

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y
BIOPROCESOS**

"PAPEL DE CD43 EN CÉLULAS TUMORALES"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biól. Amiel Olivos Ortiz

DIRECTOR DE TESIS: Martín Gustavo Pedraza Alva



CUERNAVACA, MORELOS 2008

M. 100569



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

COMITÉ TUTORAL

Dra. Lourdes Gutierrez Xicotencatl

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

JURADO DE EXAMEN

Dra. Carmen Beltrán Nuñez

(Presidente)

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

(Secretario)

Dr. Alejandro García Carrancá

(Vocal)

Dra. Marina Macías Silva

(Suplente)

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

(Suplente)

El presente trabajo se desarrollo en el Departamento de Medicina Molecular y bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y fue apoyado por donativos CONACYT U46505-M y 51198-M.

Agradezco al IBT-UNAM por la posibilidad de realizar este trabajo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante su realización, con número de registro 199937.

Agradezco a los Drs. Lourdes Gutierrez y Federico Sánchez por todas las observaciones y consejos en la revisión y mejoramiento de este proyecto.

Agradezco también a los Drs. Carmén Beltrán, Alejandro García, Marina Macías y Alejandro Zentella por las sugerencias hechas a mi trabajo.

Agradezco de manera especial al Dr. Adolfo Pedroza el apoyo técnico, la dedicación y la paciencia durante la realización de este trabajo. Gracias por enseñarme!

Dedicatoria

Una vez más aquí en el paredón y sin letras...

Estas primeras líneas las dedico a Dios por permitirme ser, estar, respirar, porque me ha concedido el milagro de sentir “todo” y hacerme saber que la vida con “todo y más” es maravillosa... Por todos los milagros en mi y para mi... Gracias por regalarme el viento...

A mi madre, a quien amo con todo mi corazón, quien siempre me acompaña, me apoya y me ama incondicionalmente... Hoy solo quiero decirte que eres parte de ese milagro mamá... Gracias por ser luz y hogar... Siempre conmigo a donde quiera que vaya...

A mi papá a quien quiero mucho... Aunque no haya muchas letras...

A mis hermanos Alejandro, Aidé, Ariel y Aramis... Gracias por estar para mi en las buenas y en las malas, por dejarme crecer, por permitirme equivocarme y ayudar a levantarme... Por todo lo que verdaderamente importa...

A mi abuela Susi... Por enseñarme a vivir, por cuidarme, por todo el amor... Gracias por no irte de mi lado...

A los niños de mi vida: Yaya, Fer, Aileen y Pao... Gracias por sus sonrisas... Nunca hubiera sido igual sin ustedes.

A la prima Clau, a Consuelo, Héctor, Javis y Jaime por cuidarme, y como ya lo he dicho antes... Por ser mis padres, sin tener que serlo...

A los amigos de siempre Christian, Rafael, Luis, Memo, Marcos, Faby, Javier y Miguel... ¿Saben cuanto los quiero?... Solo puedo decirles “*Gracias por ser parte de mi*”...

A las chicas del Lab YR... Monse, Laura, Nohemí, Mali, Ceci, Natasha, Erika, Coco, Nora, Betty... y por supuesto a la Doc que siempre nos puede regalar solo a Yvonne... Gracias por ser amigas y más... *Las quiero muchísimo a todas... sin ustedes nada mujeres bonitas!*...

A los muchachos del Lab. Gustavo, Jose Luis, Omar y más recientemente a Oswaldo... Los cafés y los goyas nunca tan divertidos... inolvidables...

A mis otros amigos y compañeros de Lab. Gutierrez: Fito, Humberto y Victor... Gracias por enseñarme cuales eran “las malas mañas”... Especialmente a usted Dr. Fito... Gracias por las sonrisas, el tiempo y la dedicación... Por la confianza sembrada en mi...

A los mentores y guías, y por mucho no solo jefes:

A la Dra. Yvonne Rosenstein por apoyarme, enseñarme y decir lo mucho que le hace falta aprender a una “niña grande” como yo... Gracias por su experiencia compartida... Por querer compartirla conmigo... Por creer, querer y la oportunidad que esto implicaba... *Muchas gracias Doc por todo... Lo que es todo...*

Al Dr. Gustavo Pedraza por aguantar a la rebelde y obtusa... Muchas gracias por dejarme pensar, por ser el jefe más duro solo en los tutorales y preguntar mucho más de lo que se, por reírte y no enojarte, por la paciencia ante todas las equivocaciones —*Después de tanto tiempo seguimos aprendiendo...*—, por los consejos y el apoyo cuando los días se pintaban de gris... Por toda la confianza que es mucha... Gracias por dejarme crecer, por ser guía, jefe y amigo... *Gracias por confiar en lo que mis manos hacen y mis ojos ven...*

A mis otros hermanos:

A Christian y a Rafa por cuidarme, quererme, regañarme, por la fe y todo este tiempo juntos...

A Luis por preocuparse y ocuparse, por estar dispuesto a venir a mi rescate a las 3 de la mañana desde el otro lado del mundo... *Cualquiera de mis manos amigo...*

A Monserrat por dejarme ser la hermana mayor, por compartir conmigo un abrazo, un te quiero y un corazón, por escucharme siempre hermana bonita...

A Laura, por cambiarme la tristeza por sonrisas, por estar allí y hacerme reír aún cuando no sabías cuanto lo necesitaba... —*Como un soplo de viento fresco pequeña hermana*—

A Miguel, porque después de todo no hemos dejado de ser amigos, gracias por escuchar, entender y apoyar amigo —*La fortuna es realmente mía, ¿Nos tomamos un café? ... Te quiero amigo*—

A Javi, porque te veo poco, pero te quiero mucho, porque contigo siempre soy bienvenida —*Que buena suerte ser los malqueridos de la facu* —

A Lalo... Azul, siempre azul a donde sea que nos lleve el viento... Porque en todos los horizontes te quiero amigo mío...

A las personas que me hicieron crecer tocando fondo, porque todo es experiencia... Gracias por forjar mi carácter y enseñarme que puedo con más de lo que creo...

Y desde siempre a Paco, el amigo que regreso cuando la necesidad de un amigo era infinita... Gracias por no irte, por regalarme un espacio en el lugar más bello, por hacerme sentir bienvenida, por traer contigo a la princesa, sin importar si tres segundos o toda la vida... *Soñando rosas e inventando estrellas... Te quiero...*

Y finalmente a todos mis ángeles, a los que puedo tocar y a los que puedo sentir... Con todo mi cariño, soy por ustedes y me los llevo conmigo...

En todas mis diferentes maneras... Los quiero mucho!

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	- 1 -
Resumen	- 4 -
Introducción	- 5 -
1. Receptores con actividad de cinasa de tirosinas	- 6 -
2. Vías de señalización activadas a través de RTKs	- 8 -
3. Regulación negativa de RTKs	- 13 -
a. Inhibición por competencia	- 13 -
b. Retroalimentación negativa	- 14 -
c. Defosforilación	- 15 -
4. Degradación de RTKs dependiente de ubiquitinación	- 15 -
5. Desregulación de las señales generadas a partir de los RTKs	- 17 -
6. Cbl	- 19 -
a. Estructura	- 19 -
7. Regulación negativa de diversos RTKs por Cbl	- 21 -
8. Otros factores de secreción como mediadores del desarrollo y progresión tumoral	- 22 -
9. El co-receptor CD43	- 25 -
a. Estructura	- 25 -
b. Isoformas	- 27 -

Antecedentes	- 29 -
Hipótesis	- 30 -
Objetivos	- 30 -
Materiales y Métodos	- 31 -
Anticuerpos	- 31 -
Cultivo Celular	- 31 -
Transfección transitoria de células NIH-3T3	- 31 -
Transfección estable de células NIH-3T3	- 32 -
Activación celular	- 32 -
Obtención de extractos celulares totales	- 33 -
Inmunoblot	- 33 -
Inmunoprecipitación	- 34 -
Ensayos de transformación celular (crecimiento sobre agar suave)	- 34 -
Tinción celular y citometría de flujo	- 35 -
Ensayos de migración y proliferación celular (Wound Healing)	- 35 -
Ensayos de captura para determinación de citocinas	- 36 -
Resultados	- 37 -
1. La estimulación a través de EGF induce la fosforilación en tirosinas de EGFR y Cbl en células NIH-3T3	- 37 -
2. Efecto de la expresión de CD43 sobre la activación del EGFR y ERK en respuesta a factor de crecimiento	- 39 -

3. Efecto de la pre-estimulación a través de CD43 sobre la activación de EGFR y las MAP cinasas ERK 1/2	- 41 –
4. Determinación de la capacidad de transformación celular en líneas transfectadas establemente con las construcciones WT, Δ IC y pFneo	- 45 –
5. Evaluación de la proliferación y de la motilidad celular en líneas transfectadas establemente con las construcciones WT, Δ IC y pFneo	- 50 –
6. Determinación de las citocinas producidas por células transformadas que expresan las construcciones WT, Δ IC y pFneo	- 53 –
Discusión y conclusiones	- 56 –
Perspectivas	- 60 –
Referencias	- 61 –

Abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
BCR	Receptor de células B
CFSE	Carboxifluorescein succinimidil éster
CSF-R	Receptor para el factor de estimulación de colonias
DDR	Receptor con dominio de discoidina
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGF-R/HER1	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
erbB/HER-2/neu	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano 2
EPH	Receptor para efrinas
ERK 1/2	Cinasas regulada por señale extracelulares 1 y 2
ERM	Proteínas Ezrina-Radixina-Moesina
FBS	Suero fetal bovino
FcεRI	Receptor tipo I para la fracción cristalizable ε
FcγR	Receptor para la fracción cristalizable γ
FGF-R	Receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos
IC	Intracitoplásmico
INF's	Interferones
IFN-γR	Receptor para interferón γ
IL's	Interleucinas
Grb2	Proteína unida al receptor para el factor de crecimiento
GM-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos
G-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos
HGF-R	Receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos
HSA	Albúmina sérica humana

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
INS-R/IR	Receptor de insulina
JAK	Cinasas Janus
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógeno
MCPs	Factores quimioattractantes de monocitos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteasa de matriz extracelular
NF-AT	Factor de transcripción de células T activadas
NGF-R	Receptor para el factor de crecimiento neural
NLS	Secuencia de localización nuclear
PDGF-R	Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A 2
PLC γ	Fosfolipasa C γ
PLD	Fosfolipasa D
PMNLs	Leucocitos polimorfonucleares
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PP1	Fosfatasa de proteínas con residuos de serinas y treoninas tipo 1
PP2A	Fosfatasa de proteínas con residuos de serinas y treoninas tipo 2 A
PTB (<i>dominio</i>)	Dominio de unión a tirosinas fosforiladas
PTP1B	Proteína fosfatasa de tirosinas de tipo 1
RET	Receptor rearrreglado durante la transfección con actividad de RTK
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor con actividad de cinasa de tirosina
RYK	Receptor relacionado con cinasas de tirosina
SH2 (<i>dominio</i>)	Dominio tipo 2 con homología a Src
SH3 (<i>dominio</i>)	Dominio tipo 3 con homología a Src

SOCS (proteínas)	Familia de proteínas supresoras de la señalización a través de citocinas
STATs	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
TCR	Receptor de células T
TGF α	Factor de crecimiento tumoral α
TIE	Receptor huérfano relacionado con angiopoyetinas 1-4
TKB (dominio)	Dominio de unión a cinasa de residuos de tirosina
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZAP-70	Cinasa de residuos de tirosina asociada a la cadena zeta

Resumen

La proliferación celular es un proceso que está regulado por diversos factores de crecimiento que se unen a receptores específicos con actividad de cinasa de tirosinas (RTKs) en la superficie celular y que inducen señales que promueven la proliferación. La regulación negativa de estas señales es esencial para prevenir la aparición de cáncer. CD43 es una glicoproteína muy abundante comúnmente expresada sobre la superficie de células hematopoyéticas. Recientemente su expresión se ha documentado en diversas células tumorales de origen epitelial, sin embargo su función en estas células no ha sido establecida. En linfocitos T, la estimulación a través de CD43 genera señales que resultan en la prevención de la actividad de la ligasa de ubiquitina Cbl, evitando con ello la interacción de Cbl con moléculas clave involucradas en el control del ciclo celular, resultando en la activación sostenida de ERK 1/2 y en la inducción de la proliferación. Así mismo, las señales generadas a partir de CD43 activan al factor transcripcional NFκB que regula la expresión de citocinas proinflamatorias.

En este trabajo demostramos que la expresión de CD43 en la superficie celular genera señales que regulan de manera positiva el ciclo celular y que asociadas al efecto de algún oncogen (como p53, ARF, EGFR o E6-HPV) promueven la transformación celular, así como la capacidad de migración y proliferación, aunque el efecto no involucra la fosforilación o activación sostenida del receptor para EGF, ni de las MAP cinasas ERK 1/2. Lo anterior es debido de manera parcial a una mayor producción de citocinas que favorecen la adhesión, quimiotaxis, inflamación y angiogénesis por parte de las células que expresan la versión silvestre de CD43 en comparación con las células que expresan la versión que carece del dominio intracelular o aquellas que no expresan CD43. Debido a ello podemos concluir también que el dominio intracitoplásmico de CD43 es fundamental para la regulación e inducción de las vías de señalización que promueven la transformación, proliferación y/o migración celular mediadas a través de esta molécula.

Introducción

En un organismo, el balance entre fenómenos como proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, interacciones entre célula-célula o célula-estroma y muerte celular es necesario para mantener la homeostasis y evitar la aparición de cáncer. Bajo condiciones normales, el número de células nuevas que se producen, se diferencian y sobreviven está altamente regulado con la finalidad de que exista un número constante de células capaces de realizar funciones determinadas. Sin embargo, en ciertas circunstancias la acumulación de múltiples cambios génicos resulta en el incremento de la proliferación celular debido a que las células se vuelven insensibles a señales anti-proliferativas o inhibitorias, y adquieren una capacidad replicativa ilimitada (inmortalización). Así mismo, estas células se hacen resistentes a señales de muerte celular o apoptosis, expandiendo así su supervivencia, y pueden adquirir la facultad de seleccionarse secuencialmente originando clonas más agresivas que son capaces de expandirse bajo condiciones independientes de factores de crecimiento exógenos al secretar productos con efectos proliferativos autócrinos, dando como resultado la aparición de metastasis (Goldsby et al., 2001, Pelangris y Khan, 2006).

Los procesos celulares que definen directamente el tamaño de un órgano están regulados por moléculas como proteínas de superficie extracelular, componentes propios de la matriz, y proteínas o péptidos de secreción (Alberts et al., 2002). Existen tres clases de proteínas capaces de inducir el crecimiento de un órgano o la progresión tumoral: mitógenos, factores de crecimiento y factores de supervivencia. Los mitógenos promueven la división celular, mientras que los factores de crecimiento estimulan el crecimiento de masa celular, y finalmente, los factores de supervivencia inhiben la apoptosis (Alberts et al., 2002). En la familia de los mitógenos encontramos algunos miembros de la familia de TGF- α , así como algunos factores de crecimiento como INR/IR, HGFR, EGF, NGF, FGF y PDGF, entre otros. Estos actúan uniéndose a receptores de membrana con actividad de cinasa de tirosinas, los cuales al ser activados generan señales que estimulan la división celular (Alberts et al., 2002).

Adicionalmente, existen otros factores de secreción que favorecen la progresión tumoral a través de la generación de microambientes proinflamatorios, entre los cuales encontramos citocinas (quimiocinas e interleucinas) y factores angiogénicos como MIF, MCP-1, MCP-5, CXCL4, CXCL8, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15, eotaxina, trombopoyetina, entre otros. Estos factores actúan uniéndose a receptores de membrana y activando vías de señalización

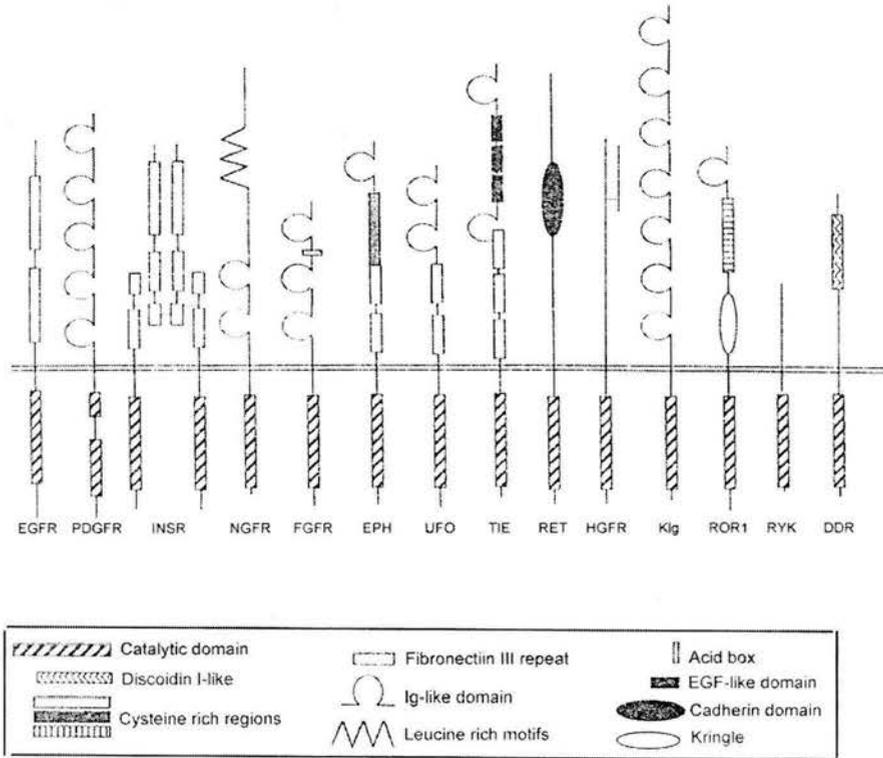
que en última instancia regulan la expresión génica (Cheadle et al., 2007; Hussain y Curtis, 2007; Kanayasu-Toyoda et al., 2007; Schober y Zerneck, 2007).

1. Receptores para factores de crecimiento y su actividad como cinasas de residuos de tirosina

Los receptores para factores de crecimiento con actividad de cinasa de residuos de tirosinas o RTKs (del inglés *r*eceptor *t*yrosine *k*inase) juegan un papel importante en diferentes procesos biológicos, tales como proliferación, diferenciación, migración y supervivencia, por lo que su actividad se regula estrechamente a diferentes niveles para alcanzar una respuesta biológica apropiada (Blume-Jensen et al., 2001). Estos receptores poseen una región N-terminal que presenta un péptido señal (capaz de dirigir esta proteína hacia la vía secretoria) seguido de un dominio de unión a ligando que contiene patrones específicos de residuos de cisteínas, así como diversos motivos estructurales característicos de cada receptor (dominios tipo cadherina, dominios Kringle, dominios IG-like, repeticiones de fibronectina-III, dominios discoidina I-like, motivos de leucina, cajas ácidas y dominios EGF-like). Esta región extracelular generalmente es modificada por glicosilaciones, en su mayoría de tipo N (revisado en Van der Geer et al., 1994). También poseen un dominio transmembranal compuesto de una región hidrofóbica seguida de varios residuos básicos que sirven de señal de transferencia-paro para el posicionamiento de la molécula. Por otro lado, hacia la región intracelular, poseen un dominio catalítico conservado de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos que contiene un sitio de unión a ATP/Mg²⁺ y un sitio de unión a sustrato (revisado en Van der Geer et al., 1994; Citri y Yarden, 2006).

Existen al menos 14 familias reportadas de RTKs clasificadas de acuerdo a las características estructurales de sus dominios extracelulares: EGF-R (receptor para el factor de crecimiento epidérmico), PDGF-R (receptor para el factor derivado de plaquetas), INS-R/IR (receptor de insulina/relacionado a insulina), NGF-R (receptor para el factor de crecimiento neural), FGF-R (receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos), HGFR (receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos75), EPH (receptor para efrinas), UFO (receptor con dominio extracelular único con actividad de RTK), TIE (receptor huérfano relacionado con angiopoyetinas ANG1-4), RET (receptor rearreglado durante la transfección con actividad de RTK), Klg (Kinase-like-gene), ROR1

(receptor huérfano relacionado a retinoides), RYK (receptor relacionado con cinasas de tirosina) y DDR (receptor con dominio de discoidina) (Figura 1) (Chou et al., 1991; 1994; Braunger, et al., 1997; Vogel, 1999; Keeble et al., 2006; Runeberg-Roos y Saarma, 2007; Mundy y Elefteriou, 2006).



Van der Geer et al., 1994

Figura 1. Familias de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs)

En general, el mecanismo de activación de estos receptores se puede resumir en cuatro pasos: dimerización, autofosforilación, transfosforilación y reclutamiento de sustratos hacia el receptor. Después de que el receptor ha interactuado con su ligando, que puede ser o no un dímero, estos receptores dimerizan debido a un cambio conformacional en el dominio externo. Lo anterior resulta en la yuxtaposición de su dominio intracitoplásmico, que a su vez induce un cambio conformacional que promueve su actividad catalítica, la cual permite su posterior transfosforilación en residuos de tirosina específicos (Vogel, 1999; Blume-Jensen et al., 2001; Citri y Yarden, 2006; Mundy y Elefteriou, 2006; Runeberg-Roos y Saarma, 2007). La transfosforilación de estos RTKs homodiméricos los habilita para catalizar la fosforilación y activación de sustratos, con o sin actividad catalítica, que han

sido reclutados hacia el dominio intracitoplásmico del receptor a través de interacciones proteína-proteína mediadas por los dominios SH2 y secuencias PTB de los sustratos y los residuos de tirosinas fosforiladas del receptor (Blume-Jensen et al., 2001; Fiorini et al., 2001). Estas interacciones permiten modular la integración o propagación de señales inducidas a través de la estimulación de RTKs y otros co-receptores (revisado en Van der Geer et al., 1994; Blume-Jensen et al., 2001; Vogel, 1999).

2. Vías de señalización activadas a través de RTKs

La función de los RTKs es la de sensibilizar y enviar una señal al interior celular de la presencia de estímulos mitogénicos. Dicha señal tiene como finalidad alcanzar el núcleo, donde se encuentra la maquinaria responsable del control del ciclo celular, por lo que dichos receptores tienen que interactuar con diversas moléculas intracelulares que las habilitan para transferir la información desde el exterior celular hasta el núcleo.

Se ha demostrado la existencia de tres clases esenciales de moléculas blanco para los RTKs. La primera de ellas corresponde a enzimas cuya actividad puede ser alterada directamente por fosforilación o que pueden obtener el acceso a sus sustratos a través de su translocación a la membrana plasmática. La segunda clase corresponde a proteínas que carecen de actividad catalítica, conocidas como proteínas adaptadoras o de andamiaje, las cuales poseen dominios SH2 y/o SH3, cuya función es la de servir como intermediarios entre los RTKs y moléculas río abajo en las cascadas de señalización. Finalmente, el último grupo se integra de proteínas estructurales cuya fosforilación puede ser responsable de rápidos rearrreglos de citoesqueleto y de membrana después de la activación de los RTKs (Blume-Jensen et al., 2001; Fiorini et al., 2001; Scaltriti y Baselga, 2006). Diversos estudios han revelado que la estimulación a través de varios RTKs induce cascadas de señalización que involucran a proteínas como Src, PI3K, Grb2/Drk/Sem-5, Shc, Nck, SOS (factor de liberación de nucleótidos de guanina de Ras), Ras, Raf-1 (cinasa de serinas), MAP cinasa cinasa (MEK), MAP cinasas ERK1/2. Estas últimas pueden translocar a núcleo y activar a factores de transcripción como Elk y c-Myc (revisado en Van der Geer et al., 1994; B; Scaltriti y Baselga, 2006) (Figura 2). Adicionalmente, se ha reportado que al menos tres clases de fosfolipasas pueden regularse a través de RTKs: fosfolipasa C- γ (PLC- γ), fosfolipasa A₂ (PLA₂) y fosfolipasa D (PLD), lo anterior gracias a la interacción entre los dominios SH2 presentes en las fosfolipasas con los

residuos de tirosina fosforilados presentes en los RTKs (revisado en Van der Geer et al., 1994; Blume-Jensen et al., 2001, Fiorini et al., 2001; Rodríguez-González et al., 2003).

El primer tipo de enzimas cuya activación se ha visto asociada con la estimulación a través de RTKs son las cinasas de tirosina de la familia Src. Esta familia incluye al menos nueve proteínas citoplásmicas estrechamente relacionadas: c-Scr, c-Yes, c-Fgr, Lck, Fyn, Lyn, Hck, Blk y Yrk (Cooke et al., 1991). Se ha reportado que la estimulación a través de PDGF-R y CSF-R promueve la activación y reclutamiento de c-Scr, c-Yes y Fyn hacia el dominio intracitoplásmico de estos RTKs (revisado en Van der Geer et al., 1994, Citri y Yarden, 2006). Todas estas proteínas contienen un dominio catalítico hacia la región C-terminal seguido de una secuencia corta que contiene residuos de tirosina potencialmente fosforilables que regulan su función. Hacia su región N-terminal contienen un dominio SH2, seguido de un dominio SH3, además presentan un residuo altamente conservado de glicina en la segunda posición, el cual es requerido para su miristilación y anclaje a la membrana (revisado en Van der Geer et al., 1994). En general, estas cinasas juegan un papel crucial en eventos de señalización tempranos, ya que son capaces de reclutar y activar a otras moléculas a través de la interacción con sus dominios SH2 y SH3, tal es el caso de PI3K, la cual interacciona a través de una secuencia rica en prolina presente en la subunidad reguladora p85 con el dominio SH3 presente en las Src cinasas (Hermiston, et al., 2002) (Figura 2).

A través de diversos estudios bioquímicos, también se ha demostrado que la estimulación de receptores como PDGF-R, FGF-R, NGF-R/TakA, CSF-R, SCF/c-Kit, INS-R/IR e EGF-R, induce el reclutamiento e interacción de la subunidad reguladora de PI3K con el dominio intracitoplásmico de estos receptores, o con proteínas adaptadoras (Grb2 o Shc) capaces de unirse a ellos a través sus dominios SH2 y los residuos de tirosinas fosforilados presentes en la región intracitoplásmica de estos receptores, dando como resultado la fosforilación y activación de estas cinasas (Blume-Jensen et al., 2001; Osaki et al., 2004, Citri y Yarden, 2006). PI3K es una enzima perteneciente a una familia de proteínas heterodiméricas compuestas de una subunidad catalítica de aproximadamente 110 KDa unida a una subunidad reguladora de 85 KDa que modula su actividad y localización celular. La activación de PI3K resulta en la fosforilación del *D-myo*-fosfatidilinositol o sus derivados en la posición 3 del grupo inositol, los cuales son capaces de regular el reclutamiento de ciertas proteínas hacia la membrana plasmática, así como su fosforilación y activación (Deane y Fruman, 2004; Osaki et al., 2004). Una de estas proteínas es PLC- γ , que a su vez puede hidrolizar fosfatidilinositol 4,5-difosfato en dos moléculas

con actividad de segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 (IP₃) (Deane y Fruman, 2004; Margolis et al., 1989; Downing et al., 1989; revisado en Van der Geer et al., 1994). Por su parte, el DAG es el activador fisiológico de la proteína cinasa C (PKC), cuya función se ha relacionado con crecimiento y procesos de tumorigenesis, ya que tiene la capacidad de activar la vía de las MAPKs (Wilde y Watson, 2001). Por otro lado, el IP₃ induce flujos de calcio a nivel intracelular, los cuales regulan un amplio rango de procesos celulares que incluyen la contracción muscular, transcripción génica, secreción, activación y proliferación celular (Bootman, et al., 2006) (Figura 2).

Se ha observado que la activación de la vía de las MAPKs mediada a través de EGF-R, PDGF-R y CSF- R induce la actividad de PLA₂, a través de la fosforilación de residuos de serina específicos de esta molécula. PLA₂ es capaz de liberar ácidos grasos, preferencialmente ácido araquidónico (precursor de moléculas mediadoras de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos), de la posición 2 de diferentes fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) (Lin et al., 1992).

Finalmente, la estimulación a través de PDGF-R e EGF-R estimulan la activación de PLD, la cual es capaz de hidrolizar fosfatidilcolina en ácido fosfatídico y colina. Posteriormente el ácido fosfatídico puede convertirse en DAG y activar así a PKC. Adicionalmente la colina puede fosforilarse por la colina cinasa y convertirse en fosforilcolina, la cual funciona como un segundo mensajero que induce estímulos mitogénicos (revisado en Van der Geer et al., 1994; Rodríguez-González et al., 2003).

Un último tipo de proteínas capaces de interactuar con el dominio intracitoplásmico de los RTKs, o que se involucran en diferentes puntos de las vías de señalización que se desencadenan como resultado de la estimulación de estos receptores, son las proteínas adaptadoras, las cuales carecen de dominio catalítico pero que contienen al menos un dominio SH2, y algunos otros dominios de interacción con proteínas, generalmente del tipo SH3. Dentro de este grupo podemos mencionar a Grb2, Shc y Nck (Citri y Yarden, 2006). Se ha demostrado que en respuesta a la estimulación con EGF y PDGF, Nck es capaz de unirse al dominio intracitoplásmico de estos receptores, a través de la interacción con su dominio tipo SH2. Se cree que la función de Nck es la de contribuir con la dispersión y magnificación de los estímulos mitogénicos, ya que la sobreexpresión de Nck resulta en la transformación morfológica de fibroblastos de ratón (revisado en Van der Geer et al., 1994; Citri y Yarden, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de receptores para EGF y CSF-1 induce la asociación de Grb2 con los residuos fosforilados de los dominios intracitoplásmicos de estos receptores. Grb2 es una proteína de 24 KDa que contiene un único dominio SH2 localizado entre dos dominios SH3, cuya expresión es ubicua. Diversos estudios han reportado que Sem-5 (homólogo a Grb2 en *C. elegans*) es necesario para la transducción de señales a partir de la estimulación de LET-23 (homólogo a EGF-R en *C. elegans*), así como para la activación de la vía Ras/MAPK. El mecanismo a través del cual esta molécula adaptadora es capaz de unirse a los RTKs activados esta mediado por su dominio SH2. Una vez unida a estos receptores permite el reclutamiento del factor intercambiador de nucleótidos SOS hacia la membrana plasmática, así como su posterior fosforilación. Una vez que esto ocurre, SOS puede actuar sobre Ras, que induce la activación de Raf y finalmente la activación de las MAPKs (revisado en Van der Geer et al., 1994; Citri y Yarden, 2006).

Finalmente, evidencias bioquímicas indican que la estimulación a través de EGF-R, PDGF-R, CSF-R, INS-R/IR y NGF-R induce el incremento en la fosforilación de tirosinas de Shc, y que ésta es capaz de asociarse con el receptor de EGF, ErbB2 y Trk fosforilados. Shc es una proteína que contiene un dominio SH2 C-terminal y una secuencia central rica en glicinas y prolinas. Se ha reportado que la fosforilación de Shc es capaz de promover su unión con Grb2 a través de la interacción del dominio SH2 de Grb2. De esta manera, la fosforilación y unión de Shc con Grb2 puede actuar como una manera alterna de activación de la vía de Ras/MAPK (revisado en Van der Geer et al., 1994).

La activación de todas las moléculas sustrato mencionadas anteriormente es solamente un paso intermedio en las vías de señalización propagadas a través de la estimulación de diferentes RTKs. Se ha demostrado que la activación de la vía de las MAPKs a través de la estimulación de RTKs tiene como resultado final la activación de diversos factores transcripcionales como Elk1, el cual es responsable de la expresión de genes inmediatos como Fos, Jun y Myc, los cuales a su vez regulan positivamente la expresión de genes requeridos para la proliferación celular como ciclina D, o negativamente la expresión de genes antiproliferativos como Jun B y GAD54 entre otros (Yamamoto et al., 2006).

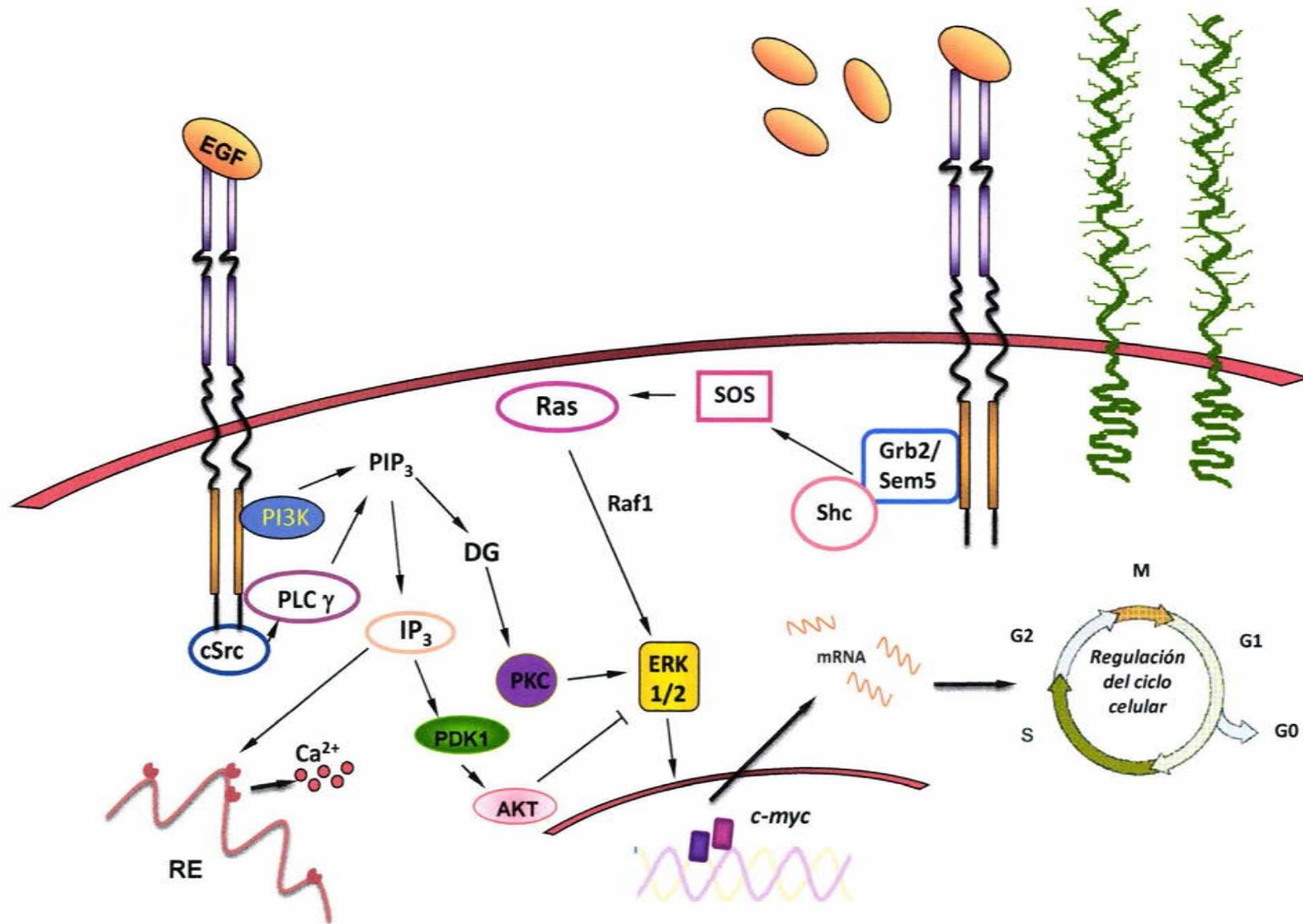


Figura 2. Vías de señalización inducidas a través de RTKs

3. Regulación negativa de RTKs

Como se mencionó anteriormente, los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs) están involucrados en diversos procesos que van desde la migración, supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto es crucial para la célula regular la actividad de estos receptores de manera estricta. Así, la activación de los RTKs es regulada negativamente a diversos niveles, entre los cuales podemos encontrar la defosforilación de residuos de tirosina, la unión de diversos RTKs con proteínas inhibitoras que evitan la dimerización de los receptores y con ello su actividad catalítica, la regulación por retroalimentación o "Feedback" de productos que se producen en consecuencia de la estimulación de los RTKs, la competencia intracelular por la unión con sustratos, y la regulación negativa debido a la degradación de los receptores o de moléculas que participan río abajo en las cascadas que resultan de la activación de los RTKs (Fiorini et al., 2001; Sweeney, et al., 2006).

a. Inhibición por competencia.

Los homólogos de EGF-R, DER (*Drosophila* EGF Receptor) y LET-23 en *C. elegans*, regulan una gran diversidad de procesos, y por tanto se regulan de forma puntual a diversos niveles. En *Drosophila*, Argos es una molécula soluble compuesta por un dominio modificado del EGF que es capaz de unirse a su ligando natural "Spitz" o bien a la región extracelular de DER, evitando de esta manera la dimerización del receptor y su activación (Jin et al., 2000; Klein et al., 2004). Por otro lado, se sabe que la estimulación a través de DER promueve la transcripción de dos genes, Kekk-1 y Sprouty, cuyo producto final codifica para proteínas que participan en la regulación negativa de los RTKs. Kekk-1 es una proteína transmembranal cuya transcripción se asocia a la estimulación a través de DER, y que posee características similares a las de una molécula de adhesión. Se ha demostrado que su efecto inhibitorio está dado a partir de la interacción física de su región extracelular y/o transmembranal con DER, evitando así su dimerización (Fiorini et al., 2001), y que es capaz de unirse a todos los receptores de ErbB/EGFR de mamífero evitando con ello la proliferación y el crecimiento de células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresan estos receptores (Sweeney et al., 2006). Por otro lado, Sprouty es una proteína cuya expresión está relacionada no solamente con un efecto sobre DER, si no además con otros RTKs, como Torso, Sevenless y Breathless,

y su mecanismo de inducción es similar al de Kerkon-1 (Ghiglione et al., 1999; Fiorini et al., 2001; Sweeney et al., 2006).

Otro mecanismo de regulación negativa alterno esta dado por herstatina, que es una proteína soluble, originada a partir de splicing alternativo de HER-2/erbB-2 (Receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano 2), la cual codifica para los subdominios I y II de este receptor. Se sabe que al ser secretada a la matriz extracelular es capaz de unirse a gpl-185/ErbB-2 con alta afinidad, previniendo de esta manera su dimerización y actividad catalítica (Fiorini et al., 2001). Evidencia experimental demuestra que el abatimiento de este mecanismo de regulación negativa es capaz de conferir una ventaja al desarrollo tumoral de glioblastomas y tumores de mama que sobreexpresan ErbB o EGFR (Sweeney et al., 2006).

b. Retroalimentación negativa

Otro mecanismo de regulación de los RTKs es a través de la activación transcripcional de reguladores negativos como resultado de las señales inducidas por la unión del receptor con su ligando. La familia de proteínas SOCS (supresor of cytokine signaling) esta constituida de al menos ocho miembros que comparten una estructura común, un dominio SH2 NH₂-terminal, una región denominada caja SOCS hacia la región COOH-terminal, y un dominio denominado caja BC, el cual les permite reclutar complejos con actividad de ligasa de ubiquitina (Fiorini et al., 2001). Se ha demostrado que SOCS-3 es un inhibidor de la vía Stat5b inducida a través del receptor de insulina (IR), ya que la estimulación a través de este RTK induce la expresión de SOCS-3, el cual es capaz de unirse al residuo pTyr 960 del IR, dando como resultado la inhibición de la vía. Aunado a ello, también se ha observado que SOCS-1 es capaz de unirse a c-Kit fosforilado (activado), así como a Grb2 y al factor intercambiador de guaninas Vav. Se ha demostrado que una vez que SOCS-1 se ha unido a sus sustratos puede ser capaz de ubiquitinarlos (Fiorini et al., 2001). Otro ejemplo claro de la inhibición por retroalimentación lo aporta RALT (receptor associated late transducer), que es un inhibidor de la respuesta mitogénica propagado por la estimulación a través del receptor de ErbB-2. Esta molécula parece ser un adaptador capaz de reclutar a otras moléculas inhibidoras, y de esta manera inhibir la activación de la vía de las MAPKs. Así mismo, se ha demostrado que el abatimiento de su expresión en células provenientes de cáncer de mama contribuye con el efecto oncogénico de la sobreexpresión de ErbB2, y que la reconstitución de este gen revierte la resistencia de

estas células a Herceptina (molécula que mimifica el efecto natural de herstatina) (Fiorini et al., 2001; Sweeney, et al., 2006).

c. Defosforilación

La defosforilación de residuos de tirosina de los RTKs también juega un papel preponderante en la modulación de señales que controlan la progresión del ciclo celular. Se sabe que el receptor PDGF β -R es defosforilado por la tirosin-fosfatasa transmembranal DEP-1 (density enhanced phosphatase), mientras que EGF-R e IR son defosforilados por la fosfatasa citosólica PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B), así como por las fosfatasas PP1 y PP2A. Adicionalmente se ha demostrado que la fosfatasa de tirosina SHP-1 es capaz de defosforilar los dominios intracitoplásmicos de los receptores CSF/c-Kit, EGF-R, PDGF-R, INS-R/IR y ErbB2. De esta manera la defosforilación de residuos es capaz de apagar las señales inducidas a través de la unión de los RTKs con sus ligandos naturales, tales como la activación de la vía de las MAPKs y de AKT/PI3K, que en última instancia promueven señales de proliferación, crecimiento y supervivencia celular (Ostman et al., 2006).

4. Degradación de RTKs dependiente de ubiquitinación

Adicionalmente, otra manera de regular la actividad de los receptores con actividad de tirosin cinasa es la ubiquitinación y degradación a través de la vía del proteosoma. Se sabe que diversos miembros de la familia de Cbl son capaces de asociarse a diversos RTKs, controlando de esta manera su degradación dependiente de ubiquitinación (revisado en Lupper et al., 1998).

En general, todas las proteínas de células de mamífero son continuamente degradadas y reemplazadas por proteínas que se sintetizadas *de novo*. Regularmente la degradación de proteínas se lleva a cabo a través de dos mecanismos principales: El sistema de ubiquitina-proteosoma y el sistema lisosomal (Burger et al., 2004). De manera genérica, se ha reportado que la mayor parte de las proteínas presentes en la superficie de membrana celular son endocitadas y degradadas en el lisosoma. Sin embargo, existe también un grupo de ellas que son degradadas en el citoplasma o en el núcleo después de ser ubiquitinadas (Burger et al., 2004). La ubiquitina es una molécula de aproximadamente 76 residuos aminoácidos altamente conservada entre eucariotes, la cual se asocia a

proteínas sustrato a través de residuos de lisina marcándolas de esta manera para su degradación en el complejo del proteosoma 26S (Kaiser et al., 2005). El proteosoma 26S es un complejo macromolecular compuesto por dos subunidades, 26S y la subunidad 19S, a través de los cuales se realiza la degradación enzimática de las proteínas poliubiquitinadas (Burger et al., 2004). La subunidad 26S está compuesta a su vez por 7 subunidades α y por 7 subunidades β , y se esta asociada a la función catalítica del proteosoma. Por otro lado, la subunidad 19S esta conformado por siete subunidades ATPasa y 12 subunidades con actividad independiente de ATPasa, las cuales están involucradas en el reconocimiento y desdoblamiento de proteínas (Kaiser et al., 2005).

El proceso de ubiquitinación molecular es un mecanismo que se desarrolla esencialmente en tres pasos, los cuales están mediados por un complejo enzimático formado por tres distintos tipos de enzimas: E1 (proteína activadora de ubiquitina), E2 (proteína conjugadora de ubiquitna) y E3 (ligasa de ubiquitina). Se ha demostrado que las enzimas de tipo E1 son capaces de mediar la transferencia de ubiquitina de E1 a E2, y que este es un proceso dependiente de ATP. Por otro lado, las enzimas de tipo E2 son capaces de transferir la ubiquitina activada (ubiquitina-ATP) directamente a las enzimas de tipo E3, siendo estas últimas capaces de ubiquitinar sustratos específicos (Burger et al., 2004).

A través de diversos estudios se ha relacionado a los procesos de ubiquitinación con la regulación de diversos procesos celulares, tales como la progresión del ciclo celular, inducción de la respuesta inflamatoria y la presentación de antígeno, entre otras (Pickart, 2001). Así mismo, también se ha demostrado que la degradación a través del proteosoma juega un papel preponderante para regular la homeostasis y los procesos asociados con el desarrollo de cáncer (Burger et al., 2004). Consistente con esto, se sabe que uno de los mecanismos a través de los cuales es capaz de lograrse la regulación negativa de las señales inducidas a través de RTKs es la ubiquitinación y degradación de estos receptores (Thien et al., 2001).

Se ha observado que las ligasas de ubiquitina de la familia de Cbl median la ubiquitinación y degradación inducida por la unión a ligando de varios RTKs, entre los cuales se encuentra el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGF-R), el receptor para el factor derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor para el factor estimulador de colonias (CSF-R) y el receptor para el factor de crecimiento hepático (HGF-R), entre otros (Peschard, et al., 2003; Lee et al., 1999; Levkowitz, et al., 1998; Miyake et al., 1999).

En *C. elegans* la inducción vulval depende de la actividad de la proteína Lin-3, que pertenece a la familia de factores de crecimiento de EGF, la cual a su vez activa a LET-23

(homólogo al EGF-R). Lo anterior resulta en la activación de LET-60 (homólogo a Ras en *C. elegans*), generando señales que conducen a la proliferación y diferenciación celular (Moghal et al., 1999). Estudios genéticos han demostrado que existen diversos reguladores negativos involucrados en la señalización de LET-23, tales como Sli-1/c-Cbl, gap-1/RasGAP y ARK-1 (Fiorini et al., 2001). En mamíferos c-Cbl es una ligasa de ubiquitina que es capaz de interactuar directamente con el EGF-R promoviendo su ubiquitinación y degradación. De forma análoga, Sli-1 promueve la regulación negativa de LET-23 regulando su degradación por ubiquitinación (Fiorini et al., 2001).

Estudios realizados en *D. melanogaster* muestran que Cbl también es capaz de actuar como un regulador negativo en la señalización a través de RTKs, ya que su homólogo D-Cbl es capaz de suprimir el desarrollo de las células fotorreceptoras R7 (Meisner et al., 1997).

Cbl no solo regula negativamente a los RTK, también existen evidencias experimentales que indican que Cbl regula negativamente las vías de señalización activadas por receptores carentes de actividad intrínseca de cinasa de tirosinas, pero que activan cinasas de tirosinas como mecanismo de transducción de señales. Por ejemplo, en la línea celular de origen linfocítico Jurkat se ha observado que la sobreexpresión de c-Cbl previene la activación de la vía de las MAPKs dependiente de Ras, y al mismo tiempo evita la activación de los factores de transcripción NF-AT y AP-1 en respuesta a la estimulación a través del TCR (receptor para el antígeno de células T) (Rao et al., 2000; Rellahan et al., 1997; Zhang^a et al., 1999; Zhang^b et al., 1999; Van Leeuwen et al., 1999). Adicionalmente se ha reportado que timocitos de ratones c-Cbl^{-/-} muestran una marcada activación de ZAP-70 en respuesta a la estimulación de TCR-CD4 (Murphy et al., 1998, Naramura et al., 1998). Un efecto similar se muestra en células T periféricas de ratones deficientes en Cbl-b, en donde la estimulación a través de TCR induce la proliferación celular y la producción de IL-2 en ausencia de la coestimulación a través de CD28, lo cual hace que este tipo de ratones sea altamente susceptible a desarrollar enfermedades autoinmunes (Bachmaier et al., 2000; Chiang et al., 2000).

5. Desregulación de las señales generadas a partir de los RTKs

La activación no controlada de estos receptores se asocia con el desarrollo de un gran número de tumores humanos (Blume-Jensen et al., 2001). Dicha activación no controlada puede estar ocasionada por diversas alteraciones genéticas, como pueden ser

mutaciones (cambio de pares de bases, deleciones, inserciones), amplificación génica o bien traslocaciones cromosomales, que resultan en el incremento de las señales generadas a partir de estos receptores, la cual, en la mayor parte de los casos es independiente de ligando (Hernández-Menéndez y Ríos-Hernández, 1999; Lewin, 2000). Estudios realizados en cultivos celulares con el receptor para EGF/HER1 han demostrado que las mutaciones en ciertos residuos lo hacen más sensible a su ligando natural. Por otro lado, se ha reportado que el producto originado a partir de un transcrito truncado del gen *c-erbB* que incluye el dominio transmembranal y carece de región N-terminal y C-terminal reguladora del receptor, le confieren propiedades oncogénicas. En consecuencia la proteína truncada, puede polimerizar espontáneamente, y debido a la carencia del dominio C-terminal, esta es incapaz de regular negativamente sus señales (Lewin, 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que algunos protooncogenes son activados por eventos que cambian su expresión, pero que mantienen su secuencia codificante inalterada. Tal es el caso de proteínas receptoras como *erbB-2*, *PDGF-R* y *erbB*. El caso más común de ello es la inserción de un genoma retroviral en la vecindad de un gen (upstream o downstream) ocasionando con ello la pérdida de su regulación y por tanto un incremento en su expresión (Lewin, 2000). Un ejemplo de esto es la adquisición del oncogen *v-erb-B* por el virus de la eritroblastosis aviar. La evidencia experimental sugiere que esto ocurrió cuando este virus introdujo su genoma dentro de la secuencia del gen que codifica para *erb-B* en aves, y que al completar su ciclo secuestró la región transmembranal y el dominio asociado con actividad de cinasa de tirosinas del receptor, confiriéndole de esta manera su capacidad oncogénica a través de la expresión del receptor de manera incontrolada (Downward et al., 1984). Otro mecanismo a través del cual se puede activar a los protooncogenes sin alterar su secuencia es la translocación a una nueva localización cromosomal, como en el caso de *c-myc*, el cual bajo condiciones normales se encuentra localizado en el cromosoma 8, pero cuando ocurre un evento de recombinación ilegítima, este se transloca al locus *Ig* en células B o al locus *TCR* de células T, los cuales se expresan muy activamente, dando como resultado una mayor expresión de *c-myc* y confiriéndole con ello un gran potencial oncogénico (Lewin, 2000). Se sabe que existe una gran incidencia de amplificaciones génicas presentes en células tumorales, ejemplo de ello es la amplificación de *c-myc* mencionada anteriormente, la cual ocasiona leucemia promielocítica, o bien la amplificación génica de *erbB2* y *c-erbB*, que se asocia a la aparición de diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, ovario, glioblastomas y carcinoma escamoso (Hernández-Menéndez y Ríos-Hernández, 1999).

Por otro lado, recientemente se ha encontrado que el desacoplamiento de la ubiquitinación y degradación de los RTKs es otro mecanismo que puede resultar en transformación celular (Peschard et al., 2001; Peschard et al., 2003).

Se ha reportado que alelos de Cbl con mutaciones en el dominio RING finger (requerido para la actividad de ligasa de ubiquitina) funcionan como protooncogenes (Bisson, et al., 2002). De igual manera se sabe que mutaciones generadas en los residuos de tirosina de diversos RTKs con los cuales interacciona Cbl para promover su ubiquitinación y degradación conducen a transformación celular (Abella, et al., 2005). De esta manera, las ligasas de ubiquitina de la familia Cbl funcionan como reguladores negativos de los procesos de señalización inducidos a través de estos receptores, marcándolos específicamente para su degradación

6. Cbl

La molécula Cbl (identificada como el producto oncogénico del linfoma linaje-B de Casitas) es miembro de la familia de ligasas de ubiquitina de tipo E3, y fue aislada inicialmente como el gen *v-cbl*, el cual se origina a partir de un evento de recombinación entre una secuencia Gag del retrovirus murino Cas-Br-M y el gen celular *c-cbl*, dando como resultado un producto que codifica solamente los primeros 355 aminoácidos de 913 aminoácidos presentes en la proteína completa (Liu et al., 1998; Thien, et al., 2001).

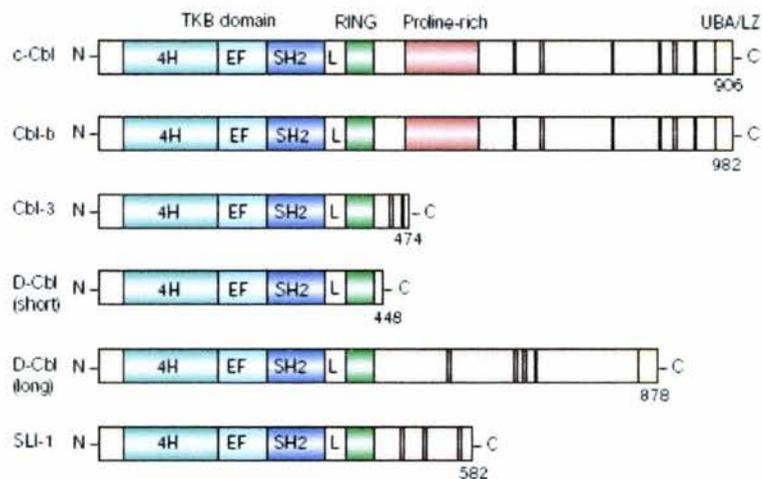
El producto del gen *c-cbl* codifica para una proteína de aproximadamente 120 KDa que se expresa en una amplia variedad de linajes celulares y con mucha mayor abundancia en células de origen hematopoyético, timo y testículo (Liu et al., 1998; revisado en Lupper et al., 1998).

Durante los últimos años se ha mostrado gran interés en el estudio de Cbl debido a su participación como molécula reguladora dentro de diversas vías de señalización, y se ha observado que diversas mutaciones en Cbl están asociadas con la inducción de diversos linfomas y leucemias mieloides, así como con la transformación de fibroblastos de ratón y de humano (Thien et al., 2001).

a. Estructura

Se han identificado al menos dos proteínas homólogas a c-Cbl en mamíferos, Cbl-b y Cbl-3, así como dos ortólogos en invertebrados, D-Cbl (*D. melanogaster*) y Sli-1 (*C. elegans*).

A partir de su descubrimiento y del análisis de su secuencia se identificaron dos regiones dentro de la molécula: una región amino terminal (N-terminal) y una región carboxilo terminal (C-terminal) (Thien et al., 2001). La región N-terminal esta altamente conservada y es de naturaleza básica. Esta comprendida por la región codificada por *v-cbl*, un dominio de unión o "linker", así como un dominio de "RING finger" de unión a zinc que incluye un motivo de Cys₃HisCys₄, el cual es necesario para el reclutamiento del complejo de ubiquitinación "UBC" (Thien et al., 2001). La región que codifica para v-Cbl, conocida también como dominio "PTB" (del inglés phospho tyrosine binding), esta conformada a su vez por cuatro dominios de vuelta-hélice (4H), un dominio de "EF hand" (que media la unión a calcio) y un dominio con homología a Src tipo 2 (SH2) que media su unión con moléculas que presentan residuos de tirosina fosforilados (Thien et al., 2001) (Figura 3).



Thien et al., 2001

Figura 3. Estructura de la familia de proteínas Cbl

La región carboxilo terminal de Cbl contiene al menos 15 secuencias ricas en prolina que median su asociación con proteínas que contienen dominios con homología a Src tipo 3 (SH3) (Liu et al., 1998). Para el caso de c-Cbl, en esta región se localiza una secuencia rica en serinas que contiene dos motivos de unión a proteínas de la familia 14-3-3. Los miembros de esta familia de proteínas se unen a proteínas fosforiladas en residuos de serina o treonina, y se han implicado en la regulación de cinasas que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Thien et al., 2001).

A diferencia de c-Cbl, Cbl-b solamente contiene un motivo de unión a proteínas de la familia 14-3-3, lo cual impide su interacción con ellas. Adicionalmente, la región carboxilo

terminal de Cbl posee un dominio de zipper de leucina, a través del cual es capaz de formar homodímeros, y cuya eliminación esta asociada con la disminución en la fosforilación de los residuos de tirosina de c-Cbl y de su asociación con el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por otro lado, la región carboxilo terminal de c-Cbl, Cbl-b y D-Cbl incluye también un dominio de asociación a ubiquitina (UBA) (Thien et al., 2001).

En general, los miembros de la familia Cbl contienen dentro de la región C-terminal diversos residuos de tirosina potencialmente fosforilables, dentro de los cuales se destacan como principales sitios de fosforilación las tirosinas Y700, Y731 y Y774 para el caso de c-Cbl, y Y709 y Y655 para el caso de Cbl-b (Liu et al., 1998). Se ha demostrado que estos residuos son fosforilados por las cinasas Syk y ZAP-70 (Fournel et al., 1996; Feshchenko et al., 1998), así como por los miembros de la familia de las Src cinasas Fyn, Yes y Lyn (Wange et al., 1996). Se sabe que la fosforilación en las tirosinas Y700 y Y774 genera un sitio de unión entre Cbl y el dominio SH2 de la molécula adaptadora Crk. Del mismo modo, se ha observado que la fosforilación de Y700 media la interacción de Cbl con el dominio SH2 del factor intercambiador de guaninas Vav1 y con Cdc42, y que la fosforilación en el residuo de tirosina Y731 de c-Cbl genera un sitio de unión con el dominio SH2 de la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol-3-OH-cinasa (PI3K) (Thien et al., 2001).

Por otro lado, gracias al uso de herramientas bioinformáticas, se ha establecido que las regiones que flanquean a las tirosinas Y700, Y731 y Y774 en c-Cbl y Cbl-b no ocurren en Cbl-3, D-Cbl o Sli-1, lo cual sugiere que estas proteínas tienen funciones adicionales (Thien et al., 2001).

7. Regulación negativa de diversos RTKs por Cbl

Como se mencionó anteriormente Cbl está implicado en regular negativamente las vías de señalización de diferentes RTKs (EGFR, PDGFR y CSF-1R, IR) y de receptores que no poseen actividad intrínseca de cinasa de tirosinas pero cuya vía de señalización depende de la fosforilación de tirosinas, tales como TCR, BCR, FcγR, FcεRI. El mecanismo molecular que utiliza Cbl para apagar estas vías de señalización depende de su función de ligasa de ubiquitina (Lee et al., 1999; Lill et al., 2000). La especificidad de esta función esta dada por dos dominios de Cbl, el dominio PTB y los residuos de tirosina que se fosforilan en respuesta a la activación de dichos receptores. Su dominio PTB le

permite a Cbl interactuar con las tirosinas fosforiladas en los RTK en respuesta a la unión del ligando, dicha interacción se requiere para la ubiquitinación y eventual internalización y/o degradación del receptor, atenuando así la señal. (Galisteo et al., 1995; Ettenberg et al., 1999; Bonita et al., 1997; Thien et al., 1997; Waterman et al., 1999).

Por el otro lado, las tirosinas fosforiladas en Cbl, ya sea directamente por los receptores activados o por las cinasas activadas en respuesta a la estimulación de los receptores carentes de actividad intrínseca de tirosin cinasa (Fournel et al., 1996; Feshchenko et al., 1998), generan sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH2, tales como ZAP-70, Vav y PI3K entre otras, y que son importantes dentro de la vía de señalización (Rao et al., 2000; Rellahan et al., 1997; Zhang^a et al., 1999 ; Zhang^b et al., 1999; Van Leeuwen et al., 1999; Fang et al., 2001). La interacción de dichas proteínas con Cbl promueve su ubiquitinación y degradación, asegurando así el apagado de la señal.

8. Otros factores de secreción como mediadores del desarrollo y progresión tumoral

Diversos estudios han demostrado que las células cancerosas son capaces de generar un microambiente específico que favorece el desarrollo del tumor, el cual se caracteriza por la presencia de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas durante periodos prolongados, que en última instancia promueven la progresión del neoplasma (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002).

Las citocinas son proteínas de secreción de bajo peso molecular (menos de 30 kDa) cuya función es servir como mensajeros intercelulares e inducir diferentes funciones biológicas en sus células blanco tras la unión a sus receptores. Todas estas proteínas comparten un plegamiento polipeptídico común y se han agrupado en cuatro grupos: familia de la hematopoyetina (GM-CSF, G-CSF, IL-2-7, IL-11-13 e IL-15), interferones (α , β , γ), quimiocinas (CC o CXC) y familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Goldsby et al., 2000). El efecto de estas proteínas esta mediado por cinco familias de receptores diferentes: superfamilia de las inmunoglobulinas, receptores para citocinas de clase I, receptores para citocinas clase II, receptores para la familia del TNF y receptores para quimiocinas. Todos ellos, a excepción de los receptores para quimiocinas, están conformados por una o más cadenas polipeptídicas diferentes, que al unirse a su ligando sufren cambios conformacionales que resultan en la oligomerización y reorientación de sus cadenas, así como en la activación de las cinasas JAK (del inglés Janus Kinases) que

se encuentran asociadas a su región intracitoplásmica. Ya que se han activado estas cinasas son capaces de fosforilar las cadenas polipeptídicas del receptor en residuos de tirosina específicos generando así sitios de unión para factores de transcripción de la familia de los STATs (del inglés Signal Transducers and Activators of Transcription) (Alberts et al., 2002; Goldsby et al., 2000). Una vez que se han reclutado estos factores de transcripción hacia el dominio intracitoplásmico del receptor se fosforilan en tirosinas a través de las cinasas JAK. Lo anterior, induce su disociación del receptor y su dimerización con otro miembro de la familia de STATs. Estos dímeros son capaces de translocar al núcleo en donde regulan la expresión de genes de diversas citocinas y mediadores inflamatorios (Alberts et al., 2002; Goldsby et al., 2000).

Existen también otros pequeños péptidos (90-130 aminoácidos) conocidos como quimiocinas, que se encargan de regular la adhesión, quimiotaxis, tráfico y activación de diferentes poblaciones de leucocitos (Goldsby et al., 2000; Cheadle et al., 2007). Entre estos factores podemos mencionar a MIF, MCP-1, MCP-5, CXCL4, CXCL8, eotaxina, trombopoyetina e IL-8 entre otras (Cheadle et al., 2007; Hussain y Curtis, 2007; Kanayasu-Toyoda, 2007; Schober y Zerneck, 2007). Estas proteínas poseen cuatro residuos de cisteína conservados y pueden agruparse en dos subgrupos de acuerdo a la posición de estos residuos: CC, en el cual los residuos de cisteínas están contiguos, y CXC, en el cual los residuos de cisteína están separados por algún otro aminoácido. La acción de estos péptidos esta mediada a través de receptores cuya cadena polipeptídica atraviesa siete veces la membrana que se encuentran acoplados a proteínas G triméricas, las cuales se activan tras la unión a su ligando dando lugar a señales que inducen la producción de segundos mensajeros como cAMP, IP₃, Ca²⁺, y son capaces de activar proteínas G pequeñas (Goldsby et al., 2000).

Los mediadores inflamatorios mencionados anteriormente tienen la finalidad de atraer leucocitos que a su vez son capaces de producir más citocinas y mediadores citotóxicos como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), proteasas de serinas y treoninas, metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), agentes perforadores de membrana, TNF- α , interleucinas (ILs) e interferones (IFNs). Esto desencadena un estado de inflamación crónica que promueve la progresión y desarrollo del tumor, ya que las diferentes especies de ROS y RNS liberadas constantemente generan más mutaciones en el DNA, y resultan en una mayor inestabilidad génica (Coussens y Werb, 2002). A la par, muchas de las células reclutadas a este microambiente inflamatorio como los macrófagos asociados a tumores (TAMs) son capaces de producir quimiocinas como MIF y suprimir directamente la actividad transcripcional de p53 potenciando de esta manera la

acumulación de mutaciones oncogénicas, la proliferación y la expansión de la supervivencia celular (Coussens y Werb, 2002). Por lo general, las células que son reclutadas a través microambiente inflamatorio inducido por la metastasis presentan diferentes deficiencias funcionales (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002). Se ha reportado que los monocitos reclutados a los sitios de metastasis a través de factores quimioattractantes de monocitos (MCPs) son capaces de diferenciarse a células dendríticas en presencia de GM-CSF e IL-4, sin embargo, estas células dendríticas infiltradas en tumores son generalmente inmaduras y poco eficientes en la presentación de antígenos, y resultan incapaces de estimular exitosamente células T (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002). Por otro lado, los monocitos expuestos a CSF e IL-6 se diferencian a TAMs, los cuales tienen una doble función: la eliminación del tumor en respuesta a citocinas como IL-2, IL-12 e IFNs, y por otro lado la producción de una gran cantidad de factores angiogénicos, factores de crecimiento linfangiogénicos, proteasas y citocinas que participan como mediadores de la progresión tumoral. Estos macrófagos producen adicionalmente IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-1 α , araquidonatos y proteasas extracelulares, VEGF-C, VEGF-D y son capaces de expresar el receptor para VEGF-3 (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002). En respuesta a todas estas citocinas liberadas por los macrófagos, las células epiteliales producen IL-8 y VEGF-A que promueven angiogénesis, mientras que estas mismas citocinas liberadas por los TAMs inducen la expresión de VCAM-1 en células mesoteliales evento que se ha asociado con diseminación tumoral (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002). Otras células implicadas en la promoción de tumores son los neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y células T activadas a través de la liberación de grandes cantidades de factores proangiogénicos como VEGF, PDGF, FGF, trombopoyetina, o quimiocinas como RANTES, eotaxina, IL-8, MCP-1, MCP-5, MIP-1, etc. Adicionalmente el neoplasma es capaz de inducir la expresión y secreción de proteasas extracelulares que contribuyen con el relajamiento endotelial y la extravasación de las células tumorales (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002).

9. El co-receptor CD43

El co-receptor CD43, también conocido como gpL115, leucosialina o sialoforina, es una proteína muy abundante expresada en la superficie de todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y en linfocitos B no activados (Rosenstein et al., 1999). Se le ha considerado como un marcador exclusivo de linfocitos, aunque recientemente se demostró que también se expresa en células de sistema nervioso, como tejido neuronal y de microglía proveniente de muestras normales y de casos de pacientes con Alzheimer, los cuales muestran un abatimiento en la expresión de CD43 comparados con las muestras provenientes de sujetos sanos (Losy et al., 1989; Matsuo et al., 1996). Así mismo, se ha encontrado la expresión de CD43 en enterocitos y células de riñón (Shiota, et al., 1994). Interesantemente, también se ha reportado la expresión tanto del RNA mensajero de CD43 como de la proteína en ciertos tipos de tumores de origen no mielóide, como adenomas y carcinomas de colon, y células metastásicas de cáncer de mama (Carlsson et al., 1986; Sikut et al., 1999; Carlow et al., 2001; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Kadaja et al., 2004).

CD43 es miembro de la familia de las mucinas y está caracterizado por una extensa O-glicosilación (70-85 O-glucanos en su dominio extracelular) (Maemura, et al., 1992). Debido a su estructura alargada (45 nm) que se extiende a partir de la superficie de la membrana celular (Cyster et al., 1991) y a su abundancia (28% de la superficie de un linfocito T) (Barclay et al., 1997), se piensa que es una de las primeras moléculas que intervienen en el contacto célula-célula, generando señales intracelulares que conducen a diversos fenómenos tales como rearrreglos de citoesqueleto (Layseca-Espinosa et al., 2003), inducción de genes de citocinas y quimiocinas en diversos tipos celulares (TNF α , IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , entre otras) (Babina et al., 1998; Nieto et al., 1999; Santana et al., 2000; Fierro et al., 2006), activación y proliferación celular mediante la generación de segundos mensajeros como diacilglicerol e inositol fosfatos, la activación de protein cinasa C (PKC), y la movilización de Ca²⁺ (Chatila et al., 1988; Del Rio et al., 2004).

a. Estructura

CD43 está codificado por un solo exón ubicado en el cromosoma 16 en humanos y en el cromosoma 7 en ratones. Está constituido por tres dominios bien definidos: dominio extracelular, dominio transmembranal y dominio intracitoplásmico (Figura 4). El dominio

extracelular consta de 235 aminoácidos, de los cuales, uno de cada cuatro son prolinas, serinas o treoninas. La primera proporciona rigidez a la molécula, mientras que las serinas y treoninas mantienen uniones O-glicosídicas con el carbohidrato *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), que a su vez se une a residuos de ácido siálico, lo cual le confiere a la molécula una alta densidad de cargas negativas (Killeen et al., 1987., Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989, Cyster et al., 1991). La estructura de los O-glicanos es característica de cada linaje y del estado de diferenciación celular. Recientemente se ha demostrado que por cada 80 O-glicanos existe un *N*-glicano [*N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unida a asparagina] presente en la región extracelular de CD43 (Tsuboi et al., 2001).

Además algunas de las isoformas de CD43 expresan una estructura denominada sialil Lewis a y x (Sialil Le^{ax}), que está conformada por tetrasacáridos de NeuNAc α 2—3Gal β 1—4(Fuc α 1—3)GlcNA β 1—R, y NeuNAc α 2—3Gal β 1—3(Fuc α 1—4)GlcNA β 1—R respectivamente (Renkonen et al., 1997). Lo anterior presumiblemente sirve como sitio de unión para selectinas presentes en células epiteliales y plaquetas (Maemura et al., 1992; Tsuboi et al., 2001; Kannagi et al., 2004).

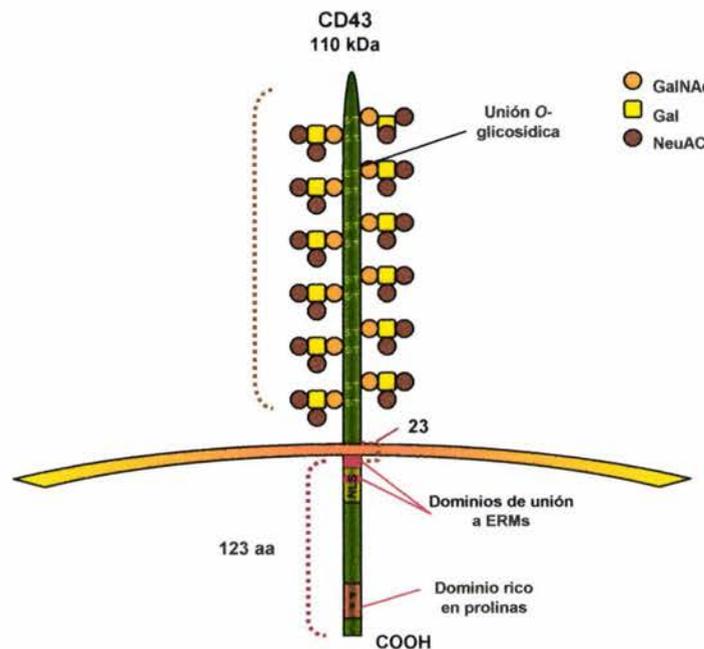


Figura 4. Esquema de CD43

El dominio transmembranal de CD43 consta de 23 aminoácidos, mientras que el dominio intracitoplásmico está conformado por 123 aminoácidos. Se sabe que este último es evolutivamente más conservado que el dominio extracelular, ya que mantiene el 72% de homología entre diferentes especies de mamíferos, por lo cual se sugiere una función conservada (Shelley et al., 1989; Pallant et al., 1989; Szlanka et al., 1999). El dominio intracitoplásmico carece de residuos de tirosina y no posee actividad enzimática; sin embargo posee una región rica en prolinas hacia la región carboxilo terminal y es un sitio de unión a proteínas que contienen dominios tipo 3 con homología a Src (SH3) (Alvarado et al., 1995; Pedraza-Alva et al., 1996). También presenta dos secuencias consenso (259-289 y 320-336 aa) que interactúan con proteínas del citoesqueleto de la familia ERM, y cuenta con varios residuos de serina y treonina potencialmente fosforilables y blancos de PKC (Pallant et al., 1989; Piller et al., 1989; Serrador et al., 1998; Yonemura et al., 1998; Allenspach et al., 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que la región intracitoplásmica de CD43 posee una secuencia de localización nuclear (NLS) (KRR-TGALVLSRGG-KR) localizada entre los aminoácidos 282-296, que interactúa con β -catenina induciendo la activación de los genes de c-myc y de ciclina-D1 en células tumorales de colon (Andersson et al. 2004).

b. Isoformas

Existen diversas isoformas de CD43, todas ellas resultado de modificaciones postraduccionales. A partir de estudios biosintéticos, se ha detectado la presencia de un precursor de CD43 de una masa molecular aparente de 50-60 kDa, que posteriormente es convertido a través de glicosilaciones en una isoforma madura que alcanza masas moleculares que van desde los 113 a los 200 kDa (Sikut et al., 1999; Fernández-Rodríguez et al., 2002).

Se ha reportado que en timocitos, linfocitos T CD4⁺ no activados, monocitos y células precursoras de eritrocitos se expresa una isoforma que posee una masa molecular de alrededor de 115 kDa conformada por tetrasacáridos de NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]Gal-NAc. En contraparte, existe una isoforma característica de células T CD4⁺ activadas, células CD8⁺, neutrofilos, plaquetas y células B, tiene un peso molecular de aproximadamente 135 kDa. Tal isoforma está conformada por hexámeros de NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]GalNAc con un centro de glicano tipo 2 (Tsuboi et al., 2001).

Se ha observado que una misma célula puede expresar más de una isoforma de CD43, lo que sugiere que las isoformas de CD43 son funcionalmente distintas y que pueden estar interactuando con ligandos diferentes.

Como se mencionó anteriormente, CD43 también se expresa sobre la superficie de células metastásicas de mama y cérvix, así como en fibrosarcomas y carcinomas de colon (Sikut et al., 1999; Fernández-Rodríguez et al., 2002). Interesantemente, en líneas celulares derivadas de carcinoma de colon (COLO 205) se ha encontrado la expresión de una isoforma aberrante de CD43 que posee una masa molecular de alrededor de 200 KDa, la cual es reconocida por anticuerpos anti sialil Le^a (Sikut et al., 1999; Fernández-Rodríguez et al., 2001). Se ha sugerido que estructuras de tipo sialil Lewis^{a/x} están implicadas en fenómenos de adhesión entre células cancerosas y endotelio vascular, lo cual está mediado a través de selectinas (E-selectina y L-selectina esencialmente). Es por ello que se piensa que este tipo de marcadores están involucrados en el desarrollo de metástasis (Kannagi et al., 2004).

Antecedentes

En células del sistema inmune, CD43 ha sido implicada en procesos de proliferación, diferenciación, migración y muerte celular (Rosenstein et al., 1999). No obstante, se desconoce la función que desempeña esta molécula en células tumorales de origen no linfóide. Interesantemente, se ha reportado que la estimulación mediada a través de CD43 en algunos tipos celulares induce la secreción de citocinas y quimiocinas como $\text{TNF}\alpha$, IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , entre otras (Babina et al., 1998; Nieto et al., 1999, Fierro et al., 2006). Es por ello que se podría sugerir que en células tumorales las señales generadas a partir de CD43 inducen la secreción de ciertos factores que favorecen el crecimiento y desarrollo tumoral a través de la generación de un microambiente inflamatorio.

Adicionalmente, se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD43 en linfocitos T induce la fosforilación dependiente de PKC en residuos de serinas de c-Cbl, lo que previene su fosforilación en tirosinas y su interacción con el factor intercambiador de guaninas Vav y con las isoformas τ de la familia de proteínas 14-3-3 (Liu et al., 1996; Pedraza-Alva et al., 2001). Por otra parte, las vías de señalización que promueven la degradación de Cbl-b, resultan en conjunto en una mayor activación de la vía de las MAP cinasas, que finalmente induce un aumento en la proliferación celular (Pedraza-Alva et al., 1998; revisado en Lopher et al., 1998; Pedraza-Alva et al., 2001). Estos resultados sugieren que las señales generadas por CD43 regulan las funciones de las ubiquitin ligasas de esta familia.

Dado que c-Cbl se requiere para apagar las señales mitogénicas iniciadas por los diferentes RTKs, y que el desacoplamiento de los mecanismos de ubiquitinación de moléculas que regulan el ciclo celular pueden conducir a la transformación (Lim et al., 2004), proponemos que en células tumorales de origen no linfóide CD43⁺ es posible que esta molécula inhiba las funciones de los miembros de la familia de Cbl y favorezca la proliferación celular en condiciones limitantes de factores de crecimiento.

Hipótesis

En células tumorales, la molécula CD43 genera señales que regulan de manera negativa las funciones de Cbl favoreciendo así la proliferación celular, y al mismo tiempo, promueve la secreción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias que favorecen la transformación celular.

Objetivos

1. Demostrar que CD43 previene la ubiquitinación de receptores para factores de crecimiento mediada a través de Cbl.
2. Demostrar que CD43 favorece la proliferación celular.
3. Demostrar que CD43 favorece la transformación celular.
4. Demostrar que CD43 promueve la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

Materiales y Métodos

Anticuerpos

Para la activación celular se utilizó el anticuerpo monoclonal L10 de ratón (IgG₁) que reconoce un epítopo ácido siálico-independiente del extremo aminoterminal de CD43. Como anticuerpo entrecruzador se utilizó una IgG de conejo anti- IgG de ratón (RaMlg) producido en nuestro laboratorio. Para los inmunoprecipitados e inmunoblots se utilizaron los anticuerpos anti-pTyr, anti-Cbl, anti-EGFR, anti-ubiquitina, anti-ERK, anti-pERK, todos ellos de Santa Cruz Biotechnology

Cultivo Celular

Las células NIH-3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón) se cultivaron en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) (Hyclone), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Gibco BRL), a 37° C y en 5% de CO₂.

Transfección transitoria de células NIH-3T3

Células NIH-3T3 (que expresan el receptor para EGF y que carecen de la expresión de CD43) se transfectaron transitoriamente al alcanzar un 90% de confluencia en placas de cultivo de 6 cm usando lipofectamina 2000 (Invitrogene). Para ello se mezclaron 2 µg de DNA plasmídico con las construcciones de CD43-WT, y CD43-ΔIC (CD43 sin el dominio IC), con 250 µl de medio DMEM incompleto sin antibióticos. Adicionalmente se mezclaron 2 µl de lipofectamina 2000 con 250 µl de medio DMEM incompleto sin antibióticos, y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se mezcló el DNA plasmídico (con las construcciones CD43-WT y CD43-ΔIC) disuelto en el medio DMEM incompleto con la lipofectamina disuelta, y se dejó incubando durante 20 minutos a 37 °C para permitir la formación de complejos DNA-liposomas. Finalmente, los complejos DNA-liposomas se agregaron gota a gota en las placas de cultivo celular. 24 horas post-transfección se procedió a realizar la estimulación.

Transfección estable de células NIH-3T3

Células NIH-3T3 se cultivaron en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro, y se transfectaron al alcanzar un 90 % de confluencia usando lipofectamina 2000 (Invitrogene). Para ello, se mezcló 15 µg de DNA linealizado con la enzima EcoR1 (Invitrogene) de las construcciones de CD43-WT, y CD43-ΔIC (CD43 sin el dominio IC), o el vector vacío en 1.5 ml de medio DMEM incompleto sin antibióticos. Adicionalmente se mezclaron 24 µl de lipofectamina 2000 con 1.5 ml de medio DMEM incompleto sin antibióticos, y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se mezcló el DNA plasmídico (con las construcciones CD43-WT y CD43-ΔIC) disuelto en el medio DMEM incompleto con la lipofectamina disuelta, y se dejó incubando durante 20 minutos a 37 °C para permitir la formación de complejos DNA-liposomas. Finalmente esta mezcla se adicionó gota a gota sobre las placas de cultivo celular. Después de 24 horas de recuperación se adicionó geneticina (G418) a una concentración final de 800 µg/ml para seleccionar a las células transfectadas exitosamente. Las clonas obtenidas se analizaron para determinar los niveles de expresión de CD43, tanto WT como ΔIC.

Activación celular

Para todos los ensayos de activación celular se utilizaron los anticuerpos L10 (IgG₁ de ratón) y RaMIg (IgG de conejo anti- IgG de ratón) a una concentración de 4 µg/ml.

Previó a cada estimulación, las células NIH-3T3, cultivadas en cajas de 6 cm de diámetro (1.6×10^6 células/caja), fueron arrestadas (deprivadas de estímulos mitogénicos) durante 24 horas con medio DMEM sin suplementar.

Las células NIH-3T3 arrestadas en medio DMEM sin suplementar se incubaron con anticuerpo anti-CD43 L10 durante 5 minutos en un volumen final de 1 ml, y posteriormente se agregó el anticuerpo entrecruzador RaMIg. Ambos se incubaron durante 5 minutos extra a 37°C y 5% de CO₂. A continuación se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.3). Finalmente, se adicionaron 3 ml de medio DMEM sin suplementar a 37°C y se procedió a realizar cinéticas de estimulación de 0 hasta 120 minutos con EGF humano a una concentración final de 5 ng/ml. Una vez concluida la activación a través de EGFR se detuvo la reacción descartando el sobrenadante y lavando con 2 ml de PBS frío.

Obtención de extractos celulares totales

Se les adicionó 200 μ l de buffer de lisis (Hepes 25 mM pH 7.7, Tritón x-100 al 0.5%, $MgCl_2$ 1.5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM, β -GP 20 mM, DTT 0.5 mM, antipaina 50 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, PMSF 4mM, NaF 5 mM, $NaVO_4$ 1mM) a las células cultivadas en cajas de 6 cm de diámetro después de su estimulación. Posteriormente las células se lisaron con un embolo de jeringa, y la mezcla obtenida fue transferida a tubos eppendorf para ser incubada durante 15 minutos a 4°C en agitación. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 g a 4 °C durante 10 minutos y se conservó el sobrenadante a -70°C para su uso subsecuente.

Inmunoblotting

Después de determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, 30 μ g de proteína se resolvieron por SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m previamente humedecidas en buffer de transferencia (Tris/HCl 0.025 M, glicina 0.192 M y 20% de metanol). La transferencia de proteínas a la membrana se realizó a 100 Volts por 1.5 horas, utilizando una cámara de transferencia húmeda (BioRad). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Carnation) o BSA al 3% en TBS-T (Tris/HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y 0.05% de Tween 20) (Bio-Rad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente (anti-pTyr, anti-Cbl, anti-EGFR, anti-ubiquitina, anti-ERK, anti-pERK, por lo general a una concentración de 1 μ g/ml diluido en TBS-T por 3 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas 3 veces (10 minutos c/u) con TBS-T, se agregó el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1:10,000 en TBS-T. Por último las membranas se lavaron tres veces con TBS-T por 10 minutos y se revelaron con el método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Inmunoprecipitación

Aproximadamente 500 µg de proteína obtenida a partir de lisados celulares totales fueron incubados en agitación con anticuerpos primarios indicados a una concentración final de 1µg/ml y en un volumen final de 400 µl durante toda la noche (ON) a 4°C. A continuación, se agregaron 30 µl de proteína A/G (1:1 v/v) acoplada a perlas de agarosa y se incubó por un período de 2 a 4 horas en agitación a 4°C. Subsecuentemente, los inmunocomplejos se lavaron dos veces con TNE-T (NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, EDTA 5 mM, 1% Triton X-100), dos veces con TNE (NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, EDTA 5 mM) y una vez con agua. Las muestras fueron desnaturalizadas en el buffer de carga (Tris base 125 mM, SDS 2%, 5% β-Mercaptoetanol, 20% glicerol) hirviendo durante 5 minutos. Finalmente, los inmunocomplejos se resuelven a través de SDS-PAGE al 10% como se describió anteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con el método se revelaron con el método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Ensayos de transformación celular (crecimiento sobre agar suave)

Se prepararon cajas de cultivo de 60 mm con una solución base de 2.5 ml de agar al 2% mezclado v/v con medio DMEM 2X suplementado. Esta mezcla se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (Gibco BRL). Posteriormente, células NIH-3T3 que expresaban establemente las construcciones CD43-WT y CD43-ΔIC, así como el vector vacío se prepararon en una solución de 2.5 ml que contenía agar al 0.8% disuelto v/v en medio DMEM 2X (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) (Hyclone), el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (Gibco BRL). Esta mezcla se vertió sobre la primera solución, y se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Se adicionaron 500 µl de medio DMEM suplementado con 10% de FBS cada tercer día durante dos semanas para permitir el crecimiento de las colonias. Finalmente, se evaluó la cantidad de colonias por cada condición a través de microscopia.

Tinción celular y citometría de Flujo

Células NIH-3T3 que expresan establemente las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC o vector vacío (pFneo) fueron crecidas en cajas de cultivo de 60 mm hasta obtener un 90% de confluencia. Después se lavaron con 2 ml de PBS y se adicionó 1 ml de Versene (Gibco/Invitrogene) para despegar, y se incubaron por 2 minutos a 37°C. Las células obtenidas de cada caja se resuspendieron en 3 ml de solución de FACS (PBS 2% FBS, 0.02% azida de sodio) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 50 μ l de suero humano diluido 1:10, para posteriormente incubar durante 30 minutos a 4°C. Se lavó nuevamente con 3 ml de solución FACS, descartándose el sobrenadante y se adicionó 50 μ l de una solución de anticuerpo anti-CD43 acoplado directamente a ficoeritrina (L10-PE), así como una solución de anticuerpo anti-EGFR acoplado directamente a FITC (EGFR-FITC), ambos a una concentración final de 1 μ g/ml, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Luego se lavó con 3 ml de solución FACS, se descartó el sobrenadante y finalmente se fijaron las células en 200 μ l de paraformaldehído al 2%. Los niveles de fluorescencia se determinaron utilizando un citómetro de flujo (Becton & Dickison) con el programa Cell Quest y el análisis de los datos se realizó utilizando el programa Flow Jo.

Ensayos de migración y proliferación celular (Wound Healing)

Células NIH-3T3 que expresan establemente las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC o vector vacío (pFneo) fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina (Gibco BRL), a 37° C y en 5% de CO₂ en cajas de cultivo de 35 mm hasta alcanzar el 100% de confluencia. Posteriormente fueron deprivadas de estímulos mitógenos en medio DMEM sin suplementar durante 24 horas. Se lavó con 2 ml de PBS y se adicionaron 2 ml de medio DMEM fresco sin suplementar, o suplementado con FBS según la concentración requerida (1, 5 y 10%), o con EGF a una concentración final de 5 ng/ml o 100 ng/ml. Consecuentemente con ayuda de una punta para pipeta se realizó una herida transversal en el centro de la monocapa celular. Finalmente se siguió el comportamiento de repoblación celular de esta cicatriz durante 36 horas por microscopia para cada condición.

Ensayos de captura para determinación de citocinas

Para determinar las citocinas que secretan las células transformadas se utilizó un arreglo de citocinas (Ray Bio® Mouse Cytokine Antibody Array I) siguiendo el protocolo del proveedor. En breve, las membranas (que están acopladas a anticuerpos contra diferentes citocinas) se incubaron con 2 ml de buffer de bloqueo disuelto 1:2 en agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente este buffer fue decantado y se agregó 1 ml del sobrenadante de cultivo obtenido a partir de los ensayos de agar suave diluido 1:3 en buffer de bloqueo 1X. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4° C en agitación. Al día siguiente las membranas se lavaron de la siguiente manera: 3 veces por 5 minutos con buffer de lavado I (Wash Buffer I) diluido 1:20 en agua destilada, y 2 veces por 5 minutos con buffer de lavado II (Wash Buffer II) diluido de la misma manera que el anterior. A continuación se preparó la solución de trabajo que contendría los anticuerpos primarios acoplados a biotina dirigidos contra las diferentes citocinas contenidas en el sobrenadante. Para ello se adicionaron 100 µl de buffer de bloqueo al tubo que contenía los anticuerpos anti-citocinas conjugados a biotina, se mezcló suavemente y se adicionaron a 2 ml de solución de bloqueo 1X. A cada membrana se le agregaron 700 µl de esta solución de trabajo después de retirar el último buffer de lavado, y se incubó durante 2 horas. En seguida, se repitieron los lavados con buffer de lavado I y II. Finalmente se agregaron 2 ml de estreptavidina disuelta 1:3000 en solución de bloqueo, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y se repitieron nuevamente los lavados con el buffer I y II. La interacción antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia.

Resultados

1. La estimulación a través de EGF induce la fosforilación en tirosinas de EGFR y Cbl en células NIH-3T3

Se ha reportado que la estimulación a través de EGF induce la fosforilación y activación del EGFR, así como el reclutamiento y asociación de Cbl (a través de su dominio TKB) hacia el dominio intracitoplásmico de estos receptores. Lo anterior resulta en la fosforilación en residuos de tirosinas de Cbl, y en la ubiquitinación del receptor para factor de crecimiento que posteriormente es endocitado y degradado en el proteosoma (revisado en Lupher et al., 1998). Para comprobar que la estimulación a través de EGF indujera la fosforilación en tirosinas de su propio receptor, así como de la ligasa de ubiquitina Cbl, y validar de esta manera nuestro modelo de estudio, se estimularon células NIH-3T3 que expresan bajos niveles de EGFR de ratón con el vector vacío (pFneo), y fueron estimuladas con EGF por diferentes periodos de tiempo, posteriormente se evaluó la fosforilación del receptor, así como de la ligasa de ubiquitina Cbl, en residuos de tirosina. La estimulación a través del factor de crecimiento induce la fosforilación en residuos de tirosina en el receptor para EGF (Figura 5A), así como la fosforilación en tirosinas de Cbl (Figura 5B). En correlación con esto, la estimulación con EGF resultó en un incremento sustancial en los niveles de ERK fosforilado (Figura 5C). Estos resultados indican que en este modelo Cbl es un sustrato para el receptor de EGF en respuesta a su estimulación y que la vía de ERK se activa como se esperaba.

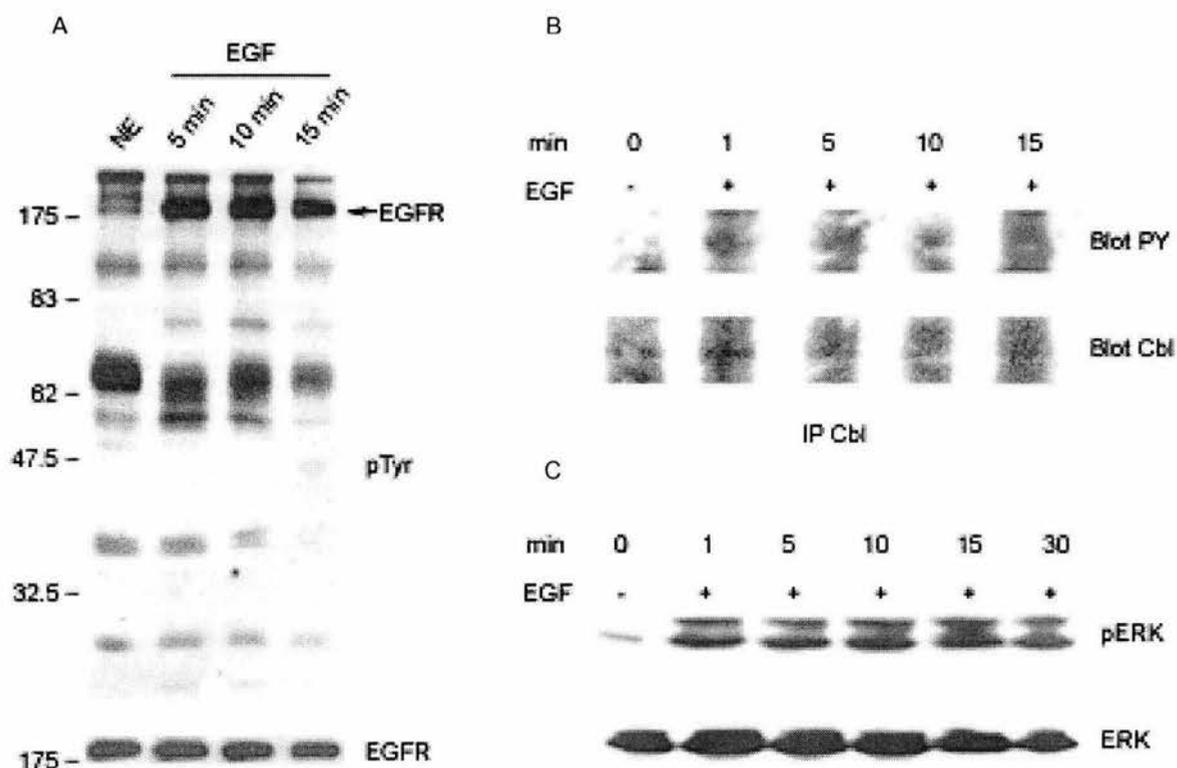


Figura 5. La estimulación a través de EGF induce la fosforilación en residuos de tirosina del EGFR y Cbl, así como de las MAP cinasas ERK 1/2. Lisados celulares totales de células NIH-3T3 transfectadas con el vector vacío (pFneo) tratadas con EGF (5 ng/ml) por diferentes tiempos se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. **A) Panel superior:** Los niveles de fosforilación en tirosinas de EGFR se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-fosfotirosinas (PY). **Panel inferior:** Los niveles de EGFR se determinaron utilizando un anticuerpo anti-EGFR. **B)** Inmunoprecipitados de Cbl obtenidos a partir de lisados celulares totales de células NIH-3T3 tratadas con EGF (5 ng/ml) por diferentes tiempos se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los niveles de fosforilación en tirosinas de Cbl se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-fosfotirosinas (PY). Los niveles de Cbl se determinaron utilizando un anticuerpo anti-Cbl. **C)** Los niveles de fosforilación de ERK (pERK) se determinaron por Western blot con un anticuerpo anti-ERK fosforilado y los niveles de ERK se determinaron como un control de carga con anticuerpo anti-ERK-1.

2. Efecto de la expresión de CD43 sobre la activación del EGFR y ERK en respuesta a factor de crecimiento.

Para determinar si la expresión de CD43 en células no linfoides favorece la activación de la vía de las MAPKs en respuesta a la estimulación por EGF, expresamos de manera estable CD43 en fibroblastos NIH-3T3 que expresan el receptor para EGF humano, y evaluamos la activación del receptor para EGF y de la cinasas ERK1/2 determinando su estado de fosforilación por medio de Western blot utilizando anticuerpos específicos. La estimulación a través de EGF induce la fosforilación en tirosinas del receptor para EGF, así como la fosforilación de las cinasas ERK1/2 en las clonas transfectadas con las diferentes construcciones (CD43-WT, CD43- Δ IC y vector vacío), y este efecto no se debe a diferencias en los niveles de fosforilación basales de residuos de tirosina entre clonas (Figura 6A). No obstante, la expresión de CD43-WT *per se* en la superficie celular no tiene ningún efecto sobre la activación del EGFR (Figura 6B) ya que no observamos diferencias significativas en los niveles de fosforilación en tirosinas de este receptor en respuesta a la estimulación por EGF cuando se comparan con los niveles de fosforilación del EGFR de las células transfectadas con el vector vacío (pFneo). Tampoco observamos diferencias en los niveles de activación de ERK1/2 en las células transfectadas con el vector vacío y las que expresan CD43 silvestre en respuesta a EGF, ya que no se detectaron cambios significativos en los niveles de fosforilación de ERK entre estas líneas celulares. Contrario a lo esperado, las células que expresan CD43- Δ IC muestran un incremento en niveles de fosforilación de las cinasas ERK1/2 (Figura 6B). Las diferencias observadas en los niveles de fosforilación no son debidas a diferencias en los niveles de eficiencia de transfección, ya que todas las estimulaciones se realizaron con una misma clona celular que expresaba CD43-WT o CD43- Δ IC respectivamente, ni a niveles variables de cantidad de proteína por cada condición, ya que el control de carga muestra cantidades equiparables de proteína (Figura 6B). Hemos obtenido resultados similares con diferentes clonas (datos no mostrados), y en conjunto estos resultados sugieren que la sola expresión de CD43 en fibroblastos de ratón NIH-3T3 no afecta la vía de señalización del EGFR en respuesta a EGF.

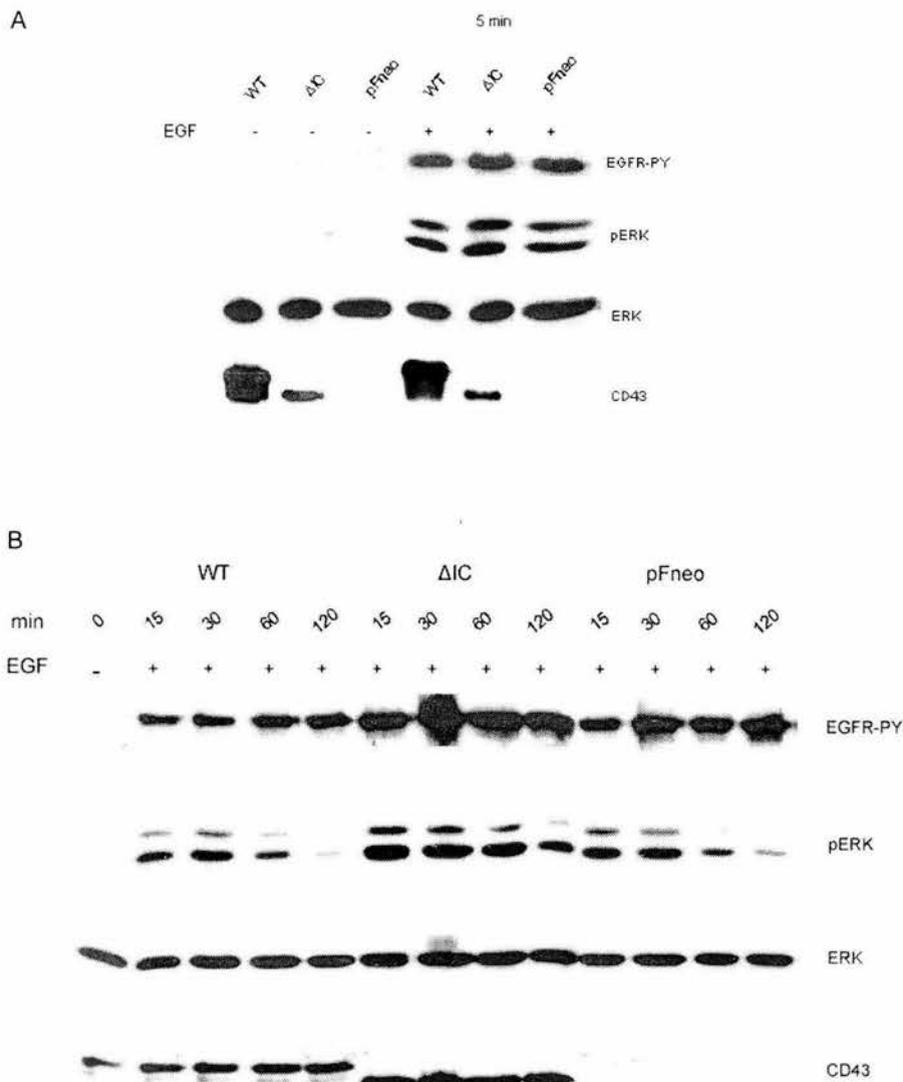


Figura 6. La estimulación con EGF no induce una mayor fosforilación en el receptor para EGF ni de las MAP cinasas ERK1/2 en células que expresan CD43. Lisados celulares totales de células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT (WT), CD43- Δ IC (Δ IC) y vector vacío (pFneo) y tratadas o no con EGF (5 ng/ml) por diferentes tiempos se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los niveles de fosforilación en residuos de tirosinas del EGFR (EGFR-PY) y los niveles de ERK fosforilado (pERK) se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-PY y anti- ERK fosforilado. Los niveles de ERK se determinaron con un control de carga con anticuerpo anti-ERK-1. Los niveles de CD43-WT y CD43- Δ IC se determinaron utilizando el anticuerpo L10. **A)** Niveles basales de fosforilación en tirosinas del EGFR y ERK 1/2 en las células transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC y pFneo. **B)** Niveles de fosforilación en tirosinas del EGFR y de ERK 1/2 en células transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC y pFneo en respuesta al factor de crecimiento EGF.

3. Efecto de la pre-estimulación a través de CD43 sobre la activación de EGFR y las MAP cinasas ERK 1/2.

Debido a que nuestros resultados indican que la sola presencia de CD43 no tiene ningún efecto sobre activación de la vía de las MAPKs o del receptor para EGF en respuesta a la estimulación con EGF, se evaluó si la estimulación a través de CD43 previa a la adición de EGF incrementaba o mantenía sostenida la actividad del EGFR o de las cinasas ERK 1/2. Para probar esta posibilidad, estimulamos a las diferentes líneas celulares con el anticuerpo anti-CD43 (L10) por 10 minutos antes de la estimulación con EGF y evaluamos los niveles de activación del EGFR y de ERK 1/2. La pre-estimulación a través de CD43 no tiene ningún efecto claro sobre los niveles de fosforilación en tirosinas del EGF-R a través del tiempo en respuesta a EGF (Figura 7). De acuerdo con esto, tampoco observamos ningún efecto de las señales de CD43 generadas por el entrecruzamiento con el anticuerpo L10 sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 tras la estimulación con EGF en las diferentes líneas celulares (Figura 7). Consistente con ello, los niveles de expresión de ERK, así como los niveles de CD43-WT y CD43- Δ IC permanecen constantes (Figura 7).

Para determinar que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular activa las vías de señalización dependientes de CD43 se estimularon células transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC y pFneo durante 10 minutos con anticuerpo anti-CD43 (L10) y se evaluó el nivel de fosforilación de residuos de tirosina de diferentes proteínas y el nivel de fosforilación de la MAP cinasa ERK. La estimulación a través de CD43 en las células que expresan CD43-WT induce la fosforilación diferencial en de residuos de tirosina de diferentes proteínas (Figura 8), comparado con las células que expresan la isoforma de CD43 truncada (Δ IC) o transfectadas con el vector vacío. Lo anterior sugiere que la estimulación con anticuerpo L10 sí es capaz de inducir señales intracelulares a partir de CD43, pero que estas no tienen ningún efecto sobre la fosforilación del receptor para EGF ni de las cinasas ERK 1/2 en fibroblastos de ratón NIH-3T3.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que aunque la pre-estimulación a través de la molécula CD43 genera señales a nivel intracelular que resultan en la fosforilación diferencial y activación de diversas proteínas, esto no le confiere a la célula una ventaja evidente a nivel de la fosforilación (mayor fosforilación o fosforilación sostenida) del receptor para factor de crecimiento ni en las cinasas ERK 1/2 en respuesta al EGF.

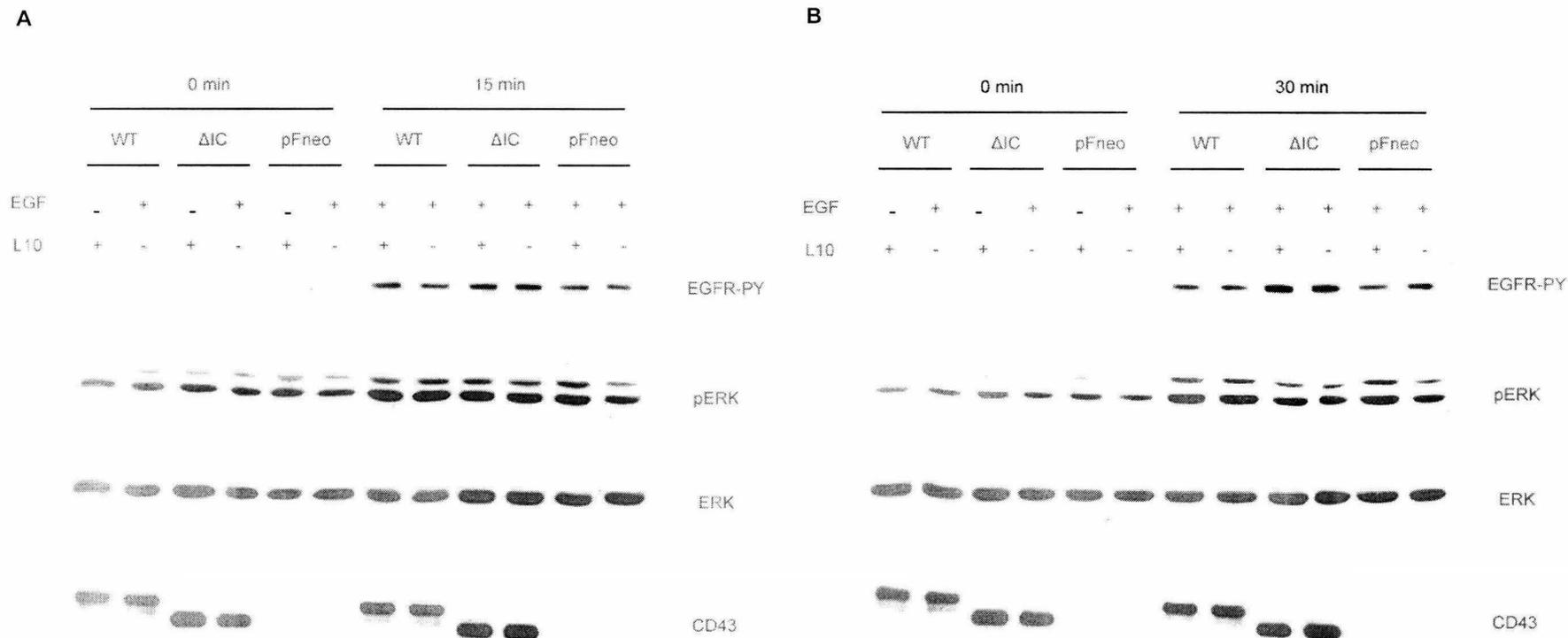
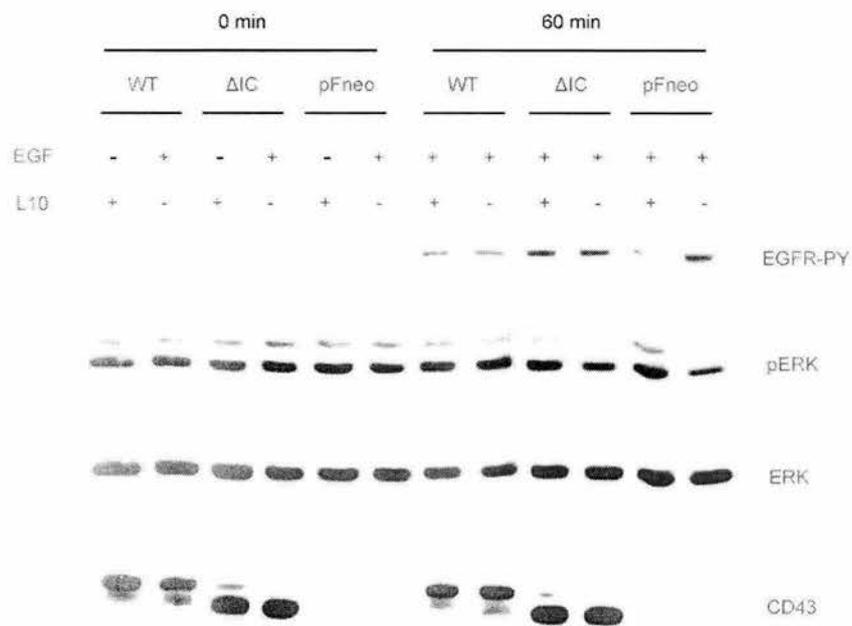
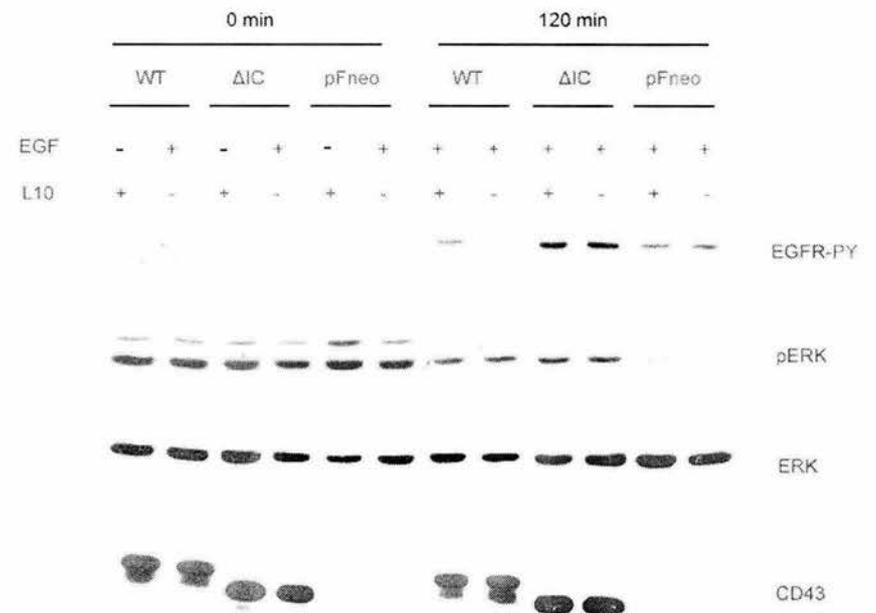


Figura 7. La Pre-estimulación a través de CD43 no afecta la actividad de las cinasas ERK 1/2 y el EGFR. Lisados celulares totales obtenidos de células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT (WT), CD43-ΔIC (ΔIC) y vector vacío (pFneo) estimuladas con el anticuerpo anti-CD43 (4 μg/ml) durante 10 minutos y posteriormente tratadas con EGF (5 ng/ml) por los tiempos indicados, se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los niveles de fosforilación en residuos de tirosinas del EGFR (EGFR-PY) y los niveles de ERK fosforilado (pERK) se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-fosfotirosinas y anti- ERK fosforilado. Los niveles de ERK se determinaron con un control de carga con anticuerpo anti-ERK-1. Los niveles de CD43-WT y CD43- ΔIC se determinaron utilizando el anticuerpo L10. **A)** Células estimuladas con EGF por 15 minutos, **B)** Células estimuladas con EGF por 30 minutos, **C)** Células estimuladas con EGF por 1 hora, **D)** Células estimuladas con EGF por 2 horas

C**D**

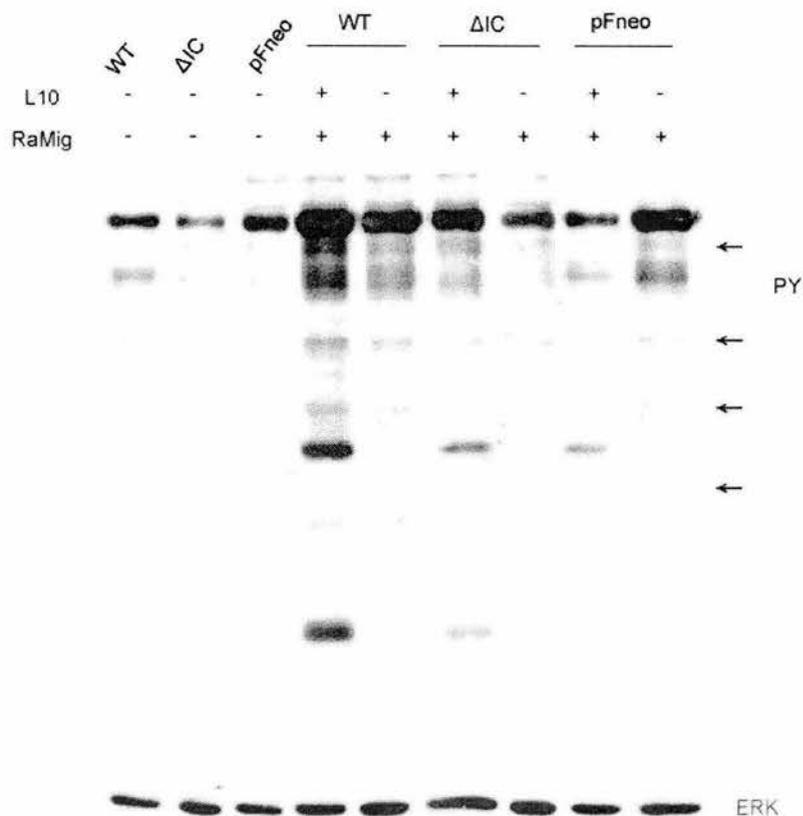


Figura 8. Estimulación a través de CD43 y su efecto sobre la inducción de señales intracelulares. Lisados celulares totales obtenidos de células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT (WT), CD43- Δ IC (Δ IC) y vector vacío (pFneo) y tratadas con anticuerpo anti-CD43 (4 μ g/ml) durante 10 minutos. Los lisados celulares totales se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. *Panel superior:* Los niveles de fosforilación en tirosinas de diferentes proteínas se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-PY. *Panel inferior:* Los niveles de ERK se determinaron como control de carga con anticuerpo anti-ERK-1. Las flechas indican la fosforilación diferencial de proteínas en respuesta a la estimulación a través de CD43.

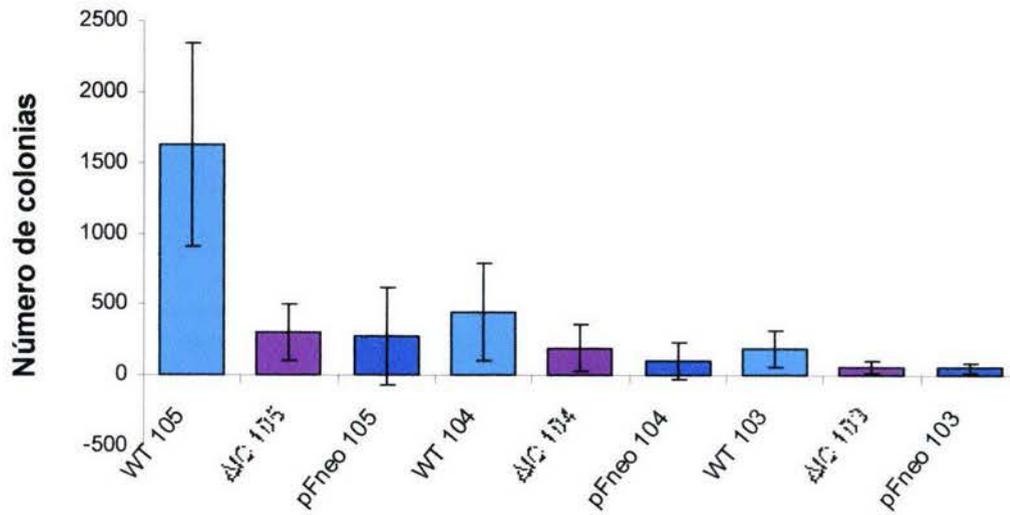
4. Determinación de la capacidad de transformación celular en líneas transfectadas establemente con las construcciones WT, Δ IC y pFneo.

Una característica de las células normales es la capacidad de crecer adheridas a una matriz extracelular y de presentar inhibición de crecimiento dependiente de contacto. Por otro lado, todas las células transformadas han perdido esta capacidad y son capaces de formar focos celulares independientes de adhesión a una matriz bajo condiciones limitantes de factores de crecimiento. La línea celular NIH-3T3 derivada a partir de fibroblastos embrionarios de ratón no presenta inhibición de crecimiento dependiente de contacto celular debido a la capacidad transformante que le confiere la sobreexpresión del receptor para EGF. Para saber si la presencia de CD43 le confiere a las células una ventaja sobre su capacidad de transformación, células NIH-3T3 (las cuales no expresan CD43) se transfectaron establemente con las construcciones CD43-WT y CD43- Δ IC, y posteriormente se sometieron a ensayos de crecimiento sobre agar suave para evaluar la capacidad transformante en cada uno de los casos. Las células que expresan la construcción CD43-WT muestran un mayor número de colonias respecto de aquellas transfectadas con la construcción CD43- Δ IC o células transfectadas con el vector vacío (pFneo) en cuatro clones independientes de cada línea celular (Figura 9). Interesantemente, las colonias formadas por las células que expresan CD43 silvestre fueron en su mayoría de tamaño más grande que las formadas en las células que expresan CD43- Δ IC o en las células transfectadas con el vector vacío en todos los casos (Figura 10). Esto sugiere que la presencia de CD43 les confiere a las células una mayor habilidad de transformación en asociación con efecto oncogénico de la sobreexpresión del EGFR.

Debido a que el incremento en la capacidad transformante de las células que expresan CD43 podría deberse a la expresión diferencial del receptor para el factor de crecimiento, evaluamos el nivel de expresión del receptor para EGF sobre la superficie celular en diferentes clones de células NIH-3T3 que expresan las construcciones antes mencionadas por medio de Western Blot y citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que independientemente de la expresión de CD43-WT o CD43- Δ IC, las clones expresan cantidades equiparables del receptor para EGF (Figura 11). Estos resultados se confirmaron por medio de citometría de flujo en colonias obtenidas de una segunda transfección (Figura 12). Es importante señalar que para nuestros fines experimentales se seleccionaron a aquellas clones que expresan cantidades equivalentes de CD43 sobre la superficie celular.

Por tanto, estos resultados indican que la capacidad de transformación promovida por la expresión de CD43 no se debe a diferencias en los niveles de expresión de receptor para EGF, y requiere de la región intracitoplásmica de ésta molécula coreceptora.

A



B

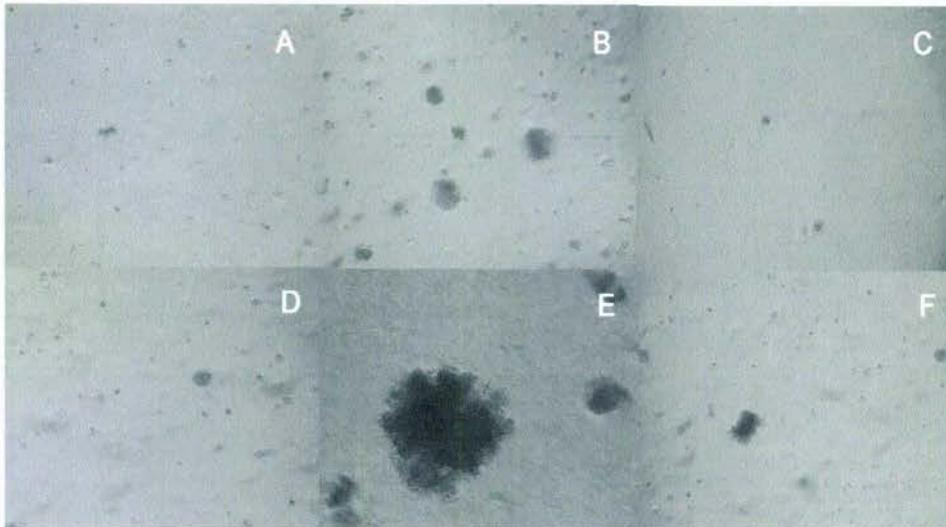


Figura 10. Las células que expresan la forma silvestre de CD43 forman colonias de mayor tamaño comparadas con las que expresan la forma truncada de CD43. Células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT (WT), CD43-ΔIC (ΔIC) y vector vacío (pFneo) se cultivaron en placas de 60 mm en agar suave durante 21 días. **A)** La figura muestra los promedios de los incrementos en el número de colonias formadas de cuatro ensayos de transformación celular independientes. Las barras de error corresponden a +/- 1 desviación estándar. **B)** El panel muestra micrografías representativas de un ensayo de transformación celular de células NIH-3T3 transfectadas con el vector vacío (pFneo), A y D), o con las construcciones CD43-WT, B y E), o CD43-ΔIC, C y F) cultivado en agar suave durante 21 días. A, B y C) *Magnificación 100X*. D, E y F) *Magnificación 400X*.

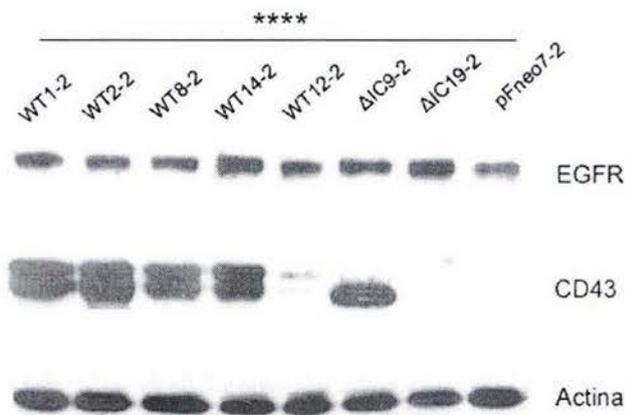
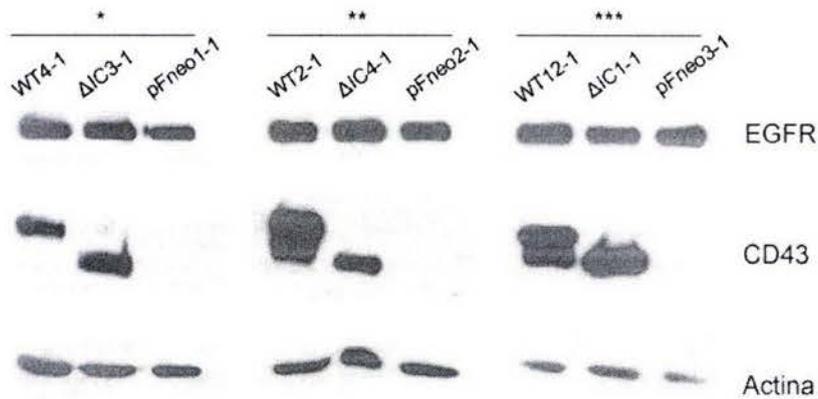


Figura 11. La capacidad transformante de las células que expresan CD43-WT no se debe a la expresión diferencial de receptor para factor de crecimiento. Lisados celulares totales obtenidos de células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT (WT), CD43- Δ IC (Δ IC) y vector vacío (pFneo), se resolvieron en SDS-PAGE al 8% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los niveles de expresión del receptor para EGF (EGFR) y CD43 se determinaron por medio de Western blot con anticuerpos anti-EGFR y anti-CD43. Los niveles de actina se determinaron como control de carga **A y B**). Los asteriscos indican cuatro grupos de clones diferentes *, **, ***, ****.

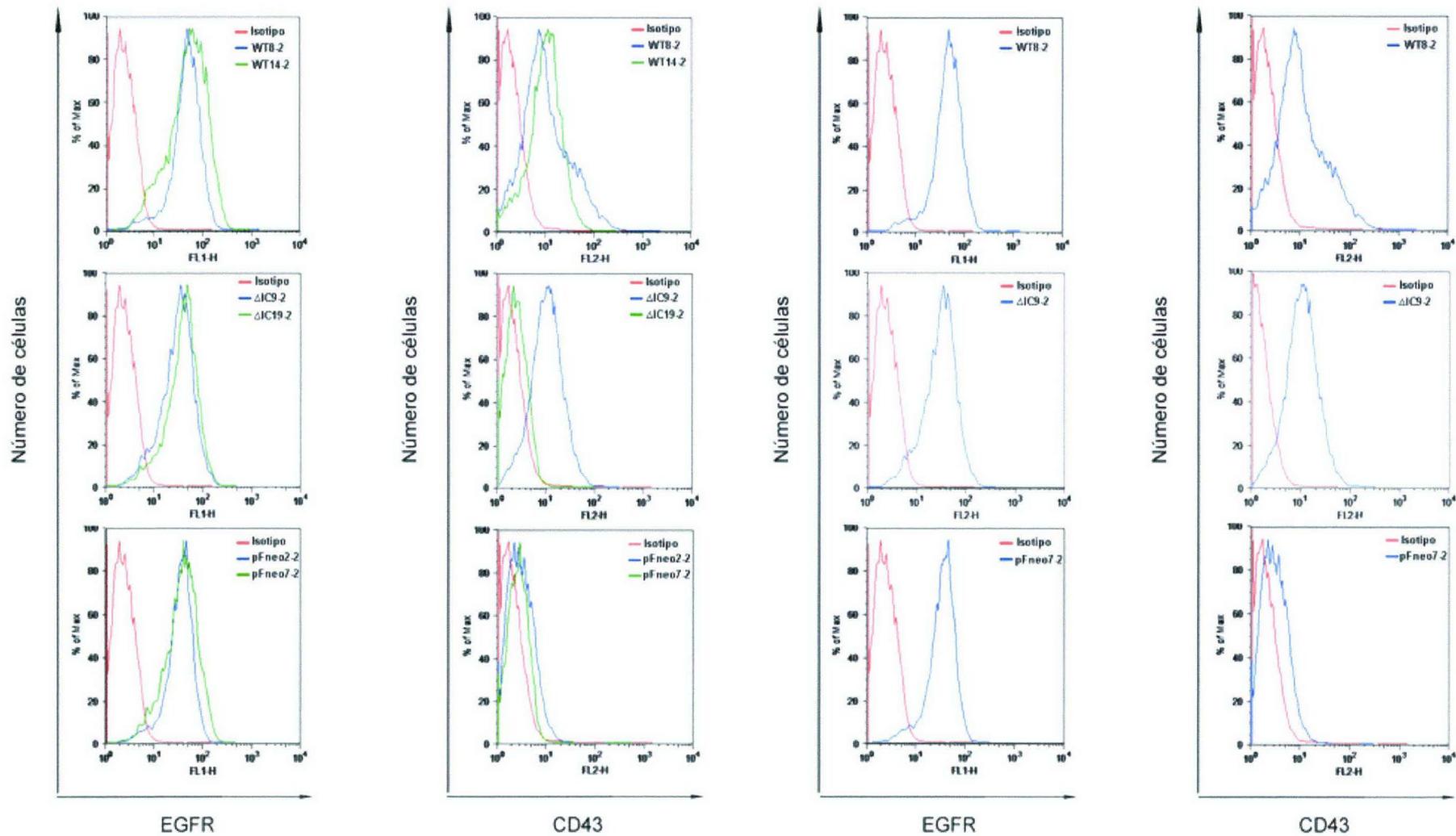


Figura 12. La expresión del receptor para EGF no depende de los niveles de expresión de CD43. Células que expresan establemente las construcciones CD43-WT (WT), CD43- Δ IC (Δ IC) y vector vacío (pFneo) se tiñeron con anticuerpos anti EGFR-FITC, así como con anti CD43-PE y se evaluó la expresión de EGFR y CD43 a través de citometría de flujo.

5. Evaluación de la proliferación y de la motilidad celular en líneas transfectadas establemente con las construcciones WT, Δ IC y pFneo.

Además de la capacidad de transformación, otro rasgo esencial en las células tumorales es el incremento en la proliferación, así como en la motilidad celular (Langdon, 2004). Para determinar si la expresión de la sialomucina CD43 sobre la superficie celular les confiere a las células alguna ventaja sobre proliferación y/o la migración celular, se realizaron ensayos de "wound healing" o cicatrización con clones celulares que expresan la versión silvestre de CD43, aquellas que expresan CD43- Δ IC (truncada hacia la región intracitoplásmica), y células transfectadas solamente con el vector vacío (pFneo) estimuladas con EGF a una concentración de 100 ng/ml, o suero fetal a diferentes concentraciones (1, 5 y 10%). No hubo diferencias sustanciales en la proliferación y/o migración celular inducida a través de la estimulación del receptor para factor de crecimiento epidérmico dependiente de EGF en ninguna de las clones que expresan construcciones diferentes para CD43 (Figura 13A y datos no mostrados). No obstante, las células que expresan CD43-WT lograron cerrar la herida en un tiempo mucho menor que aquellas que no lo expresan en respuesta a las diferentes concentraciones de suero presentes en el medio (Figura 13B y 13C), esto sugiere que CD43 activa vías de señalización que inducen una mayor capacidad proliferativa y de migración celular.

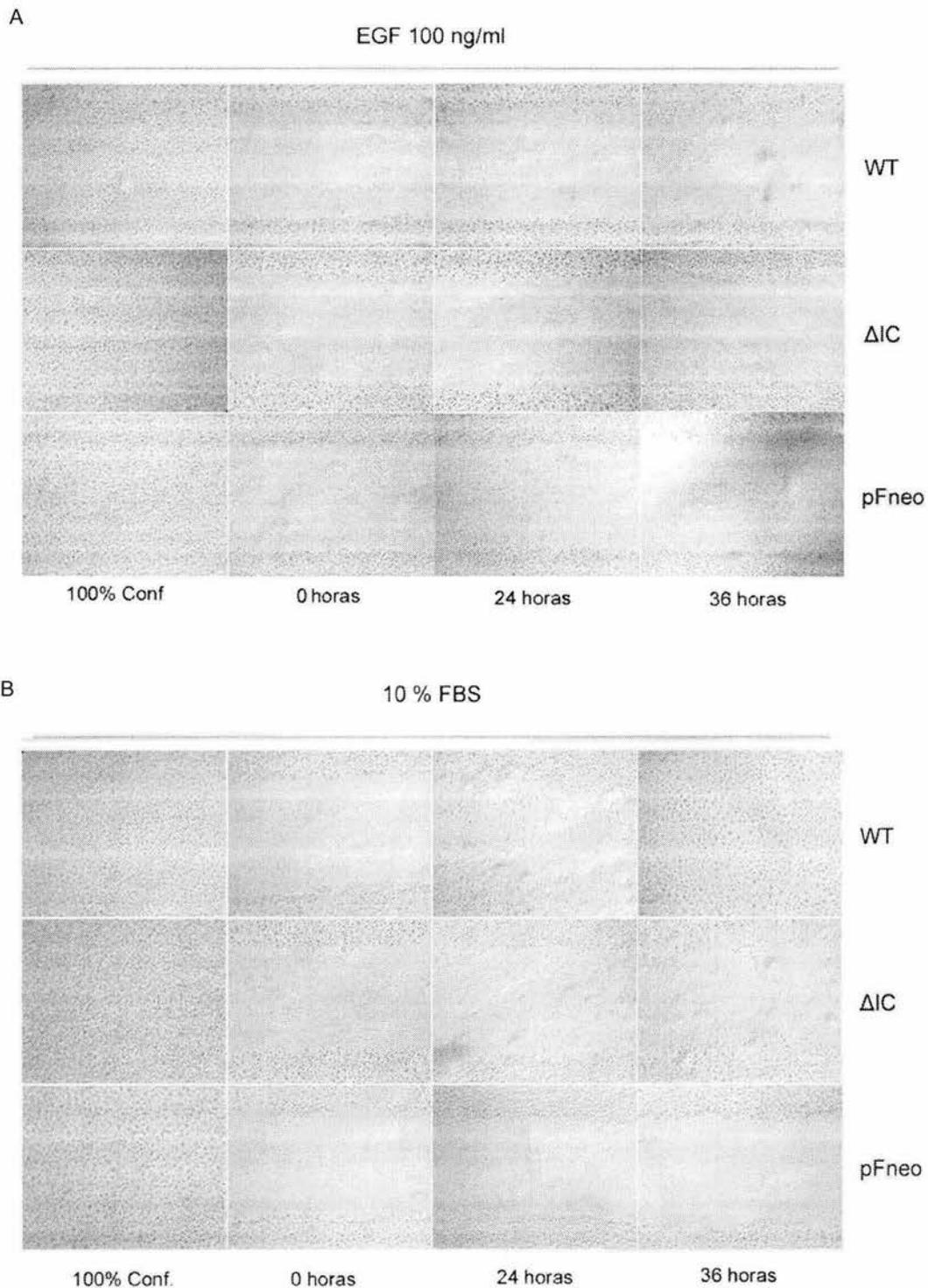


Figura 13. La expresión de CD43 silvestre promueve una cicatrización más rápida.

Células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43-ΔIC y vector vacío (pFneo) se cultivaron en placas de 35 mm hasta alcanzar 100% de confluencia en medio DMEM suplementado con FBS 10%. Posteriormente se arretaron durante 24 horas, y se lavó con 2 ml de PBS. Finalmente se estimularon con 100 ng/ml de EGF (A), y con FBS al 10 % (B) en un volumen final de 1 ml y se realizó la herida. Micrografías representativas se muestran en este panel de tres ensayos de Wound Healing. *Magnificación 100 X.*

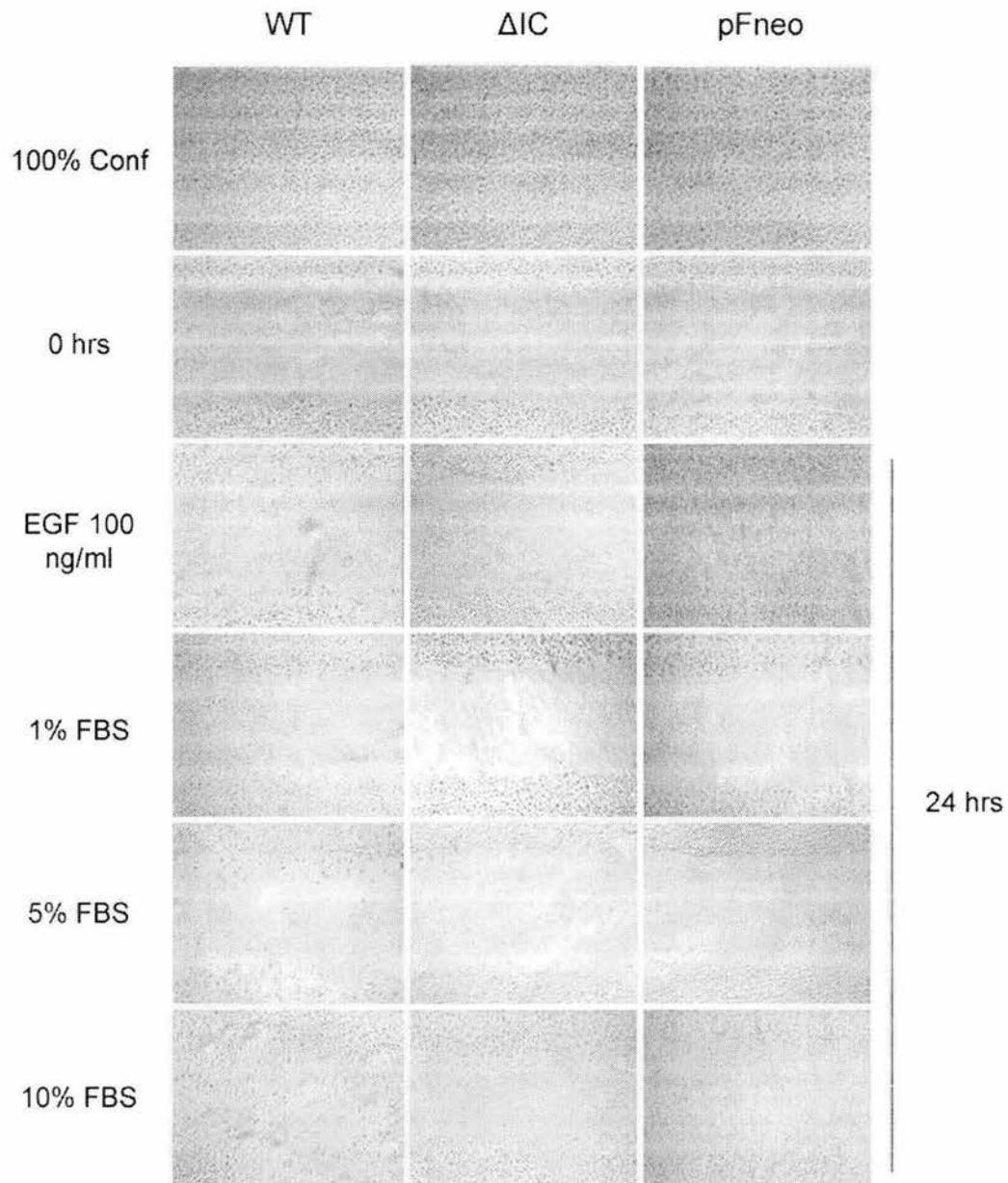


Figura 13. La expresión de CD43 silvestre promueve una cicatrización más rápida.

C) Células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43- Δ IC y vector vacío (pFneo) se cultivaron en placas de 35 mm hasta alcanzar 100% de confluencia en medio DMEM suplementado con FBS 10%. Posteriormente se arretaron durante 24 horas, y se lavó con 2 ml de PBS. Finalmente se estimularon con 100 ng/ml de EGF, así como con FBS a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 %) en un volumen final de 1 ml y se realizó la herida. Micrografías representativas se muestran en este panel de tres ensayos de Wound Healing. Magnificación 100 X.

6. Determinación de las citocinas producidas por células transformadas que expresan las construcciones WT, Δ IC y pFneo.

Las citocinas son moléculas que tienen como función regular los procesos de inflamación, angiogénesis y quimiotaxis. Estas son producidas en respuesta a un estrés celular causado por agentes endógenos o exógenos con la finalidad de minimizar el daño celular. Sin embargo, se ha demostrado que la producción sostenida de citocinas contribuye con la progresión tumoral y se asocia con la predisposición al padecimiento de diferentes tipos de cáncer. Diversos estudios sugieren que citocinas y factores de crecimiento como IL-1, IL-6, IL-15, CSF, GM-CSF, EGF, VEGF, FGF2, PDGF-BBI, TNF- α , MIF, MCP-1/CCL2, MCP-5/CclI2, CXL8, entre otras, promueven la progresión del cáncer (Hussain, S. and Harris, C., 2007, Kanayasu-Toyoda, et al. 2007, Loberg, R., et al., 2007, Nissen, L.J, et al., 2007, Pelangaris, S. and Khan, M., 2006). Recientemente se ha reportado que la estimulación a través de CD43 sobre la superficie de linfocitos T induce la secreción de citocinas proinflamatorias como RANTES, MCP-1, MIP, IL-3, IL-4, IL-8 e IFN- γ , entre otras (Fierro et al., 2006), debido a ello, determinamos si el incremento en la capacidad transformante de las células que expresan la construcción de CD43-WT se relaciona al perfil de citocinas producido. Para ello, se analizaron los niveles de citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivo provenientes de ensayos de agar suave mediante un arreglo de anticuerpos. Los resultados obtenidos muestran que existe un incremento en la producción de citocinas como IFN- γ , MCP-1, MCP-5, RANTES, IL-4, IL-5, IL-6, VEGF y trombopoyetina en células transformadas que expresan la construcción de CD43-WT comparadas con las células que expresan las construcciones CD43- Δ IC o pFneo (mock) (Figura 14A y B). Interesantemente los niveles de expresión de citocinas como GCSF y GM-CSF se redujeron drásticamente en las células que expresan la forma silvestre de CD43 en comparación con aquellas que expresan la versión truncada de esta molécula. También se observa una reducción en la expresión de citocinas IL-3, IL-13, sTNFR-1 y TNF α , aunque el efecto es menos drástico que para el caso de GCSF y GM-CSF, y parece ser parcialmente independiente de la región intracitoplásmica de CD43. Finalmente encontramos citocinas cuya expresión parece no alterarse o estar regulada por la expresión de CD43 como IL-5 e IL-17.

Estos resultados sugieren que el incremento en la capacidad de transformación en células que expresan CD43-WT se debe, al menos parcialmente, al incremento en la producción de citocinas que favorecen el crecimiento celular, expresión de moléculas de adhesión, angiogénesis y quimiotaxis. De la misma manera, el abatimiento en la expresión de ciertas

citocinas podría conferir ventajas alternas sobre dicho fenómeno. Por otro lado, existen también citocinas que están reguladas de manera independiente de CD43 que no se relacionan con el proceso de transformación celular mediada a través de esta molécula.

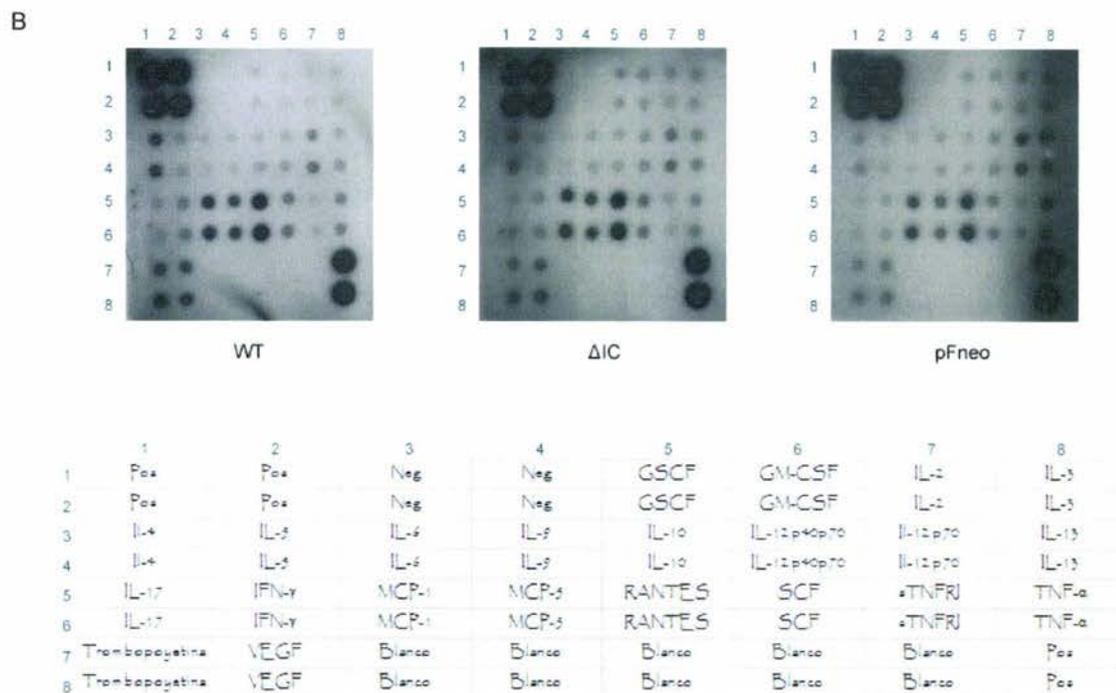
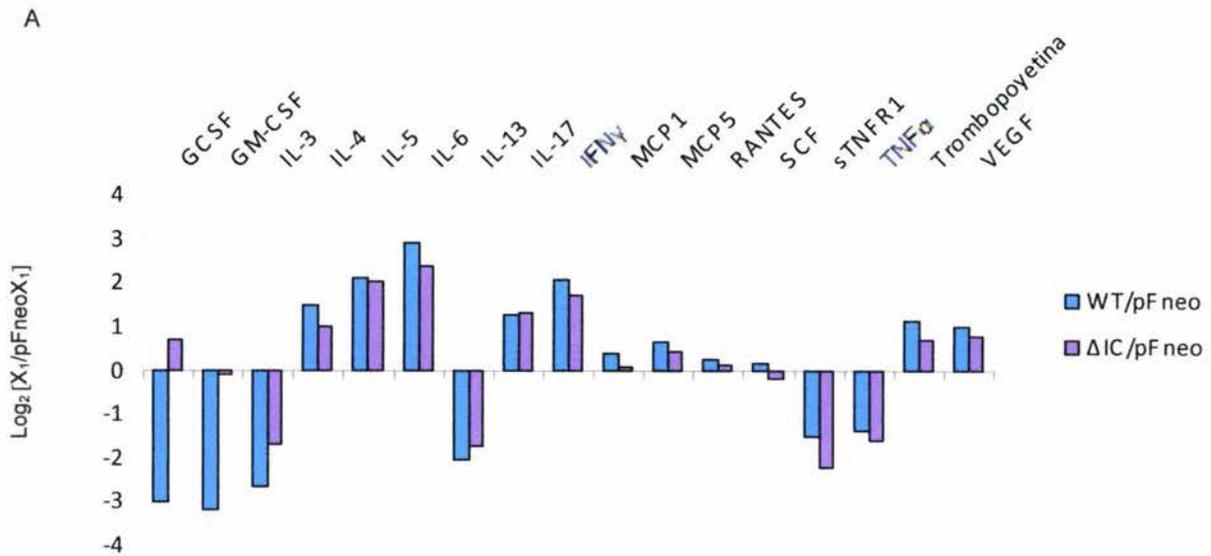


Figura 14. Las células que expresan la forma silvestre de CD43 producen más citocinas proinflamatorias. El perfil de citocinas para cada condición se obtuvo a partir de sobrenadantes de cultivo provenientes de ensayos de agar suave de células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43-ΔIC y vector vacío (pFneo) cultivadas en placas de 60 mm sobre agar suave durante 25 días. La cantidad de citocinas se determinó con el arreglo anti-citocinas Ray Bio® Mouse Cytokine Antibody Array I. **A)** La figura muestra los promedios del incremento en los valores de expresión de citocinas calculado a partir de la expresión $\text{Log}_2 [X_1/pFneoX_1]$. **B)** Blots de arreglos anti-citocinas Ray Bio® Mouse Cytokine Antibody Array I que muestran las diferencias de expresión de citocinas entre las células NIH-3T3 transfectadas con las construcciones CD43-WT, CD43-ΔIC y vector vacío (pFneo).

Discusión y conclusiones

Durante las últimas décadas se ha descrito que los procesos de proliferación y transformación celular están altamente regulados por diversos factores de crecimiento y receptores capaces de transducir señales al interior celular que promueven la proliferación o resistencia a muerte. De la misma manera se han encontrado diversos marcadores moleculares que indican un mal pronóstico en la evolución y desarrollo del cáncer (Van der Geer et al., 1994, Meisner et al., 1997, Lewin et al., 2000, Kannagi et al., 2004 Ostman et al., 2006). El co-receptor CD43, que inicialmente se consideraba de expresión exclusiva de células de origen hematopoyético, ha sido recientemente reportado sobre la superficie de células y líneas celulares provenientes de cáncer de colon, mama, páncreas, cérvix, ovario y fibrosarcoma, entre otros, y se le ha asociado con un mal pronóstico y desarrollo de la enfermedad (Shiota, et al., 1994, Sikut, et al., 1999, Fernández-Rodríguez, J., et al., 2002), no obstante su función en este tipo de células aún permanece incierta. Diversos reportes señalan que la estimulación a través de CD43 en células de origen hematopoyético induce fenómenos muy variados entre los que encontramos diferenciación, migración y proliferación celular, etc. (revisado en Rosenstein et al., 1999). De manera muy reciente se describió que la sobreexpresión de la molécula CD43 genera señales antiapoptóticas al reducir los niveles de FAS sobre la superficie de células que carecen o que presentan defectos en la función de p53 y ARF (Kadaja-Saarepuu, 2007). Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio muestran además que la estimulación a través de CD43 en linfocitos T promueve la fosforilación dependiente de PKC de residuos de serinas de c-Cbl, lo cual resulta a su vez en la prevención de la fosforilación de residuos de tirosinas y el abatimiento de su actividad (Liu et al., 1996; Pedraza-Alva et al., 2001). Se sabe que Cbl-b y c-Cbl son capaces de regular negativamente las señales generadas a partir de la estimulación de diversos receptores con o sin actividad de cinasa de tirosinas, y de esta manera regular la progresión del ciclo celular previniendo la aparición de cáncer (Lupher et al., 1992; Lim, et al., 2004). Por otro lado, es importante mencionar que la sobreexpresión de CD43 en líneas celulares no transformadas induce un incremento en el tamaño celular y un fenotipo senescente, así como la acumulación de p53 y ARF (Nuñez-Cruz, 1997; Kadaja et al., 2004). Todos estos datos sugieren que CD43 es capaz de generar señales que promueven la supervivencia celular, cuya regulación negativa en células no transformadas o en ausencia de oncogenes depende —al menos parcialmente— de p53 y ARF, así como de la ligasa de ubiquitina Cbl.

En este trabajo nos propusimos demostrar que en células tumorales la expresión de CD43 favorece la proliferación celular al regular de manera negativa las funciones de Cbl, así como demostrar que CD43 promueve la transformación celular y la generación de un microambiente proinflamatorio que favorece el desarrollo del cáncer.

Si bien pudimos demostrar que la sola expresión o la pre-estimulación a través de CD43 no le confiere a la célula ninguna ventaja evidente sobre la activación de moléculas como ERK 1/2 o el receptor para EGF —que mostraría indirectamente que CD43 previene la ubiquitinación de receptores para factores de crecimiento a través de Cbl, lo cual se reflejaría en el incremento o activación sostenida en la fosforilación de las proteínas ya mencionadas —, sí puede incrementar su capacidad transformante, así como de proliferación y migración celular. No descartamos la posibilidad de observar el efecto de ésta molécula sobre otras proteínas río abajo de EGFR, las cuales no necesariamente participan en un loop que conduzca a una mayor fosforilación o activación prolonga del EGFR, ni de las MAP cinasa ERK 1/2. De manera reciente, se reportó que la activación de la vía AKT/PI3K promueve señales de supervivencia, y previene la muerte mediada a través de ligando de Fas en líneas celulares cocultivadas con células tumorales, y al mismo tiempo se demostró que la activación de la vía AKT/PI3K previene la fosforilación de las MAP cinasas ERK1/2 (Chung-Chen et al., 2007).

Diversos estudios señalan que en muchos casos uno de los eventos esenciales que resultan en la aparición de cáncer es el desacoplamiento de elementos de regulación negativa de la vía de PI3K/AKT, debido a que ésta tiene como blanco regular moléculas capaces de promover señales de supervivencia como Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, c-Myb e inhibidores de caspasas, entre otros. Se ha demostrado también que la activación de AKT abate la expresión de moléculas pro-apoptóticas como Caspasa-9, Fas-L, IGFBP y Bim. De la misma manera, AKT fosforila la Ser 136 de Bad previniendo su actividad y evitando con ello su translocación a mitocondria, la liberación de citocromo c y la apoptosis celular (Osaki et al., 2004; Chung-Chen et al., 2007). Otro de los factores que contribuyen con la transformación celular es la alteración de las señales generadas a partir de factores de transcripción de la familia STAT. Varios estudios han demostrado que la activación constitutiva de STAT3 y STAT5, mediada a partir de RTKs y receptores para citocinas, promueve la proliferación y genera señales que previenen la muerte a través de la regulación de genes como Bcl-XL, c-Myc, Mcl-1, ciclina D1/D2 y VEGF, lo cual resulta en la promoción de tumores (Buettner et al., 2002). A la par, se ha reportado que la desensibilización y abatimiento de la actividad de la MAP cinasa p38 ante la liberación de especies reactivas de oxígeno posterior a la fosforilación de RTKs y otros receptores de

membrana, así como la inactivación de p53, inducen la formación de tumores (revisado en Sherr 2004, Dolado et al., 2007). Por lo anterior creemos que la ventaja que CD43 le confiere a las células —efecto no necesariamente mediado a través de Cbl— se encuentra a un nivel molecular diferente al de las MAP cinasas ERK 1/2 o del receptor para EGF, y que bien podría involucrar a moléculas tales como PI3K, AKT, STAT3, STAT5, Fas-L, p38 y p53, entre otras, regulando así la progresión del ciclo celular. En concordancia con esto, el análisis por citometría de flujo de la expresión del receptor para EGF sobre la superficie de células que expresan la construcción silvestre de CD43 tras la estimulación con L10 (anti-CD43) previa a EGF, no muestran un incremento o expresión sostenida del EGFR comparado con las células que expresan la construcción Δ IC o el vector vacío (datos no mostrados). Lo anterior sugiere que las señales generadas a partir de ésta molécula no inducen el abatimiento de la ubiquitinación y regulación negativa del EGFR, y por tanto que el incremento observado en la transformación celular, migración y proliferación de las células que expresan CD43 silvestre no está asociado a la pérdida de este punto de regulación del receptor para EGF.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que el efecto de la estimulación individual con EGF en fibroblastos que expresan CD43 no tiene ninguna consecuencia a nivel de proliferación y/o migración durante los ensayos de cicatrización. No obstante, la suma de las señales generadas a partir de los múltiples factores mitogénicos presentes en el medio suplementado, tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, resultan en un estímulo mayor capaz de promover la progresión del ciclo celular, así como la proliferación y migración de las células que expresan la versión silvestre de CD43. Consistente con nuestros resultados, se ha reportado que la estimulación a través del EGFR por la unión con su ligando EGF solo induce una estimulación tenue y transitoria de las cinasas ERK 1/2, y por lo tanto, es considerado como un estímulo mitógeno débil (Murphy et al., 2002). Por todo esto, no descartamos que la sola expresión o la pre-estimulación a través de CD43 previa a la estimulación a través de otros RTKs (como PDGF o VEGF), o el efecto sinérgico de la estimulación con varios factores de crecimiento, pudiera conferir una ventaja sobre la fosforilación de las MAP cinasas ERK 1/2, y de esta manera promover la progresión del ciclo celular, a diferencia de lo observado con la simple estimulación con EGF.

Finalmente, es importante mencionar que existe gran diferencia de condiciones de cultivo entre los ensayos de agar suave y las células cultivadas para ensayos de bioquímica. En los ensayos de transformación celular las condiciones de crecimiento de las células son independientes de anclaje a una matriz, además, las células fueron alimentadas cada

tercer día con medio DMEM suplementado con FBS, mientras que las células cultivadas para la realización de ensayos de bioquímica fueron crecidas en placas de cultivo de 60 mm hasta alcanzar 100% de confluencia y posteriormente fueron privadas de estímulos mitógenos previo al estímulo (anti-CD43/EGF, o EGF). Lo anterior podría ocasionar diferencias en las señales inducidas a partir de CD43 generadas a partir de las interacciones de las células y sus receptores de membrana con el medio externo. Por lo antes dicho, no descartamos que en células transformadas que expresan CD43 silvestre pueda haber una ventaja sobre la actividad de ERK 1/2 o del receptor para EGF que no es evidente en los ensayos de bioquímica debido a las diferencias antes mencionadas.

Así mismo, nuestros resultados parciales apuntan a que el incremento en la capacidad de transformación, así como de proliferación y migración celular en las células que expresan la forma silvestre de CD43 en ensayos de agar suave, se debe a un incremento en la producción de citocinas que favorecen la inflamación, adhesión, quimiotaxis y angiogénesis, tales como MCP-1, MCP-5, RANTES, IL-4, IL-5, IL-6, VEGF y trombopoyetina.

En conclusión podemos decir que CD43 es capaz de generar señales que regulan de manera positiva el ciclo celular y que asociadas al efecto de algún oncogen (como p53, ARF, EGFR o E6-HPV) promueven la transformación celular, así como la capacidad de migración y proliferación, aunque el efecto no involucra la fosforilación o activación sostenida del receptor para EGF, ni de las MAP cinasas ERK 1/2. Lo anterior podría deberse en parte a una mayor producción de citocinas que favorecen la adhesión, quimiotaxis, inflamación y angiogénesis por parte de las células que expresan la versión silvestre de CD43 en comparación con las células que expresan la construcción Δ IC o vector vacío. Debido a ello podemos concluir también que el dominio intracitoplásmico de CD43 es fundamental para la regulación e inducción de las vías de señalización que promueven la transformación, proliferación y/o migración celular mediadas a través de ésta molécula.

Perspectivas

Determinar que CD43 previene la fosforilación de Cbl en residuos de tirosina a través de Western blot.

Determinar que CD43 previene la función de ligasa de ubiquitina Cbl a través de ensayos de cinasa *in vitro*.

Demostrar que las células transfectadas con la versión silvestre de CD43 tienen una mayor capacidad proliferativa comparadas con aquellas que expresan la construcción de CD43 truncada hacia la región intracitoplásmica, a través de tinciones celulares con yoduro de propidio y CFSE.

Demostrar que CD43 favorece una mayor capacidad proliferativa en células tumorales que la expresan naturalmente (MCF-7, COLO-205, etc.) abatiendo la expresión de CD43 a través de RNAi.

Demostrar que CD43 promueve la expresión y secreción de una mayor cantidad de factores de crecimiento respecto a las células que expresan la versión truncada de la molécula y el vector vacío.

Demostrar que la secreción de citocinas proinflamatorias (quimiotácticas y pro-angiogénicas) de las células que expresan la versión silvestre de CD43 favorece la relajación del endotelio vascular, y con ello la migración y la capacidad invasiva de estas células.

Demostrar que la expresión de la versión silvestre de CD43 es capaz de favorecer el desarrollo de tumores *in vivo* mediante la inyección de células transformadas que expresan las diferentes construcciones de CD43 en ratones.

Determinar cuales son las moléculas involucradas en la vía de señalización mediada a través de CD43 que conducen a una mayor proliferación, migración y transformación celular a través de ensayos bioquímicos.

Referencias

- Abella, J. V., P. Peschard, M. A. Naujokas, T. Lin, C. Saucier, S. Urbe, and M. Park. 2005. Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol* 25:9632.
- Abramson, J.S., Hudnor, H.R. (1995). Role of the Sialophorin (CD43) Receptor in Mediating Influenza A Virus-Induced Polymorphonuclear Leukocyte Dysfunction. *Blood*. 85(6): 1615-1619.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Extracellular control of the cell division, cell growth, and apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. New York. P.1014.
- Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K., Sperling, A.I. (2001). ERM-Dependent Movement of CD43 Defines a Novel Protein Complex to the Immunological Synapse. *Immunity*. 15:739-750.
- Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horejsi, V., Schmidt, R.E. (1995). MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol*. 25: 1051-1055.
- Amano, J., Morimoto, C., Irimura, T. (2001). Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Micro. Infect*. 3:723-728.
- Andersson, C.X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Sikut, R., Sikut, A., Baeckström, D., Hansson, G.C. (2004). CD43 has a functional NLS, interacts with β -catenin, and affects gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 316:12-17.
- Babina, M., Weber, S., Henz, M. (1998). Signal transduction via CD43 (leukosialin, sialophorin) and associated biological effects in human mast cell line (HMC-1). *Biochem. Biophys. Res*. 243,1.
- Bachmaier, K. et al. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*. 403:211-216.
- Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*. 357: 539-545.
- Barclay, N., Brown, M.H., Law, A. S., McKnight, A.J., Tomlinson, M.G., Van der Merwe, P.A. (1997). The Leucocyte Antigen. Facts Book Series. Second edition. Pp:119.
- Barat, C., Tremblay, M.J. (2002). Engagement of CD43 Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcriptional Activity and Virus Production That Is Induced upon TCR/CD3 Stimulation. *J. Biol. Chem*. 277(32): 28714-28724.
- Barondes^a, S.H., Cooper, N.W., Gitt, M.A., Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and Function of a Large Family of of Animal Lectins. *J. Biol. Chem*. 269(33): 20807-20810.
- Barondes^b, S.H., Castronovo, V., Cooper, D., Cummings, R., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F., Lotan, R., Mercurio, A., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P., Rini, J., Wang, J. (1994). Galectins: A Family of Animal β -Galactoside-Binding Lectins. *Cell*. 76:597-598.
- Baum LG, Pang, M., Perillo, N.L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., Seilhamer, J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, Galectin-1, wich binds the core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med*. 181:877-887.
- Bisson, S. A., E. E. Ujack, and S. M. Robbins. 2002. Isolation and characterization of a novel, transforming allele of the c-Cbl proto-oncogene from a murine macrophage cell line. *Oncogene* 21:3677.
- Blume-Jensen, P., T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355.
- Bonita, D. P., Miyake, S., Luper Jr, M. L., Langdon, W. Y., Band, H. (1997). Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity. *Mol. Cell. Biol*. 17:4597-4610.
- Bootman, M.D., Holmes, A.M., Roderick, H.L. (2006). Calcium signalling and regulation of cell function. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons.

- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L., Nadler, L.M. (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278:124–128.
- Buettner, R., Mora, L.B., Jove, R. (2002). Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Clin. Cancer Res.* 8:945–954.
- Braunger, J. Schleitho, L., Schulz, A., Kessler, H., Lammers, R., Ullrich, A., Bartram, C., Janssen, J. (1997). Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*. 14: 2619 -2631.
- Burger, A.M., Seth, A.K. (2004). The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur. J. Cancer*. 40:2217-2229.
- Carlow, D.A., Corbel, S.Y., Ziltener, H.J. (2001). Absence of CD43 Fails to Alter T Cell Development and Responsiveness. *J. Immunol.* 166: 256-261.
- Carlsson, S.R., Fukuda, M. (1986). Isolation and Characterization of Leukosialin, a Major Sialoglycoprotein on Human Leukocytes. *J. Biol. Chem.* 261(27):12779-12786.
- Chatila, T.A., Geha, R.S. (1988). Phosphorylation Of T Cell Membrane Proteins By Activators Of Protein Kinase C. *J. Immunol.* 140(12): 4308-4314.
- Cheadle, E., Riyad, K., subae, D., Rothwell, D., Ashton, G., Batha, H., Sherlock, D., Hawkins, R., Gilham, D. (2007). Eotaxin-2 and colorectal cancer: a potential target for immune therapy. *Clin. Can. Res.* 13(19): 5719-5728.
- Chiang, Y. J. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*. 403:216–220.
- Chou, Y., Hayman, M.J. (1991). Characterization of a member of the immunoglobulin gene superfamily that possibly represents an additional class of growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4897-4901.
- Chung-Cheng, S., Yu-Ping, L., Yu-Jung, C., Jyun-Yuan, H., Woei-Jer, C., Yan-Shen, S., Bei-Chang, Y. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Activation by Integrin-Tumor Matrix Interaction Suppresses Fas-Mediated Apoptosis in T Cells. *J Immunol.* 179:4589-4597.
- Citri, A., Yarden, Y. (2006). EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Rev.* 7:505-516.
- Cooke, M., Abraham, C., Forbush, K., Perlmutter, R. (1991). Regulation of T cell receptor by Src family protein-tyrosine kinase (p59^{lyn}). *Cell* 65: 281-291.
- Coussens, L., Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
- Cyster, J., Shotton, D.M., Williams, A.F. (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* 10(4): 893-902.
- Deane, J., Fruman, D. (2004). Phosphoinositide 3-Kinase: Diverse Roles in Immune Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 22:563–98.
- Del Rio, R., Cruz-Munoz, M.E., Olivares-Zavaleta, N., Rosenstein, Y. and Pedraza-Alva, G. 2005. CD43 regulates the thresholds for T cell activation by targeting Cbl functions. *J Biol. Chem.:Submitted*.
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., Nebreda, A. (2007). p38a MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 11: 191–205.
- Downing, J. R., Margolis, B.L., Zilberstein, A., Ashmun, R.A., Ullrich, A., Sherr, C. J., Schlessinger, J. (1989). Phospholipase C- γ , a substrate for PDGF receptor kinase, is not phosphorylated on tyrosine during the mitogenic response to CSF-1. *EMBO J.* 8(11): 3345-3350.
- Ettenberg, S. A., Keane, M.M., Nau, M., Frankel, M., Wang, L., Pierce, H.J., Lipkowitz, S. (1999). Cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 18:1855–1866.
- Fang, D. *et al.* (2001). Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. *J. Biol. Chem.* 276:4872–4878.
- Fernandez-Rodriguez, J., C. X. Andersson, S. Laos, D. Baeckstrom, A. Sikut, R. Sikut, and G. C. Hansson. 2002. The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol* 23:193.
- Feshchenko, E. A., Langdon, W. Y., Tsygankov, A. Y. (1998). Fyn, Yes, and Syk Phosphorylation Sites in c-Cbl Map to the Same Tyrosine Residues That Become Phosphorylated in Activated T Cells. *J. Biol. Chem.* 273:8323–8331.

- Fierro, N. A., Pedraza-Alva, G., Rosenstein, Y. (2006). TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement. *J. Immuno.* 176: 7346–7353.
- Fiorini, M., Alimandi, M., Fiorentino, L., Sala, G., Segatto, O. (2001). Negative regulation of receptor tyrosine kinase signals. *FEBS Letters.* 490:132-141.
- Fournel, M., Davidson, D., Weil, R., Veillette, A. (1996). Association of Tyrosine Protein Kinase Zap-70 with the Protooncogene Product p120 c-cbl in T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183:301–306.
- Fratazzi, C., Manjunath, N., Arbeit, R., Carini, C., Gerken, T., Ardman, B., Remold-O'Donnell, E., Remold, H.C. (2000). A Macrophage Invasion Mechanism for Mycobacteria Implicating the Extracellular Domain of CD43. *J. Exp. Med.* 192(2): 183–191.
- Galisteo, M. L., Dikic, I., Batzer, A. G., Langdon, W. Y., Schlessinger, J. (1995). Tyrosine phosphorylation of the *c-cbl* proto-oncogene product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J. Biol. Chem.* 270:20241–20245.
- Ghigliione, C., Carraway, K.L., Amundadottir, L.T., Boswell, R.E., Perrimon, N., Duffy, E. (1999). The Transmembrane Molecule Kekk1 Acts in a Feedback Loop to Negatively Regulate the Activity of the *Drosophila* EGF Receptor during Oogenesis. *Cell.* 96:847–856.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, and B. A. Osborne. 2001. *KUBY Immunology*. W. H. Freeman, ed, New York.
- Hermiston, M., Xu, Z., Majeti, R., Weiss, A. (2002). Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J. Clin. Inv.* 109(1): 9-14.
- Hernández-Menéndez, M., Ríos-Hernández, M. (1999). *Oncogénes y Cáncer. Rev. Cubana Oncol.* 15(2): 131-139.
- Hussain, S., Harris, C. (2007). Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *Int. J Cancer.* 121:2373-2380.
- Jin, M.H., Sawamoto, K., Ito, M., Okano, H. (2000). The Interaction between the *Drosophila* Secreted Protein Argos and the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibits Dimerization of the Receptor and Binding of Secreted Spitz to the Receptor *Mol. Cell. Biol.* 20: 2098-2107.
- Jongeward, G. D., Clandinin, T. R., Sternberg, P. W. (1995). *slf-1*, a negative regulator of *let-23*-mediated signaling in *C. elegans*. *Genetics* 139:1553–1566.
- Kadaja, L., Laos, S., Maimets, T. (2004). Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor p53 and ARF. *Oncogene.* 23: 2523-2530.
- Kadaja-Saarepuu, L., Laos, S., Jaager, K., Viil, J., Balikova, A., Looke, M., Hansson, G.C., Maimets, T. (2007). CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. *Oncogene.* 1-11.
- Kaiser, P., Huang, L. (2005). Global approaches to understanding ubiquitination. *Gen. Biol.* 6(10):233.
- Kanayasu-Toyoda, T., Ishii-Watabe, A., Suzuki, T., Oshizawa, T., Yamaguchi, T. (2007). A New Role Of Thrombopoietin Enhancing Ex Vivo Expansion Of Endothelial Precursor Cells Derived From Ac133 Positive Cells. *J Biol. Chem.* Accepted Manuscript
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyaki, K., Kimura, M. (2004). Carbohydrate-mediate cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* 95(5): 377-384.
- Keeble, T., Cooper, H. (2006). Ryk: A novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 2011-2017.
- Killeen, N., Barclay, A.N., Willis, A.C., Williams, A.F. (1987). The sequence of rat leukosialin (W3/13 antigen) reveals a molecule with O-linked glycosylation of one third of its extracellular amino acids. *EMBO J.* 6(13):4029-34.
- Klein, D.E., Nappi, V.M., Reeves, G.T., Shvartsman, S.Y., Lemmon, M.A. (2004). Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature.* 430:1040-1044.
- Krawczyk, C. et al. (2000). Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells. *Immunity.* 13:463–473.
- Langdon, S. P. (2004). Invasión and Motility Assays. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press. New Jersey, USA. P. 225.
- Layseca-Espinosa, E., Pedraza-Alva, G., Montiel, J.L., Del-Río, R., Fierro, N.A., González-Amaro, R., Rosenstein, Y. (2003). T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *J. Leukoc. Biol.* 74:1-10.

- Lee, P. S., Y. Wang, M. G. Dominguez, Y. G. Yeung, M. A. Murphy, D. D. Bowtell, and E. R. Stanley. 1999. The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *Embo J* 18(13):3616–3628.
- Lefebvre, J.C., Giordanengo, V., Limouse, M., Doglio, A., Cucchiaroni, M., Monpoux, F., Mariani, R., Peyrong, J.F. (1994). Altered Glycosylation of Leukosialin, CD43, in HIV-I-infected Cells of the CEM Line. *J. Exp. Med.* 180: 1609-1617.
- Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, and Y. Yarden. 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12:3663.
- Lewin, B. (2000). *Oncogenes and Cancer. Genes VII.* Oxford University Press. USA.
- Lill, N.L., Douillard, P., Awwad, R.A., Ota, S., Lupher, M.L., Miyakei, S., Meissner-Lula, N., Hsu, V., Band, H. (2000). The evolutionarily conserved N-terminal region of Cbl is sufficient to enhance down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 275:367–377.
- Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S. (2004). Ubiquitin ligases in malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45:1329.
- Lin, L., Lin, A.Y., Knopf, J.L. (1992). Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6147-6151.
- Liu, Y.-C., Elly, C., Yoshida, H., Bonnefoy-Berard, N., Altman, A. (1996). Activation modulated association of 14-3-3 proteins with Cbl in T cells. *J. Biol. Chem.* 271:14591–14595.
- Liu, Y.-C., Altman, A. (1998). Cbl: Complex formation and functional implications. *Cell. Signal.* 10(6): 377-385.
- Loberg, R., Ying, C., Craig, M., Day, L., Sargent, E., Neeley, C., Wojno, K., Snyder, L., Yan, L., Pienta, K. (2007). Targeting CCL2 with Systemic Delivery of Neutralizing Antibodies Induces Prostate Cancer Tumor Regression In vivo. *Cancer Res.* 67(19): 9417-9424.
- Losy, J., Maehlen, J., Olsson, T., Kristensson, K. (1989). Distribution of leukosialin (W3/13)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Neurocytol.* 18:71.
- Lupher, M.L., Andoniou, C.E., Bonita, D., Miyake, S., Band, H. (1998). Molecules in focus: The c-Cbl oncoprotein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:439-444.
- Maemura, K., Fukuda, M. (1992). Poly-N-acetyllactosaminy 0-Glycans Attached to Leukosialin. The Presence Of Sialyl Le^x Structures In O-Glycans. *J. Biol. Chem.* 267(34): 24379-24386.
- Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A., and Schlessinger, J. (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell.* 57: 1101–1107.
- Matsuo, A., Walter, D.G., Terai, K., McGeer, P.L. (1996). Expresión of CD43 in human microglia and its downregulation in Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* 71(1-2):81-86.
- Meisner, H., Daga, A., Buxton, J., Fernández, B., Chawla, A., Banerjee, U., Czech, P. (1997). Interactions of *Drosophila* Cbl with epidermal growth factor receptors and role of Cbl in R7 photoreceptor cell development. *Mol. Cell. Biol.* 17(4):2217–2225.
- Miyake, S., K. P. Mullane-Robinson, N. L. Lill, P. Douillard, and H. Band. 1999. Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem* 274:16619.
- Moghal, N., Sternberg, P.W. (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11(2):190-196.
- Mundy, G., Elefteriou, F. (2006). Boning up on Ephrin Signaling. *Cell.* 126: 441-443.
- Murphy, M.A., Schnall, R.G., Venter, D.J., Barnett, L., Bertoncello, I., Thien, C.B., Langdon, W.Y., Bowtell, D.D. (1998). Tissue hyperplasia and enhanced T cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 18:4872–4882.
- Naramura, M., Kole, H. K., Hu, R.J., Gu, H. (1998). Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci.* 95:15547–15552.
- Nathan, C., Xie, Q., Halbwachs-Mecarelli, L., Jin, W.W. (1993). Albumin Inhibits Neutrophil Spreading and Hydrogen Peroxide Release by Blocking the Shedding of CD43 (Sialophorin, Leukosialin). *J. Cell Biol.* 122(1):243-256.
- Nieto, M., Rodriguez-Fernández, J., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J., Mellado, M., Martinez, C., Cabañas, C., Sanchez-Madrid, F. (1999). Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood.* 94,8.

- Nissen, L.J., Cao, R., Hedlund, E., Wang, Z. (2007). Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Inv.* 117(10): 2766-2777.
- Nuñez-Cruz, S.G. (1997). El Papel de CD43 en la Reorganización del Citoesqueleto de Actina. Tesis de Maestría en Cs. Bioquímicas. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 9: 667-676.
- Ostman, A., Hellberg, C., Bohmer, F.D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 6(4): 307-320.
- Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M.G., Fournier, R., Carlsson, S.R., Fukuda, M., Frelinger, J.G. (1989). Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86:1328-1332.
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L., Burakoff, S. J., Rosenstein, R. (1996). CD43-specific Activation of T Cells Induces Association of CD43 to Fyn Kinase. *J. Biol. Chem.* 271(44): 27564-27568.
- Pedraza-Alva, G., S. Sawasdikosol, Y. C. Liu, L. B. Merida, M. E. Cruz-Munoz, F. Ocegüera-Yanez, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2001. Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *J Biol Chem* 276:729.
- Pelangaris, S. and Khan, M. (2006). Angiogenesis. *The Molecular Biology of Cancer.* Blackwell Publishing. Victoria, Australia. P. 411.
- Peschard, P., T. M. Fournier, L. Lamorte, M. A. Naujokas, H. Band, W. Y. Langdon, and M. Park. 2001. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 8:995.
- Peschard, P., and M. Park. 2003. Scape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 3:519.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70:503-533.
- Piller, V., Piller, F., Fukuda, M. (1989). Phosphorylation of the Major Leukocyte Surface Sialoglycoprotein, Leukosialin, Is Increased by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *J Biol. Chem.* 264(31): 18824-18831.
- Rao, N. et al. (2000). The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. *J. Immunol.* 164:4616-4626.
- Rellahan, B.L., Graham, L.J., Stocia, B., DeBell, K.E., Bonvini, E. (1997). Cbl-mediated regulation of T cell receptor-induced AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* 272:30806-30811.
- Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen, F.S., Bierer, B.E., Burakoff, S.J. (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature.* 354:233-235.
- Renkonen, R., Mattila, P., Majuri, M, Rabina, J., Toppila, S., Renkonen, J., Hirvas, L., Niittymäki, J., Turunen, J.P., Renkonen, O., Paavonen, T.(1997). *Glyco. J.* 14:593:600. In vitro experimental studies of sialyl Lewis x and sialyl Lewis a on endothelial and carcinoma cells: crucial glycans on selectin ligands.
- Rodríguez-González, A., Ramírez de Molina, A., Benítez-Rajal, J., Lacal, J.C. (2003). Phospholipase D and choline kinase: their role in cancer development and their potential as drug targets. *Prog. Cell Cycle Res.* 5: 191-201.
- Rosenstein, Y., A. Santana, and G. Pedraza-Alva. 1999. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res* 20:89.
- Rothwell, S. W., and D. G. Wright. (1994). Characterization of influenza A virus binding sites on human neutrophils. *J. Immunol.* 152: 2358-2363.
- Runeberg-Roos, P., Saarma, M. (2007). Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann. Med.* 10:1-9.
- Santana, M.A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S.J., Rosenstein, Y. (2000). CD43-mediated Signals Induce DNA Binding Activity of AP-1, NF-AT, and NFκB Transcription Factors in Human T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275(40): 31460-31468.
- Scaltriti, M., Baselga, J. (2006). The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res.* 12(18): 5268-5272.
- Schmid, K., Hediger, M., Brossmer, R., Collins, J.H., Haupt, H., Marti, T., Offner, G.D., Schaller, J., Takagaki, K., Walsh, M., Schwick, H.G., Rosen, F.S., Remold-O'Donell, E.

- (1992). Amino Acid Sequence of human plasma galactoglycoprotein: Identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 663-667.
- Schober, A., Zerneck, A. (2007). Chemokines in vascular remodeling. *Throm. Haemost.* 97: 730-737.
 - Serrador, M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J., Del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gozález-Amaro, R., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F. (1998). CD43 Interacts With Moesin and Ezrin and Regulates Its Redistribution to the Uropods of T Lymphocytes at the Cell-Cell Contacts. *Blood* 91(12): 4632-4644.
 - Shelley, C.S., Remold-O'Donell, E., Davis III, A.E., Bruns, A.P., Rosen, F.S., Carroll, M.C., Whitehead, A.S. (1989). Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiscot-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2819-2823.
 - Sherr, J.C. (2004). Principles of Tumor Suppression. *Cell.* 116: 235-246.
 - Shiota, J., Nishimura, H., Okamoto, H., Yu, B., Hattori, S., Abe, M., Okada, T., Nozawa, S., Tsurui, H., Hirose, S., et al. (1994). A unique murine CD43 epitope Lp-3: distinct distribution from another CD43 epitope S7. *Cell Immunol* 155:402.
 - Sikut, Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G., Hansson, F.G.C. (1999). Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int J Cancer* 82:52.
 - Stöckl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W.F., Menzel, J.E., Knapp, W. (1996). Leukosialin (CD43)-Major Histocompatibility Class I Molecule Interactions Involved in Spontaneous T Cell Conjugate Formation. *J Exp. Med.* 184: 1769-1779.
 - Sweeney, C., Miller, J., Shattuck, D., Carraway, K. (2006). ErbB Receptor Negative Regulatory Mechanisms: Implications in Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 11:89-99.
 - Szlanka, T., Toth, G.K., Ocsosvzki, I., Keresztes, G. (1999). An antiserum raised against the recombinant cytoplasmic tail of the human CD43 glycoprotein identifies CD43 in many mammalian species. *Immunol.* 96:74-82.
 - Thien, C. B. F., Langdon, W. Y. (1997). EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the *Caenorhabditis elegans sli-1* gene. *Oncogene* 14:2239-2249.
 - Thien, C.B., Langdon, W.Y. (2001). CBL: Many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nature Rev.* 2:294-305.
 - Tsuboi, S., Fukuda, M. (2001). Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* 23: 46-53.
 - Van den Berg, T., Brevé, J., Damoiseaux, J., Kelm, S., Crocker, P., Dijkstra, C., Kraal, G. (1992). Sialoadhesin on Macrophages: Its Identification as a Lymphocyte Adhesion Molecule. *J. Exp. Med.* 176: 647-655.
 - Van den Berg, T., Nath, D., Ziltener, H., Vestweber, D., Fukuda, M., Die, I., Crocker, P. (2001). Cutting Edge: CD43 Functions as a T Cell Counterreceptor for the Macrophage Adhesion Receptor Sialoadhesin (Siglec-1). *J. Immunol.* 166: 3637-3640.
 - Van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 251-337.
 - Van Leeuwen, J.E.M., Paik, P.K., Samelson, L.E. (1999). Activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) and activating protein 1 (AP-1) by oncogenic 70Z Cbl requires an intact phosphotyrosine binding domain but not Crk(L) or p85 phosphatidylinositol 3-kinase association. *J. Biol. Chem.* 274:5153-5162.
 - Vogel, W. (1999). Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *Cell.* 13: 577-582.
 - Wange, R.L., Samelson, L.E. (1996). Complex complexes: signaling at the TCR, *Immunity* 5:197-205.
 - Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Yarden, Y. (1999). The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 274:22151-22154.
 - Wilde, J., Watson, S. (2001). Regulation of phospholipase C- γ isoforms in haematopoietic: why one, not the other?. *Cell. Signal.* 13: 691-701.
 - Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., Nishida, E. (2006). Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression. *Curr. Biol.* 16: 1171-1182.

- Yonemura, S., Jirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* 140(4): 885-895.
- Yoon, C. H., Lee, J., Jongeward, G. D., Sternberg, P. W. (1995). Similarity of *sli-1*, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene *c-cbl*. *Science* 269: 1102–1105.
- Zhang^a, Z., Elly, C., Altman, A., Liu, Y.-C. (1999). Dual regulation of T cell receptor-mediated signaling by oncogenic Cbl mutant 70Z. *J. Biol. Chem.* 274:4883–4889.
- Zhang^b, Z., Elly, C., Qiu, L., Altman, A., Liu, Y.-C. (1999). A direct interaction between the adaptor protein Cbl-b and the kinase Zap-70 induces a positive signal in T cells. *Curr. Biol.* 9:203–206.