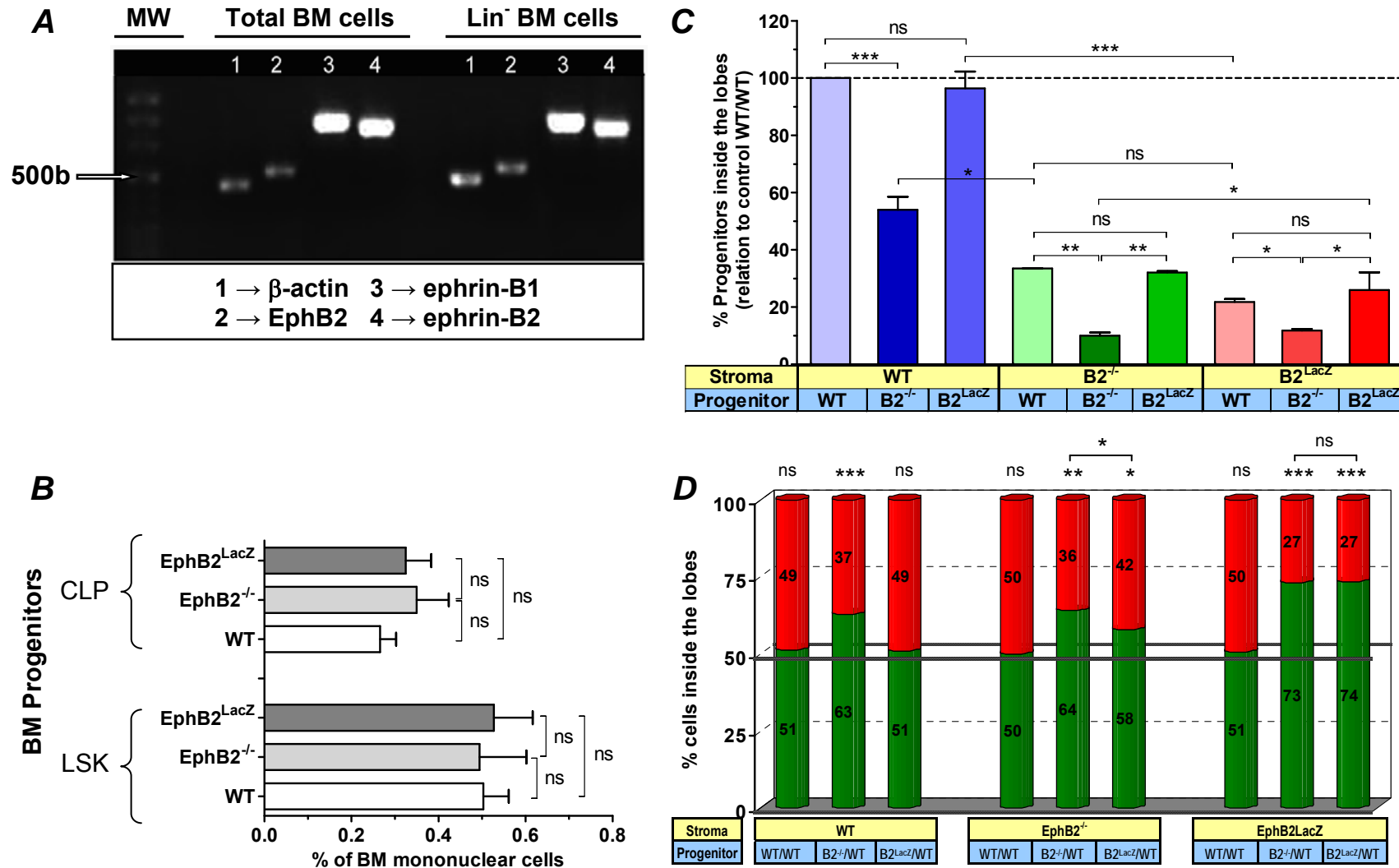
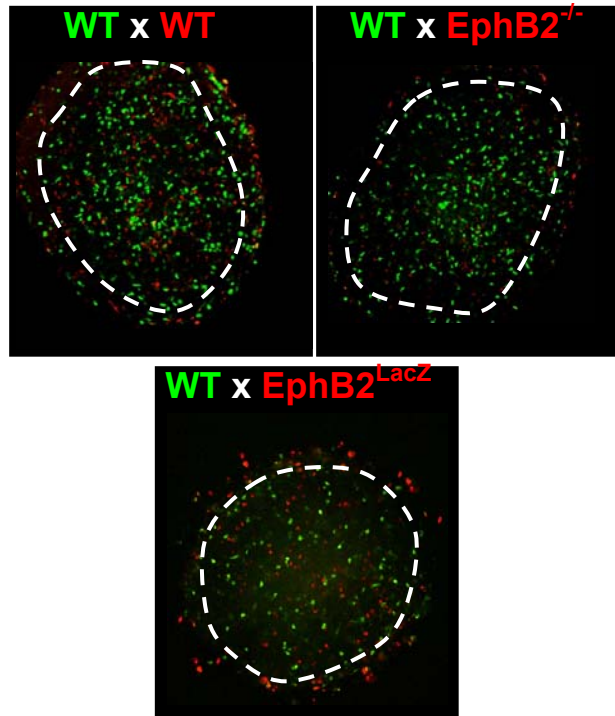
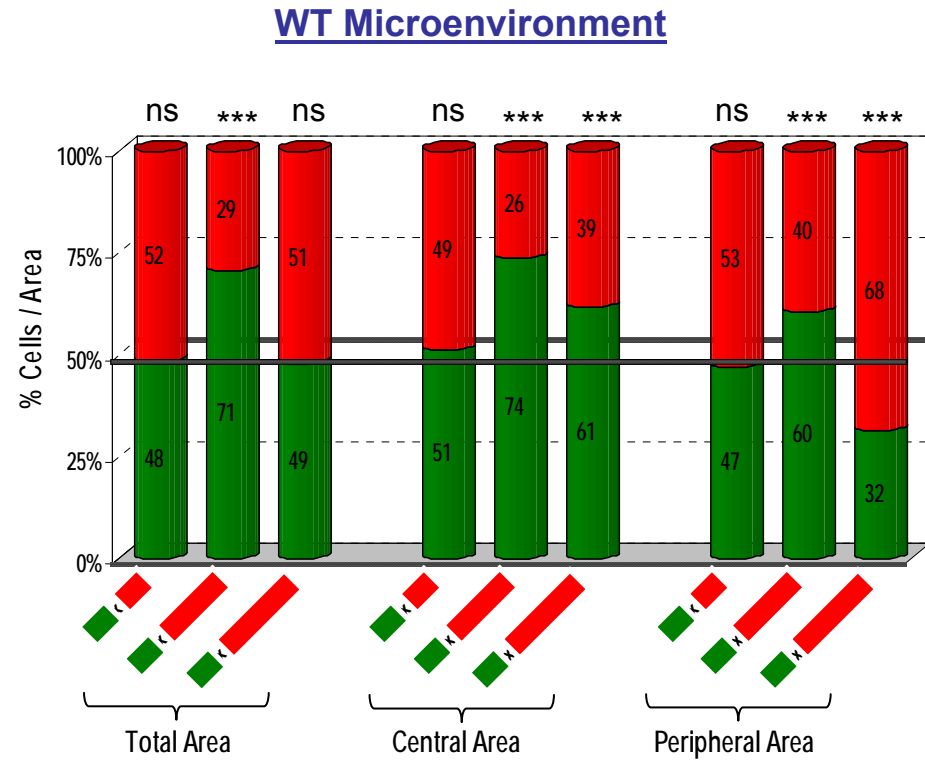


Figure 2

A



B



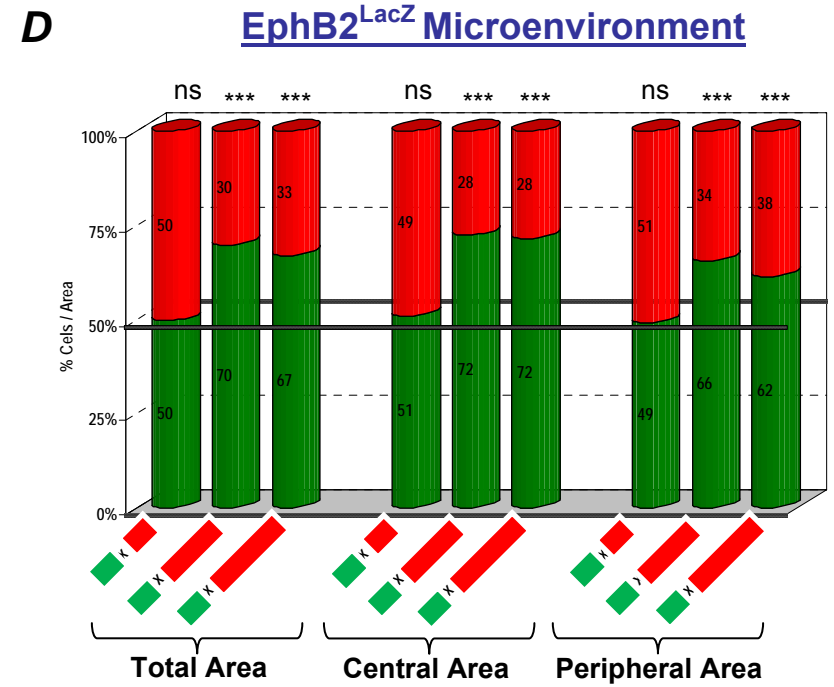
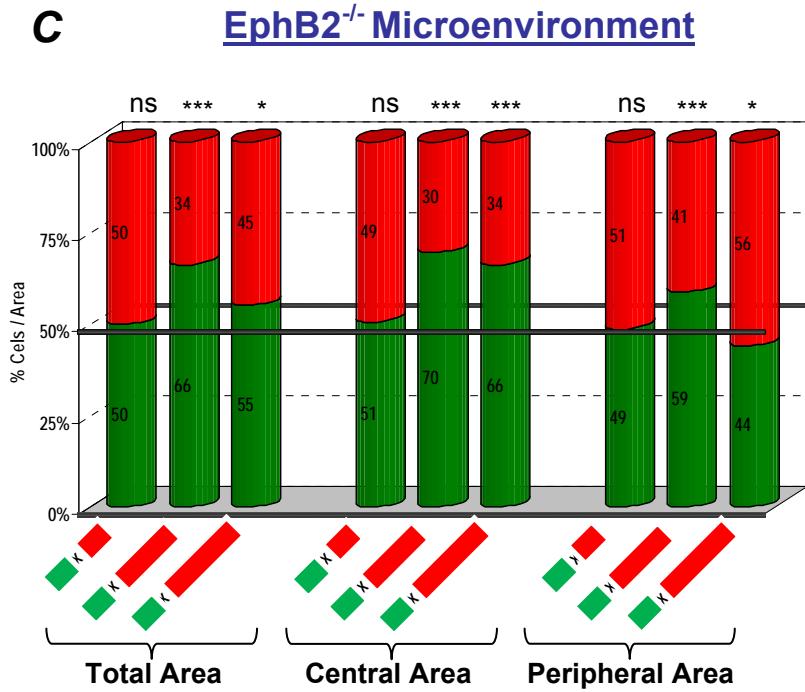


Figure 3

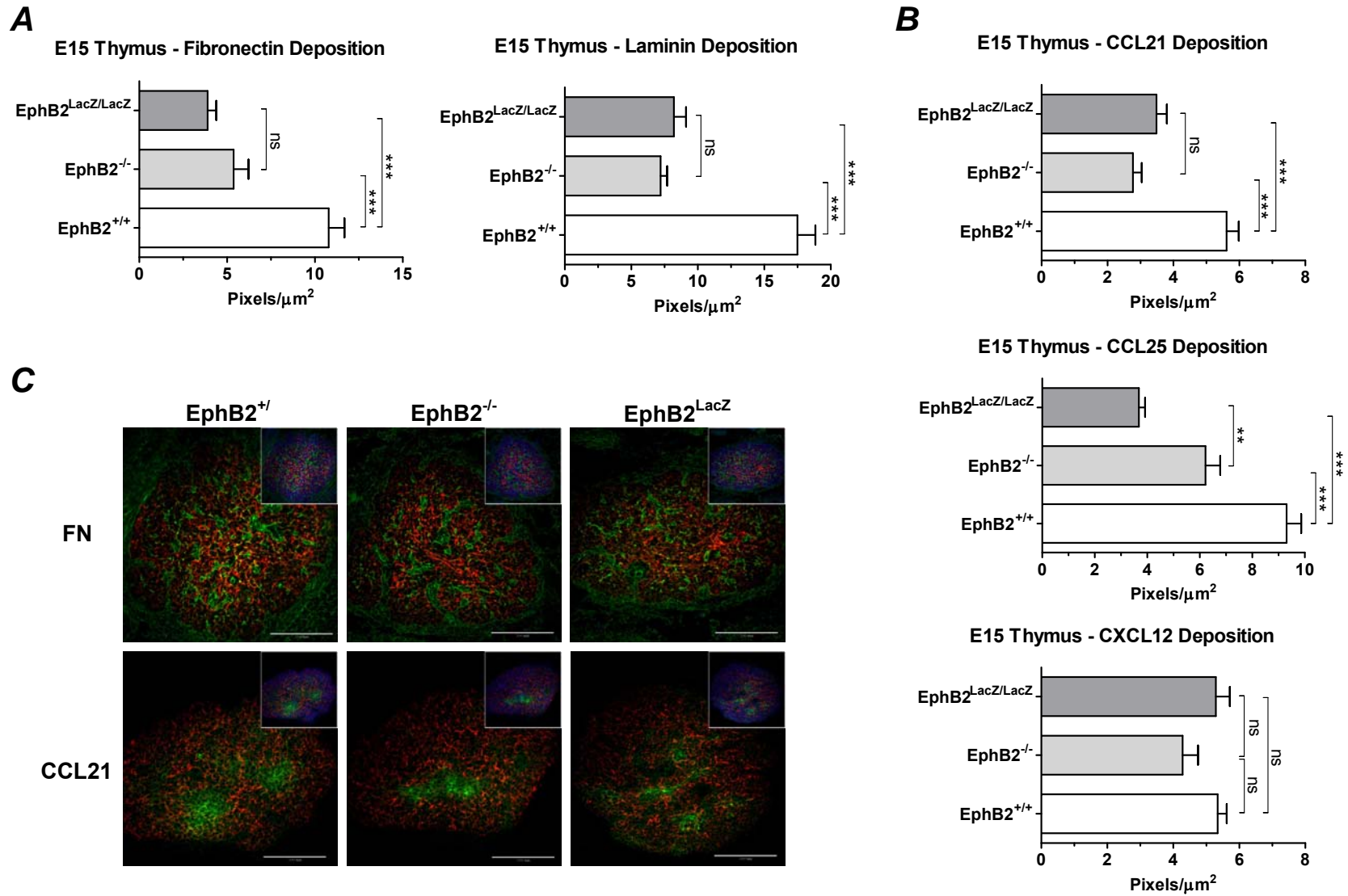


Figure 4

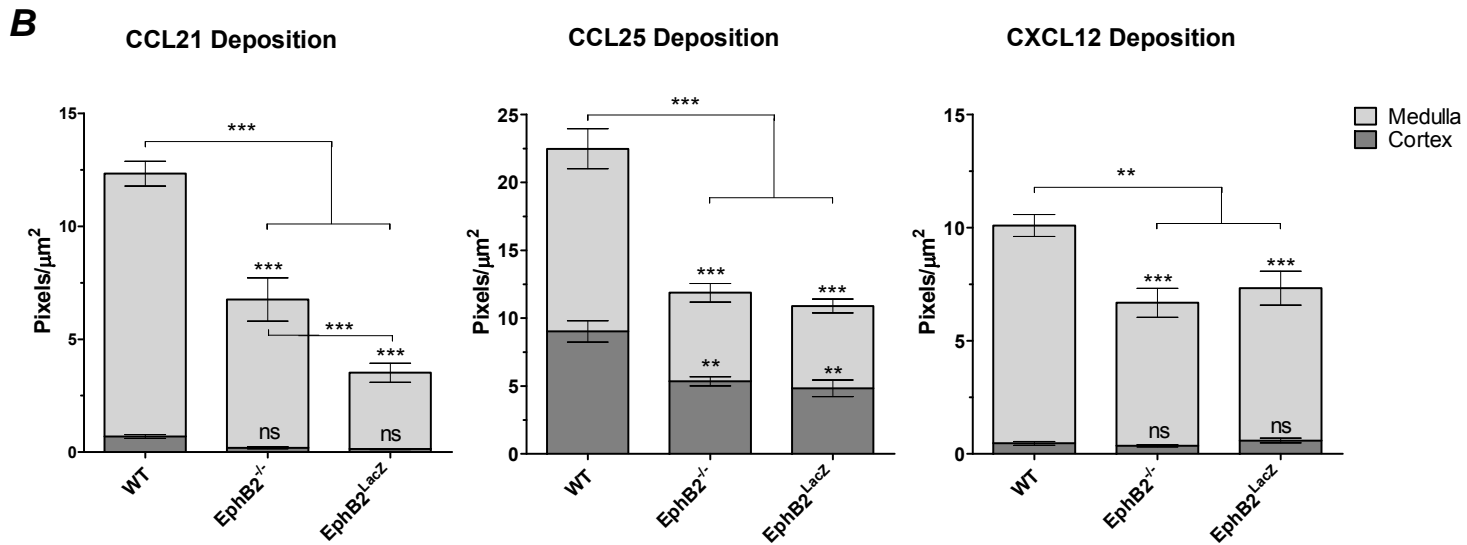
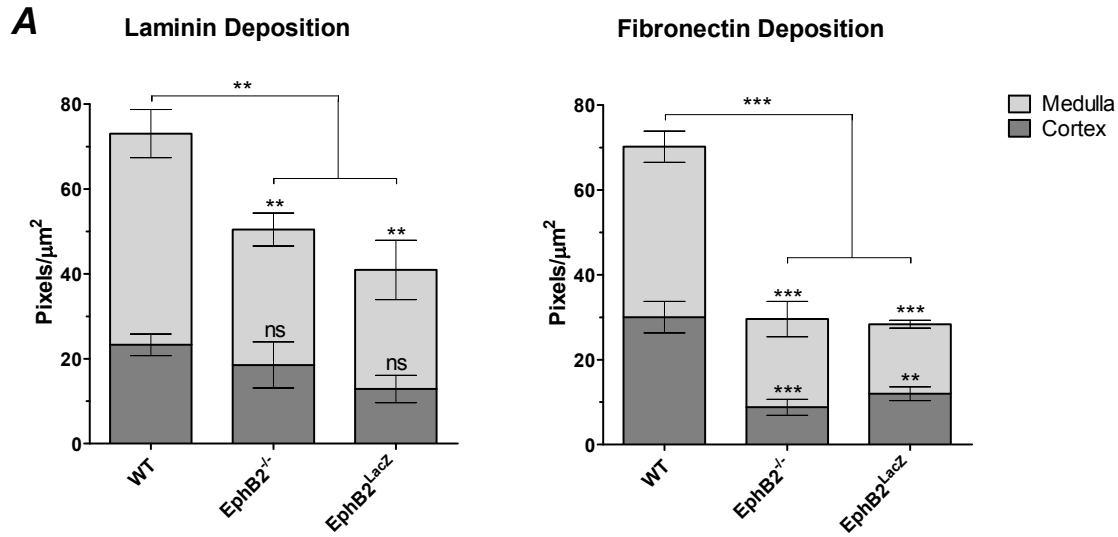


Figure 4

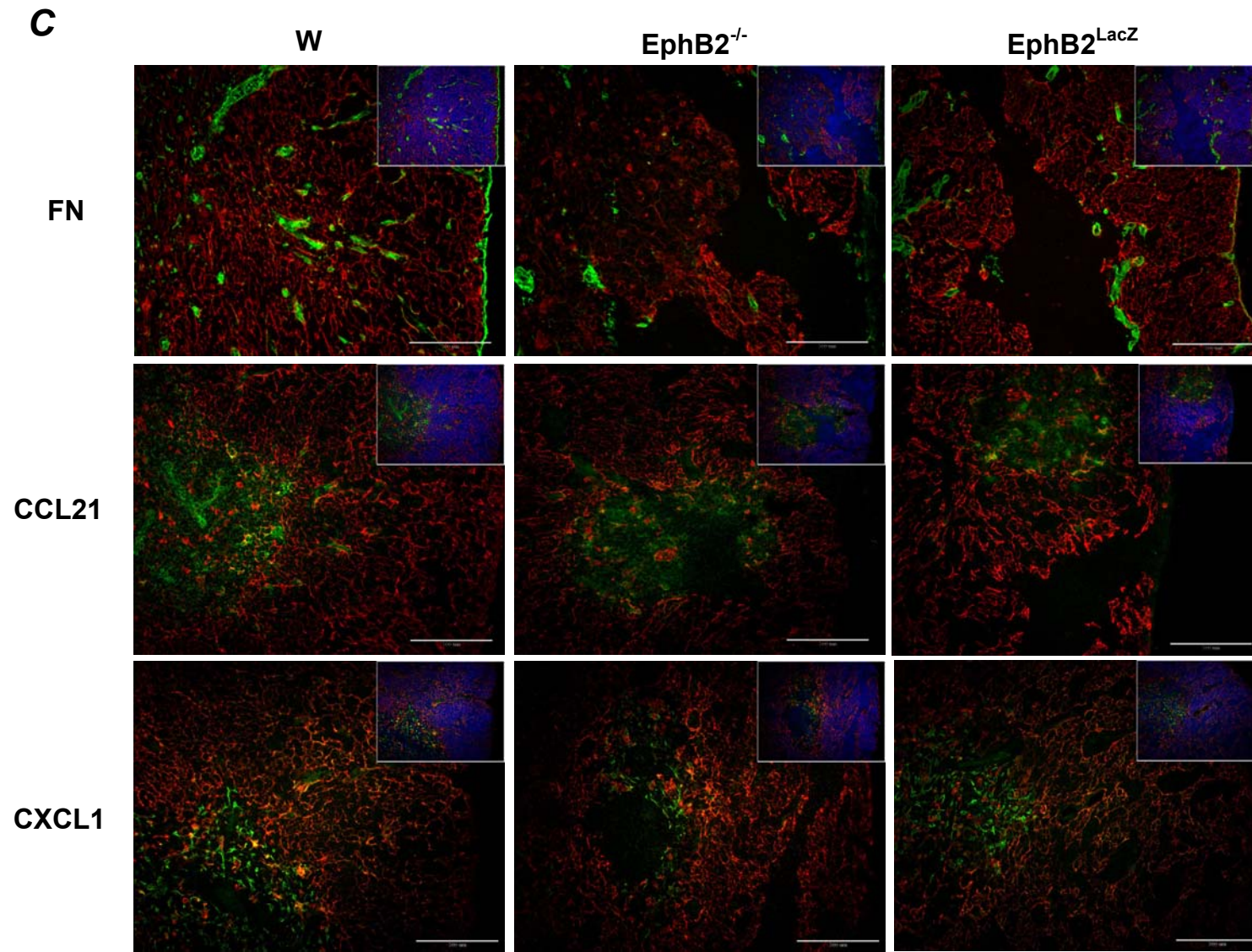


Figure 5

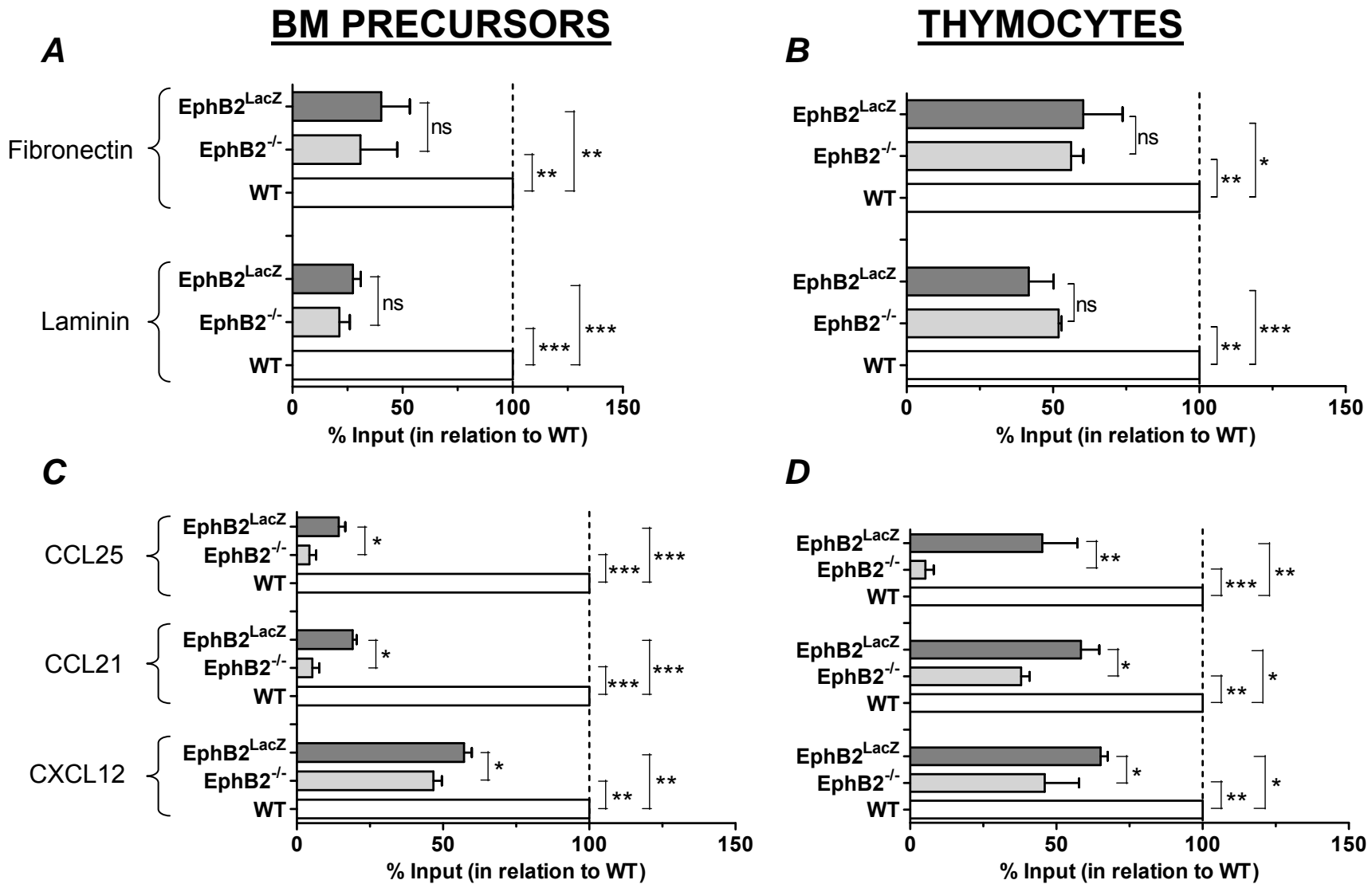


Figure 6

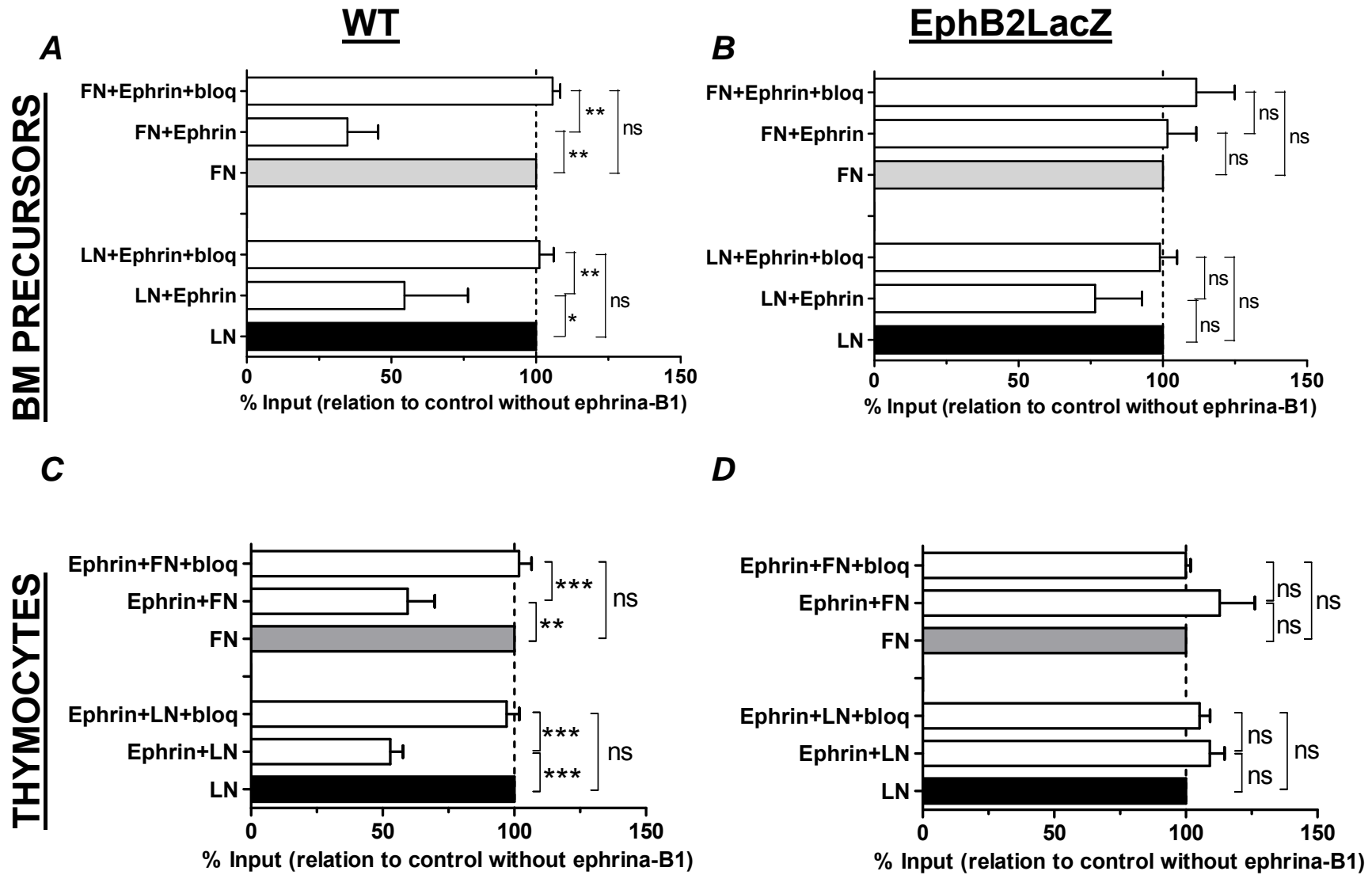
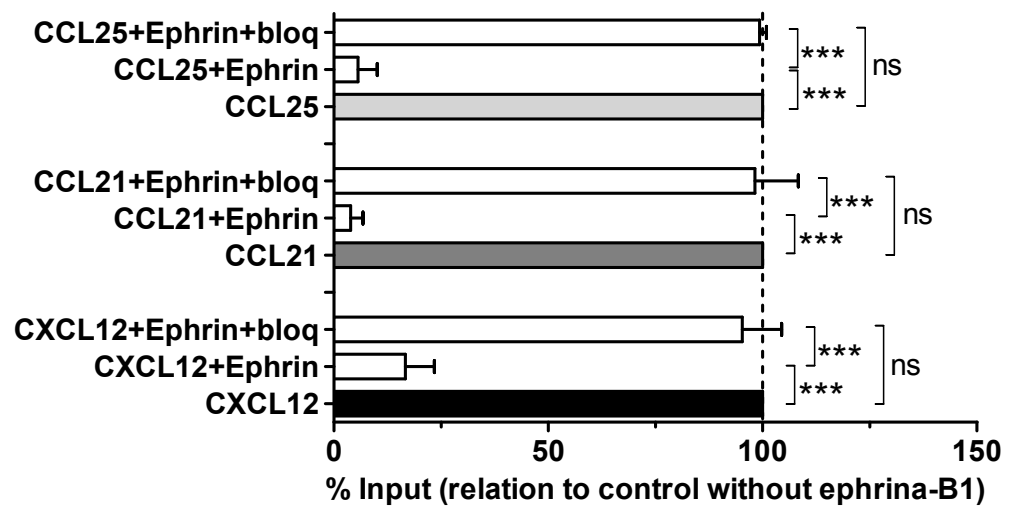


Figure 7



CAPÍTULO 4

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento intratímico de células T requer a migração orientada dos precursores derivados da medula óssea para o interior do timo em um primeiro momento, dentro do próprio órgão, através de seus múltiplos microambientes, e para fora do timo, quando os timócitos positivamente selecionados se tornam aptos a sair deste órgão e colonizar os órgãos linfóides periféricos. Todo este processo inclui diferentes eventos celulares como atração/repulsão, adesão/desadesão, migração, posicionamento, que ocorrem em locais, momentos e ordem específicos durante a diferenciação intratímica das células T (Rothenberg et al., 2008; Mendes-da-Cruz et al., 2008). Entretanto, embora muitas moléculas e mecanismos já tenham sido relacionados a cada uma destas etapas, estamos ainda longe de conhecê-las plenamente e, pouco a pouco, novas interações moleculares vão sendo incorporadas a esta crescente lista. Nesta tese, estudamos as funções atribuídas à família dos receptores Eph como moduladores da migração celular em diferentes momentos do desenvolvimento de linfócitos T.

Desde sua descoberta há duas décadas, a família de receptores tirosina-quinase Eph tem sido relacionada a um crescente número de processos fisiológicos e patológicos em muitos tipos celulares e diferentes órgãos (Pasquale, 2008). No sistema imune, o papel da família Eph tem sido caracterizado como modulador dos processos imunes onde a comunicação intercelular é crucial, como por exemplo, durante o desenvolvimento de timócitos em células T maduras dentro do timo e a subsequente diferenciação de células T ativadas em células efetoras na periferia. De fato, alterações nas interações Eph-efrina, provocadas pela adição de proteínas recombinantes Eph ou efrina/Fc a cultivos organotípicos de timo fetal, interferem com a maturação e a sobrevivência dos timócitos (Munoz et al., 2002; Wu & Luo, 2005; Alfaro et al., 2007). Além disso, defeitos na maturação dos timócitos também foram observados em camundongos nocautes para EphA4, EphB2, EphB3 e duplo-nocaute EphB2/B3, os quais apresentam severa hipocelularidade tímica e diminuição no número de células T periféricas. Esses defeitos parecem ser resultado do desenvolvimento anormal de células do microambiente tímico que promovem o aparecimento de intensa desorganização da arquitetura do órgão, além de um bloqueio na diferenciação dos timócitos, aumento da morte celular por apoptose e redução no número de células em divisão (Munoz et al., 2006; Alfaro et al., 2008) (García-Ceca *et al.* 2009, no prelo). Entretanto, outros fatores como a regulação da

migração celular – que representa um evento crucial desde a colonização do primórdio tímico pelos precursores hematopoiéticos até o correto movimento dos timócitos através dos diferentes compartimentos tímicos que suportam sua maturação gradual e a saída das células T maduras – pode contribuir para o desenvolvimento das alterações observadas em animais deficientes.

Neste sentido, o presente trabalho relaciona, inicialmente, o possível envolvimento de Eph e efrinas nos diferentes passos da organogênese do timo, que incluem a migração inicial de precursores epiteliais que resulta na ramificação e no crescimento do primórdio tímico, a colonização linfóide e as interações TEC-timócitos que determinam a organização de uma rede epitelial tímica madura. Respectivamente, demonstramos o papel desempenhado pela sinalização EphB2/efrina-B1 durante a colonização do timo fetal e a modulação da migração de precursores hematopoiéticos e timócitos em eventos quimio e haptotáticos que controlam diferentes passos do desenvolvimento de células T.

5.1 O papel de Eph e efrinas na organogênese do timo

Os receptores Eph e seus ligantes efrinas são moléculas envolvidas na morfogênese de diversos tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Nesse, desempenham papel importante regulando o posicionamento celular, a migração das fibras nervosas e, com isso, determinando os microdomínios teciduais. A ocorrência de características e moléculas em comum entre o sistema nervoso central e o sistema imune tem sido constantemente sugerida em diversos trabalhos (Savino & Dardenne, 2000; Mentlein & Kendall, 2000; Bodey et al., 2000; Lepelletier et al., 2007; Mendes-da-Cruz et al., 2009). Neste sentido, a expressão de diversas Eph e efrinas foi demonstrada em timo de camundongos adultos, tanto em TECs quanto em timócitos (Munoz et al., 2002; Vergara-Silva et al., 2002; Wu & Luo, 2005; Alfaro et al., 2008). Além disso, é possível observar sua expressão no timo durante o período fetal (Alfaro et al., 2008), sugerindo que estas moléculas possam participar do desenvolvimento deste órgão desde suas etapas iniciais. De fato, demonstramos que a falta de EphB2 e/ou EphB3 resulta em importante desorganização da rede epitelial tímica, que começa desde o dia 13.5 do desenvolvimento fetal e torna-se mais severa ao final da vida fetal e no timo neonatal (García-Ceca *et al.* 2009, no prelo; Munoz et al., 2009), onde destacamos: a) aumento no número de TECs imaturas de fenótipo CK5⁺CK8⁺MTS10⁺, que pode estar relacionado a alterações

nas interações TEC-timócitos responsáveis pela maturação destes precursores epiteliais; b) a ocorrência de grandes áreas CK5⁻CK8⁻, possivelmente decorrentes do aumento da apoptose observado nas TEC de camundongos deficientes em EphB; e c) o aumento no número de células CK5⁺CK8⁺ em áreas corticais, muito provavelmente relacionadas a uma maturação defeituosa do epitélio tímico também vista em outros modelos como nos camundongos deficientes em Foxn1 (da língua inglesa, *forkhead Box N1*) (Su et al., 2003), um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento das TEC (Blackburn et al., 1996; Anderson et al., 2006). Além disso, outros autores também demonstraram a participação dos receptores EphB2 e EphB3 durante a diferenciação e a determinação de fenótipos epiteliais em outros órgãos (Batlle et al., 2002; Dravis et al., 2004; Takano-Maruyama et al., 2006).

Em trabalhos prévios, foi ainda demonstrado que tais alterações no microambiente tímico, decorrentes da falta de uma ou mais Ephs A ou B, resultam em defeitos na diferenciação das células T. Neste sentido, camundongos deficientes em EphA4 apresentaram um bloqueio na maturação dos timócitos no estágio DN (CD4⁻CD8⁻), exibindo proporções reduzidas de timócitos DP (CD4⁺CD8⁺) (Munoz et al., 2006). Alterações semelhantes também foram encontradas em modelos quiméricos gerados em camundongos SCID (da língua inglesa, *Severe Combined Immunodeficiency Disease*) que receberam progenitores linfóides da medula óssea provenientes de animais deficientes em EphB2 e/ou EphB3 (Alfaro *et al.*, manuscrito em preparação). Neste sistema (Fig. 5.1), progenitores linfóides EphB2^{-/-} apresentaram uma massiva acumulação de timócitos DN, principalmente DN2 (CD44⁺CD25⁺) e DN3 (CD44⁻CD25⁺), resultando no decréscimo do número absoluto e da proporção de células DN4 (CD44⁻CD25⁻) e no quase total desaparecimento dos timócitos DP. Por outro lado, também foi detectado um aumento na proporção de células apoptóticas, principalmente em timócitos DP. Entretanto, progenitores linfóides EphB2^{LacZ}, que são desprovidos do domínio intracelular do receptor EphB2, mas que, através de seu ectodomínio, podem transmitir sinais *reverse* às células vizinhas que expressam efrina-B (Fig. 5.1), mostraram um fenótipo menos severo. Observou-se ainda uma recuperação parcial do bloqueio de maturação das células DN em DP e uma proporção normal de células DP apoptóticas. Porém, houve diminuição de números absolutos e das proporções das subpopulações de timócitos SP CD4⁺TCRβ^{hi} e CD8⁺TCRβ^{hi}, demonstrando que o sinal *reverse* desencadeado por EphB2 foi insuficiente para permitir a maturação final das células DP nas quimeras SCID que receberam progenitores linfóides EphB2^{LacZ}. A relevância dos

sinais *reverse* para as funções biológicas do receptor EphB2 foi primeiramente evidenciado por Henkemeyer (Henkemeyer et al., 1996) e, mais recentemente, confirmado por este mesmo grupo (Cowan et al., 2004). Em geral, vários exemplos indicam que diferentes combinações de sinais *reverse/forward* resultam em diferentes comportamentos celulares nas células que expressam Eph e/ou efrinas (Pasquale, 2005).

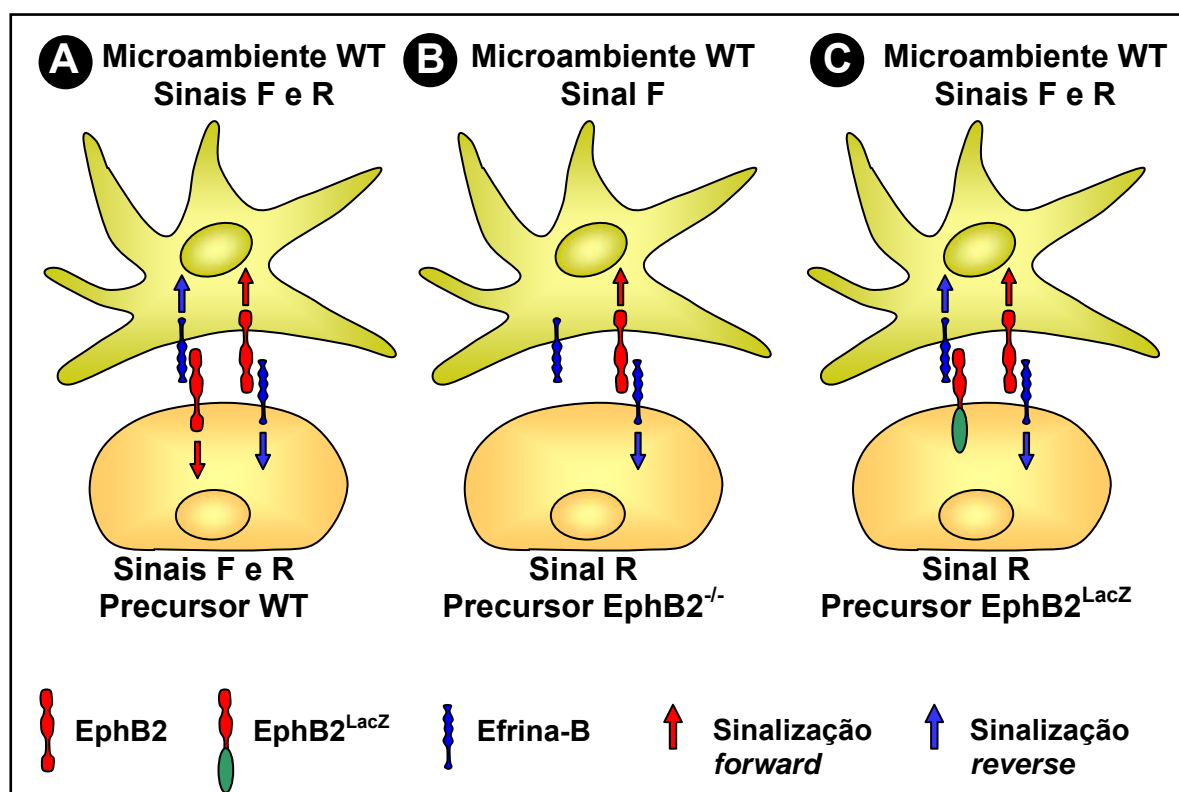


Figura 5.1 - Diferentes sinais Eph-efrina estabelecidos entre células do microambiente tímico de camundongos SCID (WT) e os precursores hematopoiéticos WT, EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ}. **A.** Nas quimeras WT-WT (condição controle) ambas as células do microambiente e precursoras recebem, sinais *forward* (F) e *reverse* (R). **B.** Ao contrário, nas quimeras EphB2^{-/-}-WT, a falta da EphB2 nas células precursoras permite a estas somente receber sinais *reverse*, mas não *forward*, enquanto que as células do microambiente recebem sinais *forward*, mas não *reverse*. **C.** Novamente, nas quimeras EphB2^{LacZ}-WT, as células precursoras recebem apenas sinais *reverse*, mas o microambiente tímico é sinalizado através de sinais *forward* e *reverse*.

Em conjunto, estes resultados demonstram o papel de Eph e efrinas na morfogênese tímica, controlando a sobrevivência celular, apoptose e proliferação, assim como, modulando a expressão gênica em ambos componentes celulares, tímócitos e TECs. Como resultado, Eph e efrinas parecem afetar o desenvolvimento

das TEC e, em grau variável, a diferenciação das células T. Diante de tal panorama e do fato de Eph e efrinas serem moduladoras de eventos migratórios em diversos tecidos (Poliakov et al., 2004; Pasquale, 2008) e, inclusive, de linfócitos T (Sharfe et al., 2002; Hjorthaug & Aasheim, 2007), não é difícil imaginar que as alterações encontradas nos diferentes modelos e aproximações experimentais anteriormente descritos sejam também decorrentes de alterações na migração tanto de precursores hematopoéticos que colonizam o timo, quanto dos timócitos em diferenciação. Desta forma, decidimos avaliar os possíveis efeitos desencadeados pela sinalização EphB2/efrina-B1 sobre a migração de precursores T.

5.2 Interações mediadas por EphB2 regulam a migração de progenitores T durante a colonização do timo

Os mecanismos moleculares que controlam a migração celular direcional durante a maturação dos precursores T tem sido objeto de inúmeros estudos, os quais identificaram um extenso número de moléculas que compõem a matriz extracelular, o citoesqueleto, proteínas de membrana e intracelulares de sinalização e proteínas adaptadoras que estão envolvidas em vários passos da migração celular. Todos estes mecanismos estão sujeitos a uma complexa regulação que controla tanto eventos que promovem a atração das células como aqueles que as repelem de domínios teciduais específicos. O efeito combinado destes sinais é que determina o tempo e a direção da locomoção celular, caracterizando um sistema multivetorial (Mendes-da-Cruz et al., 2008).

Os receptores Eph e seus ligantes efrina foram caracterizados como importantes reguladores da migração celular (Wang & Anderson, 1997; Wilkinson, 2001), apresentando distintos mecanismos através dos quais podem controlar a adesão/desadesão das células e a dinâmica do citoesqueleto de actina (Poliakov et al., 2004). Como mencionado acima, alguns trabalhos mostraram que Eph e efrinas atuam controlando a migração de linfócitos T. No que diz respeito à migração destes linfócitos T durante sua maturação intratímica, conhecemos apenas um trabalho demonstrando que a co-estimulação de timócitos com as efrinas-A1, A3, B2 ou B3 e CXCL12 promove uma redução na quimiotaxia destas células (Sharfe et al., 2002). Esta inibição parece ocorrer devido a alterações da atividade de pequenas GTPases (Rho e Cdc42) que, através da sinalização deflagrada por efrina-A1, reduz a formação dos filamentos de actina induzidos por CXCL12 favorecendo a retração

celular. Entretanto, a estimulação dos timócitos com efrina-A1 sozinha não apresentou efeito significativo sobre a polimerização basal da actina, sugerindo que a sinalização desencadeada por efrina-A1 atue como regulador do sinal derivado da quimiocina CXCL12, potencialmente modulando mecanismos quimioatrativos em sinais repulsivos.

Neste sentido, sabendo-se que durante a colonização do timo por progenitores hematopoiéticos e a diferenciação intratímica de células T, existe participação de sinalizações moduladas pelo contato célula-célula e célula-matriz extracelular (que possibilitam a entrada destes progenitores e sua migração através de nichos intratímicos específicos), testamos o envolvimento da sinalização desencadeada pelo receptor EphB2 como modulador da migração celular durante a colonização do timo fetal. Como mencionado anteriormente, resultados prévios demonstraram a participação deste receptor e de seus principais ligantes efrina-B1 e efrina-B2 durante a diferenciação das células T, através de modelos *in vitro* e *in vivo* (Alfaro et al., 2007, 2008). Na presente tese, demonstramos inicialmente que tanto o receptor EphB2, quanto seus ligantes efrina-B1 e efrina-B2, são expressos por progenitores da medula óssea de fenótipo Lin⁻, população heterogênea de precursores que são potencialmente capazes de originar linfócitos T maduros no timo, assim como outras linhagens hematopoiéticas (Bhandoola & Sambandam, 2006). Assim como descrito em outros sistemas (Pasquale, 2008; Miao & Wang, 2009), a expressão destas moléculas em progenitores hematopoiéticos sugere a participação do sistema Eph-efrina nos processos de maturação destas células. Entretanto, pouco se sabe a esse respeito. Com o intuito de estudar o papel destas moléculas como moduladoras da migração de progenitores hematopoiéticos no que diz respeito à colonização do timo, avaliamos se os precursores LSK (Lin⁻SCA-1⁺KIT^{hi}), que compreendem subpopulações de progenitores hematopoiéticos mais imaturos, e os precursores linfóides comuns (CLP; Lin⁻SCA-1^{low}KIT^{low}IL-7R α ⁺) apresentavam modificações percentuais entre camundongos normais e os mutantes em EphB2 utilizados nestes estudos. Vimos que ambos os animais EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ} apresentaram proporções normais destas subpopulações de precursores, indicando que possíveis diferenças encontradas durante o processo de colonização tímica em comparação com precursores normais não seriam relacionadas a um defeito na diferenciação destes precursores.

À semelhança de dados anteriores demonstrando redução da migração de progenitores neurais EphB1^{-/-} (Chumley et al., 2007), vimos que a falta do receptor EphB2 nos progenitores Lin⁻ da medula óssea promoveu redução da capacidade migratória destas células durante a recolonização de lóbulos tímicos alinfóides. Este resultado, conjuntamente com aqueles anteriormente citados demonstrando falhas na maturação dos precursores deficientes em EphB2 nas quimeras SCID, atribuem um papel autônomo do receptor EphB2 nestes precursores, responsável pela correta migração e maturação no timo. Entretanto, precursores EphB2^{LacZ}, capazes de ativar sinais *reverse* nas células microambientais que expressam efrinas-B, e que nas quimeras SCID demonstraram um fenótipo menos severo, também tiveram sua capacidade migratória recuperada e foram capazes de recolonizar os lóbulos tímicos com a mesma eficiência que os precursores normais, indicando mais uma vez a importância dos sinais *reverse* induzidos nas TECs (Fig. 5.1). Neste caso, se levarmos em consideração que a maturação intratímica dos precursores é dependente de sua correta migração através dos nichos específicos, podemos sugerir que este sinal *reverse*, desencadeado pela EphB2 dos precursores EphB2^{LacZ} nas TEC, foi capaz de liberar de alguma forma a entrada destes precursores a seus nichos intratímicos específicos e, com isso, recuperar a maturação do estágio DN para DP observado nas quimeras SCID. De fato, o papel da sinalização *reverse* via efrinas já foi descrito em outros sistemas como modulador de interações intercelulares, modificando a organização do citoesqueleto, promovendo ativação, adesão e migração celular, dentre outros (Nestor et al., 2007; Bundesen et al., 2003; Zamora et al., 2006; Pfaff et al., 2008). Nossos próprios resultados *in vitro* demonstram a participação do sinal *reverse* de efrinas-B durante a interação entre TEC e tímócitos, já que a adição de proteínas quiméricas EphB2/Fc ou efrina-B1/Fc bloqueou a formação de interações TEC-tímócitos e de sinapses imunológicas com ativação do TCR (Alfaro et al., 2007). Nesse sentido, deveríamos supor que o sinal *reverse* desencadeado pelos precursores EphB2^{LacZ} não é capaz de sustentar a correta migração dos precursores uma vez que observamos nas quimera SCID uma redução no número e proporção das subpopulações de tímócitos SP CD4⁺TCR β ^{hi} e CD8⁺TCR β ^{hi}. De fato, quando visualizamos através de microscopia os lóbulos tímicos reconstituídos por mesclas de precursores normais e deficientes em EphB2, marcados com CFSE (marcado celular verde) e PKH26 (marcador celular vermelho) respectivamente, constatamos que apesar dos precursores EphB2^{LacZ} serem encontrados dentro dos lóbulos em igual número que

os precursores normais, estes precursores deficientes não foram capazes de colonizar igualmente os nichos intratímicos nas regiões mais internas dos lóbulos. Em sua maioria, eles se restringem às regiões periféricas ou subcapsulares, enquanto que os precursores normais apresentaram uma distribuição homogênea dentro dos lóbulos tímicos. Em conjunto, estes resultados nos permitem concluir que tanto os sinais *forward* transmitidos pelo receptor EphB2 aos precursores, quanto os sinais *reverse* deflagrados pelos ligantes efrina-B nas TECs, são essenciais para a correta migração e maturação destes precursores T dentro do timo.

Além do papel autônomo atribuído aos receptores EphB2 nos progenitores linfóides que migraram através de um microambiente tímico normal, observamos também um importante bloqueio na migração destes precursores através de microambientes EphB2 mutantes, mesmo quando avaliamos a entrada de progenitores normais. Este resultado nos indica que a EphB2 expressa pelas TECs exerce também um papel não autônomo sobre a migração dos precursores linfóides. Além disso, nossos resultados demonstraram que esta redução da migração é equivalente nos lóbulos EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ}, indicando que essa falha é decorrente da falta dos sinais *forward* nas TECs (Fig. 5.2) que, como vimos anteriormente, levam a uma intensa desorganização do microambiente tímico e a falhas na maturação dos timócitos. Corroborando estes resultados, foi visto que lóbulos tímicos EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ} implantados sob a cápsula renal de camundongos WT apresentavam importante redução no número de timócitos WT em comparação com os lóbulos normais (García-Ceca *et al.*, dados não publicados). Resultados similares também foram encontrados em lóbulos EphA4^{-/-} implantados sob a cápsula renal de camundongos SCID reconstituídos com progenitores linfóides normais (Munoz *et al.*, 2006).

Por outro lado, observando a migração celular sobre microambientes normais que não demonstram alterações na deposição de proteínas da ECM ou quimiocinas, devemos considerar que, apesar da inalterada expressão dos receptores para tais moléculas nas células EphB2 mutantes, seu grau de ativação poderia estar sendo modificado pela falta total ou parcial dos sinais provenientes dos receptores EphB2 nas células EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ}, respectivamente. De fato, a comunicação cruzada entre estes receptores (integrinas, quimiocinas, dentre outros) e as Eph/efrinas já foram descritas em outros sistemas (Zou *et al.*, 1999; Arvanitis & Davy, 2008) e, também em timócitos (Sharfe *et al.*, 2002).

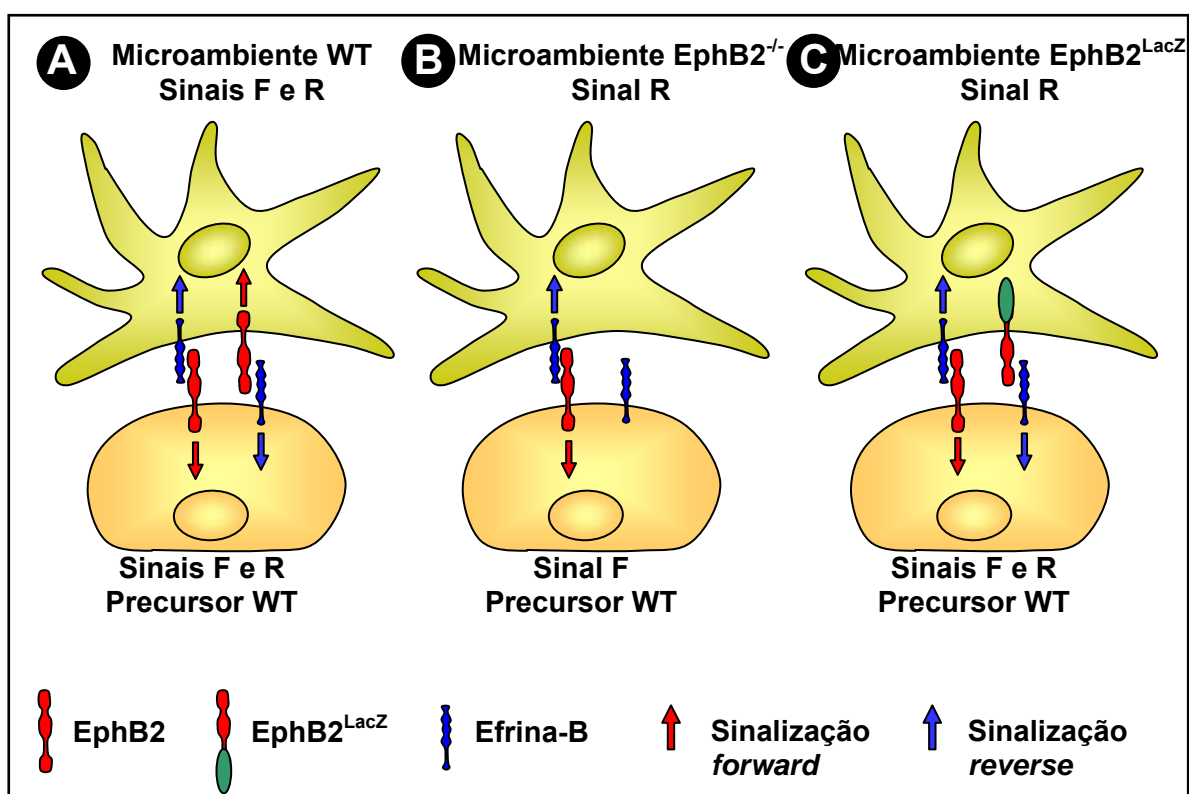


Figura 5.2 - Diferentes sinais Eph-efrina estabelecidos entre precursores hematopoiéticos WT e células microambientais dos lóbulos tímicos provenientes de camundongos WT, EphB2^{-/-} e EphB2^{LacZ}. **A.** Nos lóbulos WT reconstituídos por células WT (condição controle) ambas as células microambientais e precursoras recebem, sinais *forward* (F) e *reverse* (R). **B.** Ao contrário, nos lóbulos EphB2^{-/-}, a falta da EphB2 nas células do microambiente permite a estas somente receber sinais *reverse*, mas não *forward*, enquanto que as células progenitoras recebem sinais *forward*, mas não *reverse*. **C.** Novamente, nos lóbulos EphB2^{LacZ}, as células do microambiente recebem apenas sinais *reverse*, mas os precursores são sinalizados através de sinais *forward* e *reverse*.

Para testar esta possibilidade, realizamos experimentos de migração em câmaras de *transwell*, o que nos permitiu avaliar separadamente a possibilidade de uma regulação cruzada entre EphB2 e os receptores de ECM ou de quimiocinas. Vimos que a migração através de laminina, fibronectina ou das quimiocinas CXCL12, CCL21 e CCL25 foi consistentemente reduzida em ambas as células mutantes (progenitores hematopoiéticos e timócitos) em relação ao controle WT, indicando que a falta do receptor EphB2, ou mesmo de apenas seu domínio intracelular, é capaz de bloquear parcialmente a migração celular dirigida por estímulos haptotáticos e quimiotáticos. De fato, esta redução da migração de progenitores e timócitos EphB2 mutantes parece ser específica, pois não encontramos diferenças na capacidade

migratória destas células quando submetidas a migrar sobre BSA. Assim, é possível que esse defeito na migração celular deva-se à falta de co-estimulação de integrinas e de receptores de quimiocinas pelos receptores EphB2. Esta atividade já foi descrita em outros modelos envolvendo Eph/efrinas e integrinas e receptores de quimiocina (Lu et al., 2001; Poliakov et al., 2004; Arvanitis & Davy, 2008). Foi demonstrada inclusive a associação física entre um receptor Eph e uma integrina (Prevost et al., 2005). Cabe ainda destacar o trabalho de Grunwald e colaboradores que demonstra a associação entre receptores EphB2 e receptores NMDA durante a sinaptogênese. Neste estudo os autores descrevem os defeitos causados na plasticidade sináptica pela falta da regulação cruzada entre receptores EphB2 e as vias de sinalização ativadas pelos receptores NMDA e demonstram ainda a recuperação destes defeitos nas células EphB2^{LacZ} através de uma sinalização independente do domínio catalítico tirosina-quinase que é inexistente nestas células, mas que conservam de qualquer forma alguns domínios de sinalização intracelulares (Grunwald et al., 2001). Estes resultados suportam a idéia de que a falta de EphB2 associada com os receptores de quimiocina em nosso sistema diminui a migração nas células EphB2^{-/-}, mas não afeta igualmente as células EphB2^{LacZ}, onde a associação cruzada e os possíveis sinais independentes do domínio tirosina-quinase podem ser recuperados.

Finalmente, devemos ainda considerar que se a falta do receptor EphB2 ou de seu sinal pode desregular a migração celular dirigida por estímulos teciduais, também a ativação do sinal *forward* transmitido por este receptor e outros receptores EphB podem atuar regulando tais estímulos e a atividade migratória das células sinalizadas, como demonstrado em outros sistemas (Zou et al., 1999; Miao et al., 2000; Han et al., 2002; Yamazaki et al., 2009). Através da co-estimulação com proteínas recombinantes efrina-B1/Fc neste mesmo sistema de migração induzida por proteínas da ECM ou quimiocinas, demonstramos que precursores hematopoiéticos e timócitos WT, que são capazes de desencadear sinais *forward* através de receptores EphB, inclusive EphB2, apresentam sua migração direcional (hapto e quimiotaxia) inibida (Fig. 5.3). Esta inibição pode ser interpretada como um sinal repulsivo aos estímulos proporcionados neste sistema, assim como previamente observado em outras células (Poliakov et al., 2008; Lin et al., 2008), ou mesmo em timócitos (Sharfe et al., 2002).

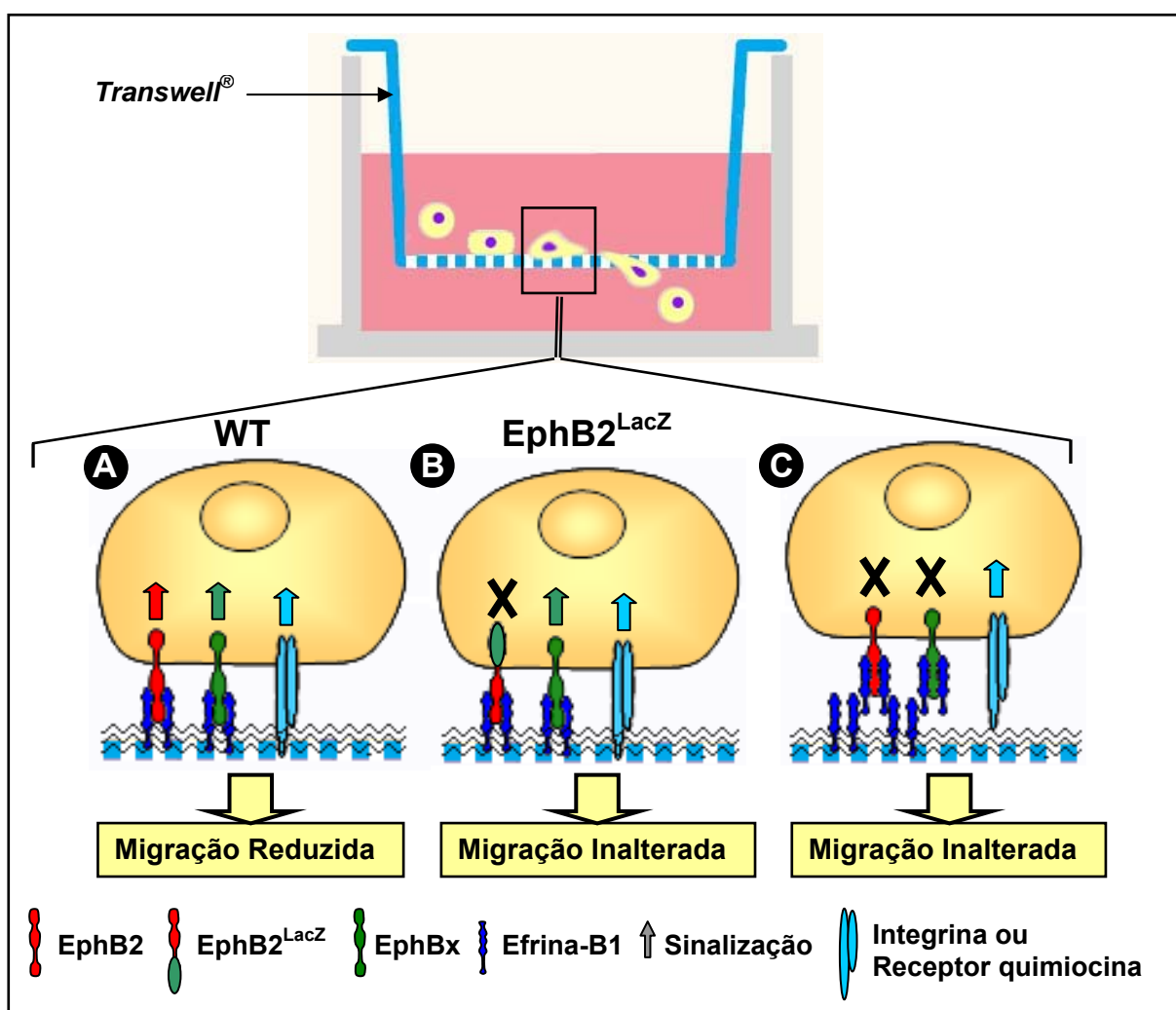


Figura 5.3 - Sistema de migração onde diferentes sinais EphB e de integrinas ou receptores de quimiocina são desencadeados em células WT e EphB2^{LacZ}. **A.** Células WT são co-estimuladas por efrina-B1/Fc e proteínas de matriz ou quimiocinas, desencadeando sinais através de seus respectivos receptores. **B.** Células EphB2^{LacZ} co-estimuladas por efrina-B1/Fc e matriz ou quimiocinas não são capazes de transmitir sinais através de EphB2, mas seguem deflagrando sinais através de outras EphB e de integrinas ou receptores de quimiocina. **C.** Células WT e EphB2^{LacZ} previamente bloqueadas com efrina-B1/Fc solúvel não são capazes de transmitir sinais através de receptores EphB, apenas ativam sinalizações via integrinas ou receptores de quimiocina.

Por outro lado, quando co-estimulamos precursores hematopoiéticos ou tímocitos EphB2^{LacZ} com efrina-B1, que neste caso é capaz de deflagrar sinais *forward* através de outros receptores EphB, mas não através de EphB2, não observamos qualquer inibição da migração celular dirigida por ECM ou quimiocinas (Fig. 5.3). Estes resultados sugerem que a ativação específica dos sinais *forward* transmitidos através do receptor EphB2 promove a repulsão celular aos estímulos induzidos por

ECM e quimiocinas. Entretanto, não podemos descartar que a própria falta do domínio tirosina-quinase nestas células EphB2^{LacZ} esteja modulando tal resposta, como vimos anteriormente neste mesmo sistema sem a co-estimulação deflagrada pela efrina-B1.

Em conjunto, estes resultados sugerem a proposição de um modelo hipotético onde, a colonização do timo fetal por parte dos precursores hematopoiéticos pode ser entendida como uma progressão de diferentes processos de atração e repulsão das células que colonizam o timo e migram através de seu estroma. Aliás, esta é uma das características mais bem estudadas e relatadas a respeito da função de Ephs e efrinas durante o desenvolvimento de diferentes sistemas (Wilkinson, 2000; Kullander & Klein, 2002; Poliakov et al., 2004; Pasquale, 2005). Além disso, no que diz respeito à migração e maturação das células T em desenvolvimento no timo, tem sido demonstrado que a ação de diferentes estímulos, gerados pelos diferentes microambientes presentes neste órgão, irá modular a migração celular em direção e velocidade específicas. Assim, o processo migratório pode mudar em dependência da concentração e da combinação de cada estímulo em cada região do timo, assim como de acordo com a capacidade das células em responder através de seus receptores específicos. A esse modelo chamamos migração multivetorial (Mendes-da-Cruz et al., 2008), onde o vetor resultante de migração pode mudar dependendo do somatório de estímulos proporcionados em um determinado momento. Neste contexto, consideramos as interações mediadas pela EphB2/efrina-B1 como novos vetores da migração celular durante a colonização do timo (Fig. 5.4). Podemos imaginar que, durante a colonização do timo fetal, os precursores hematopoiéticos são primeiramente atraídos por fatores quimiotáticos e posteriormente entram em contato com proteínas de ECM presentes na cápsula deste órgão. Neste momento, a quimioatração dos progenitores e as interações com a ECM podem ser reguladas através de interações independentes de fosforilação ou da ativação de sinais *forward* pelos receptores EphB2 que se associam em microdomínios de membrana juntamente com integrinas e receptores de quimiocina, como já relatado anteriormente (Gauthier & Robbins, 2003; Murai & Pasquale, 2003). Após atravessar a cápsula tímica, a ativação do complexo Eph-efrina, proporcionada pela interação das células progenitoras com as TECs, irá promover de um lado, através de sinais *reverse* ao epitélio tímico, modificações no microambiente que permitam a entrada destas células progenitoras e, por outro lado, mudanças na sinalização dirigida por este microambiente que levem estas células progenitoras a serem repelidas desta

região subcapsular e migrem para nichos apropriados no interior dos lóbulos tímicos. Como sabemos, esta migração será acompanhada por diferentes estímulos microambientais que permitirão a aquisição de distintos fenótipos e a maturação destas células dentro do timo, proporcionando assim a geração de linfócitos T maduros.

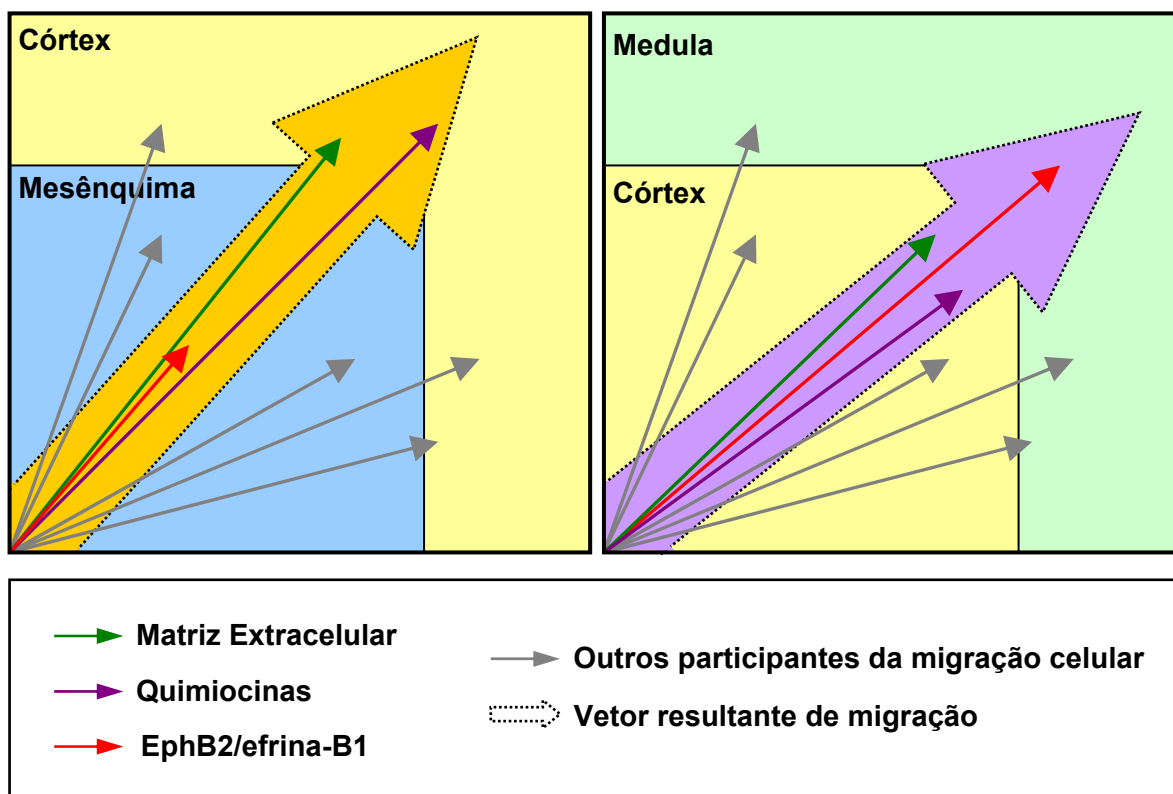


Figura 5.4 - Participação dos receptores EphB2 no modelo de migração multivetorial durante a colonização do timo. O painel à esquerda define esquematicamente a hipótese de que a migração dos precursores hematopoiéticos durante a entrada no timo resulte de um equilíbrio de várias interações entre ligantes e receptores simultaneamente. Desta forma, os vetores individuais dão origem a um vetor resultante que dirige a migração destes precursores para o interior dos lóbulos tímicos, do mesênquima que o circunda migrando através da cápsula até o córtex. O painel à direita demonstra que esta migração multivetorial pode ser alterada quando estes precursores se encontram agora dentro do timo, onde um ou mais destes vetores individuais podem ser alterados. As flechas individuais representam os vetores de migração induzidos por estímulos específicos como proteínas da matriz extracelular (verde), quimiocinas (roxo), EphB2/efrina-B1 (vermelho) e outras moléculas (cinza). As flechas pontilhadas representam o vetor resultante de migração, somatório dos vetores individuais (adaptado de Mendes-da-Cruz, 2008).

6. CONCLUSÕES

O conjunto de dados experimentais obtidos e sua discussão com os dados existentes na literatura nos permitem chegar às seguintes conclusões:

1. Tanto células epiteliais tímicas, quanto tímócitos, expressam o receptor EphB2 e ao menos um de seus principais ligantes, a efrina-B2;
2. O timo de camundongos deficientes em EphB2 e/ou EphB3 apresenta profundas alterações na rede epitelial tímica, tanto em termos de distribuição e organização, como também em quantidade, evidenciando que o sinal desencadeado por estes receptores seja essencial para o desenvolvimento e para a correta organização dos microambientes tímicos;
3. O receptor EphB2 e seus principais ligantes, efrina-B1 e efrina-B2, são expressos nas células precursoras (Lin^-) derivadas da medula óssea, onde este receptor desempenha um papel autônomo modulando a migração e a capacidade de entrada destas células em lóbulos tímicos alinfóides;
4. A falta do receptor EphB2 nestas células precursoras induz um bloqueio da diferenciação T no estágio DN ($\text{CD4}^- \text{CD8}^-$), enquanto que a ativação da sinalização via efrina-B pelos precursores $\text{EphB2}^{\text{LacZ}}$ permite a maturação dos tímócitos DN para DP ($\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$), mas não sua diferenciação em células maduras SP ($\text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ e $\text{CD4}^- \text{CD8}^+$), mostrando a participação deste receptor durante a diferenciação dos linfócitos T;
5. A falta do receptor EphB2 ou de seu domínio catalítico tirosina-quinase nas células do microambiente tímico reduz a deposição de proteínas da matriz extracelular (laminina e fibronectina) e quimiocinas (CXCL12, CCL21, CCL25) no timo, causando ainda importante inibição da entrada dos precursores hematopoiéticos neste órgão;
6. O desequilíbrio dos sinais transmitidos pelo complexo EphB2/efrina-B impede o correto posicionamento intratímico dos precursores hematopoiéticos migrantes recém chegados ao timo, corroborando nossos resultados anteriores que indicam a participação destas moléculas no processo de diferenciação de células T;

7. Nos animais mutantes, a ausência do receptor EphB2, ou de seu domínio catalítico tirosina-quinase, não modifica a expressão dos receptores celulares VLA-4, VLA-5, VLA-6, CXCR4, CCR7 e CCR9, tanto em timócitos, quanto nos precursores hematopoiéticos, assim como não afeta a diferenciação de subpopulações específicas destas células precursoras (LSK e CLP);
8. Precursores hematopoiéticos e timócitos deficientes no receptor EphB2, ou mesmo em seu domínio intracelular, apresentam migração reduzida frente a proteínas da matriz extracelular (laminina e fibronectina) e quimiocinas (CXCL12, CCL21 e CCL25), sugerindo um defeito na ativação de integrinas e de receptores de quimiocina mediada pelo receptor EphB2;
9. A co-estimulação dos precursores hematopoiéticos e timócitos normais, com proteínas recombinantes efrina-B1/Fc e proteínas de matriz extracelular ou quimiocinas, promove uma inibição da haptotaxia e quimiotaxia celular, indicando uma possível sinalização cruzada entre receptores EphB e integrinas ou receptores de quimiocina;
10. Na ausência do domínio catalítico tirosina-quinase, a migração dos timócitos EphB2^{LacZ}, co-estimulados com efrina-B1 e proteínas de matriz extracelular, não sofre alteração, sugerindo que o sinal *forward* desencadeado pelo receptor EphB2 é responsável pela redução da migração observada nas células que expressam este receptor;
11. Finalmente, seguindo nosso conceito de migração multivetorial, podemos considerar as interações mediadas pelos receptores EphB2 como um novo vetor que irá modular a migração dos precursores T durante os processos de colonização do timo e de diferenciação linfocitária no interior deste órgão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasheim HC, Delabie J & Finne EF. Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. (2005). *Blood*, **105**, 2869-76.
- Aasheim HC, Munthe E, Funderud S, Smeland EB, Beiske K & Logtenberg T. A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. (2000). *Blood*, **95**, 221-30.
- Aasheim HC, Terstappen LW & Logtenberg T. Regulated expression of the Eph-related receptor tyrosine kinase Hek11 in early human B lymphopoiesis. (1997). *Blood*, **90**, 3613-22.
- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W & Klein R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. (1999). *Genes Dev*, **13**, 295-306.
- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y & Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. (2001). *Immunity*, **15**, 659-69.
- Alfaro D, Garcia-Ceca JJ, Cejalvo T, Jimenez E, Jenkinson EJ, Anderson G, Munoz JJ & Zapata A. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. (2007). *Eur J Immunol*, **37**, 2596-605.
- Alfaro D, Munoz JJ, Garcia-Ceca J, Cejalvo T, Jimenez E & Zapata A. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. (2008). *Immunology*, **125**, 131-43.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S & Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 15396-401.
- Alonso CL, Trinidad EM, de Garcillan B, Ballesteros M, Castellanos M, Cotillo I, Munoz JJ & Zapata AG. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. (2009). *Leuk Res*, **33**, 395-406.
- Anderson G & Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. (2001). *Nat Rev Immunol*, **1**, 31-40.
- Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FA, White AJ, Pongracz JE, Rossi SW & Jenkinson EJ. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 10-27.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C & Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. (2002). *Science*, **298**, 1395-401.
- Andres AC, Reid HH, Zurcher G, Blaschke RJ, Albrecht D & Ziemiecki A. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. (1994). *Oncogene*, **9**, 1461-7.
- Aoki M, Yamashita T & Tohyama M. EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 32643-50.
- Arvanitis D & Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. (2008). *Genes Dev*, **22**, 416-29.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der

- Mark K, Wewer UM, Yamada Y & Yurchenco PD. A simplified laminin nomenclature. (2005). *Matrix Biol*, **24**, 326-32.
- Balciunaite G, Ceredig R, Massa S & Rolink AG. A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. (2005). *Eur J Immunol*, **35**, 2019-30.
- Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, Gill J, Boyd R, Sussman DJ & Hollander GA. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. (2002). *Nat Immunol*, **3**, 1102-8.
- Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T & Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. (2002). *Cell*, **111**, 251-63.
- Bennett AR, Farley A, Blair NF, Gordon J, Sharp L & Blackburn CC. Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. (2002). *Immunity*, **16**, 803-14.
- Benz C, Heinzel K & Bleul CC. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. (2004). *Eur J Immunol*, **34**, 3652-63.
- Berclaz G, Flutsch B, Altermatt HJ, Rohrbach V, Djonov V, Ziemiecki A, Dreher E & Andres AC. Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. (2002). *Oncol Rep*, **9**, 985-9.
- Bevan MJ. In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. (1997). *Immunity*, **7**, 175-8.
- Bhandoola A & Sambandam A. From stem cell to T cell: one route or many? (2006). *Nat Rev Immunol*, **6**, 117-26.
- Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. (2007). *Immunity*, **26**, 678-89.
- Blackburn CC, Augustine CL, Li R, Harvey RP, Malin MA, Boyd RL, Miller JF & Morahan G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5742-6.
- Blackburn CC & Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. (2004). *Nat Rev Immunol*, **4**, 278-89.
- Bleul CC & Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. (2000). *Eur J Immunol*, **30**, 3371-9.
- Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE & Kaiser HE. The role of the reticulo-epithelial (RE) cell network in the immuno-neuroendocrine regulation of intrathymic lymphopoiesis. (2000). *Anticancer Res*, **20**, 1871-88.
- Boehm T & Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. (2006). *Trends Immunol*, **27**, 477-84.
- Boehm T, Scheu S, Pfeffer K & Bleul CC. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. (2003). *J Exp Med*, **198**, 757-69.
- Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Cramer G, Mungall BA, Bishop KA, Choudhry V, Dimitrov DS, Wang LF, Eaton BT & Broder CC. Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10652-7.
- Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ & Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. (2006). *Trends Cell Biol*, **16**, 443-52.

- Bourgin C, Murai KK, Richter M & Pasquale EB. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. (2007). *J Cell Biol*, **178**, 1295-307.
- Brantley-Sieders DM, Caughron J, Hicks D, Pozzi A, Ruiz JC & Chen J. EphA2 receptor tyrosine kinase regulates endothelial cell migration and vascular assembly through phosphoinositide 3-kinase-mediated Rac1 GTPase activation. (2004). *J Cell Sci*, **117**, 2037-49.
- Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM, Coffman K, Jackson D, Bruckheimer E, Muraoka-Cook RS & Chen J. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. (2008). *J Clin Invest*, **118**, 64-78.
- Bruckner K & Klein R. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. (1998). *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 375-82.
- Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Ginter TI, Yamashita Y, Sharrow SO & Singer A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. (2000). *Immunity*, **13**, 59-71.
- Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS & Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. (2003). *J Neurosci*, **23**, 7789-800.
- Capone M, Hockett RD, Jr. & Zlotnik A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12522-7.
- Chidgey AP & Boyd RL. Stemming the tide of thymic aging. (2006). *Nat Immunol*, **7**, 1013-6.
- Christensen JL & Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14541-6.
- Chumley MJ, Catchpole T, Silvano RE, Kernie SG & Henkemeyer M. EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. (2007). *J Neurosci*, **27**, 13481-90.
- Ciofani M & Zuniga-Pflucker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. (2007). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 463-93.
- Ciossek T, Lerch MM & Ullrich A. Cloning, characterization, and differential expression of MDK2 and MDK5, two novel receptor tyrosine kinases of the eck/eph family. (1995). *Oncogene*, **11**, 2085-95.
- Clapp DW, Freie B, Lee WH & Zhang YY. Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats. (1995). *Blood*, **86**, 2113-22.
- Clevers H & Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. (2006). *Cancer Res*, **66**, 2-5.
- Compagni A, Logan M, Klein R & Adams RH. Control of skeletal patterning by ephrinB1-EphB interactions. (2003). *Dev Cell*, **5**, 217-30.
- Cortina C, Palomo-Ponce S, Iglesias M, Fernandez-Masip JL, Vivancos A, Whissell G, Huma M, Peiro N, Gallego L, Jonkheer S, Davy A, Lloreta J, Sancho E & Batlle E. EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. (2007). *Nat Genet*, **39**, 1376-83.
- Cory GO, Garg R, Cramer R & Ridley AJ. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 45115-21.

- Cowan CA & Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. (2001). *Nature*, **413**, 174-9.
- Cowan CA, Yokoyama N, Saxena A, Chumley MJ, Silvany RE, Baker LA, Srivastava D & Henkemeyer M. Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. (2004). *Dev Biol*, **271**, 263-71.
- Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ & Salomon DR. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. (1996). *J Exp Med*, **184**, 215-28.
- Crivellato E, Vacca A & Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. (2004). *Trends Immunol*, **25**, 210-7.
- Dalmat SR, Freitas CS & Savino W. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. (1999). *Blood*, **93**, 974-90.
- Dalva MB, McClelland AC & Kayser MS. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. (2007). *Nat Rev Neurosci*, **8**, 206-20.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M & Yancopoulos GD. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. (1994). *Science*, **266**, 816-9.
- Davy A, Bush JO & Soriano P. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. (2006). *PLoS Biol*, **4**, e315.
- Davy A & Robbins SM. Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. (2000). *Embo J*, **19**, 5396-405.
- Davy A & Soriano P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. (2005). *Dev Dyn*, **232**, 1-10.
- de Saint-Vis B, Bouchet C, Gautier G, Valladeau J, Caux C & Garrone P. Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. (2003). *Blood*, **102**, 4431-40.
- Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenroth M, Peltonen L, Walter J & Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. (2005). *J Exp Med*, **202**, 33-45.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B & Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. (2001). *Nat Immunol*, **2**, 1032-9.
- Deroanne C, Vouret-Craviari V, Wang B & Pouyssegur J. EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. (2003). *J Cell Sci*, **116**, 1367-76.
- Dravis C, Yokoyama N, Chumley MJ, Cowan CA, Silvany RE, Shay J, Baker LA & Henkemeyer M. Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. (2004). *Dev Biol*, **271**, 272-90.
- Drescher U. Eph family functions from an evolutionary perspective. (2002). *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 397-402.
- Durbin L, Brennan C, Shiomi K, Cooke J, Barrios A, Shanmugalingam S, Guthrie B, Lindberg R & Holder N. Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. (1998). *Genes Dev*, **12**, 3096-109.
- Easty DJ & Bennett DC. Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. (2000). *Melanoma Res*, **10**, 401-11.
- Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, Fallowfield ME, Florenes VA, Herlyn M & Bennett DC. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression. (1999). *Int J Cancer*, **84**, 494-501.

- Egea J & Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. (2007). *Trends Cell Biol*, **17**, 230-8.
- Elowe S, Holland SJ, Kulkarni S & Pawson T. Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 7429-41.
- Flanagan JG & Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. (1998). *Annu Rev Neurosci*, **21**, 309-45.
- Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, Lindblom P, Shani M, Zicha D & Adams RH. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. (2006). *Cell*, **124**, 161-73.
- Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M & Mehlen P. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. (2002). *Nature*, **417**, 443-7.
- Forster R, Davalos-Misslitz AC & Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. (2008). *Nat Rev Immunol*, **8**, 362-71.
- Fox GM, Holst PL, Chute HT, Lindberg RA, Janssen AM, Basu R & Welcher AA. cDNA cloning and tissue distribution of five human EPH-like receptor protein-tyrosine kinases. (1995). *Oncogene*, **10**, 897-905.
- Freywald A, Sharfe N, Miller CD, Rashotte C & Roifman CM. EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. (2006). *J Immunol*, **176**, 4066-74.
- Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T & Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 10150-6.
- Freywald A, Sharfe N & Roifman CM. The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 3823-8.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Strebhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S & Yancopoulos GD. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. (1996). *Neuron*, **17**, 9-19.
- Gallo G & Letourneau PC. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. (2004). *J Neurobiol*, **58**, 92-102.
- Gallo G, Yee HF, Jr. & Letourneau PC. Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. (2002). *J Cell Biol*, **158**, 1219-28.
- Garcia-Ceca JJ, Jimenez E, Alfaro D, Cejalvo T, Muñoz JJ, Zapata AG. The failure of EphB2 and/or EphB3 deficient mice to organize a normal thymic epithelial network reinforces the role of Eph signaling in the thymus histogenesis. (2009). *Int J Dev Biol*, no prelo.
- Gauthier LR & Robbins SM. Ephrin signaling: One raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? (2003). *Life Sci*, **74**, 207-16.
- George SE, Simokat K, Hardin J & Chisholm AD. The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. (1998). *Cell*, **92**, 633-43.
- Gerlai R. EphB and NMDA receptors: components of synaptic plasticity coming together. (2002). *Trends Neurosci*, **25**, 180-1.
- Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G & Boyd R. Thymic generation and regeneration. (2003). *Immunol Rev*, **195**, 28-50.
- Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC & Manley NR. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. (2001). *Mech Dev*, **103**, 141-3.

- Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR & Blackburn CC. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. (2004). *Nat Immunol*, **5**, 546-53.
- Gray DH, Tull D, Ueno T, Seach N, Classon BJ, Chidgey A, McConville MJ & Boyd RL. A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. (2007). *J Immunol*, **178**, 4956-65.
- Gray DH, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y & Boyd RL. Controlling the thymic microenvironment. (2005). *Curr Opin Immunol*, **17**, 137-43.
- Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, Wilkinson GA, Unsicker K, Lipp HP, Bonhoeffer T & Klein R. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. (2001). *Neuron*, **32**, 1027-40.
- Gu C & Park S. The EphA8 receptor regulates integrin activity through p110gamma phosphatidylinositol-3 kinase in a tyrosine kinase activity-independent manner. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 4579-97.
- Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY & Chen X. Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. (2006a). *Carcinogenesis*, **27**, 454-64.
- Guo H, Miao H, Gerber L, Singh J, Denning MF, Gilliam AC & Wang B. Disruption of EphA2 receptor tyrosine kinase leads to increased susceptibility to carcinogenesis in mouse skin. (2006b). *Cancer Res*, **66**, 7050-8.
- Gurniak CB & Berg LJ. A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity. (1996). *Oncogene*, **13**, 777-86.
- Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M & Vogt T. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. (2004). *Clin Chem*, **50**, 490-9.
- Han DC, Shen TL, Miao H, Wang B & Guan JL. EphB1 associates with Grb7 and regulates cell migration. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 45655-61.
- Hansen MJ, Dallal GE & Flanagan JG. Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. (2004). *Neuron*, **42**, 717-30.
- Hansenne I, Louis C, Martens H, Dorban G, Charlet-Renard C, Peterson P & Geenen V. Aire and Foxp3 expression in a particular microenvironment for T cell differentiation. (2009). *Neuroimmunomodulation*, **16**, 35-44.
- Hattori M, Osterfield M & Flanagan JG. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. (2000). *Science*, **289**, 1360-5.
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR & Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. (2004). *Immunol Rev*, **199**, 9-26.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T & Klein R. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. (1996). *Cell*, **86**, 35-46.
- Heroult M, Schaffner F & Augustin HG. Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. (2006). *Exp Cell Res*, **312**, 642-50.
- Hess AR, Margaryan NV, Seftor EA & Hendrix MJ. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. (2007). *Dev Dyn*, **236**, 3283-96.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M & Nikolov DB. Repelling class discrimination:

- ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. (2004). *Nat Neurosci*, **7**, 501-9.
- Himanen JP, Saha N & Nikolov DB. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. (2007). *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 534-42.
- Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M & O'Leary DD. EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. (2002). *Neuron*, **35**, 475-87.
- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J & Takaku F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. (1987). *Science*, **238**, 1717-20.
- Hiramine C, Nakagawa T, Miyauchi A & Hojo K. Thymic nurse cells as the site of thymocyte apoptosis and apoptotic cell clearance in the thymus of cyclophosphamide-treated mice. (1996). *Lab Invest*, **75**, 185-201.
- Hjorthaug HS & Aasheim HC. Ephrin-A1 stimulates migration of CD8+CCR7+ T lymphocytes. (2007). *Eur J Immunol*, **37**, 2326-36.
- Hollander G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C & Takahama Y. Cellular and molecular events during early thymus development. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 28-46.
- Holmberg J, Clarke DL & Frisen J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. (2000). *Nature*, **408**, 203-6.
- Huai J & Drescher U. An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 6689-94.
- Hubbard SR & Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. (2007). *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 117-23.
- Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, Keivens VM, Schwartz MA & Ginsberg MH. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. (1997). *Cell*, **88**, 521-30.
- Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP & Daniel TO. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. (1999). *Embo J*, **18**, 2165-73.
- Huynh-Do U, Vindis C, Liu H, Cerretti DP, McGrew JT, Enriquez M, Chen J & Daniel TO. Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. (2002). *J Cell Sci*, **115**, 3073-81.
- Iretton RC & Chen J. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. (2005). *Curr Cancer Drug Targets*, **5**, 149-57.
- Ivanov AI, Steiner AA, Scheck AC & Romanovsky AA. Expression of Eph receptors and their ligands, ephrins, during lipopolysaccharide fever in rats. (2005). *Physiol Genomics*, **21**, 152-60.
- Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Rossi SW & Anderson G. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? (2006). *Nat Rev Immunol*, **6**, 551-5.
- Jenkinson WE, Jenkinson EJ & Anderson G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. (2003). *J Exp Med*, **198**, 325-32.
- Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, Jenkinson EJ & Anderson G. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. (2007). *Eur J Immunol*, **37**, 2090-6.
- Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D & Weissman IL. Fik2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. (2008). *Blood*, **111**, 5562-70.

- Kawakami N, Nishizawa F, Sakane N, Iwao M, Tsujikawa K, Ikawa M, Okabe M & Yamamoto H. Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. (1999). *J Immunol*, **163**, 3211-6.
- Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. (2005). *Nat Rev Immunol*, **5**, 546-59.
- Kitamura T, Kabuyama Y, Kamataki A, Homma MK, Kobayashi H, Aota S, Kikuchi S & Homma Y. Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis. (2008). *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C189-96.
- Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ & Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11822-7.
- Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB & Richie ER. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. (2002). *J Immunol*, **169**, 2842-5.
- Knoll B & Drescher U. Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. (2004). *J Neurosci*, **24**, 6248-57.
- Kondo M, Weissman IL & Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. (1997). *Cell*, **91**, 661-72.
- Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S & Lammert E. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. (2007). *Cell*, **129**, 359-70.
- Koshida S, Kishimoto Y, Ustumi H, Shimizu T, Furutani-Seiki M, Kondoh H & Takada S. Integrin α 5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. (2005). *Dev Cell*, **8**, 587-98.
- Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J & Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. (2004). *J Mol Histol*, **35**, 233-45.
- Kullander K & Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. (2002). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 475-86.
- Kutlesa S, Siler U, Speiser A, Wessels JT, Virtanen I, Rousselle P, Sorokin LM, Muller CA & Klein G. Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. (2002). *Immunology*, **105**, 407-18.
- Kyewski B & Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. (2004). *Nat Rev Immunol*, **4**, 688-98.
- Lackmann M & Boyd AW. Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? (2008). *Sci Signal*, **1**, re2.
- Laiosa CV, Stadtfeld M & Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. (2006). *Annu Rev Immunol*, **24**, 705-38.
- Larsen AB, Pedersen MW, Stockhausen MT, Grandal MV, van Deurs B & Poulsen HS. Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. (2007). *Mol Cancer Res*, **5**, 283-93.
- Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DM, Nogueira AC, Dardenne M, Hermine O & Savino W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5545-50.
- Lepique AP, Palencia S, Irjala H & Petrie HT. Characterization of vascular adhesion molecules that may facilitate progenitor homing in the post-natal mouse thymus. (2003). *Clin Dev Immunol*, **10**, 27-33.
- Li J, Iwanami N, Hoa VQ, Furutani-Seiki M & Takahama Y. Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. (2007). *J Immunol*, **179**, 1605-15.

- Lickliter JD, Smith FM, Olsson JE, Mackwell KL & Boyd AW. Embryonic stem cells express multiple Eph-subfamily receptor tyrosine kinases. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 145-50.
- Lin KT, Sloniowski S, Ethell DW & Ethell IM. Ephrin-B2-induced cleavage of EphB2 receptor is mediated by matrix metalloproteinases to trigger cell repulsion. (2008). *J Biol Chem*, **283**, 28969-79.
- Lind EF, Prockop SE, Porritt HE & Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. (2001). *J Exp Med*, **194**, 127-34.
- Litterst C, Georgakopoulos A, Shioi J, Ghersi E, Wisniewski T, Wang R, Ludwig A & Robakis NK. Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 16155-63.
- Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, Love P, Lipp M, Kondo S, Manley N & Takahama Y. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. (2006). *Blood*, **108**, 2531-9.
- Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Hollander GA & Takahama Y. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus. (2005). *Blood*, **105**, 31-9.
- Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD & Ellis LM. Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. (2002). *Cancer*, **94**, 934-9.
- Livak F, Tourigny M, Schatz DG & Petrie HT. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. (1999). *J Immunol*, **162**, 2575-80.
- Lu M, Tayu R, Ikawa T, Masuda K, Matsumoto I, Mugishima H, Kawamoto H & Katsura Y. The earliest thymic progenitors in adults are restricted to T, NK, and dendritic cell lineage and have a potential to form more diverse TCRbeta chains than fetal progenitors. (2005). *J Immunol*, **175**, 5848-56.
- Lu Q, Sun EE, Klein RS & Flanagan JG. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. (2001). *Cell*, **105**, 69-79.
- Luo H, Yu G, Wu Y & Wu J. EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. (2002). *J Clin Invest*, **110**, 1141-50.
- Luo L & Flanagan JG. Development of continuous and discrete neural maps. (2007). *Neuron*, **56**, 284-300.
- Mann F, Ray S, Harris W & Holt C. Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. (2002). *Neuron*, **35**, 461-73.
- Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. (1995). *Cell*, **80**, 179-85.
- Marston DJ, Dickinson S & Nobes CD. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. (2003). *Nat Cell Biol*, **5**, 879-88.
- Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H & Gounari F. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. (2003). *Nat Immunol*, **4**, 866-73.
- Mathis D & Benoist C. Yes, it does. (2007). *Nat Rev Immunol*, **7**, 1.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL & Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. (2004). *Nature*, **427**, 355-60.

- McLaughlin T, Hindges R, Yates PA & O'Leary DD. Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. (2003). *Development*, **130**, 2407-18.
- Mellitzer G, Xu Q & Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. (1999). *Nature*, **400**, 77-81.
- Mendes-da-Cruz DA, Lepelletier Y, Brignier AC, Smaniotto S, Renand A, Milpied P, Dardenne M, Hermine O & Savino W. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. (2009). *Ann N Y Acad Sci*, **1153**, 20-8.
- Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M & Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. (2008). *J Immunol*, **180**, 4639-47.
- Mentlein R & Kendall MD. The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. (2000). *Immunol Today*, **21**, 133-40.
- Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E & Wang B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. (2000). *Nat Cell Biol*, **2**, 62-9.
- Miao H, Nickel CH, Cantley LG, Bruggeman LA, Bennardo LN & Wang B. EphA kinase activation regulates HGF-induced epithelial branching morphogenesis. (2003). *J Cell Biol*, **162**, 1281-92.
- Miao H, Strebhardt K, Pasquale EB, Shen TL, Guan JL & Wang B. Inhibition of integrin-mediated cell adhesion but not directional cell migration requires catalytic activity of EphB3 receptor tyrosine kinase. Role of Rho family small GTPases. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 923-32.
- Miao H & Wang B. Eph/ephrin signaling in epithelial development and homeostasis. (2009). *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 762-70.
- Mick VE, Starr TK, McCaughy TM, McNeil LK & Hogquist KA. The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive selection in vivo. (2004). *J Immunol*, **173**, 5434-44.
- Misslitz A, Bernhardt G & Forster R. Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 115-28.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT & Forster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. (2004). *J Exp Med*, **200**, 481-91.
- Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M, Nakajima M & Kuwano H. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. (2003). *Int J Cancer*, **103**, 657-63.
- Mojcik CF, Salomon DR, Chang AC & Shevach EM. Differential expression of integrins on human thymocyte subpopulations. (1995). *Blood*, **86**, 4206-17.
- Moore MA. Commentary: the role of cell migration in the ontogeny of the lymphoid system. (2004). *Stem Cells Dev*, **13**, 1-21.
- Mori K, Itoi M, Tsukamoto N, Kubo H & Amagai T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. (2007). *Int Immunol*, **19**, 745-53.
- Morrison SJ, Uchida N & Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. (1995). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 35-71.
- Munarini N, Jager R, Abderhalden S, Zuercher G, Rohrbach V, Loercher S, Pfanner-Meyer B, Andres AC & Ziemiecki A. Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. (2002). *J Cell Sci*, **115**, 25-37.

- Munoz JJ, Alfaro D, Garcia-Ceca J, Alonso CL, Jimenez E & Zapata A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. (2006). *J Immunol*, **177**, 804-13.
- Munoz JJ, Alonso CL, Sacedon R, Crompton T, Vicente A, Jimenez E, Varas A & Zapata AG. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. (2002). *J Immunol*, **169**, 177-84.
- Munoz JJ, Garcia-Ceca J, Alfaro D, Stimamiglio MA, Cejalvo T, Jimenez E & Zapata AG. Organizing the thymus gland. (2009). *Ann N Y Acad Sci*, **1153**, 14-9.
- Murai KK & Pasquale EB. 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. (2003). *J Cell Sci*, **116**, 2823-32.
- Negrete OA, Wolf MC, Aguilar HC, Enterlein S, Wang W, Muhlberger E, Su SV, Bertolotti-Ciarlet A, Flick R & Lee B. Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. (2006). *PLoS Pathog*, **2**, e7.
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schuddekopf K, Smith AJ & Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. (1996). *Science*, **272**, 886-9.
- Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME & Thompson SM. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. (2007). *J Neurosci*, **27**, 12817-28.
- Nikolov DB, Li C, Barton WA & Himanen JP. Crystal structure of the ephrin-B1 ectodomain: implications for receptor recognition and signaling. (2005). *Biochemistry*, **44**, 10947-53.
- Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K & Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. (2008). *Adv Immunol*, **99**, 59-94.
- Nobes CD & Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. (1995). *Cell*, **81**, 53-62.
- Noren NK & Pasquale EB. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. (2004). *Cell Signal*, **16**, 655-66.
- Noren NK & Pasquale EB. Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. (2007). *Cancer Res*, **67**, 3994-7.
- Ocampo JSP, Brito JM, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS & Savino W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. (2008). *Cell Immunol*, **245**, 1-9.
- Ogawa K, Wada H, Okada N, Harada I, Nakajima T, Pasquale EB & Tsuyama S. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of medullary tubule cells through Rho family GTPases. (2006). *J Cell Sci*, **119**, 559-70.
- Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R & Pawson T. Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. (1996). *Embo J*, **15**, 6035-49.
- Palmer A & Klein R. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. (2003). *Genes Dev*, **17**, 1429-50.
- Pascall JC & Brown KD. Intramembrane cleavage of ephrinB3 by the human rhomboid family protease, RHBDL2. (2004). *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 244-52.
- Pasquale EB. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. (2004). *Nat Neurosci*, **7**, 417-8.
- Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 462-75.
- Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. (2008). *Cell*, **133**, 38-52.
- Patel SR, Gordon J, Mahbub F, Blackburn CC & Manley NR. Bmp4 and Noggin expression during early thymus and parathyroid organogenesis. (2006). *Gene Expr Patterns*, **6**, 794-9.

- Penit C, Lucas B & Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. (1995). *J Immunol*, **154**, 5103-13.
- Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. (2003). *Nat Rev Immunol*, **3**, 859-66.
- Petrie HT, Livak F, Burtrum D & Mazel S. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. (1995). *J Exp Med*, **182**, 121-7.
- Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. (2007). *Annu Rev Immunol*, **25**, 649-79.
- Pfaff D, Heroult M, Riedel M, Reiss Y, Kirmse R, Ludwig T, Korff T, Hecker M & Augustin HG. Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. (2008). *J Cell Sci*, **121**, 3842-50.
- Picco V, Hudson C & Yasuo H. Ephrin-Eph signalling drives the asymmetric division of notochord/neural precursors in *Ciona* embryos. (2007). *Development*, **134**, 1491-7.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A & Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. (2003). *J Immunol*, **171**, 4521-7.
- Poliakov A, Cotrina M & Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. (2004). *Dev Cell*, **7**, 465-80.
- Poliakov A, Cotrina ML, Pasini A & Wilkinson DG. Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. (2008). *J Cell Biol*, **183**, 933-47.
- Pratt RL & Kinch MS. Activation of the EphA2 tyrosine kinase stimulates the MAP/ERK kinase signaling cascade. (2002). *Oncogene*, **21**, 7690-9.
- Prevost N, Woulfe D, Tanaka T & Brass LF. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9219-24.
- Prevost N, Woulfe DS, Jiang H, Stalker TJ, Marchese P, Ruggeri ZM & Brass LF. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9820-5.
- Prevost N, Woulfe DS, Tognolini M, Tanaka T, Jian W, Fortna RR, Jiang H & Brass LF. Signaling by ephrinB1 and Eph kinases in platelets promotes Rap1 activation, platelet adhesion, and aggregation via effector pathways that do not require phosphorylation of ephrinB1. (2004). *Blood*, **103**, 1348-55.
- Prockop SE, Palencia S, Ryan CM, Gordon K, Gray D & Petrie HT. Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. (2002). *J Immunol*, **169**, 4354-61.
- Radtke F, Ferrero I, Wilson A, Lees R, Aguet M & MacDonald HR. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. (2000). *J Exp Med*, **191**, 1085-94.
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR & Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. (1999). *Immunity*, **10**, 547-58.
- Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F & Bates EE. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. (2002). *Blood*, **100**, 3295-303.
- Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L & Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. (2005). *Nat Immunol*, **6**, 626-34.

- Rothenberg EV, Moore JE & Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. (2008). *Nat Rev Immunol*, **8**, 9-21.
- Saito T, Masuda N, Miyazaki T, Kanoh K, Suzuki H, Shimura T, Asao T & Kuwano H. Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. (2004). *Oncol Rep*, **11**, 605-11.
- Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G & Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. (1997). *Blood*, **89**, 2461-71.
- Salvucci O, de la Luz Sierra M, Martina JA, McCormick PJ & Tosato G. EphB2 and EphB4 receptors forward signaling promotes SDF-1-induced endothelial cell chemotaxis and branching remodeling. (2006). *Blood*, **108**, 2914-22.
- Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O & Villa-Verde DM. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? (2003). *Braz J Med Biol Res*, **36**, 1015-25.
- Savino W & Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. (2000). *Endocr Rev*, **21**, 412-43.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M & Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? (2002). *Trends Immunol*, **23**, 305-13.
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E & Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. (2004). *J Leukoc Biol*, **75**, 951-61.
- Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. (2004). *J Exp Med*, **200**, 469-79.
- Schwarz BA & Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 47-57.
- Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE & Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. (2007). *J Immunol*, **178**, 2008-17.
- Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H & von Andrian UH. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7006-11.
- Shao H, Pandey A, O'Shea KS, Seldin M & Dixit VM. Characterization of B61, the ligand for the Eck receptor protein-tyrosine kinase. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 5636-41.
- Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H & Roifman C. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. (2002). *Eur J Immunol*, **32**, 3745-55.
- Sharfe N, Nikolic M, Cimpeon L, Van De Kratts A, Freywald A & Roifman CM. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. (2008). *Mol Immunol*, **45**, 1208-20.
- Shimoyama M, Matsuoka H, Nagata A, Iwata N, Tamekane A, Okamura A, Gomyo H, Ito M, Jishage K, Kamada N, Suzuki H, Tetsuo Noda T & Matsui T. Developmental expression of EphB6 in the thymus: lessons from EphB6 knockout mice. (2002). *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 87-94.
- Shimoyama M, Matsuoka H, Tamekane A, Ito M, Iwata N, Inoue R, Chihara K, Furuya A, Hanai N & Matsui T. T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells. (2000). *Growth Factors*, **18**, 63-78.

- Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pleau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M & Savino W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. (2005). *Endocrinology*, **146**, 3005-17.
- Smith FM, Vearing C, Lackmann M, Treutlein H, Himanen J, Chen K, Saul A, Nikolov D & Boyd AW. Dissecting the EphA3/Ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 9522-31.
- Speiser DE, Lees RK, Hengartner H, Zinkernagel RM & MacDonald HR. Positive and negative selection of T cell receptor V beta domains controlled by distinct cell populations in the thymus. (1989). *J Exp Med*, **170**, 2165-70.
- Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL & Daniel TO. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. (1998). *Genes Dev*, **12**, 667-78.
- Stokowski A, Shi S, Sun T, Bartold PM, Koblar SA & Gronthos S. EphB/ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading, and migration: implications for dental tissue repair. (2007). *Stem Cells*, **25**, 156-64.
- Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG & Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. (2003). *Nat Immunol*, **4**, 1128-35.
- Suenobu S, Takakura N, Inada T, Yamada Y, Yuasa H, Zhang XQ, Sakano S, Oike Y & Suda T. A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. (2002). *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 1124-31.
- Suniara RK, Jenkinson EJ & Owen JJ. Studies on the phenotype of migrant thymic stem cells. (1999). *Eur J Immunol*, **29**, 75-80.
- Surawska H, Ma PC & Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. (2004). *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 419-33.
- Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. (2006). *Nat Rev Immunol*, **6**, 127-35.
- Takahashi T, Takahashi K, Gerety S, Wang H, Anderson DJ & Daniel TO. Temporally compartmentalized expression of ephrin-B2 during renal glomerular development. (2001). *J Am Soc Nephrol*, **12**, 2673-82.
- Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, Kato Y, Koseki H & Ohno H. Foxl1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning resulting from dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine. (2006). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **291**, G163-70.
- Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R & Sugimura H. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. (2004). *Embo J*, **23**, 1075-88.
- Terra-Granado E, Berbert LR, de Meis J, Nomizo R, Martins VR, Savino W & Silva-Barbosa SD. Is there a role for cellular prion protein in intrathymic T cell differentiation and migration? (2007). *Neuroimmunomodulation*, **14**, 213-9.
- Teysier JR, Rousset F, Garcia E, Cornillet P & Laubriet A. Upregulation of the netrin receptor (DCC) gene during activation of B lymphocytes and modulation by interleukins. (2001). *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 1031-6.
- Tsai PT, Lee RA & Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. (2003). *Blood*, **102**, 3947-53.
- Uehara S, Grinberg A, Farber JM & Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. (2002). *J Immunol*, **168**, 2811-9.

- Uehara S, Hayes SM, Li L, El-Khoury D, Canelles M, Fowlkes BJ & Love PE. Premature expression of chemokine receptor CCR9 impairs T cell development. (2006). *J Immunol*, **176**, 75-84.
- Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL & Takahama Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. (2004). *J Exp Med*, **200**, 493-505.
- Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. (1997). *Cell*, **90**, 403-4.
- van Eyll JM, Passante L, Pierreux CE, Lemaigre FP, Vanderhaeghen P & Rousseau GG. Eph receptors and their ephrin ligands are expressed in developing mouse pancreas. (2006). *Gene Expr Patterns*, **6**, 353-9.
- Vergara-Silva A, Schaefer KL & Berg LJ. Compartmentalized Eph receptor and ephrin expression in the thymus. (2002). *Mech Dev*, **119 Suppl 1**, S225-9.
- Villa-Verde DM, Mello-Coelho V, Lagrota-Candido JM, Chammas R & Savino W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. (1995). *Braz J Med Biol Res*, **28**, 907-12.
- Vindis C, Cerretti DP, Daniel TO & Huynh-Do U. EphB1 recruits c-Src and p52Shc to activate MAPK/ERK and promote chemotaxis. (2003). *J Cell Biol*, **162**, 661-71.
- von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. (2004). *Adv Immunol*, **84**, 201-38.
- von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F & Klein L. Thymic selection revisited: how essential is it? (2003). *Immunol Rev*, **191**, 62-78.
- Wada K, Kina T, Kawamoto H, Kondo M & Katsura Y. Requirement of cell interactions through adhesion molecules in the early phase of T cell development. (1996). *Cell Immunol*, **170**, 11-9.
- Wang HU & Anderson DJ. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. (1997). *Neuron*, **18**, 383-96.
- Wang X, Hsu HC, Wang Y, Edwards CK, 3rd, Yang P, Wu Q & Mountz JD. Phenotype of genetically regulated thymic involution in young BXD RI strains of mice. (2006). *Scand J Immunol*, **64**, 287-94.
- Wang X, Roy PJ, Holland SJ, Zhang LW, Culotti JG & Pawson T. Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent and -independent functions of the VAB-1 Eph receptor. (1999). *Mol Cell*, **4**, 903-13.
- Webb O, Kelly F, Benitez J, Li J, Parker M, Martinez M, Samms M, Blake A, Pezzano M & Guyden JC. The identification of thymic nurse cells in vivo and the role of cytoskeletal proteins in thymocyte internalization. (2004). *Cell Immunol*, **228**, 119-29.
- Wicks IP, Wilkinson D, Salvaris E & Boyd AW. Molecular cloning of HEK, the gene encoding a receptor tyrosine kinase expressed by human lymphoid tumor cell lines. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1611-5.
- Wilkinson DG. Topographic mapping: organising by repulsion and competition? (2000). *Curr Biol*, **10**, R447-51.
- Wilkinson DG. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. (2001). *Nat Rev Neurosci*, **2**, 155-64.
- Wilkinson DG. How attraction turns to repulsion. (2003). *Nat Cell Biol*, **5**, 851-3.
- Wimmer-Kleikamp SH, Janes PW, Squire A, Bastiaens PI & Lackmann M. Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. (2004). *J Cell Biol*, **164**, 661-6.

- Witt CM & Robbins K. Tracking thymocyte migration in situ. (2005). *Semin Immunol*, **17**, 421-30.
- Wu J & Luo H. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. (2005). *Curr Opin Hematol*, **12**, 292-7.
- Wu JY, Feng L, Park HT, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Z, Zhang X & Rao Y. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. (2001). *Nature*, **410**, 948-52.
- Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A & Malissen B. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. (2001). *Blood*, **98**, 2626-32.
- Xu Q, Mellitzer G, Robinson V & Wilkinson DG. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. (1999). *Nature*, **399**, 267-71.
- Yamazaki T, Masuda J, Omori T, Usui R, Akiyama H & Maru Y. EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. (2009). *J Cell Sci*, **122**, 243-55.
- Yin Y, Yamashita Y, Noda H, Okafuji T, Go MJ & Tanaka H. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. (2004). *Neurosci Res*, **48**, 285-96.
- Yokote H, Fujita K, Jing X, Sawada T, Liang S, Yao L, Yan X, Zhang Y, Schlessinger J & Sakaguchi K. Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18866-71.
- Yu G, Luo H, Wu Y & Wu J. Ephrin B2 induces T cell costimulation. (2003a). *J Immunol*, **171**, 106-14.
- Yu G, Luo H, Wu Y & Wu J. EphrinB1 is essential in T-cell-T-cell co-operation during T-cell activation. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 55531-9.
- Yu G, Mao J, Wu Y, Luo H & Wu J. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. (2006). *J Biol Chem*, **281**, 10222-9.
- Yu XZ, Martin PJ & Anasetti C. CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation. (2003b). *J Immunol*, **170**, 3002-6.
- Zamora DO, Babra B, Pan Y, Planck SR & Rosenbaum JT. Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells. (2006). *Cell Immunol*, **242**, 99-109.
- Zhang J, Gong Y, Shao X, Zhang R, Xu W, Chu Y, Wang Y & Xiong S. Asynchronism of thymocyte development in vivo and in vitro. (2007). *DNA Cell Biol*, **26**, 19-27.
- Zhang J & Hughes S. Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. (2006). *J Pathol*, **208**, 453-61.
- Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T & Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. (2006). *Cell Metab*, **4**, 111-21.
- Zimmer M, Palmer A, Kohler J & Klein R. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. (2003). *Nat Cell Biol*, **5**, 869-78.
- Zlotoff DA, Schwarz BA & Bhandoola A. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. (2008). *Semin Immunopathol*, **30**, 371-82.
- Zou JX, Wang B, Kalo MS, Zisch AH, Pasquale EB & Ruoslahti E. An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13813-8.

ANEXOS

8. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutoramento – I

EphB2-mediated interactions play a role in thymus colonization by bone marrow-derived progenitors

Resumo Publicado em Anais de Congresso:

Marco A. Stimamiglio, Eva Jimenez, Suse D. Silva-Barbosa, David Alfaro, José J. García-Ceca, Juan J. Muñoz, Teresa Cejalvo, Wilson Savino and Agustín G. Zapata (2008). EphB2-mediated interactions play a role in thymus colonization by bone marrow-derived progenitors. In: *7th Congress of the International Society for Neuroimmunomodulation (ISNIM)*, Rio de Janeiro, Brazil – April 24-27.

Justificativa

O referido resumo, apresentado em forma de cartaz e publicado nos Anais do Sétimo Congresso da Sociedade Internacional de Neuroimunomodulação, compreende os resultados iniciais do presente trabalho. Estes resultados foram obtidos durante estágio de doutoramento (sanduíche) com bolsa Capes/PDEE realizado no Laboratório do Dr. Agustín G. Zapata na Universidade Complutense de Madri (Espanha) sob a co-orientação da Dra. Eva Jiménez Pérez.

C2

EPHB2-MEDIATED INTERACTIONS PLAY A ROLE IN THYMUS COLONIZATION BY BONE MARROW-DERIVED PROGENITORS

Stimamiglio, M.A.^{*}, Jiménez, E.¹, Silva-Barbosa, S.D.², Alfaro, D.³, García-Ceca J.J.⁴, Muñoz, J.J.⁵, Cejalvo, T.⁶, Savino, W.⁷, Zapata, A.G.⁸

¹Faculty of Medicine Complutense University of Madrid, ²Oswaldo Cruz Foundation, ³Faculty of Biology Complutense University of Madrid, ⁴Faculty of Biology Complutense University of Madrid, ⁵Faculty of Biology Complutense University of Madrid, ⁶Faculty of Biology Complutense University of Madrid, ⁷Lab. on Thymus Research FIOCRUZ, ⁸Complutense University of Madrid

INTRODUCTION: Ephrin-Eph ligand-receptor pair is known to control repulsion/adhesion process in the nervous tissue. Recently, a role for this interaction in the immune system has been reported. Here we evaluated the role of the tyrosine kinase receptor protein EphB2 in thymus colonization by bone marrow-derived progenitors.

METODOLOGY: The ability to colonize the thymus was tested using lineage negative (Lin⁻) bone marrow cells from wild type (WT), EphB2 knockout and a mutant mice expressing an EphB2-βgal fusion receptor lacking the cytoplasmic domain. Lymphocyte-depleted thymic lobes were cultured with 50,000 lin⁻ bone marrow cells, stained with CFSE or PHK26. Migrating cells recovered from thymic lobes (WT, EphB2^{-/-} and EphB2-βgal) were analyzed by flow cytometry. Entire lobes were visualized by confocal microscopy. Procedures were done according to European ethical rules for animal research.

RESULTS: RT-PCR analysis showed that lin⁻ progenitors express EphB2, EphB3 and their ligands ephrin-B1, ephrin-B2. EphB2 knockout progenitors had a diminished thymus colonization capacity and the EphB2 ectodomain (EphB2-βgal progenitors) was enough to reverse this effect. Lower numbers of WT and/or EphB2 mutant progenitors were recovered from EphB2 mutant thymuses.

CONCLUSIONS: Collectively these results indicate a role for the forward (EphB2) and reverse (ephrin) signals on thymic epithelial cells, suggesting that EphB2 contributes to migration and colonization of thymic precursors.

FINANCIAL SUPPORT: Supported by CNPq, CAPES, FioCruz (Brazil); BFU2004-03132, BFU2006-65520 (Spain)

9. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutoramento – II

EphB2-mediated interactions play a role in T-cell progenitor migration

Resumo Publicado em Anais de Congresso:

Marco A. Stimamiglio, Eva Jimenez, Suse D. Silva-Barbosa, David Alfaro, José J. García-Ceca, Juan J. Muñoz, Teresa Cejalvo, Wilson Savino and Agustín G. Zapata (2009). EphB2-mediated interactions play a role in T-cell progenitor migration. In: *III Iberoamerican Congress on Neuroimmunomodulation (CIBANIM)*, Buenos Aires, Argentina – April 20-22.

Justificativa

O referido resumo, apresentado em forma de cartaz e publicado nos Anais do Terceiro Congresso Iberoamericano de Neuroimunomodulação, compreende os resultados de migração em sistema de *transwell*[®] apresentados no presente trabalho. Estes experimentos foram realizados em parte no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Oswaldo Cruz (Brasil) e finalmente no Laboratório do Dr. Agustín Zapata na Universidade Complutense de Madri (Espanha).

III Iberoamerican Congress of NeuroImmunoModulation

EphB2-mediated interactions play a role in T-cell progenitor migration

Marco A. Stimamiglio^{1,2}, Eva Jiménez³, Suse D. Silva-Barbosa², David Alfaro¹, José J. García-Ceca¹, Juan J. Muñoz¹, Teresa Cejalvo¹, Wilson Savino², Agustín G. Zapata¹.

Dept. Cell Biology, Faculty of Biology¹ and Medicine³, UCM, Madrid, Spain;
²Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil – e-mail: stima@ioc.fiocruz.br

Ephrin-Eph ligand-receptor pair is known to control repulsion/adhesion processes in the nervous tissue. Recently, a role for this interaction in immune system has been reported. Our previous results demonstrated that tyrosine kinase receptor EphB2 controls thymus colonization since reduced EphB2-Knockout lineage negative (Lin⁻) progenitor entry on lymphocyte-depleted thymic lobes occurs. EphB2LacZ Lin⁻ progenitors, that only lacks EphB2 cytoplasmic domain, revert this effect and colonize thymic lobes signaling epithelial cells through its ectodomain (reverse signaling). Because underlying mechanisms involved in these processes are little known we here evaluated the role of EphB2 receptor in T-cell progenitors migration through extracellular-matrix proteins (ECM) or towards chemokine stimuli. Firstly migration ability of mutant cells was tested using Lin⁻ bone marrow precursors and thymocytes from wild type (WT), EphB2-knockout and EphB2LacZ mice. We used laminin, fibronectin or the chemokines CXCL12, CCL21 or CCL25 as haptotactic and chemotactic stimuli on a transwell system. After 4 hours of incubation, migrated cells were counted and analyzed by flow cytometry using hematopoietic progenitor or thymocyte subpopulation phenotypic markers. EphB2^{-/-} and EphB2LacZ T-cell progenitor subpopulations had a diminished capacity to migrate through ECM stimuli as well as a reduced chemotaxis for all tested chemokines. On the other hand, EphB2 activation with immobilized ephrin-B1/Fc fusion proteins also induced reduced haptotaxis and chemotaxis of WT, but not EphB2LacZ, T-cell progenitor subpopulations demonstrating the specific involvement of EphB2 and the relevance of its forward signaling in both thymus colonization and intrathymic cell migration.

Support: CNPq/CAPES/Fiocruz(Brazil);BFU2004-03132/BFU2006-65520(Spain)

10. Artigos e resumos desenvolvidos e publicados durante o doutoramento – III

Is there a role for fibronectin upon true histiocytic lymphoma progression?

Manuscrito Publicado:

Stimamiglio, MA, Silva-Barbosa, SD, Domingues, MA, Trentin, AG, Alvarez-Silva, M, Savino W. (2008). Is there a role for fibronectin upon true histiocytic lymphoma progression? *Int J Oncology* **33**, 517-24.

Justificativa

Em etapas prévias ao trabalho ora apresentado desenvolvemos estudos relacionados ao tema geral de mecanismos de controle da migração celular que gerou o presente manuscrito concluído durante o doutorado. Neste manuscrito avaliamos as funções biológicas de interações mediadas por integrinas e moléculas da matriz extracelular em modular processos vitais durante a progressão tumoral, como a adesão celular, a proliferação, a migração e a sobrevivência das células neoplásicas de origem hematopoiética. Como sabemos, as interações estabelecidas entre as células e o microambiente tecidual são cruciais para a sua sobrevivência e desenvolvimento. Uma das formas conhecidas de interações entre as células e seu microambiente ocorre através da matriz extracelular, rede complexa de macromoléculas que proporciona suporte físico para a estruturação tecidual e modula o comportamento celular, e seus receptores presentes na superfície das células, como as integrinas. Neste sentido, nosso primeiro trabalho demonstra a importância de se estudar os mecanismos moleculares utilizados pelas células durante o reconhecimento e a migração através do microambiente tecidual.

Is there a role for fibronectin upon true histiocytic lymphoma progression?

MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO^{1,3}, SUSE DAYSE SILVA-BARBOSA¹,
MARIA APARECIDA CUSTÓDIO DOMINGUES², ANDRÉA GONÇALVES TRENTIN³,
MARCIO ALVAREZ-SILVA^{3*} and WILSON SAVINO^{1*}

¹Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Ave. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900; ²Laboratory of Hemopathology, Hematology and Hemotherapy Center of Santa Catarina, Ave. Othon Gama D'Eça 756, Florianópolis 88015-240; ³Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Biological Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, Brazil

Received February 26, 2008; Accepted April 22, 2008

DOI: 10.3892/ijo_00000035

Abstract. Cell interaction with extracellular matrix is a crucial event for various biological processes, including tumor progression. Although not exclusively, these interactions are frequently mediated by bidirectional signaling receptors known as integrins. Using a human histiocytic lymphoma-derived cell line (U-937), we evaluated the effects of ECM proteins and their integrin-type receptors in the regulation of cell attachment, proliferation, migration and survival. Fibronectin induces higher cell attachment *in vitro* when compared to laminin. Fibronectin also promotes a decrease in cell migration but do not modulate cell proliferation and death. Pre-incubation of U-937 cells with VLA-5 antagonistic peptides inhibited attachment of the cells to fibronectin-coated substrates. In a second vein, we observed that lymph node specimens obtained from diagnosed patient for true histiocytic lymphoma had greater deposition of fibronectin (but not laminin) around malignant clones. These results suggest that fibronectins play a relevant role in the establishment and progression of true histiocytic lymphoma cells.

Introduction

Cell interaction with extracellular matrix (ECM) is a crucial event for various biological processes, including cell proliferation, differentiation, migration and death, as well as tumor growth and metastasis (1). The complex process of tumor cell growth and metastasis consists of a series of steps, in which tumor cells progress from cell-cell interactions to cell-ECM interactions mainly involving cell surface adhesion molecules (2), including, among others, integrins, selectins, members of the immunoglobulin gene superfamily, cadherins and CD44 (3,4).

Integrins are a diverse family of glycoproteins that form heterodimeric receptors composed of non-covalently associated α and β subunits (5). These molecules are bidirectional signaling receptors which convey information both into and out of the cell (6). Several integrins of the β_1 and β_2 family have been identified in hematopoietic cells. Among β_1 -integrins, a particular role has been attributed to $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) and $\alpha 5\beta 1$ (CD49e/CD29) for the adhesion of hematopoietic cells to fibronectin (FN) (7,8). The FN cell-binding domains recognized by these integrins are the alternative spliced segment III CS (CS1) (9), and the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence (10), respectively. Fibronectin receptors play a critical role in the attachment of hematopoietic progenitors to bone marrow (2). Additionally, these interactions can result in signal transduction that can alter proliferation and apoptosis in leukocytes (7-11).

It has been shown that in leukemia, the aberrant expression of integrins is related to infiltration in bone marrow and lymph nodes. In chronic myeloid leukemia, abnormal trafficking of malignant progenitors may be related to impaired $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated adhesion to stromal cells and FN, as well as abnormal mobility onto FN substrates (12).

In the context of integrin-ECM interactions, invasive cells can exhibit selective targeting to specific locations in the host. For the true histiocytic lymphoma (THL), lymph nodes, gastrointestinal tract, skin, and soft tissues are common sites of infiltration (13). THL is a rare aggressive non-Hodgkin's lymphoma (<0.5% of NHLs) with a very poor outcome. It is

Correspondence to: Dr Wilson Savino, Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Ave. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil
E-mail: savino@fiocruz.br; w_savino@hotmail.com

Dr Marcio Alvarez-Silva, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Biological Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, Brazil
E-mail: malvarez@ccb.ufsc.br

*Both senior authors contributed equally

Key words: histiocytic lymphoma, U-937, integrins, extracellular matrix, fibronectin, lymph nodes

composed of neoplastic cells with variable morphology, with immunophenotypic evidence of histiocytic differentiation (14,15). This tumor frequently has an aggressive behavior and is preferentially localized, but may occur as a disseminated disease (16,17). Clinical features include weight loss, fever, lymphadenopathy and splenomegaly. The gastrointestinal tract is the most frequent extranodal localization. Infiltration of neoplastic cells is observed in central nervous system, bone, skin, lung, liver, kidney, bone marrow and soft tissues (16,18). In lymph nodes, neoplastic cells tend to surround the sinuses, where they can be immunohistochemically revealed with one or more histiocytic markers: CD68, lysozyme and α -1 anti-trypsin (15).

We investigated herein the role of fibronectin in the behavior of the U937 THL cell line, and correlated the degree of fibronectin deposition in lymph nodes from a THL patient.

Materials and methods

Reagents. RPMI-1640 culture medium, bovine serum albumin (BSA), penicillin, streptomycin, L-glutamine, propidium iodide solution, human plasma fibronectin and EHS murine sarcoma derived laminin were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA), whereas fetal calf serum (FCS), EDTA and the CellTrace[®] CFSE cell proliferation kit were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The antibodies anti-CD49d-PE (anti-VLA-4; clone 9F10), anti-CD49e-PE (anti-VLA-5; clone IIA1), anti-CD49f-PE (anti-VLA-6; clone GoH3), anti-CD29-PE-Cy5 (clone MAR4), as well as the controls anti-mouse IgG₁-PE (clone MOPC-21), anti-mouse IgG₁-PE-Cy5 (clone MOPC-31C) and anti-rat IgG_{2a}-PE (clone R35-95) were purchased from Becton-Dickinson/Pharmingen (San Diego, CA, USA) whereas polyclonal rabbit anti-human laminin (code Z0097) and anti-human fibronectin (code A0245), immune sera, LSAB[™] kit and liquid diaminobenzidine (DAB) were from Dako (Carpinteria, CA, USA). The apoptosis detection kit was from (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and the peptides GRGDSP (RGD peptide), EILDVPST (CS-1 peptide) and GRGESP (control RGE peptide) were synthesized by Invitrogen (EvoQuest[™] Laboratory Services, Carlsbad, CA, USA).

Cell culture. The human histiocytic lymphoma cell line U-937 (19) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Federal University of Rio de Janeiro). Cells were grown under standard cell culture conditions, in RPMI-1640 medium containing 2×10^{-3} M L-glutamine, 100 UI/l penicillin/streptomycin, and supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, in 25 cm² flasks (Costar, Cambridge, MA, USA). Growth and morphology were checked twice a week and the cells used for experimentation were at the third culture passage.

Flow cytometric analysis. Detection of ECM receptors on U-937 cell membrane was carried out by cytofluorometry as described elsewhere (20). Cells (10^6 viable cells per well) were plated in 96-well microplates (Nalge Nunc International, Naperville, USA). Cell suspensions were first incubated with purified mouse IgG (used for blocking Fc receptors), and subjected to anti-CD49d-PE, anti-CD49e-PE, anti-CD49f-PE or anti-CD29-PE-Cy5 mAb, or to the corresponding IgG-

matched negative controls. Cells were ultimately analyzed using a FACScalibur apparatus (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A cell gate excluding cell debris and non-viable cells was determined using forward and side scatter parameters, and was confirmed in some experiments with the use of propidium iodide staining and immediate analysis of unfixed cells. Analyses were done after recording at least 10,000 events for each sample.

Cell adhesion assay. To assess the adhesive capacity of U-937 cells on ECM substrata, cells were washed, and submitted to a cell adhesion assay on plates (24-well plates, Nalge Nunc International) pre-coated with 10 μ g/ml FN, laminin or BSA overnight at 4°C, as previously described (21). The wells were washed three times with adhesion buffer (0.5% BSA in RPMI-1640 medium) and blocked with RPMI-1640 containing 1% BSA for 1 h at 37°C. Cells were then added to the wells (2×10^5 cells per well in 500 μ l adhesion buffer) for 1 h at 37°C, followed by 30 min of incubation under shaking (60 rpm). After further washing to remove non-adherent cells, adherent cells were detached with ice-cold RPMI-1640 containing 5 mM EDTA and counted in a hemocytometer. When testing for peptide blocking activity, U-937 cells were pre-incubated in the presence of soluble peptides (RGD, CS-1, RGD and CS-1 or RGE; 500 μ g/ml) for 1 h in ice bath, before adhesion to FN.

Cell proliferation assay. Labeling of U-937 cells with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was performed as described previously (22) with minor modifications. In brief, U937 cells were washed twice and resuspended in prewarmed PBS/0.1% BSA at a final concentration of 1×10^6 cells/ml, then incubated in 1 μ M CFSE (Molecular Probes, USA) at 37°C for 15 min. Cells were washed again before addition to cell proliferation assays on 24-well plates pre-coated with 10 μ g/ml BSA or FN. Two hundred thousand cells were added to each well (in 1 ml RPMI-1640) for 1, 24, 48 and 72 h at 37°C. CFSE-labeled cells were then harvested from individual wells, washed in ice-cold PBS/0.1% BSA, resuspended and fixed in 200 μ l 1% paraformaldehyde. Growing cells were ultimately analyzed using a FACScalibur apparatus (Becton Dickinson).

Cell migration assay. Migration experiments were performed using Transwell plates (6.5 mm diameter and 8 μ m pore size; Corning Costar, Cambridge, MA, USA), as currently used in our Laboratory to ascertain fibronectin-driven T cell migration (23). Both surfaces of the polycarbonate membrane were coated with 10 μ g/ml of FN, laminin or BSA for 1 h at 37°C, followed by 1 h blocking with 1% BSA. Cells (5×10^5) were then added to the upper chamber in 100 μ l 0.5% BSA/RPMI-1640, and 600 μ l 0.5% BSA/RPMI-1640 were added to the lower chamber. After 4-h incubation at 37°C in 5% CO₂-containing atmosphere, cells that migrated into lower chambers were removed and counted in a hemocytometer.

Cell survival assay. An apoptosis detection kit (R&D Systems) was used to quantitatively determine U-937 cells undergoing apoptosis by virtue of their ability to bind annexin V and exclude propidium iodide (24). For the assay, cells (2×10^5 cells

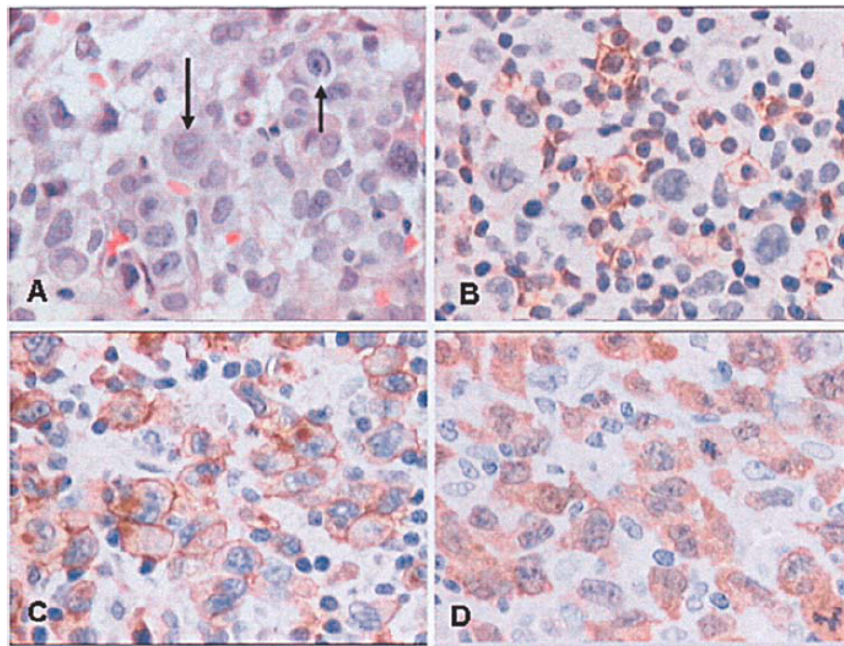


Figure 1. Histological and immunohistochemical features of lymph node from a patient diagnosed as bearing a true histiocytic lymphoma. A, hematoxylin-eosin staining, where malignant cells containing larger nuclei can be easily distinguished (arrow). Immunoperoxidase staining revealed that these cells are positive for CD15, CD45 and Lysozime (B, C and D, respectively). Original magnification x400.

per well in 1 ml RPMI-1640) were cultured for 0, 24, 48 and 72 h at 37°C on plates (24-well plates, Nalge Nunc International), pre-coated with 10 µg/ml FN or BSA and blocked with PBS/1% BSA. Cells were then harvested from individual wells, washed once and resuspended in 100 µl of binding buffer (100 mM HEPES, pH 7.4, containing 1.5 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, and 18 mM CaCl₂) containing Annexin V-FITC and 0.5 µg of propidium iodide for 15 min at room temperature in the dark. Binding buffer was then added to the mixture, and flow cytometry was performed using a FACScalibur apparatus. The percentage of total cells that did not bind propidium iodide or Annexin V-FITC (viable cells), cells that bound Annexin V-FITC alone (early apoptosis), or cells that bound both propidium iodide and Annexin V-FITC (late apoptosis or necrosis) was determined, and the results are presented in the form of a density plot.

Lymph node samples. Representative cases of normal and neoplastic lymph nodes were selected from the Hemopathology Laboratory, Santa Catarina Center of Hematology and Hemotherapy (Santa Catarina, Brazil). This study was conducted in accordance with an approved protocol by the institutional review board and the studies were performed in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. Cervical lymph node biopsy was performed in a 43-year old male patient, whose clinical examination revealed a bilateral cervical mass, axilar and mediastinal lymphadenomegaly and fever, with no signs of infection. The biopsy showed diffuse altered lymph node architecture with large atypical cells with pleomorphic nuclei, coarse chromatin with one or more nucleoli, and basophilic vacuolated cytoplasm. Flow cytometry and immunohisto-

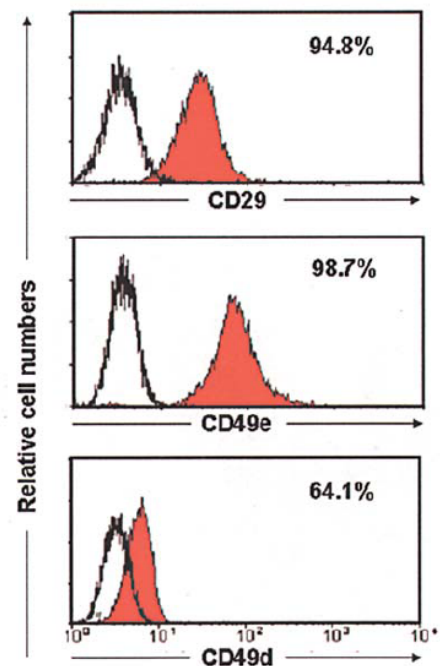


Figure 2. Differential expression of VLA-4 and VLA-5 fibronectin receptors in early cultures of true histiocytic lymphoma U-937 cells. Flow cytometric histograms show that CD29 (the β_3 integrin chain) is highly expressed, and the same is seen as regards the expression of CD49e (the α_5 integrin chain that forms the FN receptor VLA-5, the integrin $\alpha_5\beta_1$ or CD49e/CD29). Differently, only 60% of the cells express (at rather low density) CD49d (that forms the FN receptor VLA-4, the integrin $\alpha_4\beta_1$ or CD49d/CD29).

chemistry studies showed cells positive for CD45, CD68, CD15 and lysozyme, and negative for chloracetatesterase and T or B lymphocyte markers (see Fig. 1 for immunohistochemistry). A diagnosis of a malignant neoplasm with morphological and immunophenotypic features of true histiocytic lymphoma (THL) was ascertained. Control specimens consisted of cervical lymph nodes obtained from patients with negative diagnosis for neoplastic diseases.

Immunohistochemical evaluation. Immunohistochemistry was performed on 4- μ m tissue sections previously plated on silane-coated glass slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). In brief, paraffin tissue sections were treated with xylene and re-hydrated. For the detection of ECM components, slides were subjected for 30 min with 3 μ l/ml hydrogen peroxide in methanol to quench endogenous peroxidase activity and then incubated with appropriately diluted antibodies to laminin or fibronectin. Sections were then incubated to the peroxidase-coupled second antibody LSAB⁺ system for 30 min at room temperature. We developed the chromogen with immersion of the slides in a diaminobenzidine-H₂O₂ substrate for 5 min. The slides were counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted under cover slides.

Statistical analysis. Statistical significance was determined by One-way ANOVA, followed by Newman-Keuls multiple comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Data were expressed as mean \pm standard error.

Results

Expression of β_1 -integrin receptors on U-937 cells and adhesion to corresponding ECM ligands. U937 cell interactions with proteins of the ECM are mediated, although not exclusively, by different receptors of the β_1 integrin family (25). We therefore investigated U937 cells for β_1 integrin expression using cytofluorometry. As seen in Fig. 2, CD29 (the β_1 integrin chain) was largely expressed. Accordingly, cells were positive for both fibronectin receptors, although expression of VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$, detected with the anti-CD49e antibody) was clearly higher than that seen for VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, revealed with the anti-CD49d reagent). These results reveal that the VLA-5 fibronectin receptor is preferentially expressed when compared to VLA-4. The data presented were obtained until the 3rd day of culture, since we noticed that the membrane expression of these integrins decreased after further culturing in serum containing-medium (data not shown).

In order to test cell adhesion abilities to ECM-coated plates, U-937 cells in the third culture passage were used. We observed that in FN-coated plates the adhesion was increased in about 13 to 16 times when compared to adhesion to BSA (Fig. 3A). Moreover, we observed various cells on the FN-coated plates, which were spread, exhibiting cytoplasmic processes (Fig. 3B). The adhesion of cells to laminin-coated plates was not different to the control assays. Colorimetric assay of attached cells had similar results (data not shown).

Pre-incubation of U-937 cells with synthetic peptides inhibited attachment of the cells to FN-coated substrates. More than 70% of U937 cells were unattached in the presence of

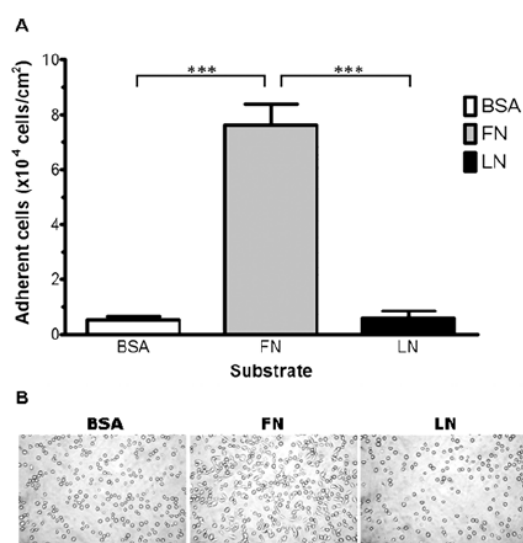


Figure 3. Specific adhesion of true histiocytic lymphoma U-937 to ECM fibronectin. Cells were incubated on bovine serum albumin (BSA), fibronectin (FN) or laminin-coated (LN) plates, as described in Materials and methods. A, Numbers of adherent viable cells, as assessed by trypan blue exclusion. B, Representative microscopic fields in the same three conditions. Note that in the fibronectin-coated plate, many cells acquired a spindle-shaped profile. Data are shown as means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. *** $p < 0.001$. Original magnification x200.

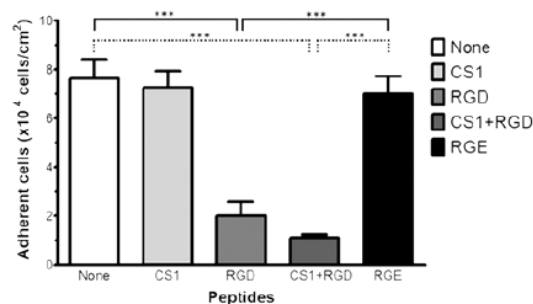


Figure 4. Inhibition of true histiocytic lymphoma U-937 cell adhesion to FN-coated surfaces by the VLA-5 inhibiting RGD peptide. Cells were pre-incubated in the presence of soluble peptides (RGD, CS-1, RGD plus CS-1 or RGE; 500 μ g/ml) before adhesion to fibronectin. Numbers of adherent viable cells were assessed by trypan blue exclusion. Data are shown as means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. *** $p < 0.001$.

500 μ g/ml RGD peptide. The mixture of RGD and CS-1 peptides showed a similar inhibitory effect compared with those by RGD peptide alone. Importantly, the CS-1 and the control peptide, RGE, did not block cell adhesion (Fig. 4). These findings clearly point to the notion that the response of U-937 cells to fibronectin is mediated by VLA-5 rather than VLA-4.

In accordance to the cytofluorometric data, cells derived from long-term cultures (that reduce FN receptor expression) highly decreased the adherence to fibronectin (not shown).

Migration arrest of U-937 cells onto FN substrates. The ability of a cancer cell to migrate is governed by several

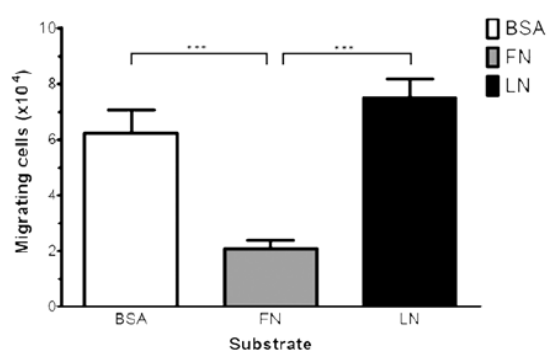


Figure 5. Fibronectin arrests migration of true histiocytic lymphoma U-937 cells. Data represents the total numbers of migrating cells in transwell chambers after stimulation with bovine serum albumin (BSA), fibronectin (FN) or laminin (LN). Migration assay was performed as described in Materials and methods. Numbers of migrating viable cells were assessed by trypan blue exclusion. The data are shown as means \pm SE of four independent experiments performed in triplicate. *** $p < 0.001$.

factors, and depends on the dynamic interaction with the ECM (26). Using the transwell migration assay, we compared the effects of ECM proteins on U-937 cell migration. In BSA-coated control inserts, ~10% of the U-937 cells spontaneously migrated after 4 h. When cells were challenged to migrate onto FN-coated inserts, a significant decrease of migration was observed. This was not observed in laminin-coated inserts, where values for cell migration were not different from those seen in the BSA-coated inserts (Fig. 5).

U-937 cell proliferation and survival on FN substrates. We monitored U-937 cell proliferation, on ECM-coated plates. Cells initially adhered to FN-coated wells, but no differences in the proliferation rate were observed when cells were cultured onto FN or BSA substrates (Fig. 6).

In early studies it was shown that death of U-937 cells could be induced by serum withdrawal (27). To determine if cell-matrix attachment modulates cell survival under serum-deprivation conditions, cells were plated on 24-well plates coated with fibronectin or BSA and cultured for 24, 48 and 72 h. We found that FN substrate did not alter U-937 cell survival under serum-deprivation conditions when compared to BSA substrate (Fig. 7).

Increase in fibronectin contents within lymph node of THL patient. Based on *in vitro* results showing ECM effects on the behavior of a THL cell line, we searched for the ECM deposition *in vivo* studying a case of THL. We analyzed the sub-capsular region from normal or THL infiltrated lymph nodes. In the THL specimens we found large cells with a more open nuclear chromatin pattern, with one or more prominent centrally-located nucleolus (Fig. 1). When we analyzed ECM protein staining, we observed in normal lymph nodes, a larger FN deposition in the capsule with a rather weak expression in the cortical region. In THL-infiltrated node a strong FN labeling was observed in the capsule as well as in the cortical region. This was paralleled by reticular fiber deposition around cortical cells, possibly coordinated by malignant infiltration (Fig. 8). Differently,

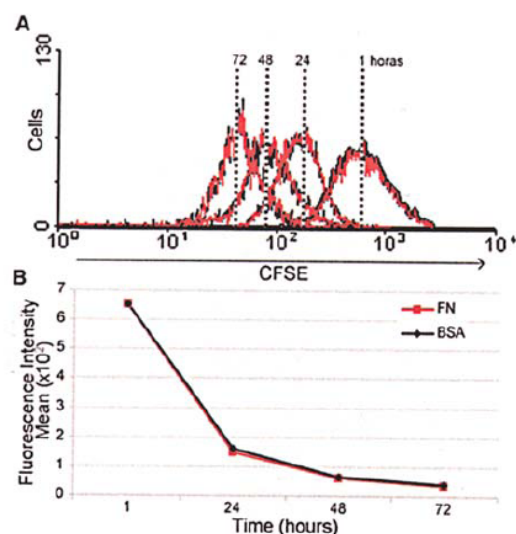


Figure 6. Fibronectin does not alter true histiocytic lymphoma U-937 cell proliferation. Cell proliferation was visualized by loss of CFSE after 1, 24, 48 and 72 h of culture on BSA (black line) or FN-coated (red line) wells. A, Representative histograms showing the proliferation profiles. B, The X-Y plot graphs represent the mean of CFSE fluorescence intensity on U-937 cells in three independent experiments performed in duplicate.

laminin immunostaining revealed a uniform distribution in capsule and cortex in both control and THL-infiltrated lymph nodes (data not shown).

Discussion

Herein, we demonstrated the role of fibronectin substrate on U-937 histiocytic lymphoma cell line adhesion and migration. We showed that the interaction with fibronectin can strongly adhere and arrest migration of U-937 cells. These responses seems to be mediated specifically by CD49e/CD29 ($\alpha 5\beta 1$ integrin, VLA-5) rather than CD49d/CD29 ($\alpha 4\beta 1$ integrin, VLA-5), since it can be abrogated by the VLA-5 blocking peptide RGD, but not by the CS-1 sequence, which is specifically recognized by VLA-4. This difference is in keeping with the higher membrane expression of CD49e, when compared to CD49d. This correlates to normal tumor progression in which cancer cells invade, attach, remodel the ECM microenvironment and establish on host tissues (5).

It should be noted however, that although U-937 cells do respond to fibronectin, this ECM component does not seem to be relevant for proliferation or death rescue of these cells in conditions of serum deprivation.

For hematological malignancies, the role of fibronectin can differ: while in some tumors fibronectin induces neoplastic survival and/or development (28,29), in others, its role for malignant progression is not relevant (30). In the case of THL cells, fibronectin does not alter cell growth but appears to modulate cell attachment and migration. This is in keeping with other findings showing that the presence of soluble factors together with fibronectin may regulate cell attachment as well as increase cell migration, that may favor THL malignant infiltration in lymph nodes and in other tissues (31).

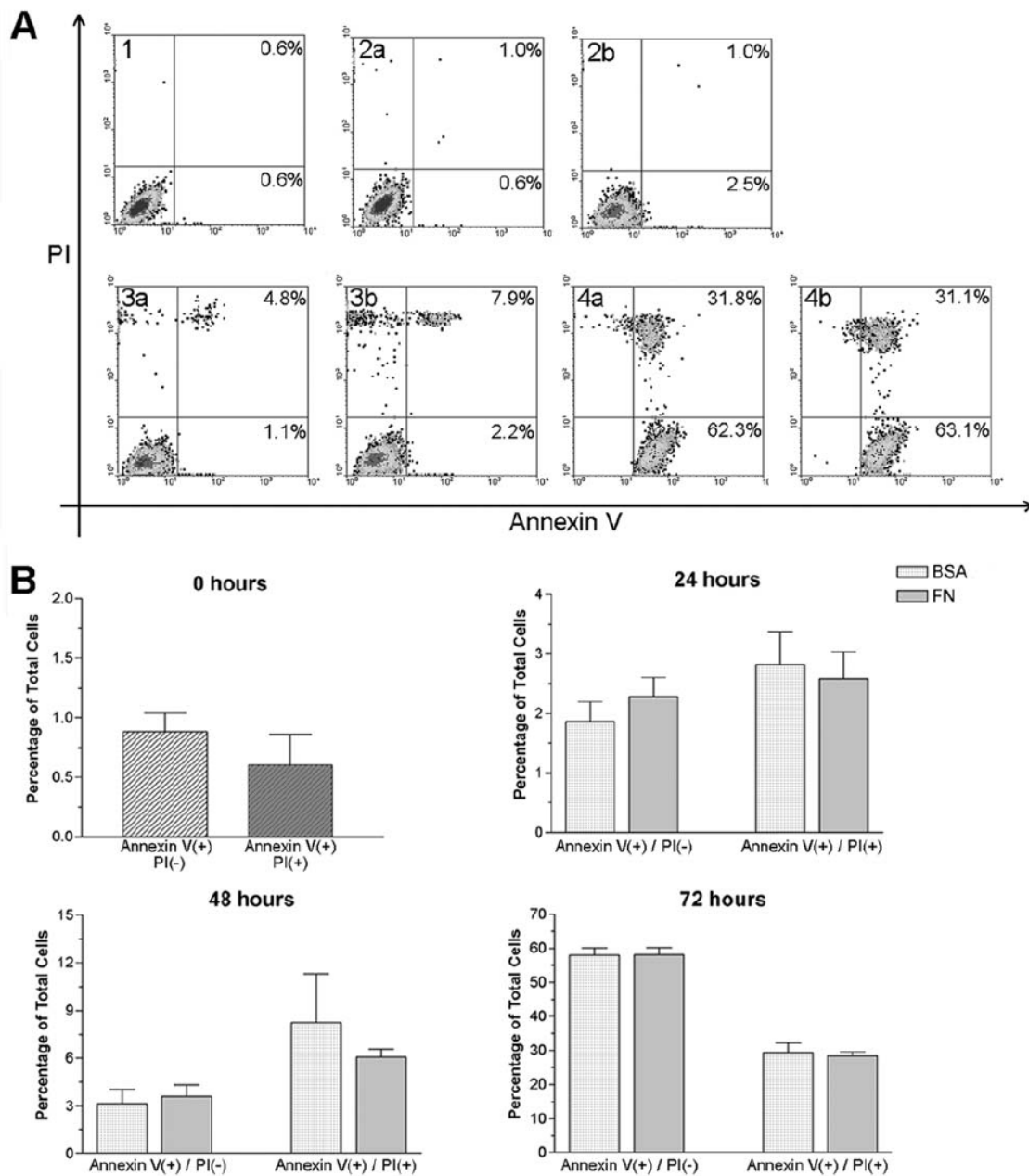


Figure 7. Fibronectin does not alter true histiocytic lymphoma U-937 cell survival under serum-deprivation. (A) Representative histograms showing propidium iodide (PI) and annexin V staining at the point zero (1) of culture, 24 h of culture on BSA (2a) or FN (2b), 48 h of culture on BSA (3a) or FN (3b), and 72 h on BSA (4a) or FN-coated (4b) wells. (B) Percentages of annexin-V positive/PI negative (early apoptosis) and annexin-V positive/PI positive (late apoptosis or necrosis) cells cultured on BSA or FN-coated wells for 0, 24, 48 and 72 h under serum-deprivation. Data are shown as means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate.

A second aspect deserving discussion refers to which fibronectin receptor(s) would be involved in FN-driven THL cell responses. In this respect, it has been shown that fibroblast adhesion to LDV sequence of fibronectin via $\alpha 4\beta 1$ integrin represses $\alpha 5\beta 1$ -mediated interstitial collagenase expression (32). Additionally, fragmentation of fibronectin by plasmin de-repress $\alpha 5\beta 1$ -mediated invasion during wound

healing, indicating an important attribute of $\alpha 4\beta 1$ integrin in regulation $\alpha 5\beta 1$ -induced invasion (33,34). In our studies, it was clear that changes in adhesiveness and migration of U-937 cells after exposure to fibronectin occurred through the VLA-5 receptor, rather than VLA-4.

In connection with the *in vitro* data, we also observed that lymph nodes infiltrated by THL cells had a greater

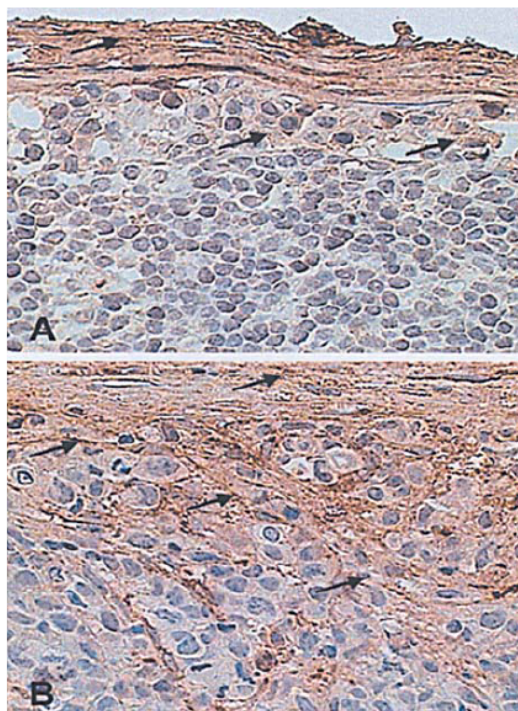


Figure 8. Immunostaining of fibronectin in normal (A) or THL-infiltrated (B) cervical lymph nodes. Arrows indicate the deposition of the ECM protein. Note that fibronectin staining is much denser in THL than control lymph node, with clearcut FN-containing fibrils (arrows). Specimens were counterstained with haematoxylin. Original magnification $\times 400$.

deposition of fibronectin (but not laminin) around malignant cells. The over-expression of fibronectin in THL infiltrated lymph node specimens, together with the behavior observed for U-937 cells on FN leads to the hypothesis that the establishment of micrometastasis seen in THL patients may be related to FN-driven migration and adhesion of the malignant cells.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazilian Ministry of Education), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Ciência e Tecnologia, Santa Catarina (FUNCITEC/SC).

References

- Vacca A, Ria R, Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti L and Dammacco F: $\alpha v \beta 3$ integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol* 29: 993-1003, 2001.
- Karmakar S and Mukherjee R: Integrin receptors and ECM proteins involved in preferential adhesion of colon carcinoma cells to lung cells. *Cancer Lett* 196: 217-227, 2003.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA: General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80: 1529-1537, 1997.
- Juliano RL: Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 283-323, 2002.
- Hood JD and Chersesh DA: Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev* 2: 91-100, 2002.
- Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687, 2002.
- Wahl SM, Feldman GM and McCarthy JB: Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *J Leukoc Biol* 59: 789-796, 1996.
- Ulbrich H, Eriksson EE and Lindbom L: Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 24: 640-647, 2003.
- Wayner EA, Garcia-Prado A, Humphries M, McDonald JA and Carter WG: Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 109: 1321-1330, 1989.
- Pierschbacher MD and Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33, 1984.
- Chigaev A, Zwart G, Graves SW, Dwyer DC, Tsuji H, Foutz TD, Edwards BS, Prossnitz ER, Larson RS and Sklar LA: $\alpha 4 \beta 1$ integrin affinity changes govern cell adhesion. *J Biol Chem* 278: 38174-38182, 2003.
- Sadovnikova E, Parovichnikova EN, Semikina EL, Kopiltsova EA, Svinareva DA, Belkin VM, Torubarova NA and Savchenko VG: Adhesion capacity and integrin expression by dendritic-like cells generated from acute myeloid leukemia blasts by calcium ionophore treatment. *Exp Hematol* 32: 563-570, 2004.
- Elghetany MT: True histiocytic lymphoma: Is it an entity? *Leukemia* 11: 762-764, 1997.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA and Bloomfield CD: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-3849, 1999.
- Bouabdallah R, Abena P, Chetaille B, Aurran-Schleinitz T, Sainy D, Dubus P, Amoulet C, Coso D, Xerri L and Gastaut JA: True histiocytic lymphoma following B-acute lymphoblastic leukaemia: case report with evidence for a common clonal origin in both neoplasms. *Br J Haematol* 113: 1047-1050, 2001.
- Chain M, Dei-Cas I, Carbia S, Xifra M, Wright D, Glorio R, Deves A and Woscoff A: Cutaneous true histiocytic malignancy: True histiocytic lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 50: S9-S10, 2004.
- Soria C, Orradre JL, Garcia-Almagro D, Martinez B, Algara P and Piris MA: True histiocytic lymphoma (monocytic sarcoma). *Am J Dermatopathol* 14: 511-517, 1992.
- Hennessy BT, Hanrahan EO and Daly PA: Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol* 5: 341-353, 2004.
- Sundstrom C and Nilsson K: Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17: 565-577, 1976.
- Dalmau SR, Freitas CS and Savino W: Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* 93: 974-990, 1999.
- Segat D, Pucillo C, Marotta G, Perris R and Colombatti A: Differential attachment of human neoplastic B cells to purified extracellular matrix molecules. *Blood* 83: 1586-1594, 1994.
- Lyons AB and Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171: 131-137, 1994.
- Cotta-de-Almeida V, Villa-Verde DM, Lepault F, Pleau JM, Dardenne M and Savino W: Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol* 34: 1578-1587, 2004.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingspeyer C: A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51, 1995.
- Pucillo CEM, Colombatti A, Vitale M, Salzano S, Rossi G and Formisano S: Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology* 80: 248-252, 1993.
- Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, Agnantis NJ and Pavlidis N: Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer* 38: 2362-2370, 2002.

27. Kim DK, Cho ES, Seong JK and Um HD: Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. *J Cell Sci* 114: 4329-4334, 2001.
28. Peled A, Hardan I, Trakhtenbrot L, Gur E, Magid M, Darash-Yahana M, Cohen N, Grabovsky V, Franitza S, Kollet O, Lider O, Alon R, Rechavi G and Lapidot T: Immature leukemic CD34⁺CXCR4⁺ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells* 20: 259-266, 2002.
29. Molla A and Block MR: Adherence of human erythroleukemia cells inhibits proliferation without inducing differentiation. *Cell Growth Differ* 11: 83-90, 2000.
30. Bhatia R, Williams AD and Munthe HA: Contact with fibronectin enhances preservation of normal but not chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 30: 324-332, 2002.
31. Weston CA and Weeks BS: bFGF stimulates U937 cell adhesion to fibronectin and secretion of gelatinase B. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 318-323, 1996.
32. Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, *et al*: Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 129: 867-879, 1995.
33. Grinnell F and Zhu M: Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *J Invest Dermatol* 103: 155-161, 1994.
34. Greiling D and Clark RA: Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 110: 861-870, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)